

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 084**

51 Int. Cl.:

C12N 15/74 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2004 E 04712328 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 1641927**

54 Título: **Activación inducida en células dendríticas**

30 Prioridad:

18.02.2003 US 448046 P

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

14.08.2015

73 Titular/es:

**BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE (100.0%)
One Baylor Plaza
Houston, TX 77030, US**

72 Inventor/es:

**SLAWIN, KEVIN;
SPENCER, DAVID y
HANKS, BRENT**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 543 084 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

Activación inducida en células dendríticas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para potenciar una respuesta inmunitaria. Más particularmente, la composición es un polipéptido coestimulador inducible que se induce mediante la oligomerización del ligando.

10

Antecedentes de la invención

Las células dendríticas (DC) son únicas entre las células presentadoras de antígenos (APC) debido a su potente capacidad para activar los linfocitos T inmunológico no expuestos anteriormente (Steimnan, 1991). Las DC expresan constitutivamente, o tras la maduración, varias moléculas que median en la interacción física y proporcionan señales de activación a los linfocitos T respondedores. Estas incluyen las moléculas MHC de clase I y clase II CDSO (B7-1) y CD86 (B7-2); CD40; CD11a/CD18 (LFA-1); y CD54 (ICAM-1) (Steinman, 1991; Steinman *et al.*, 1995). Las DC secretan también, tras la estimulación, varias citoquinas estimuladoras de los linfocitos T, que incluyen IL-1-beta, IL-6, IL-8, proteína-1-alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-1-alfa), y MIP-1-delta (Matsue *et al.*, 1992; Kitajima *et al.*, 1995; Ariizumi *et al.*, 1995; Caux *et al.*, 1994; Heufler *et al.*, 1992; Schreiber *et al.*, 1992; Enki *et al.*, 1992; Mohamadzadeh *et al.*, 1996). Ambas propiedades, la expresión de la molécula de adhesión y la producción de citoquinas están compartidas por otras APC (*por ejemplo*, macrófagos activados y linfocitos B), que son sustancialmente menos competentes en la activación de linfocitos T no expuestos anteriormente.

La activación de los linfocitos T es una importante etapa en la inmunidad protectora frente a microorganismos patógenos (*por ejemplo*, virus, bacterias, y parásitos), proteínas extrañas, y agentes químicos perjudiciales para el medio ambiente. Los linfocitos T expresan receptores sobre sus superficies (*es decir*, receptores de linfocitos T) que reconocen a los antígenos presentados sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos. Durante una respuesta inmunitaria normal, la unión de estos antígenos a los receptores de linfocitos T inicia cambios intracelulares que conducen a la activación de los linfocitos T. Las DC expresan varias moléculas de adhesión diferentes (y coestimuladoras), que median en su interacción con los linfocitos T. Las combinaciones de los receptores (en las DC) y contrarreceptores (en los linfocitos T) conocidos por tener este papel incluyen: a) MHC y CD8 de clase I, b) MHC y CD4 de clase II, c) CD54 (ICAM-1) y CD11a/CD18 (LFA-1), d) ICAM-3 y CD11a/CD18, e) LFA-3 y CD2, f) CD80 (B7-1) y CD28 (y CTLA4), g) CD86 (B7-2) y CD28 (y CTLA4) y h) CD40 y CD40L (Steinman *et al.*, 1995). De forma importante, no solo la ligadura de estas moléculas promueve la unión física entre las DC y los linfocitos T, también transduce las señales de activación.

Las células dendríticas (DC) orquestan también varias etapas críticas en el desarrollo de una respuesta inmunitaria adaptativa. Las DC comunican información relativa al estado antigénico de los tejidos periféricos a los ganglios linfáticos locales. Tras la detección de las "señales de peligro" derivadas de patógenos y endógenas, las DC se adaptan fisiológicamente a su microentorno experimentando un programa genético conocido como "maduración" a fin de dirigir una respuesta de linfocitos T eficaz. La maquinaria única de las DC les permite, no solo inducir la activación de los linfocitos T no expuestos anteriormente, sino regular también su fenotipo y función posteriores. Estos impresionantes atributos hacen de las DC una elección ideal para su aprovechamiento como adyuvantes naturales en el desarrollo de la vacuna del cáncer. Sin embargo, los limitados éxitos de recientes ensayos clínicos indican que las estrategias terapéuticas actuales con las DC necesitan un refinamiento adicional si se va a incluir la inmunoterapia en el arsenal de tratamientos contra el cáncer junto a las modalidades más tradicionales de quimio y radioterapia. Esta traducción del desarrollo de vacunas a base de DC al escenario clínico se basa significativamente en los avances de nuestra comprensión de la biología básica de las DC.

Una de las deficiencias críticas de las vacunas basadas en las DC es su naturaleza transitoria. El estado de activación y la longevidad de las DC son significativamente limitados. Menos de 24 horas después de la exposición a los lipopolisacáridos derivados de bacterias (LPS), las DC finalizan la síntesis de la citoquina IL-12 y se vuelven refractarias a estímulos adicionales. Esto implica que la activación potencial de los linfocitos T citotóxicos (CTL) de las DC está gravemente comprometida en un tiempo relativamente corto tras su activación. Los estudios con vacunas indican que la supervivencia de las DC pulsadas por antígenos en el fluido de drenaje de los ganglios linfáticos se reduce drásticamente 48 horas después de su administración y es indetectable en 72 horas. Estos hallazgos justifican la necesidad de estrategias alternativas para el diseño de vacunas a base de DC, tales como el desarrollo de DC genéticamente alteradas que puedan evitar los mecanismos fisiológicos reguladores y presenten propiedades inmunoestimuladoras potenciadas para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a la inducción y/o activación de las células presentadoras de antígenos. Se pueden usar las células presentadoras de antígenos activadas para potenciar y/o regular las respuestas inmunitarias para un antígeno diana. Más particularmente, la presente invención proporciona el uso de un ligando que se une a un

dominio de unión al ligando FKBP de una proteína quimérica, dando como resultado una oligomerización de la proteína quimérica, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una dolencia, seleccionada entre una enfermedad hiperproliferativa o una enfermedad infecciosa, modulando una respuesta inmunitaria, para activar una célula presentadora de antígenos transfectada o transducida *in vivo*, donde

- 5
- a) la célula presentadora de antígenos se ha transfectado o transducido con un vector de expresión que codifica la proteína quimérica; y
 - b) dicho vector de expresión comprende una secuencia promotora de polinucleótidos, una secuencia de polinucleótidos que codifica una región dirigida a membrana, una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio de unión al ligando FKBP capaz de unirse al ligando, una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de la región citoplásmica CD40 que no tiene un dominio extracelular funcional, unido todo operativamente.
- 10

La invención proporciona también un método para activar *in vitro* una célula presentadora de antígenos que comprende las etapas de:

- 15
- transfectar o transducir la célula presentadora de antígenos con un vector de expresión, donde dicho vector de expresión comprende una secuencia promotora de polinucleótidos, y una secuencia de polinucleótido que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia del polinucleótido codifica una región dirigida a membrana, un dominio de unión al ligando FKBP, y un polipéptido de la región citoplásmica CD40 que no tiene un dominio extracelular funcional, unidos todos operativamente; y activar la célula presentadora de antígenos transfectada o transducida administrando un ligando que se une al dominio de unión al ligando FKBP de la proteína quimérica, dando como resultado la oligomerización de la proteína quimérica.
- 20

- 25
- La invención proporciona también el uso de un vector de expresión en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una dolencia seleccionada entre una enfermedad hiperproliferativa o una enfermedad infecciosa, modulando una respuesta inmunitaria *in vivo* en un sujeto, donde dicho vector de expresión se expresa en células dendríticas y dicho vector de expresión comprende una secuencia promotora de polinucleótidos, una secuencia de polinucleótidos que codifica una región dirigida a membrana, una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio de unión al ligando FKBP, una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de la región citoplásmica CD40 que no tiene un dominio extracelular funcional, unido todo operativamente.
- 30

La invención proporciona también el uso de una célula presentadora de antígenos transfectada o transducida en la fabricación de un medicamento para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto, donde el sujeto tiene una dolencia seleccionada entre una enfermedad hiperproliferativa o una enfermedad infecciosa, donde

- 35
- a) la célula presentadora de antígenos se transfecta o transduce con un vector de expresión;
 - b) dicho vector de expresión comprende una secuencia promotora de polinucleótidos, una secuencia de polinucleótidos que codifica una región dirigida a membrana, una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio de unión al ligando FKBP y una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de la región citoplásmica CD40 que no tiene un dominio extracelular funcional, unidos todos operativamente; y
 - c) las células presentadoras de antígenos transfectadas o transducidas se administran al sujeto simultánea o posteriormente a la administración de una composición inmunógena.
- 40

El vector se selecciona entre el grupo que consiste en un vector vírico, un vector bacteriano y un vector de mamífero.

45

El vector de expresión puede codificar adicionalmente un segundo dominio de unión al ligando FKBP. La secuencia dirigida a membrana puede ser, por ejemplo, una secuencia dirigida a la miristoilación. En determinadas realizaciones, la secuencia promotora de polinucleótidos se selecciona entre el grupo que consiste en un promotor constitutivo (es decir, el promotor temprano del virus 40 de simio (SV40), un promotor del virus del tumor mamario de ratón, un promotor de repetición terminal larga del virus de la inmunodeficiencia humana, un promotor del virus Moloney, un promotor del virus de la leucemia de aves, un promotor temprano inmediato del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, un promotor de la acción humana, un promotor de la miosina humana, un promotor de la hemoglobina humana, el promotor del citomegalovirus (CMV), un promotor EF1 alfa, y un promotor de la creatina del músculo humano) un promotor inducible (es decir, el promotor de la metalotioneína, un promotor glucocorticoide, un promotor de la progesterona, y un promotor de la tetraciclina) y un promotor específico de tejido (es decir, células dendríticas (es decir, CD11c), un promotor asociado a PSA o kalikreína glandular específica de próstata).

50

55

Se describe una célula transducida, donde se transduce con el vector de expresión y/o la construcción de la presente invención. Más específicamente, la célula es una célula presentadora de antígenos o un embriocitoblasto. Se contempla que la célula transducida pueda ser una composición farmacéutica.

60

Se describe una célula de fusión que comprende una célula presentadora de antígenos transducida fusionada a una célula, donde la célula presentadora de antígenos transducida comprende un vector de expresión y/o una construcción de expresión. Más específicamente, la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de tumor

65

de próstata. Se contempla que la célula de fusión puede ser una composición farmacéutica.

Se describe una composición farmacéutica que comprende el vector de expresión o la construcción de expresión y un transportador farmacéuticamente aceptable, donde dicho vector de expresión comprende una secuencia promotora de polinucleótidos, una primera secuencia de polinucleótidos que codifica una región de unión a ligando, una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica una región de unión a ligando, una secuencia dirigida a membrana, y una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido coestimulador, unido todo operativamente.

Se describe un método para modular una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende la etapa de administrar al sujeto un vector de expresión de la presente invención. El vector de expresión se expresa en células dendríticas y el vector comprende una secuencia promotora de polinucleótidos, una secuencia de polinucleótidos que codifica una región de unión a ligando, y una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido coestimulador, unido todo operativamente. El sujeto al que se puede administrar el vector de expresión puede ser un sujeto que está inmunocomprometido.

Se describe un método para modular una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende las etapas de transducir una célula presentadora de antígenos con un vector de expresión, donde el vector de expresión comprende una secuencia promotora de polinucleótidos, una secuencia de polinucleótidos que codifica una región de unión a ligando, y una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido coestimulador, unidos todos operativamente; y administrar al sujeto células presentadoras de antígenos transducidas, donde las células presentadoras de antígenos transducidas potencian la respuesta inmunitaria en el sujeto. La célula presentadora de antígenos transducida se activa administrando un ligando que da como resultado una oligomerización. Está previsto además que las células presentadoras de antígenos transducidas se administren al sujeto simultánea o posteriormente a la administración de una composición inmunógena.

Se describe un método para inducir una respuesta inmunitaria regulada contra un antígeno en un sujeto que comprende las etapas de: transducir una célula presentadora de antígenos con un vector de expresión, donde el vector de expresión comprende una secuencia promotora de polinucleótidos, una secuencia de polinucleótidos que codifica una región de unión a ligando, y una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido coestimulador, unidos todos operativamente; cargar las células presentadoras de antígeno transducidas con el antígeno; administrar las células presentadoras de antígeno cargadas transducidas al sujeto activando de esta forma una respuesta inmunitaria contra un antígeno antitumoral de linfocitos T citotóxicos y linfocitos T citolíticos; y regular la inducción de la respuesta inmunitaria dirigida hacia los antígenos tumorales con un ligando que da como resultado una oligomerización. El ligando es una proteína o no es una proteína. Más particularmente, el ligando no es una proteína, por ejemplo, un FK506 dimérico y/o análogos diméricos de FK506. La respuesta inmunitaria está regulada positivamente por FK506 dimérico y/o los análogos diméricos de FK506 o bien está regulada negativamente por FK506 monomérico y/o los análogos monoméricos de FK506. Más específicamente, las células presentadoras de antígeno cargadas transducidas se administran al sujeto por vía intradérmica, subcutánea, intranodal o intralinfática. Se prevé que las células presentadoras de antígenos se transduzcan con el vector de expresión *in vitro* o *ex vivo* antes de administrar al sujeto.

Se puede llevar a cabo la carga de antígeno en las células presentadoras utilizando métodos convencionales, por ejemplo, de forma pulsada, mediante transducción, mediante transfección, y/o mediante electrofusión. Se prevé que los antígenos pueden ser ácidos nucleicos (ADN o ARN), proteínas, lisados de proteínas, lisados de células completas, o proteínas antigénicas unidas a otras proteínas, es decir, proteínas de choque térmico.

Los antígenos se pueden derivar o aislar de microorganismos patógenos tales como virus incluyendo VIH, gripe, herpes simple, virus del papiloma humano, Hepatitis B, Hepatitis C, VEB, Citomegalovirus (CMV) y similares. El antígeno se puede derivar o aislar de bacterias patógenas tales como de Chlamydia, Mycobacteria, Legionella, Meningococcus, Grupo A de Streptococcus, Salmonella, Listeria, Hemophilus influenzae, y similares. Aún más adicionalmente, el antígeno se puede derivar o aislar de levaduras patógenas incluyendo Aspergillus, Candida invasiva, Nocardia, Histoplasmosis, Cryptosporidia y similares. El antígeno se puede derivar o aislar de protozoos patógenos y parásitos patógenos que incluyen, pero no se limitan a Pneumocystis carinii, Trypanosoma, Leishmania, Plasmodium y Toxoplasma gondii.

En determinadas realizaciones, el antígeno incluye un antígeno asociado con un estado preneoplásico o hiperplásico. Los antígenos pueden asociarse también con, o ser causantes de cáncer. Dichos antígenos son antígenos específicos de tumor, antígenos asociados a tumores (TAA) o antígenos específicos de tejidos, sus epítomos, y los agonistas de epítomos de los mismos. Dichos antígenos incluyen, pero no se limitan al antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus epítomos tales como CAP-1, CAP-1-6D (46) y similares, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-1, MUC-2, oncogén ras mutado puntualmente, oncogenes p53 mutados normal y puntualmente, PSMA, tirosinasa, TRP-1 (gp75), NY-ESQ-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erb/B2, BRC-I, BRC-II, bcr-abl, pax3-fkhr, ews-fli-1, modificaciones de los TAA y del antígeno específico de tejido, variantes de corte y empalme de los TAA, agonistas de epítomos, y similares.

En determinadas realizaciones, la enfermedad es una enfermedad hiperproliferativa, que puede definirse también adicionalmente como cáncer. En realizaciones preferidas adicionales, el cáncer es melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, de pulmón, hepatocarcinoma, leucemia, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, de encía, lengua, neuroblastoma, cabeza, cuello, mama, pancreático, próstata, riñón, hueso, testículo, ovario, mesotelioma, de cuello de útero, gastrointestinal, linfoma, cerebro, colon, sarcoma o de vejiga. El cáncer puede incluir un tumor comprendido por células tumorales. Por ejemplo, las células tumorales pueden incluir, pero no se limitan a células de melanoma, una célula de cáncer de vejiga, una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de hígado, una célula de cáncer de páncreas, una célula de cáncer de estómago, una célula de cáncer de testículo, una célula de cáncer de cerebro, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer linfático, una célula de cáncer de piel, una célula de cáncer de cerebro, una célula de cáncer de hueso, o una célula cancerosa de tejido blando.

En otras realizaciones, la enfermedad hiperproliferativa es artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, osteoartritis, leiomiomas, adenomas, lipomas, hemangiomas, fibromas, oclusión vascular, restenosis, aterosclerosis, lesiones preneoplásicas (tales como hiperplasia adenomatosa y neoplasia intraepitelial prostática), carcinoma *in situ*, leucoplaquia pilosa oral, o psoriasis.

Se describe un método para tratar un sujeto con cáncer que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de una célula presentadora de antígeno transducida para tratar el cáncer, donde la célula presentadora de antígeno transducida se transduce con un vector de expresión que comprende una secuencia promotora de polinucleótidos, una primera secuencia de polinucleótidos que codifica una región de unión a ligando, una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica una región de unión a ligando, una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia dirigida a la miristoilación, y una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido coestimulador, unidos todos operativamente; y administrar al menos un tratamiento anticanceroso diferente. El tratamiento anticanceroso se selecciona entre el grupo que consiste en quimioterapia, inmunoterapia, cirugía, radioterapia, terapia génica y bioterapia.

Se describe un ratón transgénico que tiene incorporado en su genoma un vector de expresión que comprende una secuencia promotora de polinucleótidos, una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio citoplásmico CD40 y una secuencia de polinucleótidos que codifica una región de unión a ligando, unido todo operativamente. La región de unión a ligando es un dominio de unión a FKBP. El vector de expresión puede comprender además una segunda región de unión a ligando, que es un dominio de unión a FKBP. Además, el vector puede comprender una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia dirigida a la miristoilación. La secuencia promotora de polinucleótidos comprende CD11c. Se pueden aislar embriocitoblastos y/o células presentadoras de antígeno procedentes del ratón transgénico.

Lo anterior ha reseñado bastante ampliamente las características y ventajas técnicas de la presente invención a fin de que la descripción detallada de la invención que sigue pueda entenderse mejor. Se describirán a partir de ahora en el presente documento características y ventajas adicionales que forman el sujeto de las reivindicaciones de la invención. Deberá apreciarse también que la concepción y la realización específica descrita pueden utilizarse fácilmente como base para modificar o diseñar otras estructuras para llevar a cabo los mismos fines de la presente invención. Deberá entenderse que dichas construcciones equivalentes no se apartan del alcance de la invención como se muestra en las reivindicaciones adjuntas. Los rasgos novedosos que se consideran característicos de la invención, así como su organización y método de funcionamiento, junto con objetos y ventajas adicionales se comprenderán mejor a partir de la siguiente descripción cuando se consideran junto con las figuras acompañantes. Debe entenderse de manera expresa, sin embargo, que cada una de las figuras se proporciona a fines de ilustración y descripción solamente y no se pretende que sean una definición de los límites de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

Para una comprensión más completa de la presente invención, se hace ahora referencia a las siguientes descripciones tomadas junto con los dibujos que las acompañan.

La FIG. 1A-FIG. 1C muestra la dimerización inducida químicamente de CD40. La FIG. 1A muestra un modelo de CD40 endógeno. La FIG. 1B muestra un Sistema de dimerización inducido químicamente (CID) que utiliza un fármaco dimerizador orgánico permeable a lípidos (AP20187) que se une con alta afinidad a los dominios de unión al fármaco. La FIG. 1C muestra el Ensayo del indicador NFKB-SEAP en células Jurkat TAG.

La FIG. 2A-2F muestra que CD40 inducible inicia una potente señal NFkB en las DC. La FIG. 2A muestra el análisis de la transferencia Western dirigido contra HA de los clones iCD40 D2SC/1 DC. La FIG. 2B muestra la inmunofluorescencia anti-HA de D2SC/1.Hi (1t) y D2SC/1 (rt) FIG. 2C muestra el ensayo del indicador NFKB-SEAP. La FIG. 2D muestra la inducción de Re1B y Sp1 en D2SC/1.Hi por AP20187. La FIG. 2E muestra concentraciones máximas de cada agente (basadas en valoraciones) que se incubaron simultáneamente con iCD40 D2SC/1 durante 24 h y se analizaron los lisados nucleares mediante la transferencia western. La FIG. 2F muestra la cinética de activación de Re1B por iCD40 u otros tratamientos indicados.

La FIG. 3A-FIG. 3C muestra la maduración y activación de las DC estimuladoras de CD40 inducible. La FIG. 3A muestra la citometría de flujo de los marcadores de activación en D2SC/1 tratadas con el control, AP20187, LPS, expresión de iCD40, iCD40 + AP20187. La FIG. 3B muestra la reducción de la fagocitosis de FITC-dextrano tras el tratamiento con LPS o iCD40. La FIG. 3C muestra la activación de las células voluminosas de los ganglios linfáticos o los linfocitos T CD8 purificados mediante células D2SC/1 tratadas.

La FIG. 4A-4E muestra que la activación mediada por el fármaco *in vivo* de las DC iCD40 tras la vacunación induce una respuesta potenciada de los linfocitos T específicos de antígeno. La FIG. 4A muestra un esquema de las vacunas basadas en iCD40.D2SC/1. La FIG. 4B muestra las células iCD40.D2SC/1 que se prepararon para la inyección *in vitro* del tratamiento con LPS o iCD40, mediante la señalización de iCD40 *in vivo*, o mediante la señalización de iCD40 *in vitro* e *in vivo*. Después de 10 días, se aislaron esplenocitos y se evaluaron para determinar la proliferación específica del antígeno. La FIG. 4C muestra el porcentaje de linfocitos T específicos de K^dLLO procedentes de ratones vacunados o del control que se calculó usando la tinción con tetrámeros. La FIG. 4D muestra la actividad de los CTL procedentes de esplenocitos de ratones vacunados con DC pulsados con β -gal tratados como anteriormente utilizando un ensayo normalizado de 5 días usando utilizando células diana que expresan β -gal. La FIG. 4E muestra la actividad de los CTL evaluados en células tumorales que expresan LLO (se muestra la construcción).

La FIG. 5A-5E muestra que iCD40 activa las DC primarias y prolonga su longevidad. La FIG. 5A muestra la transferencia Western (α -HA) de DC primarias infectadas con AD-iCD40-GFP. La FIG. 5B muestra el análisis de citometría de flujo de las DC transducidas. La FIG. 5C muestra la citometría de flujo de K^b, B7.2 y CD40 endógena sobre las DC estimuladas con iCD40. La FIG. 5D muestra la cinética de la inducción de IL-12 (ELISA) por iCD40 y LPS. La FIG. 5E muestra la supervivencia cinética de las DC tras la estimulación con CD40L o CD40.

La FIG. 6A-6B muestra los aumentos de iCD40 a medida que aumenta la inmunogenicidad de las vacunas de ADN *in vivo*. La FIG. 6A y la FIG. 6C muestra que la inyección simultánea de plásmidos que expresan iCD40 potencian las respuestas de linfocitos CD8+ específicos de antígeno, se subclonó iCD40 en un vector bicistrónico impulsado por PCMV que expresaba simultáneamente hrGFP. Micropartículas de oro se revistieron con ADN plásmido que codificaba el minigén SIINFEKL, la construcción iCD40-hrGFP, o ambos. Se inyectaron micropartículas de ADN en los ratones en el abdomen (2x) y en cada oreja utilizando una pistola génica de helio. Se mantuvieron constantes las dosis de ADN a 2,5 μ g por disparo o 10 μ g por ratón. Se inyectó AP20187 i.p. 20 horas después en algunos grupos. Se extrajeron los bazo 12 días después y se analizaron mediante el análisis de flujo de dos colores usando la tinción del tetrámero PE-KbSIINFEKL /FITC-anti-CD8. La FIG. 6B muestra que la administración del fármaco *in vivo* potencia la activación de los linfocitos T CD8+. Los esplenocitos cosechados anteriormente se incubaron simultáneamente con 10 μ g/ml del péptido SIINFEKL durante la noche y se analizaron para la expresión superficial doble de CD8+CD69+ mediante citometría de flujo. Solo se clasificaron las células viables.

La FIG. 7A-FIG. 7B muestra la potenciación de iCD40 de la vacuna de ADN. La FIG. 7A muestra la activación de los linfocitos T CD8+ y la FIG. 7B muestra la activación de los linfocitos T (CD69+) CD8+ tras la vacunación.

La FIG. 8A-FIG. 8C muestra que CD40L regula en defecto y reduce la capacidad de señalización de CD40. La FIG. 8A muestra que la inhibición por endocitosis reduce la regulación en defecto de CD40. Se incubaron las líneas de células D2SC/1 con 250 μ M de citocalasina B durante 1 hora seguido por un tratamiento con CD40L durante 30 min. Se trataron también las células D2SC/1 con citocalasina B, el disolvente de control DMSO, y CD40L solo. Se llevó a cabo también el agotamiento de K⁺ de la línea de células D2SC/1 antes de la tinción superficial de CD40 y del análisis de citometría de flujo. Solamente se clasificaron las células viables para el análisis. La FIG. 8B muestra que la inhibición de la degradación lisosómica potencia los niveles intracelulares de CD40. Las líneas de células D2SC/1 se incubaron con 0,5 μ M de inhibidor de bafilomicina A durante 1 hora seguido por la tinción intracelular de CD40 (CD40 total). La fluorescencia de CD40 total se comparó con la fluorescencia de CD40 superficial. La FIG. 8C muestra que la inhibición de la endocitosis intensifica la señal de activación de CD40 en las líneas de DC. La tinción y el análisis de la superficie de H-2K^d.

La FIG. 9A-FIG. 9D muestra que iCD40 evita la inhibición negativa de la retroalimentación por la isoforma del Tipo II de CD40 (II CD40). La FIG. 9A muestra un esquema del Tipo I, II, y de iCD40. La FIG. 9B muestra que las líneas DC que expresan II CD40 no expresan niveles reducidos de iCD40. El tipo II de la isoforma CD40 se amplificó mediante la rt-PCR de la BMDC purificada, subclonado en el vector ZeoR etiquetado con myc impulsado por pEF-1 α , y se transfectó en células D2SC/1 que expresaban iCD40. Se generaron líneas estables duplicadas por selección de G418/zeocina y dilución limitante. Las líneas resultantes se cribaron para la expresión de II CD40 mediante transferencia western anti-myc y se analizaron para la expresión de iCD40 mediante transferencias western anti-Ha. La FIG. 9C muestra que el Tipo II de CD40 regula por defecto la expresión superficial del Tipo I de CD40 en líneas DC. Se analizaron el vector vacío del control y las líneas D2SC/1 que expresaban II CD40 para la expresión superficial de CD40 mediante citometría de flujo. Solamente se clasificaron las células viables para el análisis. La FIG. 9D muestra que el Tipo II de la isoforma CD40 modula por defecto la señalización del Tipo I de CD40, pero no la señalización de iCD40, se cultivaron líneas de células

D2SC/1 que expresaban iCD40-IICD40 en presencia de concentraciones crecientes de CD40L y del fármaco AP20187 seguido por la tinción superficial y el análisis del flujo de H-2K^d.

