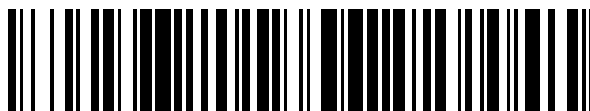


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 935**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2008** **E 08776024 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015** **EP 2185586**

54 Título: **Inmunomodulación mediante lectina de tipo C**

30 Prioridad:

20.07.2007 US 929999 P
19.03.2008 GB 0805159

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.01.2016

73 Titular/es:

CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED
(100.0%)
Angel Building 407 St John Street
London EC1V 4AD, GB

72 Inventor/es:

SANCHO-MADRID, DAVID;
SCHULZ, OLIVER;
ROGERS, NEIL CHARLES;
REIS E SOUSA, CAETANO;
PENNINGTON, DANIEL y
JOFFRE, OLIVIER PIERRE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 557 935 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

Inmunomodulación mediante lectina de tipo C

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a la regulación del sistema inmune, y en particular al uso de moléculas que tienen afinidad por la molécula CLEC9a para cebar e inhibir respuestas inmunes a antígenos diana.

10 **Antecedentes de la invención**

El sistema inmunitario puede detectar la presencia de agentes infecciosos, y estimular una respuesta contra ellos, sin destruir los tejidos propios. Este fenómeno no es trivial, dada la enorme diversidad molecular de patógenos, y sus altas tasas de replicación y mutación. Los organismos multicelulares se han estimulado durante la evolución para desarrollar algunos sistemas de reconocimiento inmunitario distintos, concretamente, los sistemas inmunitarios 'innatos' y 'adaptativos'.

El sistema inmunitario innato evolutivamente antiguo detecta la presencia y la naturaleza de la infección, proporciona la primera línea de defensa del hospedador, y controla el inicio y la determinación de la clase de efectores del sistema inmunitario adaptativo.

Las células dendríticas (DC) juegan un papel esencial al vincular la inmunidad innata y las respuestas adaptativas específicas de antígenos. Para iniciar una respuesta inmune, las DC se ceban (entre otros) mediante modelos moleculares asociados a patógenos (PAMP) expresados por patógenos. A continuación, las DC orquestan el desarrollo de la respuesta inmunitaria adaptativa, mucho más especializada e impulsan los linfocitos T y los linfocitos B específicos de antígeno.

Las funciones de reconocimiento y captación de antígenos de las DC contra patógenos están mediadas por los receptores de reconocimiento de modelos (PRR) que discriminan entre los PAMP. Estos PRR expresados por las DC incluyen los receptores de tipo Toll (TLR)¹. Además, las DC expresan otra clase de receptores, las lectinas de tipo C, algunas de las cuales pueden funcionar como PRR²⁻⁴, y/o median la comunicación intercelular⁵⁻⁸. Entre las lectinas de tipo C, existe un grupo de proteínas de tipo II con un único dominio de lectina de tipo C extracelular (CTLD) que están estructural y evolutivamente estrechamente relacionados, y agrupados en el complejo del gen NK (NKC). Aunque estos receptores carecen de un sitio de unión al calcio y un dominio de reconocimiento de hidratos de carbono típico, siguen pudiendo unirse a hidratos de carbono, como se muestra para la Dectina-1⁹. Alguno de estos receptores (CD94/NKG2, NKG2D) interactúa con MHC-I o moléculas relacionadas y bien inhiben o bien activan la citotoxicidad de los linfocitos NK y de los linfocitos T como resultado del equilibrio entre señales inhibitoras y activadoras. Sin embargo, para la mayoría de los receptores de la lectina NK, su función de especificidad de unión y de relevancia en NK o DC no es conocida. De esta manera, las lectinas de tipo C expresadas en las DC pueden actuar para reconocer microbios, pero pueden también regular la comunicación de las DC con otras células mediante el reconocimiento de estructuras celulares específicas.