Descripción detallada de la invención

1. Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, el uso de la palabra "un" o "uno" cuando se usa junto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva, puede significar también "una", pero es también coherente con el significado de "una o más", "al menos una", y una o más de una". Además, los términos "teniendo", "incluyendo", "conteniendo" y "comprendiendo" son indistintos y un experto en la materia reconoce que estos términos son términos abiertos.

El término "allogénico" como se usa en el presente documento se refiere a tipos o tejidos celulares que son antigénicamente distintos. De esta manera, las células o tejidos transferidos a partir de las mismas especies pueden ser antigénicamente distintas.

El término "antígeno", como se usa en el presente documento, se define como una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar tanto la producción de anticuerpos como la activación de células competentes inmunológicamente específicas, o ambos. Un antígeno puede derivarse de organismos, subunidades de proteínas/antígenos, células completas o lisados celulares muertos o inactivados. Los organismos ilustrativos incluyen pero no se limitan a, *Helicobacteres*, *Campylobacteres*, *Clostridia*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, virus de la gripe, los virus de la paragripe, virus sincitial respiratorio, *Borrelia burgdorferi*, Plasmodium, los virus del herpes simple, virus de la inmunodeficiencia humana, papillomavirus, *Vibrio cholera*, *E. coli*, virus del sarampión, rotavirus, *shigella*, *Salmonella typhi*, *Neisseria gonorrhoea*. Por tanto, un técnico experto prevé que cualquier macromolécula, incluyendo virtualmente todas las proteínas o péptidos, pueda servir como antígeno. Además, se pueden derivar antígenos de ADN recombinante o genómico. Un técnico experto prevé que cualquier ADN, que contiene secuencias de nucleótidos o secuencias de nucleótidos parciales de un genoma o gen patógeno o de un fragmento de un gen de una proteína que estimula una respuesta inmunitaria da como resultado la síntesis de un antígeno. Además, un experto en la materia prevé que la presente invención no esté limitada al uso de la secuencia de ácido nucleico completa de un gen o genoma. Es fácilmente inherente que la presente invención incluye, pero sin limitación, el uso de secuencias de ácido nucleico parciales de más de un gen o genoma y que estas secuencias de ácidos nucleicos se disponen en diversas combinaciones para estimular la respuesta inmunitaria deseada.

La expresión "célula presentadora de antígeno" es cualquiera de una variedad de células capaces de expresar, adquirir, o presentar al menos un antígeno o fragmento antigénico en (o en) su superficie celular. En general, la expresión "célula presentadora de antígeno" puede ser cualquier célula que alcance la meta de la invención ayudando a la potenciación de una respuesta inmunitaria (*es decir*, procedente de los grupos de linfocitos T o linfocitos B del sistema inmunitario) contra un antígeno o composición antigénica. Dichas células se pueden definir por los expertos en la materia, usando los métodos descritos en el presente documento y en la materia. Tal como entiende una persona normalmente experta en la materia (véase por ejemplo Kuby, 1993), y se usa en el presente documento en determinadas realizaciones, una célula que expresa o presenta un antígeno normal o preferentemente con una molécula o complejo mayor de histocompatibilidad de clase II para una célula inmunitaria es una "célula presentadora de antígeno". En determinados aspectos, una célula (*por ejemplo*, una célula APC) puede fusionarse con otra célula, tal como una célula recombinante o una célula tumoral que expresa el antígeno deseado. Se conocen en la materia métodos para preparar una fusión de dos o más células, tales como por ejemplo, los métodos descritos en Goding, pp. 65-66, 71-74 1986; Campbell, pp. 75-83, 1984; Kohler y Milstein, 1975; Kohler y Milstein, 1976, Gefter *et al*, 1977.

En algunos casos, la célula inmunitaria a la que una célula presentadora de antígeno expresa o presenta un antígeno es una célula CD4+TH. Las moléculas adicionales expresadas en las APC u otras células inmunitarias pueden ayudar o mejorar la potenciación de una respuesta inmunitaria. Las moléculas secretadas o solubles, tales como por ejemplo, citoquinas y adyuvantes, pueden ayudar o potenciar también la respuesta inmunitaria contra un antígeno. Dichas moléculas son bien conocidas por los expertos en la materia, y se describen diversos ejemplos en el presente documento.

El término "cáncer" como se usa en el presente documento se define como una hiperproliferación de células cuyo único rasgo -la pérdida de los controles normales- da como resultado un crecimiento desregulado, ausencia de diferenciación, invasión del tejido local, y metástasis tumoral. Los ejemplos incluyen pero no se limitan a, melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, de pulmón, hepatocarcinoma, leucemia, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, de encía, de lengua, neuroblastoma, cabeza, cuello, mama, pancreático, próstata, riñón, hueso, testículo, ovario, mesotelioma, de cuello de útero, gastrointestinal, linfoma, cerebro, colon, sarcoma o de vejiga.

Las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular" tal como se usan en el presente documento pueden utilizarse indistintamente. Todas estas expresiones incluyen también su progenie, que son todas y cada una de las generaciones posteriores. Debe entenderse que puede que toda la progenie no sea idéntica debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de iCD40" se define como un CD40 inducible. Esta iCD40 puede sortear mecanismos que extinguen la señalización de la CD40 endógena. El término "iCD40" abarca "ácidos nucleicos de iCD40", "polipéptidos de iCD40" y/o vectores de expresión de iCD40. Mas adicionalmente, se entiende que la actividad de iCD40 como se usa en el presente documento está impulsada por CID.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "ADNc" se refiera a ADNc preparado utilizando ARN mensajero (ARNm) como molde. La ventaja de utilizar un ADNc, en oposición al ADN genómico o al ADN polimerizado a partir de un molde de ARN genómico, parcialmente procesado o no procesado, es que el ADNc contiene principalmente secuencias de codificación de la proteína correspondiente. Existen momentos en que se prefiere la secuencia genómica completa o parcial, tales como cuando se requieren las regiones no codificantes para la expresión óptima o cuando se van a dirigir regiones no codificantes tales como intrones en una estrategia de sentido contrario.

La expresión "célula dendrítica" (DC) es una célula presentadora de antígeno existente *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo*, o en un hospedador o sujeto, o que se pueden derivar de un citoblasto hematopoyético o un monocito. Las células dendríticas y sus precursores se pueden aislar a partir de una variedad de órganos linfáticos, *por ejemplo*, bazo, los ganglios linfáticos, así como de la médula ósea y de la sangre periférica. La DC tiene una morfología característica con vainas delgadas (lamelipodia) que se extienden en múltiples direcciones lejos del cuerpo de la célula dendrítica. Normalmente, las células dendríticas expresan elevados niveles de MHC y moléculas coestimuladoras (*por ejemplo*, 87-1 y 87-2). Las células dendríticas pueden inducir *in vitro* la diferenciación de linfocitos T específica de antígeno, y pueden iniciar las respuestas primarias de los linfocitos T *in vitro* e *in vivo*.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "construcción de expresión" o "transgén" se define como cualquier tipo de construcción genética que contiene un ácido nucleico que codifica productos génicos donde se puede transcribir todo o parte del ácido nucleico que codifica la secuencia y que se puede insertar en el vector. El transcrito se traduce en una proteína, pero no es necesario. En determinadas realizaciones, la expresión incluye la transcripción de un gen y la traducción del ARNm en un producto génico. En otras realizaciones, la expresión incluye solo la transcripción del ácido nucleico que codifica los genes de interés. En la presente invención, la expresión "construcción terapéutica" puede utilizarse también para referirse a la construcción de expresión o al transgén. Una persona experta en la materia prevé que la presente invención utilice la construcción de expresión o el transgén como tratamiento para tratar enfermedades o trastornos hiperproliferativos, tales como el cáncer, de esta manera, la construcción terapéutica o el transgén es una construcción terapéutica o una construcción profiláctica.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "vector de expresión" se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos parte de un producto génico que se puede transcribir. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen a continuación en una proteína, polipéptido, o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas de sentido contrario o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de secuencias control, que se refieren a las secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la transcripción y la posible traducción de una secuencia de codificación unida operativamente en un organismo hospedador concreto. Además de las secuencias control que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácidos nucleicos que sirven otras funciones así como y se describe más abajo.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "ex vivo" se refiere al "exterior" del cuerpo. Un experto en la materia ha de tener en cuenta que *ex vivo* e *in vitro* se pueden usar indistintamente.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "funcionalmente equivalente", se refiere a un fragmento, variante, o análogo de ácido nucleico CD40, se refiere a un ácido nucleico que codifica un polipéptido CD40 que estimula una respuesta inmunitaria para destruir tumores o enfermedades hiperproliferativas. Preferentemente "funcionalmente equivalente" se refiere a un polipéptido CD40 que carece de dominio extracelular, pero que puede amplificar la respuesta de destrucción celular mediada por los linfocitos T regulando en exceso la expresión de la célula dendrítica de las moléculas de presentación de antígeno.

La expresión "enfermedad hiperproliferativa" se define como una enfermedad que es el resultado de una hiperproliferación de células. Las enfermedades hiperproliferativas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a cáncer o enfermedades autoinmunitarias. Otras enfermedades hiperproliferativas pueden incluir oclusión vascular, restenosis, aterosclerosis, o enfermedad inflamatoria del intestino.

Tal como se usa en el presente documento, el término "gen" se define como una proteína, polipéptido, o unidad codificadora de péptido funcional. Como apreciarán los expertos en la materia, este término funcional incluye

secuencias genómicas, secuencias de ADNc, y segmentos génicos más pequeños diseñados mediante ingeniería genética que expresan, o se adaptan para expresar, proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión, y mutantes.

5 La expresión "composición inmunógena" o el término "inmunogén" se refieren a una sustancia que puede provocar una respuesta inmunitaria. Los ejemplos de inmunógenos incluyen, por ejemplo, antígenos, autoantígenos que juegan un papel en la inducción de enfermedades autoinmunitarias, y antígenos asociados a tumores expresados en células cancerosas.

10 El término "inmunocomprometido", como se usa en el presente documento, se define como un sujeto que tiene un sistema inmunitario reducido o debilitado. El estado inmunocomprometido puede deberse a un defecto o disfunción del sistema inmunitario o a otros factores que aumentan la susceptibilidad a la infección y/o a la enfermedad. Aunque dicha clasificación permite una base conceptual para la evaluación, los individuos inmunocomprometidos frecuentemente no se ajustan a menudo completamente a un grupo u otro. Puede verse afectado más de un defecto en los mecanismos de defensa del cuerpo. Por ejemplo, los individuos con un defecto específico en los linfocitos T producido por el VIH pueden tener también neutropenia producida por los fármacos utilizados para el tratamiento antivírico o estar inmunocomprometidos debido a una rotura en la integridad de la piel y las membranas mucosas. Un estado inmunocomprometido puede ser el resultado de líneas centrales permanentes u otros tipos de deterioro debido a drogodependencia intravenosa; o estar producidos por neoplasias malignas secundarias, desnutrición, o haber sido infectados por otros agentes infecciosos tales como tuberculosis o enfermedades transmitidas por vía sexual, *por ejemplo*, sífilis o hepatitis.

20 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen reacciones adversas, alérgicas, u otras reacciones perjudiciales cuando se administran a un animal o a un ser humano.

25 Tal como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida donde cualquier medio o agente convencional es incompatible con los vectores o células de la presente invención, está contemplado su uso en composiciones terapéuticas. Pueden incorporarse también principios activos suplementarios en las composiciones.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" se define como una cadena de nucleótidos. Además, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. De esta manera, los ácidos nucleicos y polinucleótidos que se usan en el presente documento son indistintos. Un experto en la materia tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos que se pueden hidrolizar a "nucleótidos" monoméricos. Los nucleótidos monoméricos se pueden hidrolizar a nucleósidos. Tal como se usa en el presente documento, los polinucleótidos incluyen, pero sin limitación, todas las secuencias de ácidos nucleicos que se obtienen por cualquier medio disponible en la técnica, incluyendo, sin limitación, medios recombinantes, *es decir*, la clonación de las secuencias de ácidos nucleicos de una biblioteca recombinante o de un genoma de una célula, usando tecnología de clonación ordinaria y PCR™, y similares, y por medios sintéticos. Además, un experto en la materia reconoce que los polinucleótidos incluyen mutaciones de los polinucleótidos, incluyen pero no se limitan a, mutaciones de los nucleótidos, o nucleósidos por métodos bien conocidos en la materia.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se define como una cadena de restos de aminoácidos, que tienen usualmente una secuencia definida. Tal como se usa en el presente documento, el término polipéptido es indistinto con los términos "péptidos" y "proteínas".

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "promotor" se define como una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o la maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de un gen.

55 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "regular una respuesta inmunitaria" o "modular una respuesta inmunitaria" se refiere a la capacidad de modificar la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la composición de la presente invención puede potenciar y/o activar la respuesta inmunitaria. Además, la composición de la presente invención también puede inhibir la respuesta inmunitaria. La forma de regulación se determina por el ligando que se usa con la composición de la presente invención. Por ejemplo, un análogo dimérico del agente químico da como resultado la dimerización del polipéptido coestimulador que conduce a la activación de las DC, sin embargo, un análogo monomérico del agente químico no da como resultado la dimerización del polipéptido coestimulador, que no activaría las DC.

60 Los términos "transfección" y "transducción" se usan indistintamente y se refieren al proceso por el cual se introduce una secuencia de ADN exógeno en una célula hospedadora eucariota. La transfección (o transducción) puede realizarse mediante uno cualquiera de numerosos medios que incluyen, electroporación, microinyección, administración mediante pistola génica, infección retroviral, lipofección, superfección y similares.

Tal como se usa en el presente documento, el término "singénico" se refiere a células, tejidos o animales que tienen genotipos. Por ejemplo, gemelos o animales idénticos de la misma cepa endogámica. Singénico e isogénico se pueden usar de manera indistinta.

5 El término "sujeto" como se usa en el presente documento incluye, pero sin limitación, un organismo o un animal; un mamífero, incluyendo, *por ejemplo*, un ser humano, un primate no humano (*por ejemplo*, monos), ratón, cerdos, vacas, cabras, conejo, rata, cobaya, hámster, caballo, monos, ovejas, u otro mamífero no humano; un no mamífero, incluyendo, *por ejemplo*, un vertebrado no mamífero, tal como un pájaro (*por ejemplo*, un pollo o un pato) o un pez, y un invertebrado no mamífero.

10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "bajo control transcripcional" o "unido operativamente" se define como el promotor que está en la localización y en la orientación correcta en relación con el ácido nucleico que controla el inicio de la ARN polimerasa y la expresión del gen.

15 Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar", "tratado", o la expresión "que trata" se refieren a la profilaxis y/o al tratamiento. Cuando se usa con respecto a una enfermedad infecciosa, por ejemplo, el término se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto a la infección con un patógeno o, en otras palabras, disminuye la probabilidad de que el sujeto llegue a infectarse con el patógeno o que muestre signos de enfermedad atribuibles a la infección, así como a un tratamiento después de que el sujeto ha llegado a infectarse a fin de combatir la infección, por ejemplo, reducir o eliminar la infección o evitar su empeoramiento.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "vacuna" se refiere a una formulación que contiene la composición de la presente invención y que está en una forma que es capaz de administrarse a un animal. Normalmente, la vacuna comprende una solución salina convencional o un medio de solución acuosa tamponada donde la composición de la presente invención se suspende o disuelve. En esta forma, la composición de la presente invención puede usarse convenientemente para evitar, mejorar, o tratar de otra forma una dolencia. Tras la introducción en un sujeto, la vacuna puede provocar una respuesta inmunitaria que incluye, pero no se limita a, la producción de anticuerpos, citoquinas y/u otras respuestas celulares.

30

II. Células dendríticas

El sistema inmunitario innato utiliza un conjunto de receptores codificados por líneas germinales para el reconocimiento de modelos moleculares conservados presentes en microorganismos. Estos modelos moleculares se producen en determinados constituyentes de microorganismos que incluyen: lipopolisacáridos, peptidoglicanos, ácidos lipoteicoicos, fosfatidilcolinas, proteínas específicas de bacterias, incluyendo lipoproteínas, ADN bacterianos, ARN monocatenarios y bicatenarios víricos, ADN de CpG sin metilar, mananos y una variedad de diferentes componentes de la pared celular bacteriana y fúngica. Dichos modelos moleculares se pueden producir también en otras moléculas tales como alcaloides de plantas. Estas dianas de reconocimiento inmunitario innato se denominan Modelos moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) debido a que se producen por microorganismos y no por el organismo hospedador infectado (Janeway *et al.*, 1989; Medzhitov *et al.*, 1997).

45 Los receptores del sistema inmunitario innato que reconocen los PAMP se denominan Modelos de receptores de reconocimiento (PRR, por sus siglas en inglés) (Janeway *et al.*, 1989; Medzhitov *et al.*, 1997). Estos receptores varían en estructura y pertenecen a varias familias de proteínas diferentes. Algunos de estos receptores reconocen los PAMP directamente (*por ejemplo*, CD14, DEC205, colectinas), mientras que otros (*por ejemplo*, los receptores del complemento) reconocen los productos generados por el reconocimiento de PAMP. Los miembros de estas familias de receptores pueden, en general, dividirse en tres tipos: 1) receptores humoral circulantes en el plasma; 2) *receptores* endocíticos *expresados* en superficies de células inmunitarias, y 3) receptores de señalización que se pueden expresar tanto sobre la superficie celular como intracelularmente (Medzhitov *et al.*, 1997; Fearon *et al.*, 1996).

55 Las PRR celulares se expresan en células efectoras del sistema inmunitario innato, incluyendo células que funcionan como células presentadoras de antígeno profesionales (APC, por sus siglas en inglés) en la inmunidad adaptativa. Dichas células efectoras incluyen, pero sin limitación, macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y epitelio superficial. Este perfil de expresión permite a las PRR inducir directamente mecanismos efectoras innatos, y también alertar al organismo hospedador de la presencia de agentes infecciosos induciendo la expresión de un conjunto de señales endógenas tales como citoquinas y quimioquinas inflamatorias, como se analiza más adelante. Esta última función permite una movilización eficaz de las fuerzas efectoras para combatir a los invasores.

60 La función primaria de las células dendríticas (DC) es adquirir antígenos en los tejidos periféricos, viajar al tejido linfático secundario, y presentar los antígenos a linfocitos T efectoras del sistema inmunitario (Banchereau, *et al.*, 2000; Banchereau, *et al.*, 1998). Como las DC realizan su papel crucial en la respuesta inmunitaria, experimentan cambios de maduración que las permiten realizar la función adecuada para cada entorno (Termeer, C.C. *et al.*, 2000). Durante la maduración de las DC, se pierde la captación potencial del antígeno, la densidad superficial de las moléculas de clase I y clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) aumenta en 10-100 veces, y CD40,

65

aumenta también mucho la expresión de la molécula coestimuladora y de adhesión (Lanzavecchia, A. *et al.*, 2000). Además, otras alteraciones genéticas permiten a las DC alojarse en la paracorteza rica en linfocitos T de los ganglios linfáticos de drenaje y expresar quimioquinas de linfocitos T que atraigan linfocitos T que no hayan experimentado tratamiento anteriormente y linfocitos T con función de memoria y cebar linfocitos TH0 que no hayan experimentado tratamiento anteriormente específicos de antígeno (Adema, G.J. *et al.*, 1997). Durante esta etapa, Las DC maduras presentan antígeno mediante sus moléculas MHC II a los linfocitos T auxiliares CD4+, induciendo la regulación en exceso del ligando CD40 de los linfocitos T (CD40L) que, a su vez, se encastran en el receptor CD40 de las DC. Esta interacción DC:linfocitos T induce una rápida expresión de moléculas DC adicionales que son cruciales para el inicio de una potente respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+, incluyendo la regulación en exceso adicional de moléculas MHC I y II, moléculas de adhesión, moléculas coestimuladoras (*por ejemplo*, B7.1, B7.2), citolidinas (*por ejemplo*, IL-12) y proteínas antiapoptóticas (*por ejemplo*, Bcl-2) (Anderson, D.M., *et al.*, 1997; Caux, C., *et al.*, 1997; Ohshima, Y., *et al.*, 1997; Sallusto, F., *et al.*, 1998). Los linfocitos T CD8+ salen de los ganglios linfáticos, vuelven a penetrar en la circulación y se alojan en el sitio original de la inflamación para destruir los patógenos o las células malignas.

Un parámetro clave que afecta la función de las DC es el receptor CD40, que sirve como "interruptor de encendido" de las DC (Bennett, S.R. *et al.*, 1998; Clark, S.R. *et al.*, 2000; Fernandez, N.C., *et al.*, 1999; Ridge, J.P. *et al.*, 1998; Schoenberger, S.P., *et al.*, 1998). CD40 es un miembro transmembrana de 48-kDa de la superfamilia de receptores TNF (McWhirter, S.M., *et al.*, 1999). La interacción CD40-CD40L induce la trimerización de CD40, necesaria para iniciar las cascadas de señalización que implican los factores asociados al receptor TNF (TRAF) (Ni, C.Z., *et al.*, 2000; Pullen, S.S. *et al.*, 1999). CD40 usa estas moléculas de señalización para activar varios factores de transcripción en las DC, incluyendo NFκB, AP-1, STAT3, y p38MAPK (McWhirter, S.M., *et al.*, 1999).

La presente invención contempla un novedoso sistema de activación de las DC basado en las moléculas de señalización del alistamiento o en los polipéptidos coestimuladores de la membrana del plásmido de las DC resultantes en la activación prolongada/aumentada y/o en la supervivencia de las DC. Los polipéptidos coestimuladores incluyen cualquier molécula o polipéptido que activa la ruta NFκB, La ruta Akt, y/o la ruta p38. El sistema de activación de las DC se basa en la utilización de una molécula de señalización recombinante fusionada a dominios de unión a ligando (*es decir*, un dominio de unión a una molécula pequeña) donde el polipéptido coestimulador se activa y/o regula con un ligando dando como resultado la oligomerización (*es decir*, un fármaco permeable a lípidos orgánico dimerizante). Otros sistemas que se pueden usar para reticular u oligomerizar polipéptidos coestimuladores incluyen anticuerpos, ligandos naturales, y/o ligandos reticulantes o sintéticos artificiales. Mas adicionalmente, otros sistemas de dimerización contemplados incluyen el sistema cumermicina / ADN girasa B.

Los polipéptidos coestimuladores que se pueden usar en la presente invención incluyen aquellos que activan NFκB y otras cascadas de señalización variables, por ejemplo, la ruta p38 y/o la ruta Akt. Dichos polipéptidos coestimuladores incluyen, pero no se limitan a Modelos de receptores de reconocimiento, receptores de proteínas C reactivas (*es decir*, Nod1, Nod2, PtX3-R), receptores TNF (*es decir*, CD40, RANK/TRANCER, OX40, 4-1BB), y receptores HSP (Lox-1 y CD-91).

Los Modelos de receptores de reconocimiento incluyen, pero no se limitan a modelos endocíticos de receptores de reconocimiento (*es decir*, receptores de manosa, receptores secuestrantes (*es decir*, Mac-1, LRP, peptidoglicano, ácidos teicoicos, toxinas, CD11c/CR4)); Modelos de receptores de reconocimiento de señalización externa (receptores de tipo Toll (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10), proteína de reconocimiento del peptidoglicano, (las PGRP se unen al peptidoglicano bacteriano, y CD14); y al modelo de receptores de reconocimiento de señalización interna (*es decir*, los receptores NOD 1 y 2).

III. Construcciones de expresión diseñadas mediante ingeniería genética

La presente invención implica una construcción de expresión que codifica un polipéptido coestimulador y un dominio de unión a ligando, unido todo operativamente. Más particularmente, se usa más de un dominio de unión a ligando en la construcción de expresión. Mas adicionalmente, la construcción de expresión contiene una secuencia dirigida a membrana. Un experto en la materia prevé que las construcciones de expresión adecuadas pueden incluir un elemento polipeptídico coestimulador en cualquier lado de los elementos de unión al ligando FKBP anteriores. La construcción de expresión de la presente invención puede insertarse en un vector, por ejemplo, un vector vírico o un plásmido.

A. Polipéptidos coestimuladores

En la presente invención, las moléculas polipeptídicas coestimuladoras pueden amplificar la respuesta mediada por los linfocitos T regulando en exceso la expresión de la célula dendrítica de las moléculas de presentación de antígeno. Las proteínas coestimuladoras que se contemplan en la presente invención incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a los miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) (*es decir*, CD40, RANK/TRANCE-R, OX40, 4-1B), receptores de tipo Toll, receptores de proteínas C reactivas, Modelos de receptores de reconocimiento, y receptores HSP. Normalmente, se usan los dominios citoplásmicos de estos polipéptidos coestimuladores en el

vector de expresión. El dominio citoplásmico de uno de los diversos polipéptidos coestimuladores, incluyendo sus mutantes, donde se conoce la secuencia de reconocimiento implicada en el inicio de la transcripción asociada con el dominio citoplásmico o se conoce un gen sensible a dicha secuencia.

5 En las realizaciones específicas de la presente invención, la molécula polipeptídica coestimuladora es CD40. La molécula CD40 comprende una molécula de ácido nucleico que: (1) se hibrida en condiciones rigurosas con un ácido nucleico que tiene la secuencia de un gen CD40 conocido y (2) codifica un polipéptido CD40. Preferentemente, el polipéptido CD40 carece de dominio extracelular. Se contempla que se puedan usar otras variantes normales o mutantes de CD40 en la presente invención. Las secuencias de polinucleótidos ilustrativas que codifican los polipéptidos CD40 incluyen, pero no se limitan a la SEC ID N°: 1 y a las isoformas CD40 de otras especies.

15 En determinadas realizaciones, la presente invención implica la manipulación de material genético para producir las construcciones de expresión que codifican una forma inducible de CD40 (iCD40). Dichos métodos implican la generación de construcciones de expresión que contienen, por ejemplo, una secuencia heteróloga de ácido nucleico que codifica el dominio citoplásmico CD40 y medios para su expresión, replicar el vector en una célula auxiliar adecuada, obtener partículas víricas producidas del anterior, e infectar células con las partículas víricas recombinantes.

20 De esta manera, la molécula CD40 preferible de la presente invención carece de dominio extracelular. En realizaciones específicas, el dominio celular está truncado o eliminado. Se contempla que el dominio extracelular puede estar mutado utilizando mutagénesis, inserciones, deleciones, o sustituciones convencionales para producir una molécula CD40 que no tiene un dominio extracelular funcional. El ácido nucleico CD40 preferido tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 2. Los ácidos nucleicos CD40 de la invención incluyen también homólogos y alelos de un ácido nucleico que tiene la secuencia de SEC ID N° 2, así como, fragmentos, variantes, y análogos funcionalmente equivalentes de los anteriores ácidos nucleicos.

30 En el contexto de la terapia génica, el gen será una secuencia de polinucleótidos heteróloga derivada diferente a la del genoma vírico que proporciona la estructura principal del vector. El gen se deriva de una fuente procariota o eucariota tal como una bacteria, un virus, levaduras, un parásito, una planta, o incluso un animal. El ADN heterólogo se deriva también de más de una fuente, es *decir*, una construcción multigénica o una proteína de fusión. El ADN heterólogo puede incluir también una secuencia reguladora, que se deriva de una fuente y del gen de una fuente diferente.

35 **8. Dominios de unión a ligando**

El dominio de unión a ligando ("dimerización") de la construcción de expresión de la presente invención puede ser cualquier dominio conveniente que permita la inducción utilizando un ligando natural y no natural, preferentemente un ligando sintético no natural. El dominio de unión a ligando puede ser interno o externo a la membrana celular, dependiendo de la naturaleza de la construcción y de la elección del ligando. Se conoce una amplia variedad de proteínas de unión a ligando, incluyendo los receptores, incluyendo las proteínas de unión a ligando asociadas con las regiones citoplásmicas indicadas anteriormente. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "dominio de unión a ligando" puede utilizarse de manera indistinta con el término "receptor". De particular interés son las proteínas de unión a ligando para las cuales se conocen ligandos (preferentemente ligandos orgánicos pequeños) o se pueden producir fácilmente. Estos dominios o receptores de unión a ligando incluyen los receptores de FKBP y de la ciclofilina, los receptores esteroides, los receptores de la tetraciclina, los otros receptores indicados anteriormente, y similares, así como receptores "no naturales", que se pueden obtener a partir de anticuerpo, particularmente la subunidad de la cadena pesada o ligera, sus secuencias mutadas, las secuencias de aminoácidos aleatorios obtenidas por procedimientos estocásticos, las síntesis combinatorias, y similares.

50 Para la mayor parte, los dominios de unión a ligando o los dominios receptores tendrán al menos aproximadamente 50 aminoácidos, y menos de aproximadamente 350 aminoácidos, usualmente menos de 200 aminoácidos, tanto como dominio natural o como porción activa truncada del mismo. Preferentemente, el dominio de unión será pequeño (<25 kDa, para permitir una transfección eficaz en vectores víricos), monomérico (esto descarta el sistema avidina-biotina), no inmunógeno, y debe ser sintéticamente accesible, permeable a células, con ligandos no tóxicos que se pueden configurar para la dimerización.

60 El dominio receptor puede ser intracelular o extracelular dependiendo del diseño de la construcción de expresión y de la disponibilidad de un ligando adecuado. Para ligandos hidrófobos, el dominio de unión puede encontrarse en cualquier lado de la membrana, pero para ligandos hidrófilos, particularmente ligandos de proteínas, el dominio de unión será usualmente externo a la membrana celular, salvo que exista un sistema de transporte para internalizar el ligando en una forma donde esté disponible para la unión. Para un receptor intracelular, la construcción puede codificar un péptido señal y un dominio 5' o 3' transmembrana de la secuencia del dominio receptor o tener una secuencia señal 5' de unión al lípido de la secuencia del dominio receptor. Cuando el dominio receptor está entre el péptido señal y el dominio transmembrana, el dominio receptor será extracelular.

65

La porción de la construcción de expresión que codifica el receptor puede estar sujeta a mutagénesis por una variedad de motivos. La proteína mutagenizada puede proporcionar una afinidad de unión mayor que permite la discriminación por el ligando entre el receptor que se produce naturalmente y el receptor mutagenizado, lo que proporciona oportunidades para diseñar una pareja receptor-ligando, o similares. El cambio en el receptor puede implicar cambios en los aminoácidos conocidos por estar en el sitio de unión, mutagénesis aleatoria utilizando técnicas combinatorias, donde los codones de los aminoácidos asociados con el sitio de unión u otros aminoácidos asociados con cambios conformacionales pueden estar sujetos a mutagénesis cambiando el codón o codones del aminoácido concreto, tanto con cambios conocidos como de manera aleatoria, expresando las proteínas resultantes en un hospedador procariota adecuado y a continuación cribando las proteínas resultantes para establecer la unión.

Se pueden usar anticuerpos o subunidades de anticuerpos, *por ejemplo*, de cadena pesada o ligera, particularmente fragmentos, más particularmente toda o parte de la región variable, o fusiones de la cadena pesada y ligera para crear una unión de alta afinidad, como el dominio de unión. Los anticuerpos que se contemplan en la presente invención expresan ectópicamente un producto humano, tal como un dominio extracelular que no estimularía una respuesta inmunitaria y generalmente no se expresa en la periferia (*es decir*, fuera del SNC/área del cerebro). Dichos ejemplos, incluyen, pero no se limitan al receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (LNGFR), y proteínas superficiales embrionarias (*es decir*, antígeno carcinoembrionario).

Más adicionalmente, se pueden preparar anticuerpos contra moléculas hapténicas, que sean fisiológicamente aceptables, y las subunidades de anticuerpos individuales cribarse para la afinidad de unión. El ADNc que codifica las subunidades puede aislarse y modificarse por delección de la región constante, porciones de la región variable, mutagénesis de la región variable, o similares, para obtener un dominio de la proteína de unión que tenga la afinidad adecuada por el ligando. De esta forma, se puede emplear casi cualquier compuesto hapténico fisiológicamente aceptable como ligando o proporcionar un epítipo para el ligando. En vez de unidades de anticuerpos, se pueden emplear receptores naturales, donde se conoce el dominio de unión y existe un ligando útil para la unión.

C. Oligomerización

La señal transducida será normalmente el resultado de la oligomerización mediada por ligando de las moléculas de proteínas quiméricas, *es decir*, como resultado de la oligomerización tras la unión al ligando, aunque se pueden emplear otros acontecimientos de unión, por ejemplo, activación alostérica, para iniciar una señal. La construcción de la proteína quimérica variará con el orden de diversos dominios y el número de repeticiones de un dominio individual.

Para multimerizar el receptor, el ligando para los dominios de unión a ligando/dominios receptores de las proteínas quiméricas de la membrana superficial será usualmente multimérico en el sentido que tendrá al menos dos sitios de unión, siendo cada uno de los sitios de unión capaz de unirse al dominio receptor. De forma deseable, los ligandos sujetos serán un dímero o un oligómero de orden mayor, usualmente no mayor de aproximadamente tetramérico, de moléculas orgánicas sintéticas pequeñas, las moléculas individuales tienen normalmente al menos aproximadamente 150 D y unas pocas de ellas aproximadamente 5 kDa, usualmente unas pocas de aproximadamente 3 kDa. Se puede emplear una variedad de parejas de ligandos y receptores sintéticos. Por ejemplo, en realizaciones que implican receptores naturales, se puede usar FK506 dimérico con un receptor FKBP, se puede usar ciclosporina A dimerizada con el receptor de ciclofilina, estrógeno dimerizado con un receptor estrógeno, glucocorticoides dimerizados con un receptor glucocorticoide, tetraciclina dimerizada con el receptor de la tetraciclina, vitamina D dimerizada con el receptor de la vitamina D, y similares. Se pueden usar alternativamente órdenes mayores de los ligandos, *por ejemplo*, se puede usar el trimérico. Para las realizaciones que implican receptores no naturales, *por ejemplo*, subunidades de anticuerpos, subunidades de anticuerpos modificados o receptores modificados y similares, se puede usar cualquiera de una gran variedad de compuestos. Una característica significativa de estas unidades de ligandos es que pueden unirse al receptor con alta afinidad y pueden dimerizarse químicamente.

En determinadas realizaciones, la presente invención utiliza la técnica de la dimerización químicamente inducida (CID) para producir una proteína o polipéptido controlado condicionalmente. Además de que su técnica es inducible, también es reversible, debido a la degradación del agente de dimerización lábil o la administración de un inhibidor competitivo monomérico.

El sistema CID usa ligandos sintéticos bivalentes para reticular rápidamente las moléculas de señalización que se fusionan a dominios CID de unión a ligando. Este sistema se ha usado para estimular la oligomerización y la activación de la superficie celular (Spencer *et al.*, 1993; Spencer *et al.*, 1996; Blau *et al.*, 1997), o proteínas citosólicas (Luo *et al.*, 1996; MacCorkle *et al.*, 1998), el alistamiento de factores de transcripción de elementos del ADN para modular la transcripción (Ho *et al.*, 1996; Rivera *et al.*, 1996) o el alistamiento de moléculas de señalización de la membrana plasmática para estimular la señalización (Spencer *et al.*, 1995; Holsinger *et al.*, 1995).

El sistema CID se basa en la noción de que la agregación del receptor superficial activa eficazmente las cascadas de señalización corriente abajo. En la realización más sencilla, el sistema CID utiliza un análogo dimérico del fármaco supresor permeable lípido, FK506, que pierde su bioactividad normal ganando a la vez la capacidad de

reticular moléculas genéticamente fusionadas a la proteína de unión FK506, FKBP12. Fusionando uno o más FKBP y una secuencia de miristoilación para el dominio de señalización citoplásmico de un receptor diana, se puede estimular la señalización en un dimerizador dependiente de fármaco, pero ligándolo de una manera independiente del ectodominio. Esto proporciona al sistema control temporal, reversibilidad usando análogos de fármacos monoméricos, y especificidad potenciada. La elevada afinidad de la tercera generación de CID APZ0187/AP1903 para su dominio de unión, FKBP12, permite la activación específica del receptor recombinante *in vivo* sin la inducción de efectos secundarios no específicos a través de FKBP12 endógeno. Además, los ligandos sintéticos son resistentes a la degradación de la proteasa, haciéndolos más eficaces a los receptores de activación *in vivo* que la mayoría de agentes de proteínas administrados.

Los ligandos usados en la presente invención pueden unirse a dos o más de los dominios de unión a ligando. Un experto en la materia prevé que las proteínas quiméricas pueden unirse a más de un ligando cuando contienen más de un dominio de unión a ligando. El ligando es normalmente una no proteína o un compuesto químico. Los ligandos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a FK506 dimérico (*por ejemplo.*, FK1012).

Como el mecanismo de activación de CD40 se basa fundamentalmente en la trimerización, este receptor es particularmente adecuado para el sistema CID. La regulación de CID proporciona al sistema 1) control temporal, 2) reversibilidad mediante la adición de un monómero no activo tras los signos de una reacción autoinmunitaria, y 3) potencial limitado para los efectos secundarios no específicos. Además, la activación de DC CD40 inducible *in vivo* podría evitar el requisito de una segunda señal de "peligro" requerida normalmente para la inducción completa de la señalización de CD40 y podría promover potencialmente la supervivencia de DC *in situ* permitiendo un cebado potenciado de los linfocitos T. De esta manera, las vacunas de DC diseñadas mediante ingeniería genética para expresar iCD40 amplifican la respuesta de destrucción mediada por los linfocitos T regulando en exceso la expresión de DC de las moléculas de presentación de antígeno, moléculas de adhesión, citoquinas promotoras de TH1, y factores prosupervivencia.

Otros sistemas de dimerización contemplados incluyen el sistema cumermicina / ADN girasa B. La dimerización inducida por cumermicina activa una proteína Raf modificada y estimula la cascada de la quinasa MAP. Véase Farrar *et al.*, 1996.

D. Direccionamiento a membrana

Una secuencia dirigida a membrana proporciona el transporte de la proteína quimérica a la membrana de la superficie celular, donde la misma u otras secuencias pueden codificar la unión de la proteína quimérica a la membrana superficial celular. Puede emplearse cualquier secuencia dirigida a membrana que sea funcional en el hospedador y puede, o no, asociarse con uno de los otros dominios de la proteína quimérica. Dichas secuencias incluyen, pero no se limitan a una secuencia dirigida a la miristoilación, una secuencia dirigida a la palmitoilación, secuencias de prenilación (*es decir*, farnesilación, geranyl-geranilación, secuencia CAAX) o secuencias transmembrana (utilizando péptidos señal) de receptores.

E. Marcadores seleccionables

En determinadas realizaciones de la invención, las construcciones de expresión de la presente invención contienen construcciones de ácidos nucleicos cuya expresión se identifica *in vitro* o *in vivo* incluyendo un marcador en la construcción de expresión. Dichos marcadores conferirían un cambio identificable a la célula permitiendo una fácil identificación de las células que contienen la construcción de expresión. Usualmente, la inclusión de un marcador de selección del fármaco ayuda en la clonación y en la selección de transformantes. Por ejemplo, genes que confieren resistencia a la neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores seleccionables útiles. Como alternativa, se emplean enzimas como la timidina quinasa (tk) del virus del herpes simple. Se pueden emplear también marcadores inmunológicos. No se cree que el marcador seleccionado sea importante, siempre que pueda expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Los ejemplos adicionales de marcadores seleccionables son bien conocidos del experto en la materia e incluyen iniciadores tales como EGFP, βgal o cloranfenicol acetiltransferasa (CAT).

F. Regiones control

1. Promotores

No se cree que sea importante el promotor concreto empleado para controlar la expresión de una secuencia de polinucleótidos de interés, siempre que pueda dirigir la expresión del polinucleótido en la célula dirigida. De esta manera, cuando la célula humana es la diana, es preferible situar la región de codificación de la secuencia del polinucleótido adyacente y bajo el control de un promotor que puede expresarse en una célula humana. Hablando de manera general, dicho promotor puede incluir un promotor tanto humano como vírico.

En varias realizaciones, el promotor del gen temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV), el promotor temprano del SV40, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, β-actina, el promotor de la insulina de

rata y de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa se pueden usar para obtener un elevado nivel de expresión de la secuencia de codificación de interés. Se contempla también en la materia el uso de otros promotores víricos o de células de mamíferos o de fagos bacterianos para conseguir la expresión de una secuencia de codificación de interés, con la condición de que los niveles de expresión sean suficientes para un fin dado. Mediante el uso de un promotor con propiedades bien conocidas, se puede optimizar el nivel y el modelo de expresión de la proteína de interés tras la transfección o la transformación.

La selección de un promotor que se regula en respuesta a señales fisiológicas o sintéticas específicas puede permitir la expresión inducible del producto génico. Por ejemplo, en el caso donde la expresión de un transgén, o transgenes, cuando se utiliza un vector multicistrónico, sea tóxica para las células donde el vector se produce, es deseable prohibir o reducir la expresión de uno o más de los transgenes. Los ejemplos de transgenes que son tóxicos para la línea celular productora son los genes proapoptóticos y de la citoquina. Están disponibles algunos sistemas promotores inducibles para la producción de vectores víricos cuando los productos transgénicos son tóxicos (añadidos en más promotores inducibles).

El sistema de la ecdisona (Invitrogen, Carlsbad, CA) es uno de dichos sistemas. Este sistema está diseñado para permitir la expresión regulada de un gen de interés en células de mamíferos. Consiste en un mecanismo de expresión estrechamente regulado que permite virtualmente la no expresión del nivel basal del transgén, pero con una inducibilidad de 200 veces. El sistema se basa en el receptor heterodimérico de la ecdisona de *Drosophila*, y cuando la ecdisona o un análogo tal como muristerona A se une al receptor, el receptor activa un promotor que activa a su vez la expresión del transgén posterior de tal manera que se alcancen elevados niveles de transcritos de ARNm. En este sistema, ambos monómeros del receptor heterodimérico se expresan constitutivamente a partir de un vector, mientras que el promotor sensible a la ecdisona, que impulsa la expresión del gen de interés está en otro plásmido. Podría por tanto ser útil el diseño mediante ingeniería genética de este tipo de sistema en el vector de transferencia génica de interés. La transfección simultánea de plásmidos que contienen el gen de interés y de los monómeros del receptor en la línea de células productoras podría a continuación permitir la producción del vector de transferencia génica sin la expresión de un transgén potencialmente tóxico. En el momento adecuado, la expresión del transgén podría activarse con ecdisona o muristerona A.

Otro sistema inducible que podría ser útil es el sistema Tet-Off™ o Tet-On™ (Clontech, Palo Alto, CA) originalmente desarrollado por Gossen y Bujard (Gossen y Bujard, 1992; Gossen *et al.*, 1995). Este sistema permite también elevados niveles de expresión génica que se van a regular en respuesta a la tetraciclina o a derivados de tetraciclina tales como doxiciclina. En el sistema Tet-On™, la expresión génica se activa en presencia de doxiciclina, mientras en el sistema Tet-Off™, la expresión génica se activa en ausencia de doxiciclina. Estos sistemas se basan en dos elementos reguladores derivados del operón de resistencia a la tetraciclina de *E.coli*. La secuencia operadora de tetraciclina a la cual se une el represor de la tetraciclina, y la proteína represora de tetraciclina. El gen de interés se clonó en un plásmido por detrás de un promotor que tiene elementos sensibles a la tetraciclina en el mismo. Un segundo plásmido contiene un elemento regulador denominado transactivador controlado por tetraciclina, que está compuesto, en el sistema Tet-Off™, por el dominio VP16 del virus del herpes simple y el represor de la tetraciclina natural. De esta manera, en ausencia de doxiciclina, la transcripción se activa constitutivamente. En el sistema Tet-On™, el represor de la tetraciclina no es de tipo natural y en presencia de doxiciclina activa la transcripción. Para la producción del vector de terapia génica, sería preferible el sistema Tet-Off™ de tal manera que las células productoras podrían crecer en presencia de tetraciclina o doxiciclina y evitar la expresión de un transgén potencialmente tóxico, pero cuando se introduce el vector en el paciente, la expresión génica se activaría constitutivamente.

En algunas circunstancias, es deseable regular la expresión de un transgén en un vector de terapia génica. Por ejemplo, se utilizaron promotores víricos diferentes con resistencias variables a la actividad dependiendo del nivel de expresión deseado. En células de mamíferos se usa a menudo el promotor temprano inmediato del CMV para proporcionar una fuerte activación de la transcripción. Se han usado también versiones modificadas del promotor del CMV que son menos potentes cuando se desean niveles de expresión reducidos del transgén. Cuando se desea la expresión de un transgén en células hematopoyéticas se usan a menudo promotores retrovíricos tales como los LTR del VLM o del MMTV. Otros promotores víricos que se usan dependiendo del efecto deseado incluyen SV40, LTR del VSR, LTR del VIH-1 y VIH-2, los promotores de adenovirus tales como de la región E1A, E2A, o de la región MLP, LTR del VAA, VSH-TK, y virus del sarcoma de aves.

De forma similar se usan promotores específicos de tejido para efectuar la transcripción en tejidos o células específicas de tal manera que reduzcan la toxicidad potencial o los efectos indeseables a los tejidos no dirigidos. Por ejemplo, promotores tales como el promotor asociado a PSA o kalikreína glandular específica de próstata.

En determinadas indicaciones es deseable activar la transcripción en momentos específicos tras la administración del vector de terapia génica. Esto se lleva a cabo con dichos promotores tales como los que son hormonas o citoquinas regulables. Las citoquinas y los promotores sensibles a la proteína inflamatoria que se pueden usar incluyen quinínogeno K y T (Kageyama *et al.*, 1937), c-fos, TNF-alfa, proteína C reactiva (Arcone *et al.*, 1988), haptoglobina (Oliviero *et al.*, 1987), amiloide A2 sérico, C/EBP alfa, IL-1, IL-6 (Poli y Cortese, 1989), Complemento C3 (Wilson *et al.*, 1990), IL-8, glicoproteína ácida alfa-1 (Prowse y Baumann, 1988), alfa-1-antitripsina, lipoproteína

lipasa (Zechner *et al.*, 1988), angiotensinógeno (Ron *et al.*, 1991), fibrinógeno, c-jun (inducible por ésteres de forbol, TNF-alfa, radiación UV, ácido retinoico, y peróxido de hidrógeno), colagenasa (inducida por ésteres de forbol y ácido retinoico), metalotioneína (metales pesados y glucocorticoides inducibles), Estromelina (inducible por ésteres de forbol, interleuquina-1 y EGF), alfa-2 macroglobulina y alfa-1 anti-quimotripsina.

Se cree que cualquiera de los anteriores promotores solos o en combinación con otros puede ser útil de acuerdo con la presente invención dependiendo de la acción deseada. Además, esta lista de promotores no debe tomarse como exhaustiva o limitante, los expertos en la materia conocerán otros promotores que se utilizan junto con los promotores y métodos descritos en el presente documento.

2. Potenciadores

Los potenciadores son elementos genéticos que aumentan la transcripción de un promotor localizado en una posición distante en la misma molécula de ADN. Los potenciadores están organizados de forma muy similar a los promotores. Es decir, están compuestos por muchos elementos individuales, cada uno de los cuales se une a una o más proteínas transcripcionales. La distinción básica entre potenciadores y promotores es operacional. Una región potenciadora, en su conjunto, debe poder estimular la transcripción a distancia; esto no es necesario que sea verdadero con respecto a una región promotora o sus elementos componentes. Por otra parte, un promotor debe tener uno o más elementos que dirigen el inicio de la síntesis del ARN en un sitio concreto y en una orientación concreta, mientras que los potenciadores carecen de estas especificidades. Los promotores y potenciadores son a menudo solapantes y contiguos, a menudo parece que tienen una organización modular muy similar.

Puede usarse cualquier combinación promotora/potenciadora (como según la Base de datos de promotores eucariotas EPDB) para impulsar la expresión del gen. Las células eucariotas pueden soportar la transcripción citoplásmica de determinados promotores bacterianos si se proporciona la polimerasa bacteriana adecuada, tanto como parte del complejo de administración o como una construcción de expresión genética adicional.

3. Señales de poliadenilación

Cuando se emplea una inserción de ADNc, se deseará incluir normalmente una señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación adecuada de la transcripción génica. No se cree que sea crucial la naturaleza de la señal de poliadenilación para la práctica satisfactoria de la invención, y se emplea cualquiera de dichas secuencias tales como una hormona del crecimiento humano o bovino y las señales de poliadenilación de SV40. Se contempla también que un elemento del casete de expresión sea un terminador. Estos elementos pueden servir para potenciar los niveles del mensaje y para minimizar la lectura a través del casete en otras secuencias.

4. Señales de inicio y sitios internos de unión al ribosoma

Se puede requerir también una señal de inicio específica para una traducción eficaz de las secuencias de codificación. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG o las secuencias adyacentes. Puede ser necesario proporcionar señales exógenas de control de la traducción, incluyendo el codón de inicio ATG. Una persona normalmente experta en la materia podría fácilmente determinar esto y proporcionar las señales necesarias. Se sabe que el codón de inicio debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción de la inserción completa. Las señales exógenas de control de la traducción y los codones de inicio pueden ser tanto naturales como sintéticas. Puede potenciarse la eficacia de la expresión mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción adecuados.

En determinadas realizaciones de la invención, se utilizan elementos de sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) para crear multigenes, o mensajes policistrónicos. Los elementos IRES pueden derivar el modelo de cribado del ribosoma de la traducción 5' metilada derivada de cap y comenzar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Se han descrito elementos IRES procedentes de dos miembros de la familia picornavirus (polio y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como un IRES de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, 1991). Los elementos IRES se pueden unir a marcos de lectura abiertos heterólogos. Se pueden transcribir juntos múltiples marcos de lectura abiertos, separado cada uno de ellos por un IRES, creando mensajes policistrónicos. En virtud del elemento IRES, cada marco de lectura abierto es accesible a los ribosomas para una traducción eficaz. Se pueden expresar eficazmente múltiples genes utilizando un único promotor/potenciador para transcribir un único mensaje (véanse las Patentes de los EE.UU. N^{os} 5.925.565 y 5.935.819).

IV. Métodos de transferencia génica

Para mediar en el efecto de la expresión del transgén en una célula, será necesario transferir las construcciones de expresión de la presente invención a una célula. Dicha transferencia puede emplear métodos víricos o no víricos de transferencia génica. Esta sección proporciona una descripción de los métodos y composiciones de transferencia génica.

Se generó una célula transformada que comprendía un vector de expresión introduciendo en la célula el vector de expresión. Los métodos adecuados para la administración de polinucleótidos para la transformación de un órgano, una célula, un tejido o un organismo para uso con la invención actual incluyen virtualmente cualquier método por el cual se puede introducir un polinucleótido (*por ejemplo*, ADN) en un órgano, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en el presente documento o conocería una persona normalmente experta en la materia.

Una célula hospedadora puede, y se ha utilizado, como receptora de vectores. Las células hospedadoras pueden derivarse de procariontes o eucariontes, dependiendo tanto de que el resultado deseado sea la replicación del vector como de la expresión de parte o de todas las secuencias de polinucleótidos codificadas por el vector. Están disponibles numerosas líneas y cultivos celulares para uso como células hospedadoras, y se pueden obtener a través de la American Type Culture Collection (ATCC), que es una organización que sirve como archivo de cultivos vivos y materiales genéticos. En realizaciones específicas, la célula hospedadora es una célula dendrítica, que es una célula presentadora de antígeno.

Está también comprendido en el conocimiento de un experto en la materia determinar un hospedador adecuado. Generalmente esto se basa en la estructura principal del vector y en el resultado deseado. Se puede introducir un plásmido o un cósmido, por ejemplo, en una célula hospedadora procarionte para la replicación de muchos vectores. Las células bacterianas utilizadas como células hospedadoras para la replicación y/o la expresión del vector incluyen DH5 α , JM109, y KC8, así como numerosos hospedadores bacterianos comercialmente disponibles tales como SURE[®] Competent Cells y SOLOPACK[™] Gold Cells (STRATAGENE[®], La Jolla, CA). Como alternativa, podrían usarse células bacterianas tales como *E. coli* LE392 como células hospedadoras para los virus fagos. Las células eucariontes que se pueden usar como células hospedadoras incluyen, pero no se limitan a levaduras, insectos y mamíferos. Los ejemplos de células hospedadoras eucariontes de mamíferos para la replicación y/o la expresión de un vector incluyen, pero sin limitación, HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, COS, CHO, Saos, y PC12. Los ejemplos de cepas de levaduras incluyen, pero sin limitación, YPH499, YPH500 y YPH501.

A. Transferencia no vírica

1. Transformación *ex vivo*

Los métodos para transfectar células y tejidos vasculares retirados de un organismo en un escenario *ex vivo* son conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se han alterado genéticamente células endoteliales caninas mediante transferencia génica retroviral *in vitro* y se han trasplantado en un can (*Wilson et al.*, 1989). En otro ejemplo, se transfectaron células endoteliales de minicerdo Yucatan mediante retrovirus *in vitro* y se trasplantaron en una arteria usando un catéter de doble globo (*Nabel et al.*, 1989). De esta manera, se contempla que las células o tejidos se puedan retirar y transfectar *ex vivo* usando los polinucleótidos de la presente invención. En aspectos concretos, las células o tejidos trasplantados pueden introducirse en un organismo. De esta manera, está bien comprendido en el conocimiento de un experto en la materia aislar células dendríticas procedentes de un animal, transfectar las células con el vector de expresión y a continuación administrar posteriormente las células transfectadas o transformadas al animal.

2. Inyección

En determinadas realizaciones, se puede administrar un polinucleótido a un órgano, una célula, un tejido o un organismo mediante una o más inyecciones (*es decir*, una inyección con aguja), tal como, por ejemplo, por vía subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, *etc.* Los métodos de inyección de vacunas son bien conocidos por las personas normalmente expertas en la materia (por ejemplo, la inyección de una composición que comprende una solución salina). Las realizaciones adicionales de la presente invención incluyen la introducción de un polinucleótido mediante microinyección directa. La cantidad del vector de expresión usado puede variar dependiendo de la naturaleza del antígeno así como del órgano, célula, tejido u organismo utilizado.

Las inyecciones intradérmicas, intranodales, o intralinfáticas son algunos de los métodos usados más comúnmente de administración de DC. La inyección intradérmica se caracteriza por una baja velocidad de absorción en el torrente sanguíneo pero una rápida captación en el sistema linfático. La presencia de grandes cantidades de células dendríticas de Langerhans en la dermis transportará y procesarán el antígeno intacto hasta los ganglios linfáticos drenantes. Es necesaria la preparación del sitio adecuado para realizar esto correctamente (*es decir*, el pelo puede cortarse a fin de observar la colocación adecuada de la aguja). La inyección intranodal permite la administración directa del antígeno a los tejidos linfáticos. La inyección intralinfática permite la administración directa de las DC.