La ontogenia y/o el microentorno en el cual se sitúan las DC pueden dar como resultado la expresión de distintas combinaciones de receptores superficiales en las DC. Por ejemplo, los criterios fenotípicos solo permiten la clasificación de las DC de los ganglios linfáticos de ratón en seis poblaciones principales¹⁰. De estos, las DC no plasmacitoides convencionales en tejidos linfoides convencionales se subdividen tradicionalmente en subpoblaciones CD8 α ⁻ y CD8 α ⁺. Se ha argumentado que los diferentes subconjuntos de DC pueden estar implicados en el reconocimiento específico de determinados patógenos y/o regulan diferentes respuestas inmunes, por ejemplo, Th1 o Th2 (inmunidad) o linfocitos T reguladores (tolerancia)¹¹. Sin embargo, el fenotipo y el comportamiento funcional de las DC también están significativamente condicionados por estímulos de activación externa, que denotan una plasticidad significativa. Como primer enfoque para comprender las diferencias entre los subconjuntos de DC, se aislaron las subpoblaciones de DC y sus propiedades se evaluaron *in vitro*: en ratón, los subconjuntos D8 α ⁺ y CD8 α ⁻ de DC de bazo difieren en su capacidad para fabricar IL-12 *in vitro*^{12,13}. Sin embargo, también se ha determinado la producción diferencial de IL-12 *in vitro* mediante el reconocimiento del modelo, lo que demuestra la flexibilidad funcional de los diferentes subconjuntos de DC¹⁴. Como segundo enfoque, se aislaron los subconjuntos de DC, se sometieron a un pulso de antígenos y, a continuación, se reinfundieron in vivo. Los subconjuntos CD8 α ⁺ y CD8 α ⁻ cebaron diferencialmente las respuestas Th1 y Th2 in vivo^{15,16}. La inmunoterapia es factible si los inventores pueden determinar las moléculas que se expresan selectivamente en un subconjunto de DC concreto. Estas moléculas pueden a continuación convertirse en diana para alterar la función de este subconjunto de DC.

Sumario de la invención

Los inventores han descubierto que CLEC9a se expresa preferentemente en el subconjunto de células dendríticas que expresan CD8 en ratones, y por tanto se han designado como células dendríticas CD8⁺. Este es un importante tipo celular porque se cree que puede procesar antígenos derivados del exterior de la célula y de presentarlos a los

linfocitos T mediante moléculas MHC de tipo I. Esto se diferencia de la mayoría de células presentadoras de antígenos, que presentan antígenos derivados extracelularmente mediante moléculas MHC de tipo II. En consecuencia, este mecanismo de presentación de antígenos se denomina algunas veces "Presentación cruzada". Estas células juegan por tanto un importante papel en la generación y estimulación de respuestas a linfocitos T citotóxicos (LTC), que son parte esencial del sistema inmunitario contra a patógenos intracelulares (por ejemplo, virus) y cánceres.

Este hallazgo da lugar a la exploración de numerosas aplicaciones. Por ejemplo, permite dirigir específicamente antígenos contra las células dendríticas capaces de presentación cruzada.

En un primer aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un antígeno peptídico, en la que el antígeno se acopla covalentemente a un anticuerpo o a uno de sus fragmentos funcionales que tiene afinidad por CLEC9a, y en la que dicha composición comprende además opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona además dicha composición para su uso en un método de tratamiento médico, por ejemplo, para su uso en la estimulación de una respuesta inmunitaria contra el antígeno o para su uso en la inducción de tolerancia hacia el antígeno.

La invención proporciona además el uso de dicha composición en la preparación de un medicamento para estimular una respuesta inmunitaria contra el antígeno o para su uso en la inducción de tolerancia hacia el antígeno.

La invención proporciona además un método para dirigir un antígeno contra una célula presentadora de antígenos, que comprende poner en contacto la célula presentadora de antígenos *in vitro* con dicha composición, en el que la célula presentadora de antígenos expresa CLEC9a.

A lo largo de esta memoria descriptiva, el término "agente de unión" se usa como término alternativo de anticuerpo o fragmento funcional del mismo que tiene afinidad por Clec9a.

La célula presentadora de antígenos será normalmente una célula dendrítica, y preferentemente es capaz de una presentación cruzada del antígeno extracelular mediante moléculas MHC de tipo I. Por "extracelular" se entiende que el antígeno se ha capturado por la célula desde su entorno extracelular, normalmente mediante endocitosis o fagocitosis.