3. Electroporación

En determinadas realizaciones de la presente invención, se introduce un polinucleótido en un órgano, una célula, un tejido o un organismo mediante electroporación. La electroporación implica la exposición de una suspensión de células y ADN a una descarga eléctrica de alto voltaje. En algunas variantes de este método se emplean determinadas enzimas degradadoras de la pared celular, tales como las enzimas degradadoras de pectina, para volver las células receptoras diana más susceptibles a la transformación mediante electroporación que las células

sin tratar (patente de los Estados Unidos N° 5.384.253).

La transfección de células eucariotas utilizando electroporación ha sido muy satisfactoria. Se han transfectado prelinfocitos B de ratones con genes de la inmunoglobulina kappa humana (Potter *et al.*, 1984), y se han transfectado hepatocitos de rata con el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (Tur-Kaspa *et al.*, 1986) de esta manera.

4. Fosfato de calcio

En otras realizaciones de la presente invención, se introduce un polinucleótido en las células utilizando la precipitación con fosfato de calcio. Se han transfectado células KB humanas con ADN de adenovirus 5 (Graham y Van Der Eb, 1973) utilizando esta técnica. También, de esta manera, se han transfectado células L(A9) de ratón, C127 de ratón, CHO, CV-1, BHK, NIH3T3 y HeLa con un gen marcador de la neomicina (Chen y Okayama, 1987), y se han transfectado hepatocitos de rata con una variedad de genes marcadores (Rippe *et al.*, 1990).

5. DEAE Dextrano

En otra realización, se administra un polinucleótido en una célula usando DEAE dextrano seguido por polietilenglicol. De esta manera, se introdujeron plásmidos indicadores en células de mieloma y eritroleucemia de ratón (Gopal, 1985).

6. Carga por sonicación

Las realizaciones adicionales de la presente invención incluyen la introducción de un polinucleótido mediante una carga sónica. Se han transfectado fibroblastos LTK con el gen de la timidina quinasa mediante carga por sonicación (Fechheimer *et al.*, 1987).

7. Transfección mediada por liposomas

En una realización adicional de la invención, puede atraparse un polinucleótido en un complejo lipídico tal como, por ejemplo, un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana con una bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas de lípidos separadas por un medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando se suspenden los fosfolípidos en una solución acuosa en exceso. Los componentes lípidos experimentan una autorredispersión antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas de lípidos (Ghosh y Bachhawat, 1991). Se contempla también un polinucleótido complejado con Lipofectamina (Gibco BRL) o Superfect (Qiagen).

8. Transfección mediada por receptor

Además, puede administrarse un polinucleótido a una célula diana mediante vehículos de administración mediados por receptor. Estos aprovechan la captación selectiva de macromoléculas por endocitosis mediada por receptor que se producirá en una célula diana. A la vista de la distribución específica del tipo celular de diversos receptores, este método de administración añade otro grado de especificidad a la presente invención.

Determinados vehículos dirigidos a gen mediados por receptor comprenden un ligando específico del receptor celular y un agente de unión a polinucleótido. Otros comprenden un ligando específico del receptor celular al cual se va a administrar el polinucleótido que se ha unido operativamente. Se han usado algunos ligandos para la transferencia génica mediada por receptor (Wu y Wu, 1987; Wagner *et al.*, 1990; Perales *et al.*, 1994; Myers, documento EPO 0273085), que establece la operabilidad de la técnica. Se ha descrito la administración específica en el contexto de otro tipo de célula de mamífero (Wu y Wu, 1993). En determinados aspectos de la presente invención, se selecciona un ligando para corresponder a un receptor específicamente expresado en la población de células diana.

En otras realizaciones, un componente de un vehículo de administración de polinucleótidos de un vehículo dirigido a un polinucleótido específico de célula puede comprender un ligando de unión específico en combinación con un liposoma. Los polinucleótido(s) que se van a administrar se alojan en el liposoma y el ligando de unión específico se incorpora funcionalmente en la membrana del liposoma. El liposoma se unirá específicamente de esta manera a los receptor(es) de una célula diana y administrará los contenidos a una célula. Dichos sistemas han mostrado ser funcionales usando sistemas, donde, por ejemplo, se usa el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en la administración mediada por receptor de un polinucleótido a las células que presentan una regulación en exceso del receptor de EGF.

En realizaciones preferidas adicionales, el componente del vehículo de administración de polinucleótidos de un vehículo de administración dirigida puede ser el mismo liposoma, que comprenderá preferentemente uno o más lípidos o glicoproteínas que dirigen la unión específica de células. Por ejemplo, se ha incorporado lactosil ceramida, un asiogangliósido terminado en galactosa, a liposomas y se ha observado un aumento en la captación del gen de la insulina en hepatocitos (Nicolau *et al.*, 1987). Se contempla que las construcciones transformantes específicas de

tejidos de la presente invención pueden administrarse específicamente a una célula diana de una manera similar.

9. Bombardeo de microprojectiles

5 Se pueden usar técnicas de bombardeo de microprojectiles para introducir un polinucleótido en al menos un
 10 orgánulo, célula, tejido u organismo (Patente de los Estados Unidos N° 5.550.318; patente de los Estados Unidos N°
 5.538.880; patente de los Estados Unidos N° 5.610.042; y solicitud PCT N° WO 94/09699). Este método depende
 de la capacidad de acelerar los microprojectiles revestidos de ADN a una elevada velocidad, lo que les permite
 perforar membranas celulares y penetrar en las células sin destruirlas (Klein *et al.*, 1987). Existe una amplia variedad
 de técnicas de bombardeo con microprojectiles conocidas en la materia, muchas de las cuales son aplicables a la
 invención.

15 En este bombardeo de microprojectiles, una o más partículas pueden revestirse con al menos un polinucleótido y
 administrarse a células mediante una fuerza propulsora. Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar
 partículas pequeñas. Uno de dichos dispositivos se basa en una descarga de alto voltaje para generar una corriente
 eléctrica, que proporciona a la vez la fuerza motora (Yang *et al.*, 1990). Los microprojectiles usados han consistido
 en sustancias biológicamente inertes tales como partículas o perlas de tungsteno u oro. Las partículas ilustrativas
 incluyen las comprendidas por tungsteno, platino, y preferentemente, oro. Se contempla que, en algunos casos, la
 precipitación de ADN sobre partículas metálicas no sería necesaria para la administración del ADN a una célula
 20 receptora usando el bombardeo de microprojectiles. Sin embargo, se contempla que las partículas puedan contener
 ADN en lugar de estar revestidas con ADN. Las partículas revestidas con ADN pueden aumentar el nivel de
 administración del ADN mediante el bombardeo de partículas pero no son, en y por sí mismas, necesarias.

B. Transferencia mediada por un vector vírico

25 En determinadas realizaciones, se incorpora un transgén a una partícula vírica para mediar la transferencia génica a
 una célula. Normalmente, el virus simplemente se expondrá a la célula hospedadora adecuada en condiciones
 fisiológicas, permitiendo la captación del virus. Los presentes métodos se emplean ventajosamente utilizando una
 variedad de vectores víricos, como se analiza más adelante.

1. Adenovirus

30 El adenovirus es particularmente adecuado para uso como vector de transferencia génica debido a su genoma, con
 un ADN de tamaño medio, facilidad de manipulación, títulos altos, amplia gama de células diana, y elevada
 infectividad. El genoma vírico de aproximadamente 36 kb se une por repeticiones terminales invertidas (ITR) de 100-
 200 pares de bases (pb), donde están contenidos elementos que actúan en cis necesarios para la replicación y el
 empaquetamiento del ADN vírico. Las regiones inicial (E) y posterior (L) del genoma que contienen diferentes
 unidades de transcripción se dividen al inicio de replicación del ADN vírico.

40 La región E1 (E1A y E1B) codifica las proteínas responsables de la regulación de la transcripción del genoma vírico
 y unos pocos genes celulares. La expresión de la región E2 (E2A y E2B) da como resultado la síntesis de las
 proteínas para la replicación del ADN vírico. Estas proteínas están implicadas en la replicación del ADN, la expresión
 final del gen, y la desactivación de la célula hospedadora (Renan, 1990). Los productos de los genes posteriores
 (L1, L2, L3, L4 y L5), incluyendo la mayoría de las proteínas de cápsidas víricas, se expresan solamente después de
 45 un procesamiento significativo de un único transcrito primario caracterizado por el promotor posterior mayor (MLP).
 El MLP (localizado a 16,8 unidades cartográficas) es particularmente eficaz durante la fase final de la infección, y
 todos los ARNm caracterizados a partir de este promotor poseen una secuencia líder 5' tripartita (TL), que hace de
 ellos ARNm preferidos para la traducción.

50 Para optimizar el adenovirus para la terapia génica, es necesario maximizar la capacidad de transporte de manera
 que se puedan incluir grandes segmentos de ADN. Es también muy deseable reducir la toxicidad y la reacción
 inmunológica asociadas con determinados productos adenovíricos. Las dos metas son, de manera amplia,
 colindantes en que la eliminación de genes adenovíricos sirve a ambos fines. Al llevar a la práctica la presente
 invención, es posible conseguir ambas metas reteniendo a la vez la capacidad de manipular las construcciones
 55 terapéuticas con relativa facilidad.

El gran desplazamiento del ADN es debido a que los elementos cis requeridos para la replicación del ADN vírico
 están localizados en las repeticiones terminales invertidas (ITR) (100-200 pb) en cualquier extremo del genoma
 vírico lineal. Los plásmidos que contienen las ITR pueden replicarse en presencia de un adenovirus no defectivo
 60 (Hay *et al.*, 1984). Por tanto, la inclusión de estos elementos en un vector adenovírico debe permitir la replicación.

Además, la señal de empaquetamiento para la encapsulación vírica se localiza entre los pb 194-385 (0,5-1,1
 unidades cartográficas) en el extremo izquierdo del genoma vírico (Hearing *et al.*, 1987). Esta señal imita el sitio de
 reconocimiento de la proteína en el ADN del bacteriófago λ donde una secuencia específica cierra el extremo
 izquierdo, pero lejos de la secuencia del extremo cohesivo, media la unión a las proteínas que se requieren para la
 65 inserción del ADN en la estructura de la cabeza. Los vectores de sustitución E1 de Ad han demostrado que un

fragmento de 450 pb (0-1,25 unidades cartográficas) en el extremo izquierdo del genoma vírico podría dirigir el empaquetamiento en células 293 (Levrero *et al.*, 1991).

5 Anteriormente, se ha mostrado que determinadas regiones del genoma adenovírico se pueden incorporar en el genoma de células de mamíferos y los genes codificados expresarse a partir del anterior. Estas líneas celulares son capaces de soportar la replicación de un vector adenovírico que es deficiente en la función adenovírica codificada por la línea celular. Han existido también informes de complementación de vectores adenovíricos deficientes en la replicación por vectores "auxiliares", *por ejemplo*, el virus natural o condicionalmente mutantes defectivos.

10 Se pueden complementar vectores adenovíricos deficientes en la replicación, en trans, por el virus auxiliar. Esta observación sola no permite el aislamiento de los vectores deficientes en la replicación, sin embargo, debido a la presencia del virus auxiliar, necesaria para proporcionar funciones replicativas, podría contaminarse cualquier preparación. De esta manera, ha sido necesario un elemento adicional que podría añadir especificidad a la replicación y/o empaquetamiento del vector deficiente en la replicación. Este elemento, que se proporciona en la presente invención, se deriva de la función de empaquetamiento del adenovirus.

15 Se ha mostrado que existe una señal de empaquetamiento para el adenovirus en el extremo izquierdo de la cartografía convencional del adenovirus (Tibbets, 1977). Estudios posteriores han mostrado que un mutante con una deleción en la región E1A (194-358 pb) del genoma crecen mal incluso en una línea celular que ha complementado la función inicial (E1A) (Hearing y Shenk, 1983). Cuando se recombinó un ADN adenovírico de compensación (0-353 pb) en el extremo derecho del mutante, el virus se empaquetó normalmente. El análisis adicional de la mutación identificó un elemento corto, repetido, dependiente de posición en el extremo izquierdo del genoma de Ad5. Se ha encontrado que una copia de la repetición era suficiente para un empaquetado eficaz si está presente en cualquier extremo del genoma, pero no cuando se mueve hacia el interior de la molécula de ADN de Ad5 (Hearing *et al.*, 20 25 1987).

Utilizando versiones mutadas de la señal de empaquetamiento, es posible crear virus auxiliares que se empaquetan con eficacias variables. Normalmente, las mutaciones son mutaciones o deleciones puntuales. Cuando se hacen crecer virus auxiliares con una baja eficacia de empaquetamiento en células auxiliares, el virus se empaqueta, prácticamente a tasas reducidas en comparación con el virus natural, permitiendo por tanto la propagación del auxiliar. Cuando estos virus auxiliares se hacen crecer en células junto con el virus que contiene las señales de empaquetamiento naturales, sin embargo, las señales de empaquetamiento naturales se reconocen preferentemente sobre las versiones mutadas. Proporcionando una cantidad limitante de factor de empaquetamiento, el virus que contiene las señales limitantes se empaqueta selectivamente cuando se compara con los auxiliares. Si la preferencia es suficientemente grande, deben conseguirse disoluciones madre que se acerquen a la homogeneidad.

2. Retrovirus

40 Los retrovirus son un grupo de virus de ARN monocatenarios caracterizados por una capacidad de convertir su ARN a ADN bicatenario en células infectadas por un proceso de transcripción inversa (Coffin, 1990). Este ADN resultante se integra a continuación de forma estable en cromosomas celulares como un provirus y dirige la síntesis de las proteínas víricas. La integración da como resultado la retención de las secuencias génicas víricas en la célula receptora y sus descendientes. El genoma retroviral contiene tres genes - gag, pol y env - que codifican las proteínas de la cápsida, la enzima polimerasa, y componentes de la envoltura, respectivamente. Una secuencia que se encuentra en la dirección 5' del gen gag, denominada Ψ , funciona como una señal para el empaquetamiento del genoma en viriones. Están presentes dos secuencias de repetición terminal larga (LTR) en los extremos 5' y 3' del genoma vírico. Este contiene secuencias de un promotor y un potenciador fuertes y se requieren también para la integración en el genoma de la célula hospedadora (Coffin, 1990).

50 Para construir un vector retroviral, se inserta un ácido nucleico que codifica un promotor en el genoma vírico en lugar de determinadas secuencias víricas para producir un virus que es defectivo en la replicación. A fin de producir viriones, se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes gag, pol y env pero sin los componentes de LTR e Ψ (Mann *et al.*, 1983). Cuando un plásmido recombinante que contiene un ADNc humano, junto con las secuencias de LTR e Ψ retrovirales se introduce en esta línea celular (mediante precipitación con fosfato de calcio, por ejemplo), la secuencia Ψ permite al transcrito de ARN del plásmido recombinante empaquetarse en partículas víricas, que se secretan a continuación en el medio de cultivo (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). Se recoge el medio que contiene los retrovirus recombinantes, se concentra opcionalmente, y se usa para la transferencia génica. Los vectores retrovirales infectan una amplia variedad de tipos celulares. Sin embargo, la integración y la expresión estable de muchos tipos de retrovirus requieren la división de las células hospedadoras (Paskind *et al.*, 1975).

55 Se ha desarrollado recientemente una solución diseñada para el direccionamiento específico de los vectores retrovirales basada en la modificación química de un retrovirus mediante la adición química de restos de galactosa a la envoltura vírica. Esta modificación podría permitir la infección específica de células tales como hepatocitos mediante los receptores de asialoglicoproteínas, si esto se desea.

Se ha diseñado una solución diferente para el direccionamiento de retrovirus recombinantes donde se han usado anticuerpos biotinilados contra una proteína de la envoltura retroviral y contra un receptor específico de célula. Los anticuerpos se acoplaron mediante los componentes de biotina utilizando estreptavidina (Roux *et al.*, 1989). Utilizando anticuerpos contra los antígenos de clase I y clase II del complejo de histocompatibilidad mayor se ha demostrado la infección de una variedad de células humanas que perforan aquellos antígenos superficiales con un virus ecotrópico *in vitro* (Roux *et al.*, 1989).

3. Virus adenoasociados

Los VAA utilizan un ADN monocatenario lineal, de aproximadamente 4700 pares de bases. Repeticiones terminales invertidas flanquean el genoma. Dos genes están presentes en el genoma, que proporcionan un aumento de numerosos productos génicos distintos. El primero, el gen cap, produce tres proteínas de viriones diferentes (VP), designadas VP-1, VP-2 y VP-3. El segundo, el gen rep, codifica cuatro proteínas no estructurales (NS). Uno o más de estos productos del gen rep es responsable de transactivar la transcripción de VAA.

Los tres promotores en VAA se designan por su localización, en unidades cartográficas, en el genoma. Existen, de izquierda a derecha, p5, p19 y p40. La transcripción proporciona un aumento a seis transcritos, dos iniciados en cada uno de los tres promotores, cortándose y empalmándose uno de cada pareja. El sitio de corte y empalme, derivado de las unidades cartográficas 42-46, es el mismo para cada transcrito. Las cuatro proteínas no estructurales se derivan aparentemente del más largo de los transcritos, y surgen tres proteínas de viriones del transcrito más pequeño.

No se ha asociado VAA con ningún estado patológico en seres humanos. De manera interesante, para una replicación eficaz, VAA requiere funciones "auxiliares" de los virus tales como el virus del herpes simple I y II, citomegalovirus, el virus de la pseudorrabia y, por supuesto, adenovirus. El mejor caracterizado de los auxiliares es adenovirus, y se ha mostrado que muchas funciones "iniciales" de este virus ayudan en la replicación del VAA. Se cree que la expresión de bajo nivel de las proteínas rep de VAA mantiene la expresión estructural de VAA en estado de verificación, y se cree que la infección del virus auxiliar elimina este bloque.

Se pueden obtener repeticiones terminales del vector de VAA mediante digestión de la endonucleasa de restricción de VAA o un plásmido tal como p201, que contiene un genoma de VAA modificado (Samulski *et al.*, 1987), o mediante otros métodos conocidos por el experto en la materia, que incluyen, pero no se limitan a síntesis química o enzimática de las repeticiones terminales basadas en la secuencia publicada de VAA. El técnico normalmente experto en la materia puede determinar, mediante métodos bien conocidos tales como el análisis de la delección, la secuencia mínima o parte de los ITR de VAA que se requieren para su función, es decir, la integración estable y específica del sitio. El técnico normalmente experto puede determinar también qué modificaciones menores de la secuencia pueden tolerarse manteniendo a la vez la capacidad de las repeticiones terminales de dirigir la integración estable, específica de sitio.

Los vectores basados en VAA han demostrado ser vehículos seguros y eficaces para la administración del gen *in vitro*, y estos vectores se desarrollan y ensayan en etapas preclínicas y clínicas para un amplio intervalo de aplicaciones en una potencial terapia génica, *ex vivo* e *in vivo* (Carter y Flotte, 1995; Chattexjee *et al.*, 1995; Ferrari *et al.*, 1996; Fisher *et al.*, 1996; Flotte *et al.*, 1993; Goodman *et al.*, 1994; Kaplitt *et al.*, 1994; 1996; Kessler *et al.*, 1996; Koeberl *et al.*, 1997; Mizukami *et al.*, 1996).

La transferencia y expresión génica eficaz mediada por VAA en el pulmón ha conducido a ensayos clínicos para el tratamiento de la fibrosis quística (Carter y Flotte, 1995; Flotte *et al.*, 1993). De manera similar, parece prometedoras las etiquetas para el tratamiento de la distrofia muscular mediante la administración génica mediada por VAA de la distrofina al músculo esquelético, de la enfermedad de Parkinson mediante la administración del gen de la tirosina hidroxilasa al cerebro, de la hemofilia B mediante la administración del gen del Factor IX al hígado, y potencialmente del infarto de miocardio mediante la administración del gen del factor de crecimiento endotelial vascular al corazón, debido a que la expresión del transgén mediada por VAA en estos órganos ha mostrado recientemente ser muy eficaz (Fisher *et al.*, 1996; Flotte *et al.*, 1993; Kaplitt *et al.*, 1994; 1996; Koeberl *et al.*, 1997; McCown *et al.*, 1996; Ping *et al.*, 1996; Xiao *et al.*, 1996).

4. Otros vectores víricos

Se emplean otros vectores víricos como construcciones de expresión en la presente invención. Se emplean vectores derivados de virus tales como de virus vaccinia (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988) virus de la viruela del canario, y virus del herpes. Estos virus ofrecen algunas características para el uso en la transferencia génica en diversas células de mamíferos.

Una vez que la construcción se ha administrado en la célula, el ácido nucleico que codifica el transgén se sitúa y expresa en diferentes sitios. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el transgén se integra de manera estable en el genoma de la célula. Esta integración está en la localización y orientación análogas mediante recombinación homóloga (sustitución del gen) o se integra en una localización aleatoria, no específica (aumento del

gen). En otras realizaciones adicionales, el ácido nucleico se mantiene de manera estable en la célula como un segmento episómico, separado de ADN. Dichos segmentos de ácido nucleico o "episomas" codifican secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y la replicación independiente de o en sincronización con el ciclo de la célula hospedadora. Cómo se administra la construcción de expresión a una célula y cuándo el ácido nucleico que permanece en la célula es dependiente del tipo de construcción de expresión empleada.

V. Potenciación de una respuesta inmunitaria

En determinadas realizaciones, la presente invención contempla una novedosa estrategia de activación de DC que incorpora la manipulación de los polipéptidos coestimuladores de la señalización que activan las rutas NFκB, La ruta Akt, y/o las rutas p38. Este sistema de activación de las DC se puede usar junto con o sin vacunas normalizadas para potenciar la respuesta inmunitaria debido a que sustituye el requerimiento de auxilio de los linfocitos T CD4+ durante la activación (Bennet S.R. *et al.*, 1998; Ridge, J.P. *et al.*, 1998; Schoenberger, S.P., *et al.*, 1998). De esta manera, el sistema de activación de las DC de la presente invención potencia las respuestas inmunitarias evitando la necesidad de la generación de péptidos MHC específicos de clase II.

En realizaciones específicas, la activación de las DC es mediante la activación de CD40. De esta manera, la activación de las DC mediante interacciones CD40/CD40L endógenas puede estar sujeta a la regulación por defecto debida a la retroalimentación negativa, que conduce rápidamente al "efecto de desgaste de IL-12". En 7 a 10 horas después de la activación de CD40, se produce alternativamente una isoforma cortada y empalmada de CD40 (tipo II) como un factor secretable (Tone, M., *et al.*, 2001). CD40 de tipo II puede actuar como receptor negativo dominante, regulando por defecto la señalización a través de CD40L y limitando potencialmente la potencia de la respuesta inmunitaria generada. Por tanto, la presente invención coopta la regulación natural de CD40 creando una forma inducible de CD40 (iCD40), careciendo de dominio extracelular y activado a su vez por ligandos de dimerización sintéticos (Spencer, D.M. *et al.*, 1993) mediante una tecnología denominada dimerización inducida químicamente (CID).

La presente invención comprende un método de potenciar la respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende la etapa de administrar cualquiera del vector de expresión, construcción de expresión o células presentadoras de antígeno transducidas de la presente invención al sujeto. El vector de expresión de la presente invención codifica un polipéptido coestimulador, tales como iCD40.

En determinadas realizaciones, las células presentadoras de antígeno están comprometidas en un animal, tal como un ser humano, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, o roedores. El sujeto es un ser humano, más preferentemente, un paciente que padece una enfermedad infecciosa, y/o un sujeto que está inmunocomprometido, o que padece una enfermedad hiperproliferativa.

En determinadas realizaciones de la presente invención, la construcción de expresión y/o el vector de expresión se pueden utilizar como una composición o sustancia que activa las células presentadoras de antígeno. Dicha composición que "activa las células presentadoras de antígeno" o "potencia la actividad de las células presentadoras de antígeno" se refiere a la capacidad de estimular una o más actividades asociadas con las células presentadoras de antígeno. Dichas actividades son bien conocidas de los expertos en la técnica. Por ejemplo, una composición, tal como una construcción o vector de expresión de la presente invención, puede estimular la regulación en exceso de moléculas coestimuladoras en células presentadoras de antígeno, induce la translocación nuclear de NF-κB en células presentadoras de antígeno, activa los receptores de tipo toll en las células presentadoras de antígeno, u otras actividades que implican citoquinas o quimioquinas.

Una cantidad de una composición que activa las células presentadoras de antígeno que "potencia" una respuesta inmunitaria se refiere a una cantidad donde se observa una respuesta inmunitaria que es mayor o se intensifica o se desvía de cualquier manera con la adición de la composición cuando se compara con la misma respuesta inmunitaria medida sin la adición de la composición. Por ejemplo, se puede medir la actividad lítica de los linfocitos T citotóxicos, por ejemplo, utilizando un ensayo de liberación de ⁵¹Cr, con y sin la composición. La cantidad de la sustancia a la cual se potencia la actividad lítica de los CTL en comparación con la actividad lítica de los CTL sin la composición se dice que es una cantidad suficiente para potenciar la respuesta inmunitaria del animal al antígeno. En una realización preferida, la respuesta inmunitaria está potenciada por un factor de al menos aproximadamente 2, más preferentemente en un factor de aproximadamente 3 o más. La cantidad de citoquinas secretadas puede estar también alterada.

La respuesta inmunitaria potenciada puede ser una respuesta inmunitaria activa o pasiva. Como alternativa, la respuesta puede ser parte de una solución de inmunoterapia adaptativa donde se obtienen células presentadoras de antígeno procedentes de un sujeto (*por ejemplo*, un paciente), a continuación se transducen con una composición que comprende el vector de expresión o una construcción de la presente invención. Las células presentadoras de antígeno se pueden obtener a partir de la sangre del sujeto o de la médula ósea del sujeto. En algunas realizaciones preferidas, las células presentadoras de antígeno se aíslan de la médula ósea. En una realización preferida, las células presentadoras de antígeno se administran al mismo a un animal diferente (*por ejemplo*, el mismo o diferentes donantes). En una realización preferida, el sujeto (*por ejemplo*, un paciente) tiene o es sospechoso de tener un

cáncer, tal como por ejemplo, cáncer de próstata, o tiene o es sospechoso de tener una enfermedad infecciosa. En otras realizaciones, el método de potenciar la respuesta inmunitaria se practica junto con un tratamiento contra el cáncer conocido o cualquier tratamiento conocido para tratar la enfermedad infecciosa.

5 la construcción de expresión, el vector de expresión y/o las células potenciadoras de antígeno conocidas pueden potenciar o contribuir a la eficacia de la vacuna, por ejemplo, potenciando la inmunogenicidad de antígenos más débiles tales como antígenos muy purificados o recombinantes, reduciendo la cantidad de antígeno requerida para una respuesta inmunitaria, reduciendo la frecuencia de inmunización requerida para proporcionar inmunidad protectora, aumentar la eficacia de las vacunas en sujetos con respuestas inmunitarias reducidas o debilitadas, tales como en recién nacidos, individuos de la tercera edad, e inmunocomprometidos, y potenciar la inmunidad en un tejido diana, tal como la inmunidad mucosal, o promover la inmunidad mediada por células o humoral estimulando un perfil de citoquina concreto.

15 Más adicionalmente, un individuo o sujeto comprometido es un sujeto que tiene una respuesta inmunitaria reducida o debilitada. Dichos individuos pueden incluir también un sujeto que ha experimentado quimioterapia o cualquier otra terapia que ha dado como resultado un sistema inmunitario debilitado, un receptor de trasplante, un sujeto que toma actualmente inmunosupresores, un individuo de la tercera edad, o cualquier individuo que tiene células auxiliares T CD4 reducidas y/o dañadas. Se contempla que la presente invención se puede utilizar para potenciar la cantidad y/o la actividad de las células auxiliares T CD4 en un sujeto inmunocomprometido.

20 En realizaciones específicas, antes de administrar la célula presentadora de antígeno transducida, las células se estimulan con antígenos (denominados también en el presente documento "antígenos diana") Tras el estímulo, las células presentadoras de antígeno transducidas cargadas se administran al sujeto parenteralmente, intradérmicamente, intranodalmente, o intralinfáticamente. Las rutas parenterales adicionales incluyen, pero no se limitan a subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intramiocardial, transendocardial, transepicardial, intratecal, y las técnicas de infusión.

25 El antígeno diana, tal como se usa en el presente documento, es un antígeno o un epítipo inmunológico en el antígeno, que es crucial en el reconocimiento inmunitario y en la eliminación, en última instancia, del agente causante de la enfermedad o del estado de enfermedad en un mamífero. El reconocimiento inmunitario puede ser celular y/o humoral. En el caso de patógenos intracelulares y de cáncer, el reconocimiento inmunitario es preferentemente una respuesta de los linfocitos T.

30 El antígeno diana puede obtenerse o aislarse de un microorganismo patógeno, tal como virus que incluyen el VIH, (Korber et al, 1977) la gripe, el herpes simple, el virus del papiloma humano (Patente de los Estados Unidos N° 5.719.054), la hepatitis B (Patente de los Estados Unidos N° 5.780.036), la hepatitis C (Patente de los Estados Unidos N° 5.709.995), el VEB, el citomegalovirus (CMV) y similares. El antígeno diana puede obtenerse o aislarse de bacterias patógenas tales como *Chlamydia* (Patente de los Estados Unidos N° 5.869.608), *Mycobacteria*, *Legionella*, *Meningococcus*, *Streptococcus de grupo A* de, *Salmonella*, *Listeria*, *Hemophilus influenzae* (Patente de los estados Unidos N° 5.955.596) y similares.

35 El antígeno diana se puede derivar o aislar de levaduras patógenas incluyendo *Aspergillus*, *Candida invasiva* (Patente de los Estados Unidos N° 5.645.992), *Nocardia*, *Histoplasmosis*, *Cryptosporidia* y similares.

40 El antígeno diana puede obtenerse o aislarse de protozoos patógenos y parásitos patógenos incluyendo, pero sin limitación, *Pneumocystis carinii*, *Tripanosoma*, *Leishmania* (Patente de los Estados Unidos N° 5.965.242), *Plasmodium* (Patente de los Estados Unidos N° 5.589.343) y *Toxoplasma gondii*.

45 El antígeno diana incluye un antígeno asociado con un estado preneoplásico o hiperplásico. El antígeno diana puede asociarse también con, o ser causante de cáncer. Dicho antígeno diana puede ser un antígeno específico de tumor, antígenos asociados a tumores (TAA) o antígenos específicos de tejidos, sus epítomos, y los agonistas de epítomos de los mismos. Dichos antígenos diana incluyen, pero no se limitan al antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus epítomos tales como CAP-1, CAP-1-6D (46) y similares (N° de acceso al GenBank M29540), MART-1 (Kawakami et al, 1994), MAGE-1 (Patente de los estados Unidos N° 5.750.395), MAGE-3, GAGE (Patente de los Estados Unidos N° 5.648.226), GP-100 (Kawakami et al., 1992), MUC-1, MUC-2, oncogén ras mutado puntualmente, oncogenes p53 mutados normal y puntualmente (Hollstein et al., 1994), PSMA (Israeli et al., 1993), tirosinasa (Kwon et al. 1987) TRP-1 (gp75) (Cohen et al., 1990; Patente de los Estados Unidos N° 5.840.839), NY-ESQ-1 (Chen et al., US 1997), TRP-2 (Jackson et al., 1992), TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erb/B2, (patente de los Estados Unidos N° 5.550.214), BRC-I, BRC-II, bcr-abl, pax3-fkhr, ews-fli-1, modificaciones de los TAA y del antígeno específico de tejido, variantes de corte y empalme de los TAA, agonistas de epítomos, y similares. Se pueden identificar otros TAA, aislarse y clonarse mediante métodos conocidos en la materia tales como los descritos en la Patente de los Estados Unidos N° 4.514.506. El antígeno diana puede incluir también uno o más factores de crecimiento y variantes de corte y empalme de cada uno.

65 Para los organismos que contienen un genoma de ADN. Un gen que codifica un antígeno diana o un epítipo inmunológico del mismo de interés se aísla del ADN genómico. Para organismos con genomas de ARN, el gen

deseado puede aislarse de copias de ADNc del genoma. Si están disponibles cartografías de restricción del genoma, el fragmento de ADN que contiene el gen de interés se escinde por digestión con la endonucleasa de restricción mediante métodos rutinarios en la materia. En casos donde el gen deseado se ha clonado previamente, los genes pueden obtenerse fácilmente de los clones disponibles. Como alternativa, si se conoce la secuencia de ADN del gen, el gen se puede sintetizar mediante cualquiera de las técnicas convencionales para la síntesis de ácidos desoxirribonucleicos.

Se pueden amplificar los genes que codifican un antígeno de interés clonando el gen en un hospedador bacteriano. Con este fin, se pueden usar diversos vectores de clonación procariotas. Los ejemplos son plásmidos pBR322, pUC y pEMBL.

Los genes que codifican al menos un antígeno diana o su epítipo inmunológico pueden prepararse para la inserción en los vectores plásmidos designados para la recombinación con un virus mediante técnicas normalizadas. En general, los genes clonados pueden escindirse del vector de clonación procariota mediante digestión con el enzima de restricción. En la mayor parte de casos, el fragmento escindido contendrá la región de codificación completa del gen. El fragmento de ADN que transporta el gen clonado se puede modificar según sea necesario, por ejemplo, para volver los extremos del fragmento compatibles con los sitios de inserción de los vectores de ADN utilizados para la recombinación con un virus, a continuación purificarse antes de la inserción en los vectores en los sitios de escisión de la endonucleasa de restricción (sitios de clonación).

Se puede conseguir la carga antigénica de células dendríticas con antígenos incubando células dendríticas o células progenitoras con el polipéptido, ADN (puro o en un vector plásmido) o ARN; o con bacterias o virus recombinantes que expresan antígeno (*por ejemplo*, vaccinia, virus de la viruela aviar, adenovirus o vectores lentivíricos). Antes de la carga, el polipéptido puede conjugarse covalentemente con un ligando inmunológico que proporciona linfocitos T auxiliares (*por ejemplo*, una molécula transportadora). Como alternativa, se puede pulsar una célula dendrítica con un ligando inmunológico no conjugado, por separado o en presencia del polipéptido. Antígenos procedentes de células o MHC, se pueden obtener moléculas mediante elución ácida u otros métodos conocidos en la materia (véase Zitvogel *et al.*, 1996).

Un experto en la materia es plenamente consciente de que la activación de la molécula coestimuladora de la presente invención se basa en la oligomerización de los dominios de unión a ligando, por ejemplo CID, para inducir su actividad. En realizaciones específicas, el ligando no es una proteína. Más específicamente, el ligando es FK506 dimérico o los análogos diméricos de FK506, que dan como resultado una potenciación o la regulación positiva de la respuesta inmunitaria. El uso de FK506 monomérico o de los análogos monoméricos de FK506 da como resultado la inhibición o reducción en la respuesta inmunitaria negativamente.

Los linfocitos T se activan por contacto con la célula presentadora de antígeno que comprende el vector de expresión de la presente invención y se ha estimulado, transfectado, pulsado, o electrofusionado con un antígeno.

La electrofusión en la presente invención es un método para generar células híbridas. Existen algunas ventajas en la producción de híbridos celulares mediante electrofusión. Por ejemplo, se pueden controlar electrónicamente de manera fácil y precisa los parámetros de fusión para las condiciones dependientes de las células que se van a fusionar. Además, la electrofusión de células ha mostrado la capacidad de aumentar la eficacia de fusión sobre esta o la fusión por medios químicos o mediante fusógenos biológicos. La electrofusión se lleva a cabo aplicando pulsos eléctricos a las células en suspensión. Exponiendo las células a un campo eléctrico alternante, las células se acercan entre sí formando cadenas de perlas en un proceso denominado alineación mediante dielectroforesis. Los pulsos posteriores con un voltaje mayor producen que las células entren en un contacto más estrecho, se forman electroporos reversibles en la en la descomposición reversible permeabilizante y mecánica de las membranas celulares, dando como resultado la fusión.

Los linfocitos T expresan un único receptor de unión a antígeno en su membrana (receptor de linfocitos T), que puede reconocer el antígeno solo con moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) sobre la superficie de otras células. Existen algunas poblaciones de linfocitos T, Tales como los linfocitos T auxiliares y los linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T auxiliares y los linfocitos T citotóxicos se distinguen principalmente por su expresión de las glicoproteínas CD4 y CD8 de unión a membrana, respectivamente. Los linfocitos T auxiliares secretan varias linfocinas, que son cruciales para la activación de los linfocitos B, linfocitos T citotóxicos, macrófagos y otras células del sistema inmunitario. Por el contrario, un linfocito T CD8 no expuesto anteriormente reconoce un antígeno-complejo MHC que prolifera y se diferencia en una célula efectora denominada un linfocito T CD8 (CTL). Los CTL eliminan células del cuerpo que expresan el antígeno, tales como células infectadas por virus y células tumorales, produciendo sustancias que dan como resultado la lisis celular.

Se puede evaluar la actividad de los CTL mediante métodos descritos en el presente documento o como conocería una persona experta en la materia. Por ejemplo, pueden evaluarse los CTL en células mononucleares aisladas recientemente de sangre periférica (PBMC), en la línea células expandida mediante IL-2 estimulada por fitohemaglutinina a partir de PBMC (Bernard *et al.*, 1998) o por linfocitos T aislados de un sujeto previamente inmunizado y reestimulados durante 6 días con DC infectadas con un vector de adenovirus que contiene antígeno

utilizando ensayos normalizados de microtoxicidad de liberación de ^{51}Cr durante 4 h. Un tipo de ensayo utiliza linfocitos T clonados. Se han ensayado linfocitos T clonados para su capacidad de mediar la perforina y la destrucción dependiente del ligando Fas en los ensayos de citotoxicidad redirigida (Simpson *et al.*, 1998). Los linfocitos T citotóxicos clonados expresaron destrucción dependiente de Fas y perforina. Recientemente, se ha desarrollado el ensayo de liberación de la deshidrogenasa in vitro que toma ventaja de un nuevo sistema de amplificación fluorescente (Page *et al.*, 1998). Esta solución es sensible, rápida, y reproducible y se puede usar ventajosamente para la reacción mixta de linfocitos (MLR). Puede automatizarse además fácilmente para ensayos de citotoxicidad a gran escala usando la integridad de la membrana celular, y de esta manera se considera en la presente invención. En otro ensayo fluorométrico desarrollado para detectar la citotoxicidad mediada por célula, el fluoróforo usado es la molécula no tóxica AlamarBlue (Nociari *et al.*, 1998). El AlamarBlue se inactivó fluorescentemente (es decir, bajo rendimiento cuántico) hasta que se produce la reducción mitocondrial que da a continuación como resultado un drástico aumento en la intensidad de la fluorescencia del AlamarBlue (es decir, un aumento en el rendimiento cuántico). Se ha notificado que este ensayo es extremadamente sensible, específico y requiere un número significativamente menor de células efectoras que el ensayo de liberación normalizado de ^{51}Cr .

Otras células inmunitarias que se inducen por la presente invención incluyen linfocitos citolíticos naturales (NK). Los NK son células linfáticas que carecen de receptores específicos de antígeno y son parte del sistema inmunitario innato. Normalmente, las células infectadas son destruidas usualmente por los linfocitos T alistados por partículas extrañas unidas a la superficie celular de las MHC. Sin embargo, las células infectadas por virus señalizan la infección expresando proteínas víricas que son reconocidas por anticuerpos. Estas células pueden ser destruidas por los NK. En células tumorales, si las células tumorales pierden la expresión de las moléculas MHC I a continuación pueden ser susceptibles a los NK.

En realizaciones adicionales, la célula presentadora de antígeno transducida se transfecta con el ARNm de una célula tumoral. La célula presentadora de antígeno transfectada transducida se administra a un animal para afectar la respuesta inmunitaria de los linfocitos T citotóxicos y del antígeno antitumoral de los linfocitos citolíticos naturales y se regula usando FK506 dimérico y análogos de FK506 diméricos. El ARNm de la célula tumoral es ARNm procedente de una célula de tumor de próstata.

Más adicionalmente, la célula presentadora de antígeno transducida se pulsa con lisados tumorales celulares. Las células presentadoras de antígeno transducidas pulsadas se administran a un animal para afectar la respuesta inmunitaria del antígeno antitumoral de los linfocitos citolíticos naturales y los linfocitos T citotóxicos y se regula usando FK506 dimérico y análogos de FK506 diméricos. Los lisados celulares tumorales son lisados celulares de tumor de próstata.

VI. Formulaciones y rutas para la administración a pacientes

Cuando se contemplan aplicaciones clínicas, será necesario preparar composiciones farmacéuticas- construcciones de expresión, vectores de expresión, proteínas fusionadas, células transducidas, DC activadas, DC transducidas y cargadas--en una forma adecuada para la aplicación prevista. En general, esto conllevará preparar composiciones que estén esencialmente exentas de pirógenos, así como de otras impurezas que podrían ser perjudiciales para seres humanos o animales.

Se desea generalmente emplear sales y tampones adecuados para volver los vectores de administración estables y permitir la captación por células diana. Se emplearán también tampones cuando se introduzcan células recombinantes en un paciente. Las composiciones acuosas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz del vector para las células, disuelto o disperso en un transportador o medio acuoso farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones se denominan también inóculos. La frase "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen reacciones adversas, alérgicas, u otras reacciones no deseadas cuando se administran a un animal o a un ser humano. "Vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida donde cualquier medio o agente convencional es incompatible con los vectores o células de la presente invención, está contemplado su uso en las composiciones terapéuticas. Pueden incorporarse también principios activos suplementarios en las composiciones.

Las composiciones activas de la presente invención pueden incluir preparaciones farmacéuticas clásicas. La administración de estas composiciones de acuerdo con la presente invención será mediante cualquier ruta común siempre que el tejido diana esté disponible mediante esta ruta. Esto incluye la administración oral, nasal, bucal, rectal, vaginal o tópica. Como alternativa, la administración puede ser ortotópica, mediante inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa. Dichas composiciones se administrarán normalmente como composiciones farmacéuticamente aceptables, descritas más arriba.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación en otro momento de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos

los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la extensión en que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse por medio de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutano, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares y cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir mediante el uso de composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monostearato de aluminio y gelatina.

Para administración oral, las composiciones de la presente invención pueden incorporarse con excipientes y usarse en la forma de enjuagues bucales y dentífricos no ingeribles. Puede prepararse un enjuague bucal incorporando el principio activo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado, tal como una solución de borato de sodio (Solución Dobell). Como alternativa, el principio activo puede incorporarse en un enjuague antiséptico que contiene borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio. El Principio activo puede también dispersarse en dentífricos, incluyendo: geles, pastas, polvos y suspensiones. El principio activo puede añadirse en una cantidad terapéuticamente eficaz a una pasta dentífrica que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes, agentes espumantes, y humectantes.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse en forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o dichos ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Pueden derivarse también sales formadas con los grupos carboxilo libres de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, hierro, y dichas bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

Tras la formulación, se administrarán soluciones de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos y similares. Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido se vuelve en primer lugar isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas concretas son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En esta línea, los medios acuosos estériles, que se pueden emplear, serán conocidos por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación podría disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y se añade a 1000 ml de fluido de hipodermocilisis o se inyecta en el sitio propuesto de la infusión, (véase por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo de la dolencia del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para el sujeto individual. Además, para la administración humana, las preparaciones deben cumplir la esterilidad, la pirogenicidad, y la seguridad y los estándares de pureza generales que se requieren por la FDA Office of Biologics standards.

VII. Métodos para tratar una enfermedad

La presente invención abarca también métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad producida por microorganismos patógenos y/o una enfermedad hiperproliferativa.

Las enfermedades que pueden tratarse o prevenirse mediante el uso de la presente invención incluyen enfermedades producidas por virus, bacterias, levaduras, parásitos, protozoos, células cancerosas y similares. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención (DC transducidas, vectores de expresión, construcciones de expresión, etc.) pueden usarse como potenciadores inmunitarios generalizados (composición o sistema activador de las DC) y como tales tienen utilidad en el tratamiento de enfermedades. La enfermedad ilustrativa que se puede tratar y/o prevenir utilizando la composición farmacéutica de la presente invención incluye, pero no se limita a infecciones de etiología vírica tales como VIH, gripe, herpes, hepatitis vírica, Epstein Bar, polio, encefalitis vírica, sarampión, varicela, Virus del papiloma etc.; o infecciones de etiología bacteriana tales como neumonía, tuberculosis, sífilis, etc.; o infecciones de etiología parasítica tales como malaria, tripanosomiasis, leishmaniosis, trichomoniasis, amebiasis, etc.

Los estados preneoplásicos o hiperplásicos que se pueden tratar o prevenir usando la composición farmacéutica de la presente invención (DC transducidas, vectores de expresión, construcciones de expresión, etc.) incluyen, pero no se limitan a estados preneoplásicos o hiperplásicos tales como pólipos en el colon, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lesiones de mama y similares.

Los cánceres que se pueden tratar usando la composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a melanoma primario o metastásico, adenocarcinoma, carcinoma espinocelular, carcinoma celular adenoescamoso, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemia, cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, 5 cáncer de colon, mieloma múltiple, neuroblastoma, NPC, cáncer de vejiga, cáncer de cuello de útero y similares.

otras enfermedades hiperproliferativas que se pueden tratar usando el sistema de activación de las DC de la presente invención incluyen, pero no se limitan a artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, osteoartritis, leiomiomas, adenomas, lipomas, hemangiomas, fibromas, oclusión vascular, restenosis, 10 aterosclerosis, lesiones preneoplásicas (tales como hiperplasia adenomatosa y neoplasia intraepitelial prostática), carcinoma *in situ*, leucoplaquia pilosa oral, o psoriasis.

En el método de tratamiento, la administración de la composición farmacéutica (construcción de expresión, vectores de expresión, proteínas fusionadas, células transducidas, DC activadas, DC transducidas y cargadas) de la 15 invención puede ser para cualquier fin "profiláctico" o "terapéutico". Cuando se proporciona profilácticamente, la composición farmacéutica de la presente invención se proporciona por adelantado a cualquier síntoma. La administración profiláctica de la composición farmacéutica sirve para prevenir o mejorar cualquier infección o enfermedad posterior. Cuando se proporciona terapéuticamente, la composición farmacéutica se proporciona en o después del inicio de un síntoma de la infección o enfermedad. De esta manera, se puede proporcionar la presente 20 invención antes de la exposición anticipada a un agente causante de enfermedad o estado de enfermedad o tras el inicio de la infección o enfermedad.

La expresión "dosis unitaria" referente al inóculo, se refiere a unidades físicamente distintas adecuadas como 25 dosificaciones unitarias para mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de composición farmacéutica calculada para producir el efecto inmunogénico deseado en asociación con el diluyente requerido. Las especificaciones para la novedosa dosis unitaria de un inóculo de la presente invención están dictadas por y son dependientes de las características únicas de la composición farmacéutica y del efecto inmunológico concreto que se va a conseguir.

Una cantidad eficaz de la composición farmacéutica sería la cantidad que consigue este resultado seleccionado de 30 potenciar la respuesta inmunitaria, y dicha cantidad podría determinarse como materia rutinaria por una persona experta en la materia. Por ejemplo, una cantidad eficaz para tratar una deficiencia en el sistema inmunitario podría ser la cantidad necesaria para producir la activación del sistema inmunitario, dando como resultado el desarrollo de una respuesta inmunitaria específica de antígeno tras la exposición al antígeno. El término es también sinónimo de 35 "cantidad suficiente".

La cantidad eficaz para cualquier aplicación concreta puede variar dependiendo de dichos factores como la 40 enfermedad o dolencia que se está tratando, la composición concreta que se está administrando, el tamaño del sujeto, y/o la gravedad de la enfermedad o dolencia. Una persona normalmente experta en la materia puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de una composición concreta de la presente invención sin necesitar experimentación innecesaria.

A. Terapias basadas en genética

Específicamente, los presentes inventores pretenden proporcionar, a una célula, una construcción de expresión 45 capaz de proporcionar un polipéptido coestimulador, tal como CD40 a la célula, tal como una célula presentadora de antígeno y que activa CD40. Los vectores de expresión particularmente preferidos son vectores víricos tales como adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, virus vaccinia y retrovirus. Se prefiere también un vector de expresión encapsulado en lisosomas. 50

Los expertos en la materia estarán atentos a cómo aplicar la administración génica a situaciones *in vivo* y *ex vivo*. Para vectores víricos, se preparará generalmente una disolución madre de vector vírico. Dependiendo del tipo de virus y del título alcanzable, se administrarán 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} o 55 10×10^{12} partículas infecciosas al paciente. Se pueden extrapolar figuras similares para las formulaciones liposómicas u otras no víricas comparando eficacias de captación relativas. Se describe a continuación una formulación como una composición farmacéuticamente aceptable.

B. Terapia basada en células

Otra terapia que se contempla es la administración de células presentadoras de antígeno transducidas. Las células 60 presentadoras de antígeno pueden transducirse *in vitro*. Se ha descrito anteriormente la formulación como una composición farmacéuticamente aceptable.

En terapias basadas en células, las células presentadoras de antígeno transducidas pueden transfectarse con 65 ácidos nucleicos de antígenos diana, tales como ARNm o ADN o proteínas; pulsadas con lisados celulares, proteínas o ácidos nucleicos; o electrofusionadas con células. Las células, proteínas, lisados de células, o ácidos

nucleicos pueden derivarse de células, tales como células tumorales u otros microorganismos patógenos por ejemplo, virus, bacterias, protozoos, *etc.*

C. Tratamientos combinados

5 A fin de aumentar la eficacia del vector de expresión de la presente invención, puede ser deseable combinar estas composiciones y métodos de la invención con un agente eficaz en el tratamiento de la enfermedad.

10 En determinadas realizaciones, se pueden usar agentes anticancerosos en combinación con la presente invención. Un agente "anticanceroso" es capaz de afectar negativamente el cáncer en un sujeto, por ejemplo, destruyendo una o más células cancerosas, induciendo la apoptosis en una o más células cancerosas, reduciendo la tasa de crecimiento de una o más células cancerosas, reduciendo la incidencia del número de metástasis, reduciendo el tamaño de un tumor, inhibiendo el crecimiento de un tumor, reduciendo el suministro de sangre a un tumor o a una o más células cancerosas, promoviendo una respuesta inmunitaria contra una o más células cancerosas o un tumor, previniendo o inhibiendo la progresión de un cáncer, o aumentando el lapso de vida de un sujeto con un cáncer. los agentes anticancerosos incluyen, por ejemplo, agentes de quimioterapia (quimioterapia), agentes de radioterapia (radioterapia), un procedimiento quirúrgico (cirugía), agentes inmunoterapéuticos (inmunoterapia), agentes de terapia génica (terapia génica), tratamiento hormonal, otros agentes biológicos (bioterapia) y otros tratamientos alternativos.

20 En realizaciones adicionales se pueden usar antibióticos en combinación con la composición farmacéutica de la presente invención para tratar y/o prevenir una enfermedad infecciosa. Dichos antibióticos incluyen, pero no se limitan a: amikacina, aminoglicósidos (por ejemplo., gentamicina), amoxicilina, anfotericina B, ampicilina, antimoniales, atovacuona de sodio estibogluconato, azitromicina, capreomicina, cefotaxima, cefoxitina, ceftriaxona, cloranfenicol, claritromicina, clindamicina, clofazimina, cicloserina, dapsona, doxiciclina, etambutol, etionamida, fluconazol, fluoroquinolonas, isoniazid, itraconazol, kanamicina, ketoconazol, minociclina, ofloxacina), ácido para-aminosalicílico, pentamidina, polimixin definsinas, protionamida, pirazinamida, pirimetamina sulfadiazina, quinolonas (*por ejemplo*, ciprofloxacina), rifabutina, rifampina, esparfloxacina, estreptomycin, sulfonamidas, tetraciclinas, tiacetazona, trimetaprim-sulfametoxazol, viomicina o sus combinaciones.

30 De forma más general, dicho agente se proporcionará en una cantidad combinada con el vector de expresión eficaz para destruir o inhibir la proliferación de una célula cancerosa y/o microorganismo. Este proceso puede implicar poner en contacto las célula(s) con agente(s) y la composición farmacéutica de la presente invención al mismo tiempo o en un periodo de tiempo donde la administración separada de la composición farmacéutica de la presente invención y un agente a una célula, tejido u organismo produce un beneficio terapéutico deseado. Esto se consigue poniendo en contacto la célula, tejido u organismo con una sola composición o formulación farmacéutica que incluye tanto la composición farmacéutica de la presente invención como uno o más de los agentes, o poniendo en contacto la célula con dos o más composiciones o formulaciones, en donde una composición incluye la composición farmacéutica de la presente invención y la otra incluye uno o más agentes.

40 La expresión "puesta en contacto" y el término "exposición", cuando se aplican a una célula, tejido u organismo, se usan en el presente documento para describir el proceso mediante el cual la composición farmacéutica y/o el otro agente, tal como, por ejemplo, un agente quimioterapéutico o radioterapéutico, se suministran a una célula diana, tejido u organismo o se colocan en yuxtaposición directa con la célula diana, tejido u organismo. Para conseguir la destrucción o estasia celular, la composición farmacéutica y/o los agentes adicionales se suministran a una o más células en una cantidad combinada eficaz para destruir la(s) célula(s) o impedir su división.

50 La administración de la composición farmacéutica puede preceder, ser concurrente con y/o seguir el otro agente(s) mediante intervalos comprendidos de minutos a semanas. En realizaciones donde la composición farmacéutica de la presente invención, y los otros agente(s) se aplican independientemente a una célula, tejido u organismo, se garantizaría generalmente que no expire un periodo de tiempo significativo entre los tiempos de cada administración, de forma que la composición farmacéutica de la presente invención y los agente(s) siguieran pudiendo ejercer un efecto ventajosamente combinado en la célula, tejido u organismo. Por ejemplo, en dichos casos, se contempla que se puede poner en contacto la célula, tejido u organismo con dos, tres, cuatro o más modalidades sustancialmente simultáneas (*es decir*, en menos de aproximadamente un minuto) a medida que la composición farmacéutica de la invención. En otros aspectos, se pueden administrar uno o más agentes en desde sustancialmente simultáneamente, aproximadamente 1 minuto, a aproximadamente 24 horas a aproximadamente 7 días a aproximadamente 1 a aproximadamente 8 semanas o más, y cualquier intervalo derivable de ellos, antes de y/o después de la administración del vector de expresión. Más adicionalmente, se pueden emplear varios regímenes de la composición farmacéutica de la presente invención y uno o más agentes.

VIII. Animales transgénicos

65 Se describen en el presente documento métodos detallados para generar animales transgénicos no humanos. Se puede utilizar cualquier animal no humano en los métodos descritos en el presente documento. Los mamíferos preferidos son roedores, *por ejemplo*, ratas o ratones.