Los métodos terapéuticos que emplean las composiciones de la invención pueden comprender una única administración, o una secuencia de dos o más administraciones separadas en intervalos determinados adecuados de tiempo. Por ejemplo, el método puede comprender una etapa de cebado (es decir, una primera administración) seguida por una o más etapas de refuerzo (una administración o administraciones posteriores). Por ejemplo, la primera administración y la segunda administración se pueden separar en uno o más días, una o más semanas, uno o más meses, preferentemente entre dos semanas y un mes. Se pueden proporcionar administraciones posteriores después de una o más semanas o meses.

Las respuestas inmunes estimuladas mediante el direccionamiento de CLEC9a implican la proliferación de linfocitos T, que pueden ser LTC o linfocitos T auxiliares. Las células presentadoras de antígenos (y en particular las células dendríticas) que expresan CLC9a pueden inducir la proliferación de linfocitos CD8+ T y linfocitos CD4+ T, y pueden estimular la proliferación de ambos tipos de linfocitos T en cualquier respuesta inmunitaria dada.

En determinadas circunstancias, se cree que pueden estimular la proliferación de linfocitos T reguladores (Treg). Los linfocitos Treg se caracterizan por la expresión del factor de transcripción Foxp3 (Forkhead box p3). La mayoría de linfocitos Treg son CD4+ y CD25+, y se pueden modular como un subconjunto de linfocitos T auxiliares, aunque una pequeña población puede ser CD8+. De esta manera, la respuesta inmunitaria puede comprender la proliferación de linfocitos Treg en respuesta al antígeno. La composición puede administrarse con un adyuvante que estimula la proliferación de linfocitos Treg.

En la medida que las composiciones de la invención estimulan la proliferación y diferenciación de linfocitos Treg en respuesta a un antígeno específico, puede considerarse que actúan estimulando una respuesta inmunitaria. Sin embargo, dado que los linfocitos Treg pueden modular la respuesta de otras células del sistema inmunitario contra un antígeno por otro camino, por ejemplo, inhibiendo o suprimiendo su actividad, el efecto sobre el sistema inmunitario en su conjunto puede ser modular (por ejemplo, suprimir o inhibir) la respuesta inmunitaria contra este antígeno. Por tanto, los métodos que implican composiciones de la invención pueden igualmente referirse a métodos de modular (por ejemplo, inhibir o suprimir) una respuesta inmunitaria contra un antígeno.

En la práctica, entonces, las composiciones de la invención pueden utilizarse terapéutica o profilácticamente para inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria indeseable contra un antígeno concreto, incluso en un sujeto con inmunidad preexistente o con una respuesta inmunitaria en curso contra el antígeno. Esto puede ser particularmente útil (por ejemplo) en el tratamiento de una enfermedad autoinmune.

En determinadas circunstancias, puede ser posible también que un sujeto tolere un antígeno concreto dirigiendo al antígeno contra la célula presentadora de antígenos que expresa CLEC9a. La composición puede emplearse de esta manera en métodos para inducir tolerancia en un sujeto hacia un antígeno, en los que la composición se administra en ausencia de un adyuvante.

5 La tolerancia en este contexto implica normalmente el agotamiento de las células inmunes que de otra manera podrían responder a este antígeno, o inducirían una reducción duradera en la sensibilidad a un antígeno en dichas células inmunes.

10 Normalmente, el sujeto es un vertebrado, preferentemente un mamífero. El sujeto puede ser un ser humano, otro primate, o un animal doméstico, de laboratorio o de ganadería, tal como un ratón, rata, cobaya, lagomorfo (por ejemplo, conejo), gato, perro, cerdo, vaca, caballo, oveja o cabra.

15 En cualquier aspecto de la invención, la composición puede ser una composición farmacéutica, por ejemplo, una vacuna, que contiene el antígeno y su anticuerpo asociado en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se puede formular mediante cualquier ruta de administración adecuada incluyendo, pero sin limitarse a intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, nasal, subcutánea, intradérmica, etc.

20 Las células dendríticas CD8 α pueden estar implicadas en al menos las respuestas inmunes de tipo Th1, Th2, y Th17. De esta manera, los métodos de la invención pueden aplicarse a la estimulación de diversos tipos de respuestas inmunes contra cualquier antígeno. Sin embargo, se cree que estas células son particularmente importantes en la generación de respuestas de LTC, de tal manera que la respuesta inmunitaria que se va a estimular es preferentemente una respuesta de LTC. Puede ser deseable determinar la producción y/o la proliferación de los LTC, que son normalmente linfocitos T que expresan CD8 y que tienen actividad citotóxica contra células que expresan su antígeno análogo en el contexto de moléculas de MHC de tipo I.

25 Sin embargo, dirigir el antígeno contra las células dendríticas CLEC9a⁺ puede dar también como resultado la proliferación de linfocitos T auxiliares, o en lugar de LTC. De esta manera, puede ser deseable adicional o alternativamente determinar la producción y/o la proliferación de linfocitos T auxiliares. Los linfocitos T auxiliares pueden ser linfocitos T CD4⁺, y pueden ser de tipo Th1, Th2, Th17 o Treg. Pueden incluir también otros tipos de linfocitos Treg que no expresan CD4, por ejemplo, linfocitos T CD8⁺ reguladores.

30 Se entenderá por tanto que los métodos y composiciones descritos en el presente documento se pueden usar para la profilaxis y/o el tratamiento de cualquier dolencia en la que sea deseable inducir una respuesta de LTC, tales como el cáncer, o una infección por un parásito o patógeno intracelular, tal como una infección vírica.

35 Puede ser deseable también administrar adicionalmente agentes inmunoestimuladores para conseguir la estimulación y proliferación máxima de LTC, y/o la estimulación y proliferación de otros tipos de linfocitos T. Estos pueden incluir agentes que pueden activar células dendríticas y estimular su capacidad para promover la activación de los linfocitos T. Dicho agente puede denominarse adyuvante. El adyuvante puede comprender un agonista de CD40 (tal como un ligando de CD40 soluble, o un anticuerpo agonista específico de CD40), un agonista de CD28, CD27 u OX40 (por ejemplo, un anticuerpo agonista específico de una de dichas moléculas), un antagonista de CTLA-4 (por ejemplo, un anticuerpo de bloqueo específico de CTLA-4), y/o un agonista del receptor de tipo Toll (TLR), y/o cualquier otro agente que pueda inducir la activación de células dendríticas. Un agonista de TLR es una sustancia que activa un receptor de tipo Toll. Preferentemente, el agonista de TLR es un activador de TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 o TLR9. Un agonista de TLR adecuado es MPL (monofosforil lípido A), que se une a TLR4. Otros agonistas de TLR que se puede usar son LTA (ácido lipoteicoico, que se une a TLR2; Poli I:C (ácido poliinosinapolicitidílico), que se une a TLR3; flagelina, que se une a TLR5; imiquimod o poliU ARN(1-(2-metilpropil)-1H-imidazo(4,5-c) quinolin-4-amina), que se une a TLR7 y CpG (motivos de ADN CpG) que se une a TLR9; o cualquier otro componente que se une y activa un TLR. Para más detalles, véanse Reis e Sousa, Toll-like receptors and dendritic cells. Seminars in Immunology 16:27, 2004. Los adyuvantes que puede que no actúen mediante TLR incluyen 5' trifosfato de ARN, poli I:C, y β -glucanos tales como curdlan (β -1,3-glucano). Se pueden usar también como adyuvantes citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α o IL-1

55 Los agentes de unión que tienen actividad agonista de CLEC9a (por ejemplo, pueden reticular CLC9a sobre la superficie de células dendríticas, que se describe con más detalle a continuación) pueden activar las células dendríticas. Dichos agentes de unión agonistas pueden considerarse por tanto adyuvantes por derecho propio. De esta manera, cuando se usa dicho agente de unión, puede no ser necesario administrar un adyuvante adicional tal como el que se ha descrito anteriormente (aunque puede seguir siendo deseable hacerlo). Se describen con más detalle a continuación los agentes de unión que pueden actuar como agonistas de CLC9a.