Un ratón transgénico describe un ratón que tiene genes de otro organismo insertados en su genoma mediante técnicas de ADN recombinante. El ratón transgénico puede incluir material de un organismo no relacionada, tal como un virus, planta, o ser humano. De esta manera, en una realización ilustrativa, los "animales transgénicos no humanos" de la invención se producen mediante la introducción de transgenes en la línea germinal del animal no humano.

La introducción del transgén en el embrión se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica tal como, por ejemplo, microinyección, electroporación, o lipofección. Por ejemplo, el gen CD40 se puede introducir en un mamífero mediante microinyección de la construcción en el pronúcleo de los ovario(s) fertilizado(s) para hacer que una o más copias de la construcción se retenga en las células del mamífero o mamíferos en desarrollo. Tras la introducción de la construcción del transgén en el ovario fertilizado, el ovario se puede incubar *in vitro* para cantidades variables de tiempo, o reimplantarse en el hospedador derivado, o ambas. Se describe la incubación *in vitro* hasta la madurez. Un método habitual es incubar los embriones *in vitro* durante aproximadamente 1-7 días, dependiendo de la especie, y después reimplantarlos en el hospedador derivado.

Las células embrionarias diana en diferentes estadios del desarrollo también se pueden utilizar para inducir transgenes. Se utilizan diferentes métodos dependiendo del estadio del desarrollo de la célula embrionaria diana. La línea o líneas específicas de cualquier animal utilizado para llevar a la práctica la presente invención se seleccionan por su buen estado de salud general, buenos rendimientos embrionarios, buena visibilidad pronuclear del embrión, y buena estructura reproductiva. Además, el haplotipo es un factor significativo.

Los embriocitoblastos, a veces denominados células ES, se derivan de la masa celular interna (ICM) de ovarios fertilizados en la fase de blastocito, y se pueden cultivar y mantener *in vitro* en un estado no diferenciado. Los embriocitoblastos son materiales biológicos muy útiles para preparar animales transgénicos. Por ejemplo, un ratón inactivado génicamente donde se ha inactivado un gen específico se puede producir mediante sustitución de un gen activo en el cromosoma del embriocitoblasto por un gen inactivado mediante un sistema de recombinación homólogo.

La progenie de los embriones manipulados transgénicamente se puede someter a ensayo para determinar la presencia de la construcción CD40 por análisis mediante transferencia Southern del segmento de tejido. Si una o más copias de la construcción exógena clonada siguen estando integradas de forma estable en el genoma de dichos embriones transgénicos, es posible establecer líneas permanentes de mamíferos transgénicos que incluyen la construcción añadida transgénicamente.

La camada de los mamíferos genéticamente alterados se puede someter a ensayo después del nacimiento para determinar la incorporación de la construcción en el genoma de la progenie. Preferentemente, este ensayo se lleva a cabo hibridando una sonda correspondiente a la secuencia de ADN que codifica el producto deseado de proteína recombinante o un segmento de la misma del material cromosómico de la progenie. Dicha progenie del mamífero donde se ha descubierto al menos una copia de la construcción incluida en su genoma se hace crecer hasta su madurez.

Se pueden producir ratones transgénicos que contienen un vector de expresión que comprende una secuencia promotora de polinucleótido, una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio citoplásmico CD40 y una secuencia de polinucleótidos que codifica una región de unión a ligando dimérica, unido todo operativamente. Estos ratones se pueden usar para obtener células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas, que expresan el dominio citoplásmico CD40.

IX. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se han incluido para demostrar realizaciones preferidas de la presente invención. Las personas expertas en la materia deberán apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos siguientes representan técnicas y composiciones descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención, y, por tanto, se puede considerar que constituyen los modos preferidos para su práctica.

EJEMPLO 1

Desarrollo de técnicas para un aislamiento eficaz de DC

Médula ósea procedente de tibias y fémures de ratones C57BL/6 se cultivó en RPMI suplementado con GM-CSF e IL-4 (Inaba, K. *et al.*, 1992). Los cultivos de médula ósea se mantuvieron durante un total de 6 días en placas de 24 pocillos donde la mitad de cada uno se rellenó con medio fresco y citocinas en el día 3. El día final del cultivo, las células se lavaron de las placas, se incubaron simultáneamente con perlas anti-CD11c (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), y se aplicaron a dos columnas magnéticas consecutivas. Las DC esplénicas se sometieron a purificación con microperlas inmediatamente después del tratamiento con colagenasa del tejido esplénico. Basándose en el análisis por citometría de flujo, la pureza DC de la suspensión de células final fue consistentemente > 95 % para las DC derivadas de médula ósea y >80 % para las DC esplénicas.

EJEMPLO 2**Desarrollo de técnicas para una electrofusión celular eficaz**

5 Dos poblaciones de linfocitos T Jurkat se tiñeron individualmente con diferentes colorantes lipófilos, que fluorescen a diferentes longitudes de onda (DiI y DiO). Estas poblaciones de células se mezclaron y se fusionaron con el instrumento de electrofusión BTX2001 a diferentes voltajes de CA. La eficacia de la fusión se analizó mediante citometría de flujo. La electrofusión de las células Jurkat TAg usando un voltaje de 275 V de CA generaron rendimientos de híbridos viables de aproximadamente el 60 %.

10

EJEMPLO 3**Construcción de un vector CD40 inducible**

15 Se produjo un receptor CD40 inducible basado en la dimerización químicamente inducida (CID) y modelada según la activación endógena de CD40 para dirigirse especialmente a las DC (Figura 1A). El receptor CD40 recombinante, denominado iCD40, se diseñó mediante rt-PCR amplificando el dominio de señalización citoplasmático de 228 pb de CD40 a partir de DC derivadas de médula ósea purificada de murino (> 95 % CD11c+) y subclonando el fusión de ADN resultante tanto en dirección 3' (*es decir*, M-FvFvlsCD40-E) o en dirección 5' (M-CD40-FvFvls-E) de copias en tándem del dominio de unión al fármaco dimerizante, FKBP12(V36) (Figura 1B). La localización en la membrana se consiguió con un dominio dirigido a la miristoilación (M) y se incluyó una etiqueta HA en el epítipo (E) para facilitar la identificación. Para determinar si los transcritos podían activar NFκB, las construcciones se transfectaron transitoriamente en las células Jurkat T y se llevaron a cabo ensayos indicadores de NFκB en presencia del fármaco dimerizador titulado, AP20187 (Figura 1C). La Figura 1C mostró que niveles crecientes de AP20187 dieron como resultado una regulación en exceso de la actividad transcripcional de NFκB significativa en comparación con el vector de control, M-FvFvls-E, que carece de la secuencia CD40. Puesto que la versión próxima a la membrana de iCD40, M-CD40-FvFvls-E, era menos sensible a AP20187 en este sistema de ensayo, se utilizó la construcción M-FvFvlsCD40-E en los estudios posteriores, y hasta el momento se ha denominado como "iCD40". Esta decisión estuvo reforzada por la estructura cristalográfica de la cola citoplásmica de CD40, que reveló una conformación en horquilla que podría alterarse perjudicialmente mediante la fusión de una proteína heteróloga a su extremo carboxilo (Ni 2000). Los datos también mostraron una fuerte supresión del fármaco a más de 100 nM, posiblemente debida a la saturación de los dominios de unión al fármaco. Este mismo fenómeno se había observado en otros tipos celulares que expresan niveles limitantes del receptor iCD40. Estos resultados sugieren que iCD40 podía inducir la translocación nuclear dependiente de CID del factor de transcripción de NFκB.

35

Una vez que el virus Ad-iCD40-GFP demostró que transducía satisfactoriamente las células 293T e inducía la expresión de los transgenes iCD40 y GFP, las células dendríticas derivadas de médula ósea se transdujeron con eficacias comprendidas entre 25-50 % en condiciones exentas de suero. Los resultados han demostrado que las DC primarias que expresan iCD40 mostraban una regulación en exceso de los marcadores de la maduración (por ejemplo, CD86, CD40) y una capacidad mejorada para sintetizar la citoquina IL-12 cuando se trata con CID. Además, las DC primarias que expresan iCD40 tratadas con CID sobrevivieron más tiempo en cultivo y pudieron inducir una respuesta CTL *in vivo* más sólida comparada con las DC no transducidas y las DC de control transducidas con Ad-GFP.

40

EJEMPLO 4**Fusión celular**

50 La línea celular de cáncer de próstata murino TRAMP-C2 se cultivó en medio con elevada concentración de glucosa con insulina y DHT y con el colorante Cell Tracker Green (CMFDA, Molecular Probes, Eugene, OR). Las DC aisladas que se tiñeron con el colorante Cell Tracker Orange (CMTMR, Molecular Probes, Eugene, OR) se fusionaron a células TRAMP-C2 irradiadas con g usando el instrumento BTX Electro-Cell Manipulator 2001 (Genetronics, San Diego, CA), que aplica una corriente alterna para dimerizar células en el centro de un campo eléctrico. A continuación se libera un pulso de corriente directa de alto voltaje que fusiona las membranas de las células dimerizadas, sometiendo las células a condiciones fusogénicas rigurosas durante periodos de tiempo más cortos, y produciendo mayores rendimientos de los híbridos que la fusión convencional en polietilenglicol. A pesar de estar irradiadas, las células híbridas sobrevivieron varios días.

55

EJEMPLO 5

60

Ensayo con CTL/IFN-γ

65 Esplenocitos y 4-6 ganglios linfáticos se incubaron con células TRAMP-B7 tratadas con mitomicina C (y lavadas 8X) (obtenidas de Jim Allison, UCB). Después de 7 días, los linfocitos T expandidos/viables se purificaron mediante Ficoll y se estimularon por segunda vez con TRAMP-C2-B7. Después de 7 días más, diluciones de células de TRAMP-C2 (preincubadas durante 2 días con 1 ng/ml de IFN-γ para estimular MHC) se incubaron con linfocitos T y se

analizaron para determinar la producción de IFN- γ *de novo*. Como alternativa, las células diana se precargaron con ^{51}Cr para ensayos CTL auténticos.

EJEMPLO 6

Determinar si la activación de iCD40 *in situ* puede aumentar la inmunidad antitumoral

Células DC cultivadas en proliferación se transdujeron con adenovirus que expresaba iCD40 y después se fusionaron con células TRAMP-C2 irradiadas, como anteriormente. Para puntos temporales de 6 h, el heterocarionte DC:TRAMP se mantuvo en medio de cultivo suplementado con el dimerizador AP20187 durante 6 horas antes de la preparación y administración de la vacuna. Para el resto de puntos temporales CID (0, 6, 12 y 24 h después de la vacunación), el dimerizador AP20187 se suministró a ratones vacunados y de control mediante inyección i.p. Un grupo de control adicional recibió híbridos DC/iCD40:TRAMP pero no CID. Dos semanas después de una vacuna de refuerzo, los ratones se estimularon con 2×10^6 células TRAMP-C2 como antes por vía s.c. La eficacia de la estimulación de iCD40 *in situ* versus *in vitro* se correlaciona con las mediciones de incidencia del tumor y el tamaño y mediante los ensayos CTL tras la vacunación con DC/iCD40:tumor en presencia o ausencia de CID.

EJEMPLO 7

Transfección de DC con ARNm de células tumorales

Usando los métodos de Gilboa y colaboradores (Gilboa, *et al.*, 1998; Boczkowski, *D.*, *et al.*, 1996), los ADNc preparados a partir de células TRAMP-C2 se amplificaron y se subclonaron en un vector de expresión. Tras su transcripción en un lisado de reticulocitos, el ARNm se purificó usando un cebador poli-T y separación con perlas magnéticas. Numerosos protocolos de transfección basados en lípidos (por ejemplo, FuGene6, Superfectin) están actualmente disponibles, y se usó el método más eficaz basado en transfecciones de control de DC recientemente amplificadas usando un plásmido indicador.

EJEMPLO 8

Pulsado de DC con péptidos de células tumorales

Para aumentar la posibilidad de transferir péptidos derivados de tumores relevantes, que puedan unirse a moléculas MHC, las DC se pulsaron con péptidos derivados de células TRAMP-C2. Como los niveles de MHC son muy bajos en las células derivadas de TRAMP cultivadas, los niveles de MHC en las células tumorales se reforzaron usando 5 ng/ml de IFN- γ de murino. Los péptidos derivados de MHC se purificaron mediante HPLC y MHC tratado con ácido usando métodos anteriormente descritos (Nair, S.K. *et al.*, 1997). Finalmente, las DC se trataron inicialmente con un péptido transportador TAP de sentido contrario para aumentar la densidad de MHC "vacío" sobre la superficie, como se ha descrito anteriormente (Nair, S.K. *et al.*, 1996).

EJEMPLO 9

Pulsado de DC con otros antígenos

La inmunoterapia específica activa usando vacunas compuestas por HSPPC-96 derivadas de tumor aislado de murino se demostró contra tumores murinos (Tamura, Y. *et al.*, 1997). El propio gp96 es no polimórfico pero actúa como chaperona para los péptidos inmunógenos estrechamente unidos, que se cree representan el repertorio celular completo de inmunógenos. De esta manera, las proteínas gp96 se purificaron usando una columna de afinidad y se usaron para cebar las DC.

EJEMPLO 10

iCD40 activa NF κ B en las DC

La respuesta fisiológica de iCD40 se evaluó en la línea DC inmadura, D2SC/1 (Lutz 1994), que mantiene un fenotipo estable durante periodos de cultivo prolongados. El uso de esta línea de DC evita los efectos de maduración simultáneos que frecuentemente se producen espontáneamente en DC primarias en las condiciones de cultivo típicas. iCD40 se subclonó en un vector bicistónico que expresaba simultáneamente el gen Neo^R y el vector resultante se electroporó en células D2SC/1. Las D2SC/1 DC que expresan de forma estable el transgén iCD40 se seleccionaron por cultivo mediante G418, y se derivaron líneas clónicas mediante dilución limitante. El cribado mediante sondeo para detectar la etiqueta HA del epítipo permitió seleccionar los clones D2SC/1 DC que expresaban niveles elevados (Hi), intermedios (Int), y bajos (Lo) de iCD40 (iCD40 DC) para análisis posterior (Figura 2A). Se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia adicionales para verificar la localización de iCD40 en la membrana (Figura 2B).

Se llevaron a cabo ensayos indicadores en estas líneas celulares para determinar si iCD40 también podía inducir la activación de NF κ B en las DC. Concentraciones crecientes de AP20187 dieron como resultado un aumento consistente de la actividad de NF κ B que se reflejó adicionalmente en los niveles de expresión del transgén mediante las respectivas líneas DC (Figura 2C). Varios estudios han identificado que la subunidad RelB de NF κ B desempeña un papel significativo en el programa de maduración de las DC (Pettit 1997; Martin 2003). De hecho, la ubicación nuclear de RelB se correlaciona con el estado maduro de las DC y las DC RelB^{-/-} mostraron un fenotipo constitutivamente inmaduro. Por tanto, como marcador derivado de la activación de DC, la translocación nuclear de RelB se analizó mediante transferencia Western en las DC iCD40 expuestas a diluciones logarítmicas de AP20187 (Figura 2D). Resultados adicionales confirmaron adicionalmente que iCD40 desencadenó la translocación nuclear de RelB expresado en DC de forma dependiente de CID.

La potencia de activación de las DC para iCD40 se comparó con otros estímulos tradicionales de maduración de las DC, tales como LPS, TNF α , mAb contra CD40, y CD40L. Para la comparación más informativa, cada agente se tituló para determinar la concentración óptima para inducción de RelB en las iCD40 DC y estas concentraciones se utilizaron para comparar directamente la activación de RelB mediante estos factores diferentes (Figura 2E). Los datos indican claramente que la inducción de RelB dependiente de fármaco en las iCD40 DC es superior a LPS, TNF α , mAb contra CD40, y CD40L. Los experimentos de seguimiento de pulso revelaron adicionalmente que el fármaco dimerizador AP20187 estimuló una señal nuclear de RelB más prolongada y duradera que TNF α o el MAb dirigido contra CD40 (Figura 2F). Aunque la inducción de RelB mediada por TNF α finalizó después de 24 h y la RelB inducida por MAb dirigido contra CD40 después de 48 h, el receptor iCD40 estimuló la ruta de maduración de RelB durante al menos 72 h en presencia del fármaco dimerizador. Estos resultados sugieren que debido a la estimulación mediada por fármaco, los iCD40 DC pueden mantener un estado de activación hiperextendido.

EJEMPLO 11

iCD40 Induce la activación de DC

Un componente del programa de maduración de DC incluye la regulación en exceso de varias moléculas de la superficie que participan en el proceso de estimulación de linfocitos T mediante la implicación directa de la presentación de antígenos y la estimulación simultánea. Por tanto, los iCD40 DC se trataron con AP20187 y la expresión superficial de varios marcadores de maduración, incluyendo, ICAM-1 (CD54), B7.1 (CD80), MHC clase I K^d, MHC clase II I-A^d y CD40 endógeno (Figura 3A) se analizaron mediante citometría de flujo. La exposición de estas DC al CID dio como resultado elevaciones significativas en la expresión de cada una de dichas proteínas inmunoestimuladoras en comparación con los iCD40 DC no tratados y la línea D2SC/1 precursora. Esta disminución observada en la intensidad de fluorescencia de estos marcadores de DC maduras fue comparable a la de DC tratadas con LPS (de *E. coli*). Solamente fue detectable una mínima señalización basal del receptor iCD40 en los iCD40 DC no tratados y el tratamiento con fármaco de la línea D2SC/1 de control precursora no tuvo un efecto observable. Además, cuando los iCD40 DC se pretrataron con un exceso de la forma monomérica del fármaco, la regulación en exceso dependiente del fármaco dimerizador sobre estos marcadores superficiales quedó completamente eliminada, lo que indica que la agregación física del dominio CD40 citoplásmico fue completamente necesario para inducir el fenotipo DC maduro en la línea D2SC/1.

Cuando las DC experimentan maduración, también muestran alteraciones funcionales. Estos cambios incluyen una menor capacidad para captar moléculas de su microentorno y una potenciación concomitante de su capacidad para estimular la activación de los linfocitos T. La modificación inducida por fármaco de la endocitosis mediada por el receptor DC de D2SC/1 se investigó midiendo la captación de una molécula de dextrano marcada con FITC en los iCD40 DC y en la línea precursora D2SC/1. (Figura 3B). La activación mediada por CID de los iCD40 DC dio como resultado la captación reducida de FITC-dextrano a niveles comparables con el de las DC tratadas con LPS a 37 °C. La realización de esta misma serie de experimentos a 0 °C dio como resultado una captación mínima de la molécula FITC-dextrano, confirmando que la activación de iCD40 también puede regular la función de captación del antígeno en esta línea de DC.

El enfoque inicial para determinar la capacidad de estimulación de los linfocitos T de los iCD40 DC implicaba la incubación simultánea de D2SC/1 DC tratadas con mitomicina con células derivadas de ganglios linfáticos singénicos (LN) *in vitro*. Este ensayo de reacción de linfocitos mixta (MLR, por sus siglas en inglés) mide la capacidad de los iCD40 DC para inducir una respuesta proliferativa de linfocitos T singénicos a antígenos xenogénicos derivados de suero bovino (Figura 3C). Los resultados indican que los iCD40 DC tratados con CID pudieron inducir la proliferación de linfocitos T en niveles similares al de las DC tratadas con LPS *in vitro*. Para investigar si este efecto de activación de linfocitos T era dependiente de los linfocitos T CD4⁺ auxiliares, se purificaron linfocitos T CD8⁺ de tejido LN (> 95 %) y se repitió el ensayo de proliferación basado en ³H-timidina (Figura 3C). Los datos mostraron que los iCD40 DC pudieron inducir la proliferación de linfocitos T CD8⁺ de forma independiente de CD4⁺ en oposición a las células DC tratadas con LPS, que no pudieron sortear el requisito de las señales auxiliares derivadas de los linfocitos T CD4⁺. Estos resultados demuestran que las DC que expresan iCD40 que se han expuesto previamente al fármaco dimerizador mostraron mayor capacidad de estimulación de linfocitos T *in vitro*. Además, los datos de agotamiento de CD4⁺ infieren que el receptor iCD40 puede sustituir los linfocitos T auxiliares CD4⁺ T en las estrategias de vacunación basadas en DC.

EJEMPLO 12**Activación de los iCD40 DC *in vivo* mediada por fármaco después de la vacunación**

5 Como las condiciones *in vitro* no imitan necesariamente las condiciones *in vivo* más fisiológicamente relevantes, se investigó la capacidad de los iCD40 DC para inducir *in vivo* una respuesta de linfocitos T específica de antígeno después de la activación mediada por fármaco anterior o posterior a la vacuna. 1×10^6 células DC progenitoras y D2SC/1 DC que expresaban iCD40 se pulsaron con el antígeno peptídico restringido con H-2K^d, LLO₉₁₋₉₉, derivado de la proteína listeriolisina O de *Listeria monocytogenes* ± LPS, o AP20187, y se inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) a ratones BALB/c singénicos. Un subconjunto de ratones que recibían DC pulsadas con LLO₉₁₋₉₉ recibió una inyección i.p con AP20187 o MAb dirigido contra CD40 20 horas después de la vacunación inicial. Finalmente, se recogieron esplenocitos de ratones tratados con LLO diez días después, y se cultivaron simultáneamente con DC pulsadas con LLO₉₁₋₉₉ y DC no pulsadas tratadas ambas con mitomicina C durante 5 días antes de evaluar su captación de ³H-timidina (Figura 4A). Los resultados indican que la activación *in vivo* de los iCD40 DC mediante la inyección de AP20187 potenciaron significativamente la respuesta de linfocitos T resultante con respecto a la activación *in vitro* de iCD40 antes de la administración de la vacuna de DC (Figura 4B). Además, La activación previa y posterior de los iCD40 DC combinada dio como resultado un efector proliferativo aditivo de los linfocitos T, lo que sugiere que la activación *in vitro* de las DC no transmitía efectos adversos, tales como la atenuación de su capacidad de migración. En oposición al ensayo de migración de linfocitos T *in vitro* analizado anteriormente, la estimulación con iCD40 de las DC *in vivo* dio como resultado una respuesta de linfocitos T significativa más sólida comparada con las DC tratadas con LPS. Además, usando un tetrámero específico H-2K^d-LLO₉₁₋₉₉, se determinó que una fracción significativa de la población de linfocitos T sensible era específica del epítipo peptídico restringido con K^d utilizado originalmente para cargar la vacuna basada en DC (Figuras 4C,D).

25 Aunque el análisis de tetrámeros es una ayuda potente para cuantificar poblaciones de linfocitos T, no refleja la función efectora de los linfocitos T. Para investigar la funcionalidad de los linfocitos T que son sensibles a la presentación del antígeno iCD40 DC, se utilizó una línea celular derivada del tumor P815 (P13.1), que expresa ectópicamente la proteína β-galactosidasa (βgal) como antígeno tumoral derivado. Tras vacunar los ratones BALB/c con DC cargadas de βgal y siguiendo el protocolo de cultivo anteriormente mencionado, se llevó a cabo un ensayo de liberación de ⁵¹Cr por linfocitos T citotóxicos (CTL) para evaluar la capacidad de los linfocitos T estimulados para destruir las células tumorales que expresan βgal. Consistente con los datos de proliferación de linfocitos T *in vivo* presentados anteriormente, la administración de AP20187 después de la administración de DC dio como resultado una destrucción mejorada de las células con respecto a las DC no activadas o preactivadas (Figura 4D). Para estudiar adicionalmente la respuesta CTL a las DC que expresan iCD40, se generó una línea de linfoma A20 que expresaba LLO₉₁₋₉₉ mediante clonación en marco de dos minigenes LLO₉₁₋₉₉ en tándem en dirección 5' de una proteína de fusión HygGFP. Esta estrategia permitió la selección de las células tumorales A20 que expresaban LLO₉₁₋₉₉ en cultivo con higromicina y para rastrear la expresión de LLO₉₁₋₉₉ mediante citometría de flujo de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) (Figura 4E). La construcción que expresaba LLO₉₁₋₉₉ también incluyó dos secuencias de aminoácidos AAY adyacentes después de cada minigén para mejorar la eficiencia de procesamiento proteosómico de los péptidos restringidos con MHC de clase I. A pesar de los perfiles de citometría de flujo que indicaban que la fusión del péptido LLO₉₁₋₉₉ en dirección 5' de HygGFP desestabilizaba la funcionalidad tanto del gen HygR como la intensidad de fluorescencia de EGFP, la línea tumoral A20-LLO siguió mostrando una sensibilidad fuertemente aumentada hacia la destrucción mediada por CTL tras su administración mediante iCD40 DC expuestas a AP20187 cargadas con LLO₉₁₋₉₉.

45

EJEMPLO 13**iCD40 activa las DC primarias derivadas de médula ósea**

50 Aunque las células D2SC/1 tienen muchas características de las células DC recientemente aisladas, era importante examinar la funcionalidad de iCD40 en DC primarias derivadas de médula ósea (BMDC) usando adenovirus que expresaban iCD40. Se diseñó mediante ingeniería genética un vector adenovírico de tipo 5 con replicación deficiente con una región vírica E1 y una E3 borrada para expresar tanto iCD40 como EGFP bajo el control de un promotor/potenciador CMV temprano/inmediato. El Ad-iCD40-GFP se transdujo satisfactoriamente y expresó el transgén iCD40, así como el marcador EGFP, en BMDC purificadas (Figura 5A,B). La titulación de Ad-iCD40-GFP durante la medida de la regulación en exceso inducida por iCD40 de B7.2 (CD86), mostró una activación máxima de iCD40 mediada por fármaco a aproximadamente 100 moi que procedió asintóticamente hasta alcanzar una meseta para los títulos víricos más elevados. Aunque los efectos fueron modestos, AP20187 indujo la expresión superficial de MHC clases I K^b, B7.2, así como CD40 endógeno sobre las BMDC que expresaban iCD40 a 100 moi pero no en las células DC no transducidas (Figura 5C). Los efectos del Ad-iCD40-GFP sobre las BMDC se estudiaron usando tinción intracelular con citoquina para evaluar la expresión de DV de la citoquina polarizante T_H1, IL-12. Los resultados confirmaron numerosos informes previos de que un vector adenovírico vacío podía contribuir a las lecturas de fluorescencia de fondo al estimular la producción de bajos niveles de si citoquina (Figura 5D) (Korst 2002). Estos datos también revelaron que el transgén iCD40 podía generar un nivel significativo de señalización base a estos títulos incluso en ausencia de CID. Sin embargo, la exposición a AP20187 de estas DC que expresan iCD40 consiguió superar de forma reproducible estos efectos acumulados para aumentar adicionalmente el

65

porcentaje de las DC IL-12⁺. De manera interesante, la estimulación de la síntesis de IL-12p70/p40 con LPS y CD40L alcanzó un máximo a las 8 h y disminuyó a continuación, mientras que el porcentaje de las DC IL-12⁺ siguió aumentando hasta al menos 24 h después de la transducción adenovírica. Un trabajo anterior de Langenkamp et al. (Langenkamp 2000) había demostrado que el tratamiento prolongado de las DC con LPS agotaba su capacidad de producción de citoquinas. Estos resultados implican que iCD40, en oposición a la señal de peligro LPS, podía estimular i mantener una respuesta más duradera de IL-12 mediante BMDC.