60 Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, se cree que la naturaleza del adyuvante usado puede afectar el tipo de respuesta obtenida. Las células presentadoras de antígenos que expresan CLEC9a pueden estimular tanto los linfocitos T CD4⁺ como los linfocitos T CD8⁺, y la naturaleza de la respuesta de CD4⁺ puede estar afectada por el adyuvante utilizado. Por ejemplo, el uso de poli I:C parece favorecer la generación de una respuesta de CD4⁺ de tipo Th1. Curdlan parece estimular una respuesta de CD4⁺ de tipo Th17

Determinados adyuvantes promueven la estimulación de células Treg. Estos incluyen el ácido retinoico, y en particular el ácido retinoico todo trans (ATRA) conocido también como tretinoína. De esta manera, cuando la respuesta inmunitaria que se va a estimular es una respuesta Treg (que puede en la práctica suprimir las respuestas de otros componentes del sistema inmunitario contra un agente concreto) puede ser adecuado utilizar un adyuvante promotor de Treg. Puede ser también posible favorecer la estimulación de linfocitos T sin la administración de un adyuvante.

Las composiciones de la invención pueden administrarse o formularse para la administración con el adyuvante, tanto secuencial como simultáneamente, en las mismas composiciones o en composiciones separadas. De esta manera, las composiciones de la invención pueden, pero no es necesario, comprender un adyuvante.

Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, y como se ha explicado anteriormente, se cree que la administración del antígeno en ausencia de un adyuvante puede dar como resultado el desarrollo de tolerancia al antígeno. Es decir, se induce que el sistema inmunitario no responda a futuras administraciones del mismo antígeno. Esto puede implicar (pero no necesariamente) la generación de linfocitos Treg capaces de la supresión activa de la respuesta. De esta manera, las administraciones adicionales de un antígeno a un sujeto que han sido toleradas para este antígeno deben dar como resultado una menor respuesta inmunitaria que en un sujeto sin tratamiento previo para este antígeno (es decir, cuyo sistema inmunitario no se ha expuesto previamente al antígeno). La magnitud de la respuesta inmunitaria puede evaluarse mediante cualquier criterio adecuado, tal como la aparición de inflamación, hinchazón, proliferación celular (por ejemplo, de linfocitos T CD4⁺ Th1, Th2 o Th17 o LTC) o producción de citoquinas inflamatorias (por ejemplo, IL-1, IL-4, IL-12, IFN-gamma, TNF-alfa). En determinadas realizaciones, el individuo que se ha hecho tolerante no presentará sustancialmente respuesta inmunitaria a este antígeno.

En las composiciones y métodos anteriormente descritos, el antígeno se acopla covalentemente al agente de unión. Por ejemplo, el agente de unión puede acoplarse al antígeno mediante un agente de acoplamiento adecuado. La persona experta es muy consciente de los métodos y reactivos adecuados que se pueden usar para las reacciones de acoplamiento.

Como alternativa, el antígeno y el agente de unión pueden ser parte de la misma cadena peptídica, es decir, pueden expresarse como una proteína de fusión. La proteína de fusión puede contener una secuencia enlazadora entre el antígeno y el agente de unión.

El agente de unión es un anticuerpo contra CLC9a o uno de sus fragmentos funcionales. De esta manera, el agente de unión comprende un sitio de unión a anticuerpo específico de CLC9a. El agente de unión puede ser polivalente como se describe con más detalle a continuación.

El antígeno es un antígeno peptídico. El término "péptido" se refiere a la naturaleza del antígeno, es decir, que está formado por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, y no debe interpretarse que implica cualquier tamaño o longitud concreta. Normalmente, el antígeno peptídico tendrá al menos 8 aminoácidos de longitud, y puede tener hasta 30 aminoácidos de longitud, hasta 50 aminoácidos de longitud, hasta 100 aminoácidos, hasta 200 aminoácidos, e incluso más longitud y puede tener restos acoplados a los aminoácidos, tales como cadenas de glicol. Por ejemplo, puede tener de 25 a 35 aminoácidos de longitud.

Aunque sin desear quedar ligado por teoría particular alguna, el antígeno peptídico debe poder unirse a moléculas MHC de tipo II o moléculas MHC de tipo I, o debe poder procesarse en una célula presentadora de antígenos (tal como una célula dendrítica) para dar lugar a uno o más péptidos que pueden a moléculas MHC de tipo II o moléculas de MHC de tipo I. Se ha sugerido recientemente que los péptidos de epítomos cortos de aproximadamente 8 aminoácidos de longitud pueden inducir una reactividad de LTC menos sostenida que los péptidos más largos (por ejemplo, alrededor de 30 aminoácidos de longitud) (21). Las moléculas MHC de tipo I se unen normalmente a péptidos de 8 o 9 aminoácidos de longitud, mientras que las moléculas MHC de tipo II pueden unirse a péptidos de 8 aminoácidos hasta 20 aminoácidos, hasta 30 aminoácidos, o incluso más.

El antígeno puede ser cualquier proteína o fragmento de la misma contra la cual es deseable provocar una respuesta inmune, en particular una respuesta de LTC, pero también una respuesta Th17 o una respuesta Treg. Esta puede incluir antígenos asociados con, expresados por, expresados en, o secretados por células contra las cuales es deseable estimular una respuesta de LTC, incluyendo células cancerosas y células que contienen patógenos o parásitos intracelulares. Por ejemplo, el antígeno puede ser, o puede comprender, un péptido epitópico procedente de una proteína expresada por un patógeno o parásito intracelular (tal como una proteína vírica) o procedente de una proteína expresada por una célula cancerosa o tumoral. De esta manera, el antígeno puede ser un antígeno específico de tumor. El término antígeno "específico de tumor" no debe interpretarse como restringido a antígenos procedentes de tumores sólidos, sino que abarca antígenos expresados específicamente por cualquier célula cancerosa, transformada o maligna.

Puede ser particularmente deseable provocar una respuesta Treg contra un antígeno contra el cual el sujeto presenta, o está en riesgo de desarrollar, una respuesta inmunitaria indeseable. Por ejemplo, puede ser un autoantígeno contra el cual se produce una respuesta inmunitaria en una enfermedad autoinmune. Los ejemplos de

enfermedades autoinmunes en las que se han identificado antígenos específicos potencialmente patogénicos significativos incluyen la esclerosis múltiple (proteína básica de mielina), diabetes mellitus dependiente de insulina (ácido glutámico decarboxilasa), diabetes mellitus resistente a insulina (receptor de insulina), enfermedad celíaca (gliadina), penfigoide bulloso (colágeno de tipo XVII), anemia hemolítica autoinmune (proteína Rh), trombocitopenia autoinmune (GpIIb/IIIa), miastenia grave (receptor de la acetilcolina), enfermedad de Graves (receptor de la hormona estimuladora del tiroides), glomerulonefritis, tal como enfermedad de Goodpasture (colágeno alfa3(IV)NC1), y anemia perniciosa (factor intrínseco). Como alternativa, el antígeno diana puede ser un antígeno exógeno que estimula una respuesta que produce también daños a los tejidos del hospedador. Por ejemplo, la fiebre reumática aguda está producida por una respuesta de anticuerpos a un antígeno estreptocócico que reacciona en cruzado con un antígeno de las células del músculo cardíaco. De esta manera, estos antígenos, o sus fragmentos o epítomos concretos, pueden ser antígenos adecuados a utilizar en la presente invención.

El agotamiento de los linfocitos Treg o el deterioro de la función de los linfocitos Treg ha mostrado dar como resultado una enfermedad autoinmunitaria en modelos murinos. Las enfermedades producidas en animales de ensayo incluyen la artritis (por ejemplo, artritis reumatoide), enfermedad inflamatoria del intestino, gastritis, anemia perniciosa, tiroiditis, insulinitis, diabetes, sialoadenitis, adrenalitis, orquitislooforitis autoinmune, glomerulonefritis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y encefalitis autoinmune experimental y esclerosis múltiple.

Se ha mostrado también que la inducción de una respuesta de tipo 1 de los linfocitos T reguladores reduce el desarrollo del ateroesclerosis en modelos de murino (Mallat Z. et al. Circulation 108:1232-7, 2003).

Se ha mostrado también que la actividad de Treg es significativa en la tasa a la cual se rechazan los aloinjertos. El agotamiento de los linfocitos Treg o el deterioro de la función aceleran la tasa de rechazo, aunque la infusión de animales de ensayo con linfocitos singénicos enriquecidos con linfocitos Treg ha mostrado prolongar la supervivencia del injerto.

Las composiciones de la presente invención pueden por tanto encontrar uso en el tratamiento de cualquiera de estas dolencias.