Además del estado de activación de las DC, la longevidad de las DC es otra variable crítica que afecta la generación de inmunidad dependiente de linfocitos T. De hecho, la destrucción de las DC mediada por CTL se considera un mecanismo significativo para modular las respuestas inmunitarias protegiendo al mismo tiempo al hospedador de patologías autoinmunitarias. Otro trabajo ha establecido que la estimulación con CD40 de las DC prolonga su supervivencia por una variedad de mecanismos, incluyendo la regulación en exceso de la proteína antiapoptótica bcl-X_L y el inhibidor de granzima B spi-6 (Medema 2001; Miga 2001). Los efectos del iCD40 con respecto a CD40L sobre la supervivencia se compararon en un ensayo de cultivo *in vitro* con privación de suero (Figura 5E). Al analizar la población celular positiva para yoduro de propidio (PI) con la membrana comprometida mediante citometría de flujo, se determinó que las BMDC que expresan iCD40 mostraron mayor longevidad en estas condiciones comparada con las DC no transducidas tratadas con CD40L. Este efecto era dependiente de iCD40 ya que las DC transducidas con Ad-GFP no pudieron reflejar una supervivencia mejorada en dichas condiciones. Estos resultados también mostraron que la exposición de BMDC que expresan iCD40 al fármaco dimerizador AP20187 potenció aún más este efecto de supervivencia con respecto a las BMDC no tratadas.

A pesar de la maduración no intencionada inducida por el vector adenovírico y los efectos de señalización basales potenciados de iCD40 en las BMDC primarias, se detectó de forma consistente la activación mejorada de las DC en presencia de AP20187. En su conjunto, estos datos sugieren que un receptor CD40 inducible diseñado para responder a un agente farmacológico pudo mantener las DC primarias en un estado de activación continuado en comparación con los efectos más transitorios de la estimulación con CD40L. Estos datos fueron consistentes con hallazgos anteriores que describían solamente una modulación de DC a corto plazo para estímulos dirigidos contra el CD40 endógeno.

EJEMPLO 14

El interruptor de activación de iCD40 actúa como un potente auxiliar para vacunas de ADN

Estudios anteriores habían demostrado que las DC tienen un papel fundamental en el procesamiento y presentación de vacunas de ADN a linfocitos T sensibles. Por tanto, para examinar los efectos de iCD40 sobre la funcionalidad primaria de las DC *in vivo*, el interruptor de activación de iCD40 se incorporó en un protocolo de vacunación con ADN dependiente de una pistola de genes (Singh 2002). Micropartículas de oro se revistieron con un minigén OVA257-264 en presencia y ausente de un receptor bicistrónico que expresaba simultáneamente iCD40 con el indicador hrGFP. La transfección biolística de ratones C57BL/6 con el minigén OVA257-264 dio como resultado una mejora de 3 veces en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ específicos de OVA257-264, mientras que la inclusión del vector que expresaba iCD40 aumentó en gran medida esta misma población de linfocitos T CD8⁺ 2 veces más (Figura 6A,C). Aunque AP20187 no estimuló adicionalmente la expansión de linfocitos T CD8⁺ específicos de OVA257-264, la administración i.p del fármaco dimerizador ~20 horas después de la vacunación mejoró el porcentaje de linfocitos T CD69⁺ CD8⁺ T activados (Figura 6B).

Para demostrar la eficacia del sistema iCD40 en ausencia de los linfocitos T CD4⁺ auxiliares. Ratones silvestres (C57BL/6) y con CD4 inactivado genéticamente (deficientes en linfocitos T auxiliares) se vacunaron usando el protocolo de vacunación Gene Gun DNA anterior. La Figura 7A muestra que la mejora de la población de linfocitos T CD8⁺ específica de antígeno existía en los ratones ~14 días después de la vacunación. La Figura 7B muestra la mejora de los linfocitos T CD8⁺ activados (CD69⁺) ~14 días después de la vacunación. Todos los datos se normalizaron al antígeno OVA en solitario. Los datos demostraron adicionalmente la potencia mejorada del sistema iCD40 regulado por fármaco con respecto al receptor CD40 de longitud completa y el anticuerpo monoclonal agonista dirigido contra CD40.

De esta manera, estos resultados demuestran la eficacia del interruptor de activación de iCD40 *in vivo*, y mostró que iCD40 puede seguir regulando en exceso las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ en ausencia de los linfocitos T CD4⁺ auxiliares.

EJEMPLO 15

El receptor iCD40 aislado es resistente a la regulación por defecto inducida por ligando y a la inhibición por retroalimentación negativa mediada por la isoforma de CD40 de Tipo II

Los datos presentados anteriormente implican que el receptor iCD40 regulado por fármaco puede suministrar una señal estimuladora más potente a las DC que la activación del CD40 endógeno. Se determinó que la causa

subyacente de esta diferencia está basada en la falta de un dominio extracelular, convirtiendo iCD40 en resistente tanto a la regulación por defecto inducida por ligando como a la interferencia mediante receptores negativos dominantes.

5 Para investigar inicialmente la regulación por defecto potencial del CD40 superficial tras la implicación del ligando, el análisis mediante citometría de flujo de la expresión de CD40 en la superficie de DC se controló en presencia y ausencia de CD40L. La adición de CD40L redujo rápidamente la intensidad de fluorescencia promedio de CD40 en la línea D2SC/1 DC con una cinética rápida. Los estudios de inhibición mostraron que este proceso era sensible tanto al inhibidor de la endocitosis, citocolasina B, así como al agotamiento del potasio intracelular, lo que sugiere que los mecanismos de endocitosis mediada por receptor tienen un papel en la regulación de CD40 (Figura 8A). Además, el tratamiento de la línea D2SC/1 con el inhibidor de la H⁺ATPasa endosomal bafilomicina A₁ potenció los niveles de CD40 basado en ensayos de tinción intracelular. En su conjunto, estos resultados sugieren que debido a la implicación del ligando, CD40 se capturó mediante endocitosis y se degradó mediante procesamiento proteolítico lisosómico (Figura 8B). Un trabajo adicional indica que la inhibición de la endocitosis de CD40 potencia su capacidad de señalización (Figura 8C).

La expresión de la isoforma truncada de "tipo II" de CD40, que carece tanto de un dominio transmembrana como de un dominio citoplásmico, se reguló por exceso en respuesta a la maduración de DC (Figura 9A). Un trabajo anterior ha demostrado que la isoforma de CD40 de tipo II eliminó la expresión superficial, así como la expresión celular total, de CD40 de tipo I (Tone et al. 2001). Se teorizó que este mecanismo inhibidor implicó interacciones homotípicas entre los dominios extracelulares de las isoformas CD40 de tipo I y II, sin embargo, no se presentó evidencia directa que proporcionara más información sobre esta ruta reguladora. Por tanto, se teorizó que iCD40 sería resistente a la inhibición mediada por CD40 de tipo II debido a la ausencia de un ectodominio de unión del ligando. Para investigar la potencial regulación del CD40 de tipo I endógeno e iCD40 mediante este producto génico de corte y empalme alternativo, la isoforma de CD40 de tipo II se amplificó mediante rt-PCR a partir de DC derivadas de médula ósea purificada de murino y se subclonó en un vector que expresaba ZeoR en fase con la etiqueta de epítipo derivada de mic-c. Esta construcción se utilizó para generar DC clónicas de "doble estado" que expresan tanto iCD40 y CD40 de tipo II (IICD40) mediante la selección de líneas celulares en G418 y medio que contiene zeocina. Se seleccionaron líneas celulares de DC que expresaban niveles elevados (Hi), intermedios (Int), y bajos (Lo) de IICD40 mediante análisis de transferencia western dirigida contra la etiqueta mic para análisis adicional (Figura 9B). Una transferencia dirigida contra HA de estas mismas líneas iCD40-IICD40 DC demostró que la expresión celular total de iCD40 no se vio afectada por la expresión en exceso del transgén IICD40 (Figura 9B). Sin embargo, el análisis mediante citometría de flujo de la expresión superficial de CD40 de tipo I demostró una reducción en la intensidad de fluorescencia promedio de este receptor en líneas DC que expresan IICD40 (Figura 9C). Además, se descubrió que existía una relación inversa prevista que existía entre el nivel de expresión de CD40 de tipo II y la expresión de CD40 de tipo I. Estos datos eran consistentes con el de un trabajo anterior que demostró que la regulación por defecto de CD40 de tipo I mediada por IICD40.

Para ampliar estos hallazgos, los efectos de las titulaciones de CD40L y AP20187 de cada una de las líneas IICD40 se analizaron basándose en la hipótesis de que la regulación por defecto de las CD40 de tipo I mediada por IICD40 debería aplanar la respuesta de DC a CD40L pero no a AP20187 (Figura 9D). Usando la expresión superficial de H-2K^d de MHC de clase I como indicador, los resultados revelaron que IICD40 desplazó la curva dosis-respuesta tal que cantidades elevadas de CD40L eran necesarias para iniciar la señalización a través del eje CD40 mientras que, por el contrario, AP20187 indujo niveles aún más elevados de H-2K^d que el vector vacío de control. En su conjunto, estos datos confirmaron que los hallazgos de Tone et al. y respaldaron la noción de que las interacciones CD40-IICD40 de tipo I se produjo mediante los dominios extracelulares homólogos de dichos receptores. Además, estos resultados sugieren que el interruptor del receptor iCD40 pudo sortear los mecanismos de retroalimentación negativa que implican las isoformas CD40 dominantes negativas.

50 EJEMPLO 16

Generación de una construcción CD11c para generar un ratón transgénico iCD40 específico de DC

Para generar un ratón transgénico que exprese iCD40 específico de DC. El iCD40 se subclonó en un vector que contenía el promotor CD11c específico de DC que se purificó mediante ultracentrifugación en gradiente de CsCl. Tras la secuenciación, se mostró que el vector inducirá la expresión de iCD40 en células 293T. Se realizaron microinyecciones de ADN en ratones C57BL/6.

DC derivadas de médula ósea se aislaron a partir de progenie positiva para PCR según transferencias Western dirigidas contra HA. Aunque la expresión de la proteína iCD40 se descubrió en todos los ratones, los niveles variaron desde escasamente detectable a fácilmente detectable. Estos ratones se están reproduciendo en la actualidad para experimentos funcionales, pero los resultados iniciales muestran una importante expansión de las DC esplénicas en los ratones que expresan iCD40, con una mayor activación de los linfocitos T tras la administración de CID.

65

REFERENCIAS

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas de los niveles de los expertos en la materia a la que pertenece la invención.

- 5 Adema, G.J., et al., *Nature*, 1997, 12 de junio. 387: p. 713-7.
 Amara, J.F., N.L. *Hum Gene Ther*, 1999, 1 nov. 10: p. 2651-5.
 Anderson, D.M., et al., *Nature*, 1997, 13 nov. 390: p. 175-9.
- 10 Banchereau, J. a. S., R., *Science*, 1998, 392: 245-252.
 Banchereau, J. y R.M. Steinman, *Nature*, 1998, 19 mar. 392: p. 245-52.
 Banchereau, J., et al., *Annu Rev Immunol*, 2000, 18: p. 767-811.
 Bander, NH., et al., *Prostate*, 1997, 1 dic. 33: p. 233-9.
 Bennett, S.R., et al., *Nature*, 1998, 4 de junio. 393: p. 478-80.
- 15 Boczkowski, D., et al., *J Exp Med*, 1996 184(2): p. 465-72.
 Caux, C. et al., *J Exp Med*, 1994, 1 oct. 180: p. 1263-72.
 Chen et al *PNAS* 94: 1914-1918, 1997
 Clackson, T., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95: p. 10437-10442.
 Clarke, S.R., *J Leukoc Biol*, 2000, May. 67: p. 607-14.
 Cohen et al *Nucleic Acid Res.* 18:2807-2808, 1990
- 20 Farrar, M.A., *Nature*, 1996, 12 Sep. 383:p. 178-81.
 Fearon et al. (1996) *Science* 272: 50-3.
 Fernandez, N.C., et al., *Nat Med*, 1999, 5 abr. p. 405-11.
 Gilboa, E., et al., *Cancer Immunol Immunother*, 1998, 46 abr. p. 82-7.
 Hennans, I., et al., *Journal of Immunology*, 2000,164: 3095-3101.
- 25 Hollstein et al *Nucleic Acids Res.* 22:3551-3555, 1994
 Inaba, K., et al., *J Exp Med*, 1992, 1 dic.176: p. 1693-702.
 Israeli et al *Cancer Res.* 53:227-230, 1993
 Jackson et al *EMBOJ*, 11:527-535,1992
 Janeway y col., (1989) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54: 1-13.
- 30 Kawakami et al *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91:6458-6462, 1992
 Kawakami et al, *J. Exp. Med.* 180:347-352, 1994.
 Korber et al, eds *HIV Molecular Immunology Database*, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N. Mex. 1977
- 35 Korst, R., et al., *Molecular Therapy*, 2002, 5(3): 307-315.
 Kugler, A., et al., *Nat Med*, 2000, Mar. 6: p. 332-6.
 Kwon et al *PNAS* 84:7473-7477, 1987
 Langenkamp, A., et al., *Nature Immunology*, 2000, 1(4): 311-316.
 Lanzavecchia, A. y F. Sallusto, *Science*, 2000. 290: p. 92-96.
- 40 Lutz, M., et al., *Journal of Immunological Methods*, 1994, 174: 269-279.
 Maldonado-Lopez, R., et al., *J Exp Med*, 1999, 1 feb. 189: p. 587-92.
 Martin, E., et al., *Immunity*, 2003, 18: 155-167.
 McWhirter, S.M., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 20 jul. 96: p. 8408-13.
- 45 Medema, J., et al., *Journal of Experimental Medicine*, 2001, 194(5): 657-667.
 Medzhitov et al. (1997) *Curr. Opin. Immunol.* 94: 4-9.
 Miga, A., et al., *European Journal of Immunology*, 2001, 31: 959-965.
 Morse, M.A., et al., *Cancer Res.*, 1999, 1 ene. 59: p. 56-8.
- 50 Nair, S.K., *Gene Ther*, 1998, 5 nov: p. 1445-6.
 Nair, S.K., D. Snyder, y E. Gilboa, *J Immunol*, 1995. 156(5): p. 1772-80.
 Nair, S.K., et al., *Eur J Immunol*, 1997. 27(3): p. 589-97.
 Ni, C. et al., *PNAS*, 2000, 97(19): 10395-10399.
 Ni, C.Z., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 12 sep. 97: p. 10395-9.
 Ohshima, Y., et al., *J Immunol*, 1997, 15 oct. 159: p. 3838-48.
 O'Sullivan, B. J. y R. Thomas, *The Journal of Immunology*, 2002, 168: 5491-5498.
- 55 Quaaz, F., et al., *Immunity*, 2002, 16: 257-270.
 Pettit, A., et al., *Journal of Immunology*, 1997, 159: 3681-3691.
 Pirtskhalaishvili, G., et al., *J Immunol*, 2000, 15 ago. 165: p. 1956-64.
 Pound, C.R., et al., *JAMA*, 1999, 5 may. 281: p. 1591-7.
 Pound, C.R., et al., *Urol Clin North Am*, 1997, May. 24: p. 395-406.
- 60 Pulendran, B., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 2 feb. 96: p. 1036-41.
 Pullen, S.S., et al., *J Biol Chem*, 1999, 14 may: 274: p. 14246-54.
 Putzer, B.M., et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 30 sep. 94: p. 10889-94.
 Ridge, J.P., D.R. F. y P. *Nature*, 1998, 4 de junio. 393: p. 474-8.
 Risoan, M.C., et al., *Science*, 1999, 19 feb. 283: p. 1183-6.
- 65 Sallusto, F., et al., *Eur J Immunol*, 1998, 28 sep: p. 2760-9.
 Schoenberger, S.P., et al., *Nature*, 1998, 4 de junio. 393: p. 480-3.
 Schuler, G. y R.M. *J Exp Med*, 1997, 20 oct.186: p. 1183-7.

Shariat, S.F., et al., *Can.Res.*, 2001. 61(6).
 Simons, J.W., et al., *Cancer Res.*, 1999, 15 oct. 59: p. 5160-8.
 Slovin, S.F., et al., *Semin Urol Oncol*, 1998, 16 feb: p. 53-9.
 5 Spencer, D.M., et al., *Curr Biol*, 1996. 6(7): p. 839-47.
 Spencer, D.M., et al., *Science*, 1993. 262: p. 1019-1024.
 Steinman, R. a. P., M. *Journal of Clinical Investigation*, 2002, 109: 1519-1526.
 Tamura, Y., et al., *Science*, 1997, 3 oct. 278: p. 117-20.
 Tang, H.L. y J.G. Cyster, *Science*, 1999, 30 abr. 284: p. 819-22.
 10 Tartour, E. y W.H. Fridman, *Immunol Ltrs*, 2000. 74: p. 1-3.
 Termeer, C.C., et al., *J Immunol*, 2000, 15 ago. 165: p. 1863-70.
 Timmerman, J.M. y R. Levy, *Annu Rev Med*, 1999, 50: p. 507-29.
 Tjoa, B.A. y G.P. Murphy, *Immunol Ltrs*, 2000. 74: p. 87-93.
 Tone, M., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(4): p. 1751-1756.
 15 Patente de los Estados Unidos N° 4.514.506
 Patente de los Estados Unidos N° 5.550.214
 Patente de los Estados Unidos N° 5.648.226
 Patente de los Estados Unidos N° 5.709.995
 Patente de los Estados Unidos N° 5.719.054
 Patente de los Estados Unidos N° 5.750.395
 20 Patente de los Estados Unidos N° 5.780.036
 Patente de los Estados Unidos N° 5.840.839
 Patente de los Estados Unidos N° 5.869.608
 Patente de los Estados Unidos N° 5.955.596
 25 Ullrich, A. y J. Schlessinger, *Cell*, 1990. 61: p. 203-212.
 Wong, P., *Immunity*, 2003, 188: 499-511.
 Xie, X., et al., *Hum Gene Ther*, 2001. 12(5).
 Zitvogel L, et al., *J Exp Med* 1996. 183:87-97.

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> Spencer, David Hanks, Brent Slawin, Kevin
 <120> Activación inducida en células dendríticas
 35 <130> P02165WOO
 <140> No asignado
 <141> 18-02-2004
 40 <150> US 60/448.046
 <151> 18-02-2003
 <160> 4
 45 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 228
 <212> ADN
 50 <213> Ratón
 <400> 1
 tatatcaaaa aggtggtcaa gaaaccaaag gataatgaga tgttaccccc tgcggctcga 60
 cggcaagatc cccaggagat ggaagattat cccggtcata acaccgctgc tccagtgcag 120
 gagacactgc acgggtgtca gcctgtcaca caggaggatg gtaaagagag tgcgatctca 180
 gtgcaggagc ggcaggtgac agacagcata gccttgagge ccctggtc 228
 55 <210> 2
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Ratón

<400> 2

Tyr Ile Lys Lys Val Val Lys Lys Pro Lys Asp Asn Glu Met Leu Pro
1 5 10 15

Pro Ala Ala Arg Arg Gln Asp Pro Gln Glu Met Glu Asp Tyr Pro Gly
20 25 30

His Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His Gly Cys Gln Pro
35 40 45

Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser Val Gln Glu Arg
50 55 60

Gln Val Thr Asp Ser Ile Ala Leu Arg Pro Leu Val
65 70 75

5

<210> 3
<211> 1579
<212> ADN
<213> Ratón

10

<400> 3

ES 2 543 084 T3

tgccttgcac ggtgtctttg cctcggctgt gcgcgctatg gggctgcttg ttgacagcgg 60
 tccatctagg gcagtgtgtt acgtgcagtg acaaacagta cctccacgat ggccagtgtc 120
 gtgattttgtg ccagccagga agccgactga caagccactg cacagctctt gagaagaccc 180
 aatgccaccc atgtgactca ggcgaattct cagcccagtg gaacagggag attcgtgttc 240
 accagcacag acactgtgaa cccaatcaag ggcttcgggt taagaaggag ggcaccgcag 300
 aatcagacac tgtctgtacc tgtaaggaag gacaacactg caccagcaag gattgcgagg 360
 catgtgtctc gcacacgccc tgtatccctg gctttggagt tatggagatg gccactgaga 420
 ccaactgatac cgtctgtcat ccctgccag tcggcttctt ctccaatcag tcatcacttt 480
 tcgaaaagtg ttatccctgg acaagctgtg aggataagaa cttggaggtc ctacagaaag 540
 gaacgagtca gactaatgtc atctgtggtt taaagtccg gatgcgagcc ctgctgggtc 600
 ttctgtcgt gatgggcac ctcacacca ttttcgggggt gtttctctat atcaaaaagg 660
 tggtaagaa accaaaggat aatgagatgt taccctctgc ggctcgacgg caagatcccc 720
 aggagatgga agattatccc ggtcataaca ccgctgctcc agtgcaggag aactgcacg 780
 ggtgtcagcc tgtcacacag gaggatggta aagagagtgc catctcagtg caggagcggc 840
 aggtgacaga cagcatagcc ttgaggeccc tggctgaac cctggaactg ctttgagggc 900
 gatggctgct tgctgacctt tgaagtttga gatgagccaa gacagagccc agtgcagcta 960
 actctcatgc ctgccccctg tcatttctca acttgccttt taaggatgga gggaaagctc 1020
 gggcatcggg aggtccacag tgatatctac caagtgcagc agtgcaggac ccagagttgt 1080
 cttgctcggg cgttcactgt aaggagtctg ggctacagga gtccgtggcc cgcagcttgt 1140
 gctcgtagag ggcacctgtg tgccatcagc agggactggt ctaaataaat ctgtaattat 1200
 ttatacaatg gcatctcaga aactctagca ggtggggcag aaaacaggta gtggaatgat 1260
 gggtagagaa acagctttta aaacacattc caaggcaggt aagatggctt ttgtgggtaa 1320
 aggagcttgc tgcccaaacc cggttacctg attttgatcc ctgggacttc atggtaaaag 1380
 ggagagaacc aaatccagag ggttgtcatt tgacctccat gtgtgctctg tggtaatgta 1440
 ccccgctgtg gcacatgtgc acatattcta aaatggatgt ggtgggtgtat tgtagaaatt 1500
 atttaatccg ccctgggttt ctacctgtgt gttaccattt agttcttgaa taaagacaca 1560
 ctcaaccttt atatttaca 1579

<210> 4
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> Ratón

5

<400> 4

ES 2 543 084 T3

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

Ala Val His Leu Gly Gln Cys Val Thr Cys Ser Asp Lys Gln Tyr Leu
20 25 30

His Asp Gly Gln Cys Cys Asp Leu Cys Gln Pro Gly Ser Arg Leu Thr
35 40 45

Ser His Cys Thr Ala Leu Glu Lys Thr Gln Cys His Pro Cys Asp Ser
50 55 60

Gly Glu Phe Ser Ala Gln Trp Asn Arg Glu Ile Arg Cys His Gln His
65 70 75 80

Arg His Cys Glu Pro Asn Gln Gly Leu Arg Val Lys Lys Glu Gly Thr
85 90 95

Ala Glu Ser Asp Thr Val Cys Thr Cys Lys Glu Gly Gln His Cys Thr
100 105 110

Ser Lys Asp Cys Glu Ala Cys Ala Gln His Thr Pro Cys Ile Pro Gly
115 120 125

Phe Gly Val Met Glu Met Ala Thr Glu Thr Thr Asp Thr Val Cys His
130 135 140

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Gln Ser Ser Leu Phe Glu Lys
145 150 155 160

Cys Tyr Pro Trp Thr Ser Cys Glu Asp Lys Asn Leu Glu Val Leu Gln
165 170 175

Lys Gly Thr Ser Gln Thr Asn Val Ile Cys Gly Leu Lys Ser Arg Met
180 185 190

Arg Ala Leu Leu Val Ile Pro Val Val Met Gly Ile Leu Ile Thr Ile
195 200 205

Phe Gly Val Phe Leu Tyr Ile Lys Lys Val Val Lys Lys Pro Lys Asp

ES 2 543 084 T3

210		215		220											
Asn	Glu	Met	Leu	Pro	Pro	Ala	Ala	Arg	Arg	Gln	Asp	Pro	Gln	Glu	Met
225					230					235					240
Glu	Asp	Tyr	Pro	Gly	His	Asn	Thr	Ala	Ala	Pro	Val	Gln	Glu	Thr	Leu
				245					250					255	
His	Gly	Cys	Gln	Pro	Val	Thr	Gln	Glu	Asp	Gly	Lys	Glu	Ser	Arg	Ile
			260					265					270		
Ser	Val	Gln	Glu	Arg	Gln	Val	Thr	Asp	Ser	Ile	Ala	Leu	Arg	Pro	Leu
		275					280					285			
Val															

REIVINDICACIONES

1. Uso de un ligando que se une a un dominio de unión al ligando FKBP de una proteína quimérica, dando como resultado una oligomerización de la proteína quimérica, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una dolencia, seleccionada entre una enfermedad hiperproliferativa o una enfermedad infecciosa, modulando una respuesta inmunitaria, para activar una célula presentadora de antígenos transfectada o transducida *in vivo*, donde
- 5
- a) la célula presentadora de antígenos se ha transfectado o transducido con un vector de expresión que codifica la proteína quimérica; y
- 10
- b) dicho vector de expresión comprende una secuencia promotora de polinucleótidos, una secuencia de polinucleótidos que codifica una región dirigida a membrana, una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio de unión al ligando FKBP capaz de unirse al ligando, una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de la región citoplásmica CD40 que no tiene un dominio extracelular funcional, unido todo operativamente.
- 15
2. Un método para activar *in vitro* una célula presentadora de antígenos que comprende las etapas de:
- transfectar o transducir la célula presentadora de antígenos con un vector de expresión, donde dicho vector de expresión comprende una secuencia promotora de polinucleótidos, y una secuencia de polinucleótido que codifica una proteína quimérica, donde la secuencia del polinucleótido codifica una región dirigida a membrana, un dominio de unión al ligando FKBP, y un polipéptido de la región citoplásmica CD40 que no tiene un dominio extracelular funcional, unidos todos operativamente; y
- 20
- activar la célula presentadora de antígenos transfectada o transducida administrando un ligando que se une al dominio de unión al ligando FKBP de la proteína quimérica, dando como resultado la oligomerización de la proteína quimérica.
- 25
3. Uso de un vector de expresión en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una dolencia seleccionada entre una enfermedad hiperproliferativa o una enfermedad infecciosa, modulando una respuesta inmunitaria *in vivo* en un sujeto, donde dicho vector de expresión se expresa en células dendríticas y dicho vector de expresión comprende una secuencia promotora de polinucleótidos, una secuencia de polinucleótidos que codifica una región dirigida a membrana, una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio de unión al ligando FKBP, una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de la región citoplásmica CD40 que no tiene un dominio extracelular funcional, unido todo operativamente.
- 30
4. El uso o método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde el vector de expresión comprende adicionalmente una segunda secuencia de polinucleótido que codifica un segundo dominio de unión al ligando FKBP.
- 35
5. El uso o método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde el ligando no es una proteína.
- 40
6. El uso de la reivindicación 3, donde el ligando se administra al sujeto para dar como resultado una oligomerización.
7. El uso de la reivindicación 3, donde el sujeto está inmunocomprometido.
- 45
8. El uso de la reivindicación 3, donde el sujeto inmunocomprometido está infectado por VIH.
9. Uso de una célula presentadora de antígenos transfectada o transducida en la fabricación de un medicamento para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto, donde el sujeto tiene una dolencia seleccionada entre una enfermedad hiperproliferativa o una enfermedad infecciosa, donde
- 50
- a) la célula presentadora de antígenos se transfecta o transduce con un vector de expresión;
- b) dicho vector de expresión comprende una secuencia promotora de polinucleótidos, una secuencia de polinucleótidos que codifica una región dirigida a membrana, una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio de unión al ligando FKBP y una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de la región citoplásmica CD40 que no tiene un dominio extracelular funcional, unidos todos operativamente; y
- 55
- c) las células presentadoras de antígenos transfectadas o transducidas se administran al sujeto simultánea o posteriormente a la administración de una composición inmunógena.
- 60
10. El uso de la reivindicación 9, donde la célula presentadora de antígenos transfectada o transducida se activa administrando un ligando que da como resultado una oligomerización.
11. El uso de la reivindicación 9, donde la célula presentadora de antígenos transfectada o transducida se carga con un antígeno.
- 65

12. El uso de la reivindicación 11, donde el antígeno es un antígeno tumoral.
13. El uso de la reivindicación 11, donde la carga comprende pulsar dicha célula con péptidos o lisados celulares eluidos con ácido.
- 5 14. El uso de la reivindicación 11, donde la carga comprende electrofusionar dicha célula con antígenos o lisados celulares.
- 10 15. El uso de la reivindicación 11, donde la carga comprende transfectar dicha célula con ARNm de un antígeno.
16. El uso de la reivindicación 11, donde dichas células presentadoras de antígeno cargadas transfectadas o transducidas se administran a dicho sujeto por vía intradérmica o subcutánea.
- 15 17. El uso de la reivindicación 9, donde dichas células presentadoras de antígeno se transfectan o transducen con el vector de expresión *in vitro* antes de administrarse a dicho sujeto.
18. Uso de un ligando de la reivindicación 1, donde el ligando es FK506 dimérico o un análogo dimérico de FK506.
- 20 19. Uso de un ligando de la reivindicación 1, donde la dolencia es una enfermedad hiperproliferativa.
20. Uso de un ligando de la reivindicación 1, donde el ligando es AP20187 o AP1903.
- 25 21. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, o 9, donde la dolencia se selecciona entre el grupo que consiste en una dolencia preneoplásica, una dolencia hiperplásica, y cáncer.
22. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, o 9, donde la dolencia se selecciona entre el grupo que consiste en una infección bacteriana, infección vírica, infección por levaduras, e infección por protozoos.
- 30 23. El uso o método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde el dominio de unión al ligando FKBP comprende un dominio FKBP12.
24. El uso o método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde el dominio de unión al ligando FKBP comprende un dominio FKBP12(v36).
- 35 25. El uso o método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, donde el dominio de unión al ligando FKBP comprende dos copias en tándem de un dominio FKBP12(v36).

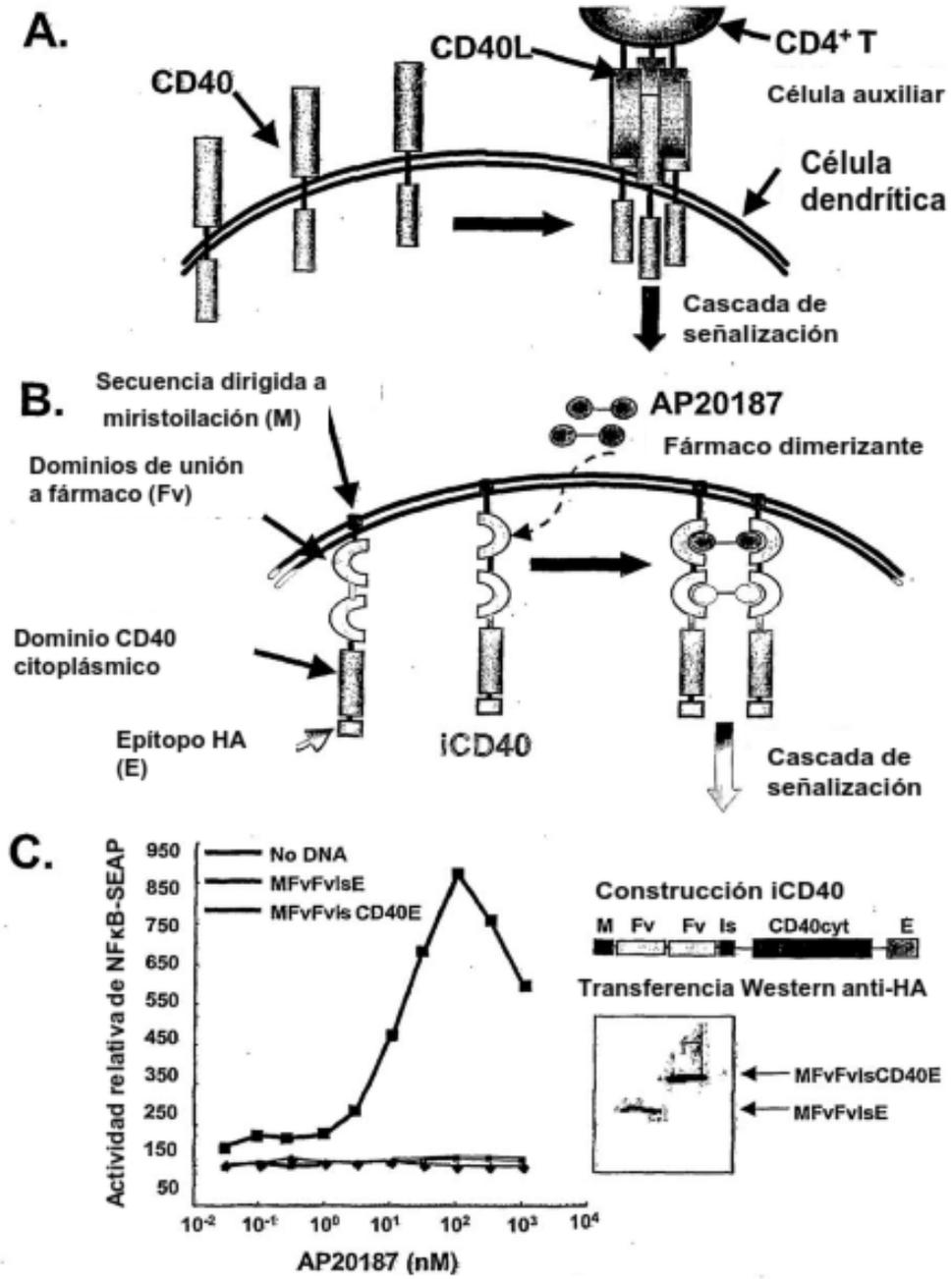


Figura 1.

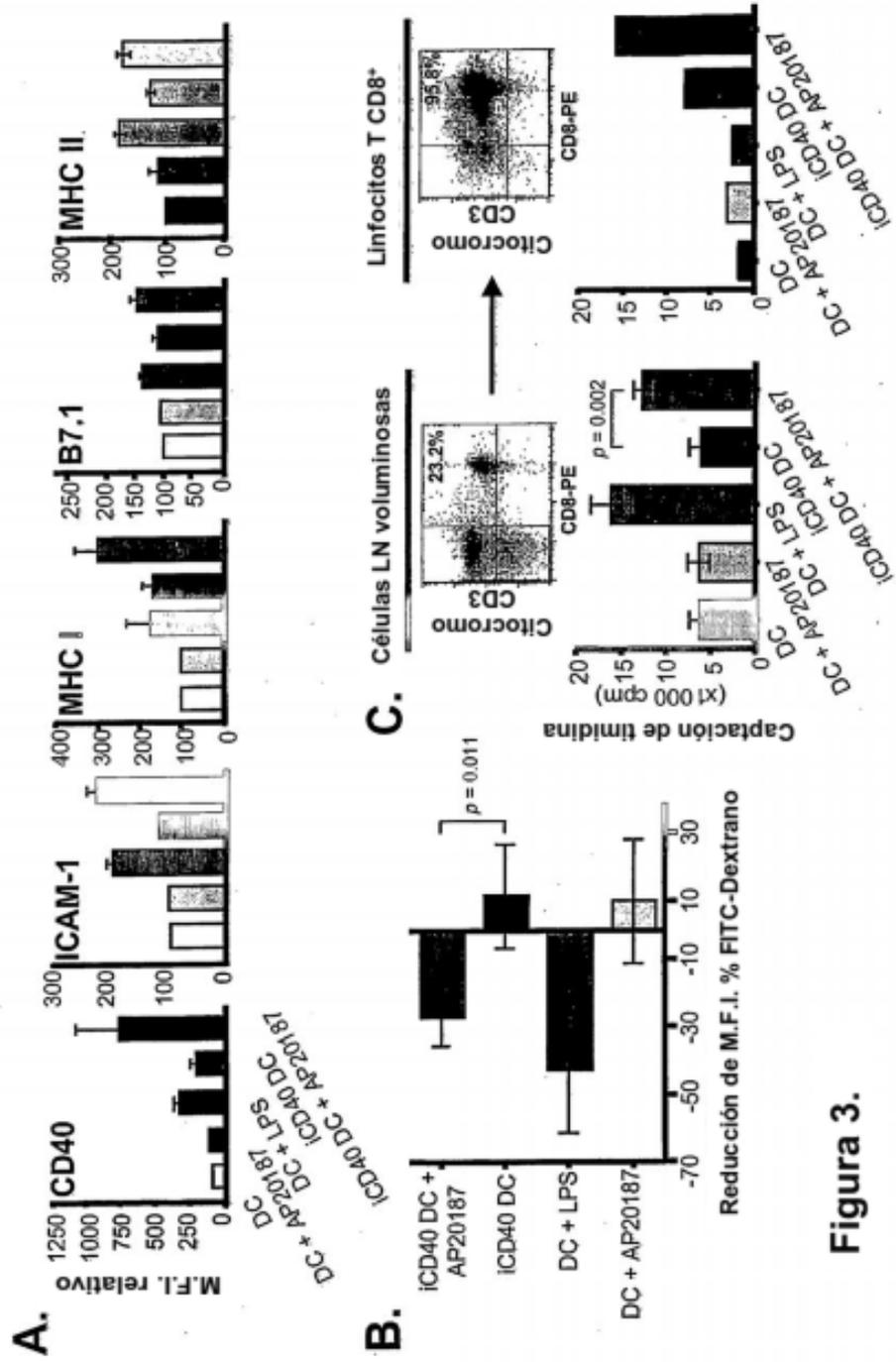
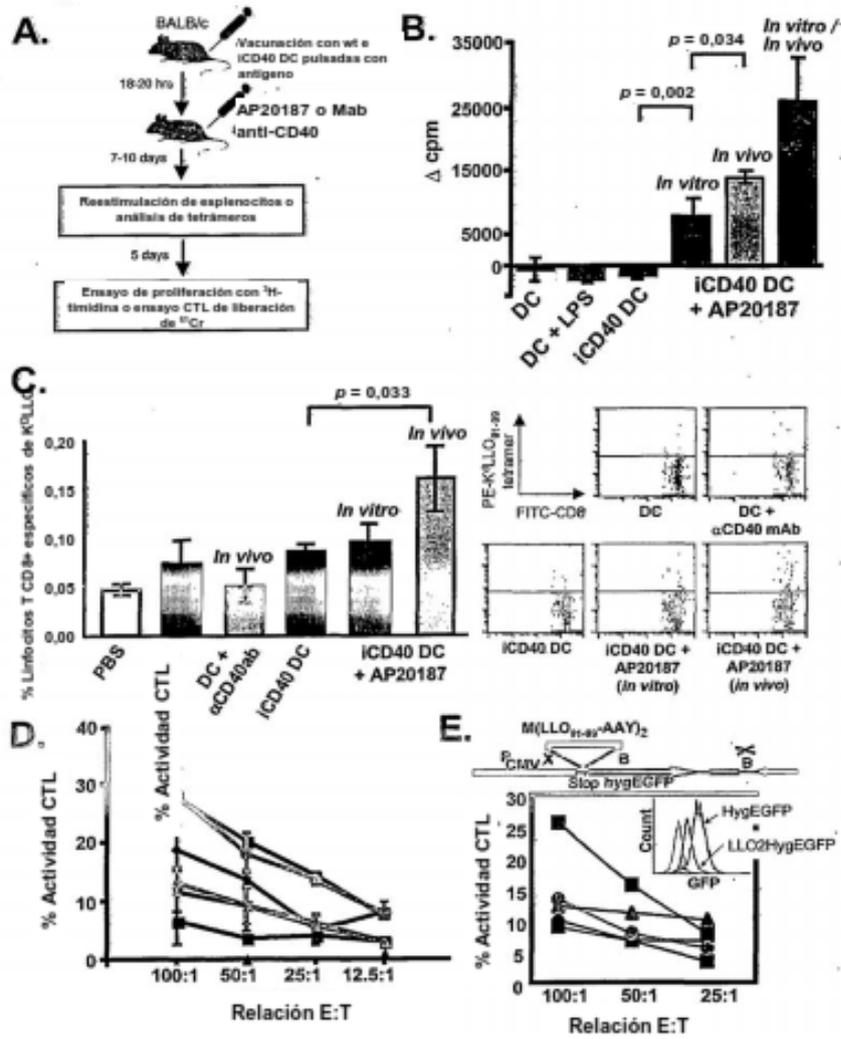


Figura 3.

Figura 4.



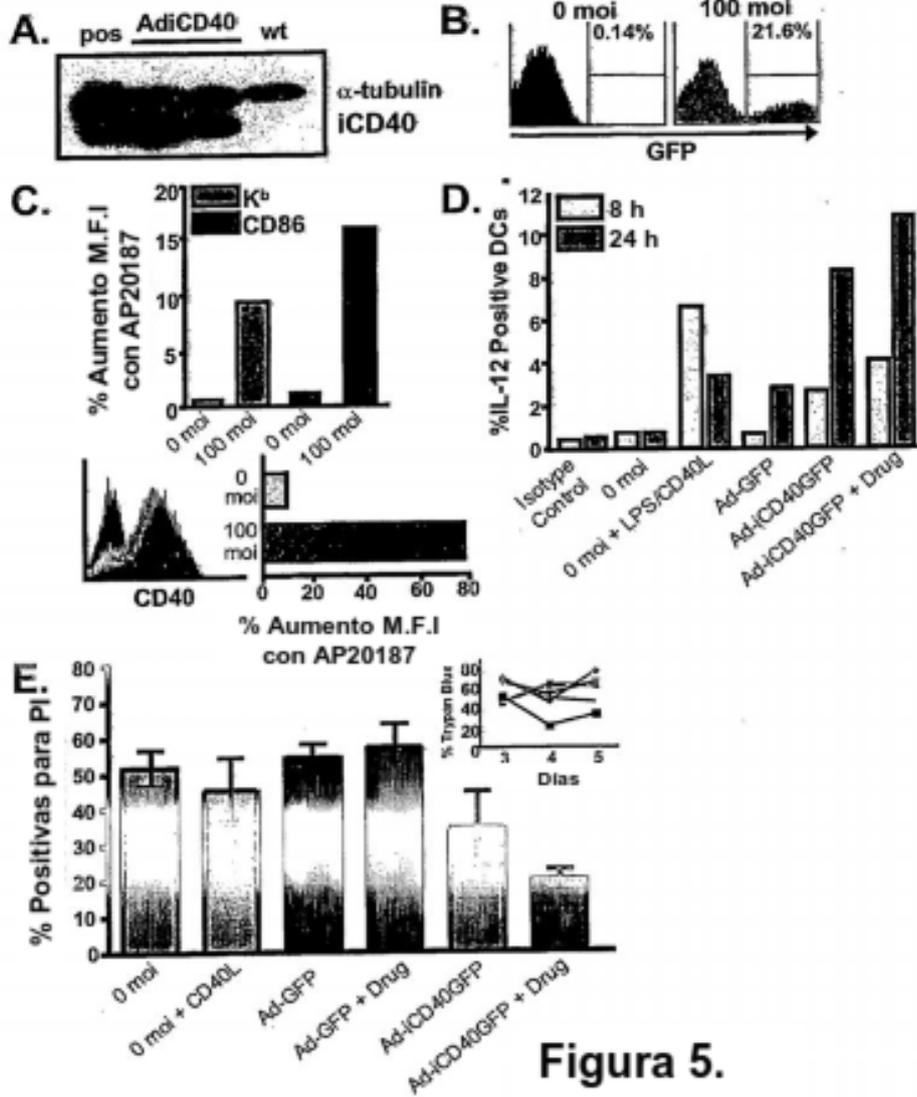
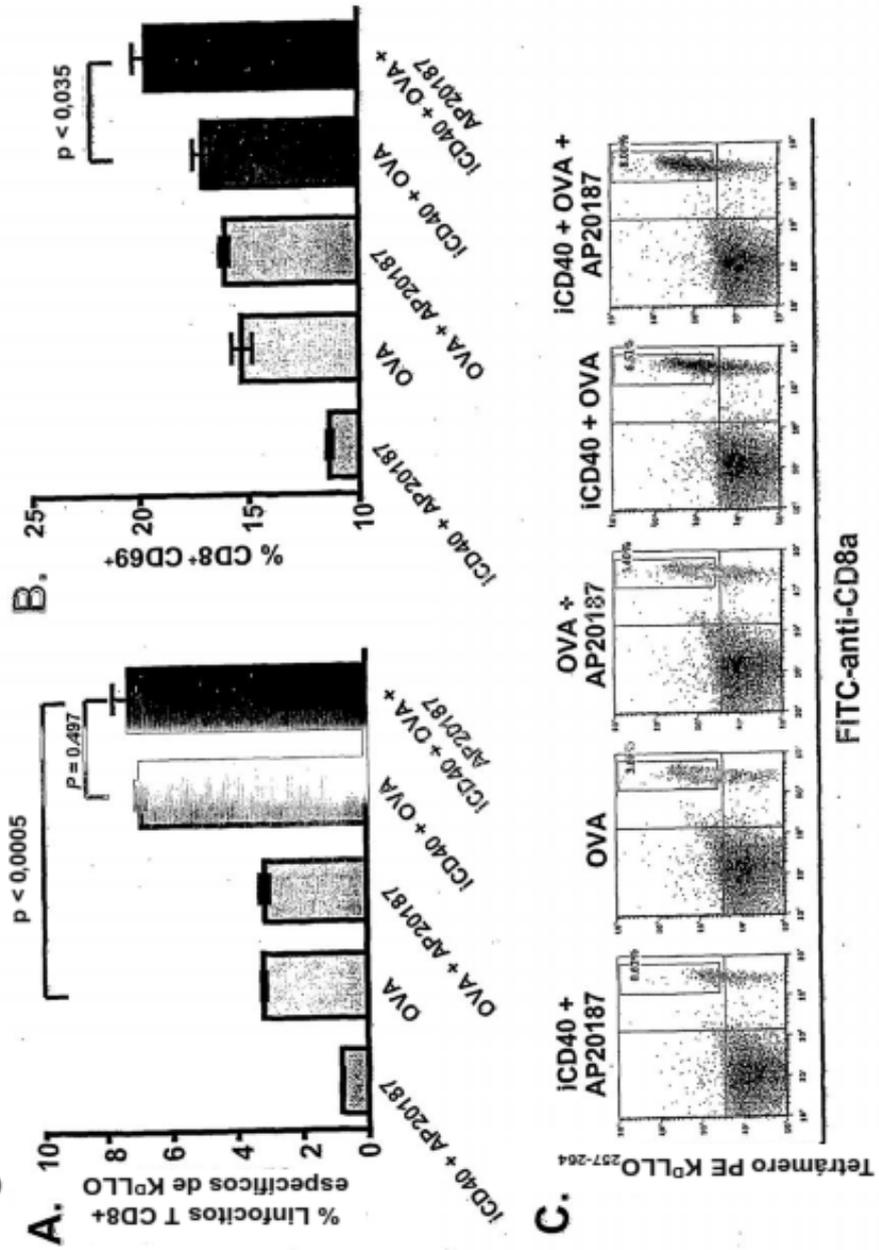


Figura 5.

Figura 6.



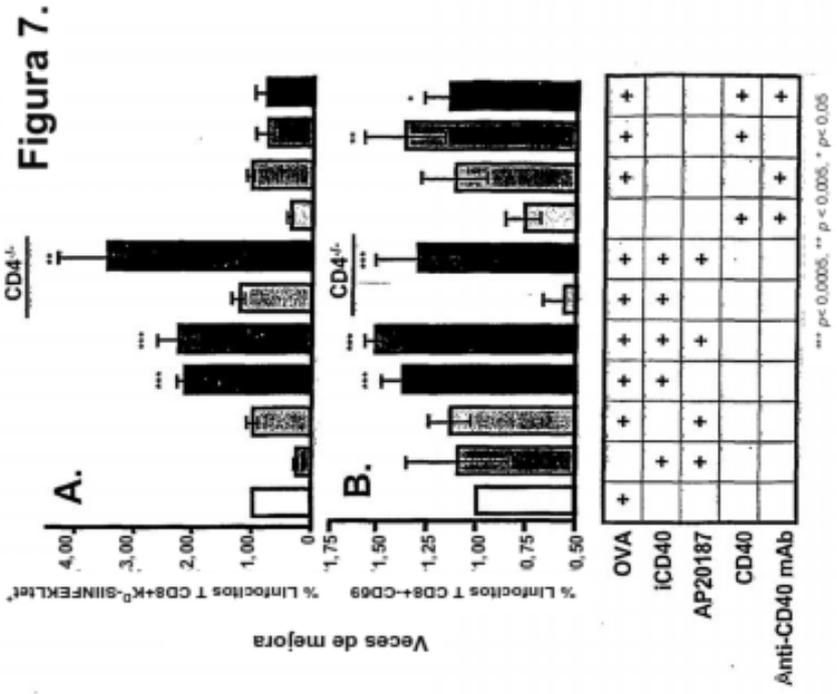
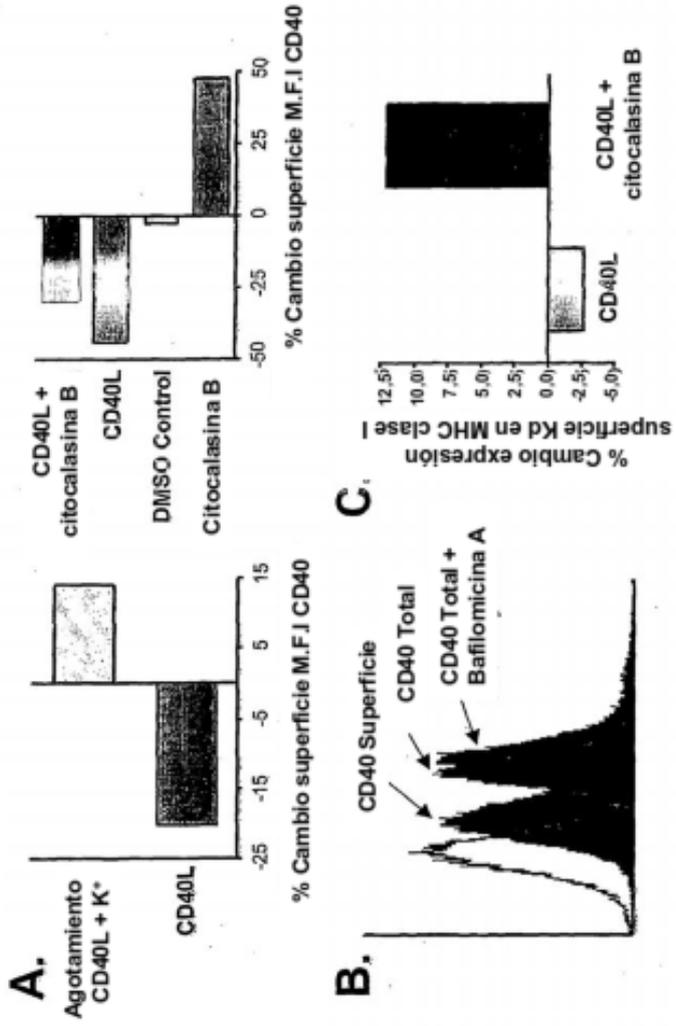


Figura 8.



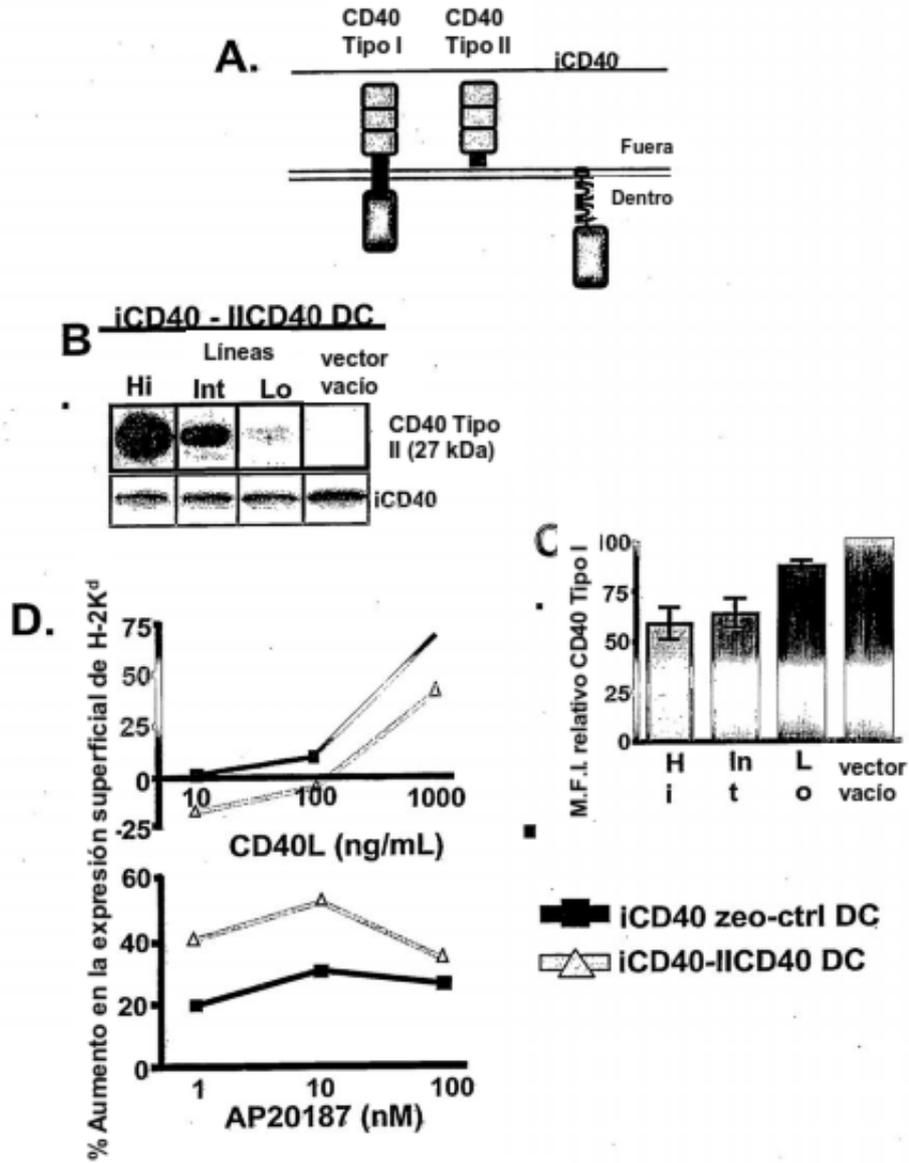


Figura 9.