El hallazgo de que la molécula de CLEC9a es un marcador de un subconjunto específico de células dendríticas también la convierte en un agente terapéutico adecuado para la regulación por defecto de respuestas inmunes indeseables.

En un aspecto adicional, la invención proporciona:

- (i) un ácido nucleico que puede hibridarse con el ARNm o el ADN que codifica CLEC9a y que es un ARN o un ADN antisentido, un ARNip o una ribozima, o (ii) un anticuerpo o uno de sus fragmentos funcionales que tiene afinidad por CLEC9a que comprende una molécula de toxina capaz de destruir una célula o una enzima capaz de convertir una molécula no tóxica en una molécula tóxica, para utilizar en un método de tratamiento médico, por ejemplo, para su uso en la inhibición de una respuesta inmunitaria.

De esta manera, un anticuerpo o uno de sus fragmentos funcionales que tiene afinidad por CLC9a puede comprender un resto efector que actúa para destruir células diana. Por ejemplo, puede comprender una molécula de toxina que puede destruir la célula. Este mecanismo puede ser particularmente eficaz, dado que los inventores han mostrado que los anticuerpos que se unen a CLEC9a pueden someterse a endocitosis por las células dendríticas, de tal manera que la molécula de toxina conjugada tendría una elevada probabilidad de ser capturada en la célula.

Como alternativa, el resto efector puede ser una enzima que puede convertir una molécula no tóxica en una molécula tóxica en la proximidad de la célula.

Dichos ácidos nucleicos, y anticuerpos o sus fragmentos funcionales, pueden ser particularmente útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Algunas enfermedades autoinmunes se caracterizan por niveles inusualmente elevados de muerte celular y se cree que las respuestas inmunes contra autoantígenos asociados con estas células pueden contribuir a la patogénesis de estas dolencias. Dichos agentes pueden inhibir o evitar la estimulación de respuestas inmunes contra estos antígenos.

Los anticuerpos pueden expresarse convenientemente en forma de scFv. Si fuera necesario, un anticuerpo puede codificarse como una proteína de fusión con el antígeno, o con un resto efector como se ha descrito anteriormente. Un ejemplo de solución de vacunación de ADN se describe en Nchinda et al., J. Clin. Invest. 118(4), 1427-36, 2008.

El ácido nucleico comprende normalmente una región de codificación que codifica el agente de unión, opcionalmente junto con cualquier ligando, en unión operativa con secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción para asegurar la expresión y la secreción adecuadas de las proteínas de las células que captan el ácido nucleico. Dichas secuencias incluyen (pero no se limitan a) secuencias de inicio de la transcripción (por ejemplo, promotor y potenciador), secuencias de terminación de la transcripción, señales de corte y empalme adecuadas, secuencias de inicio y terminación de la traducción, y un péptido señal para permitir la secreción.

El sujeto que se va a tratar puede padecer una dolencia inflamatoria o autoinmune, especialmente una dolencia caracterizada por una actividad de LTC indeseable, y/o una dolencia caracterizada por altos niveles de muerte celular. Dichas afecciones incluyen:

- 5 - enfermedades autoinmunes, incluyendo artritis reumatoide y otros tipos de artritis crónica o aguda u artropatía con un componente inmune, lupus sistémico eritematoso (que se conoce por implicar particularmente altos niveles de muerte celular), escleroderma, síndrome de Sjögren, diabetes autoinmune (particularmente de Tipo I), tiroiditis, y otras enfermedades inmunes específicas de órganos, incluyendo psoriasis;
- 10 - enfermedades neurológicas, incluyendo esclerosis múltiple, miastenia grave, y otras enfermedades neurológicas inmunomediadas. Se incluyen también enfermedades gastrointestinales, incluyendo enfermedad de Crohn, colitis, enfermedad celíaca y hepatitis;
- 15 - enfermedades cardiovasculares, que se reconocen ahora que tienen un componente inmunomediado significativo, incluyendo aterosclerosis, cardiomiopatía, fiebre reumática, endocarditis, vasculitis, y otras enfermedades cardiovasculares inmunomediadas;
- 20 - enfermedades respiratorias inmunomediadas, incluyendo enfisema, infecciones de las vías aéreas respiratorias, y otras enfermedades respiratorias inmunomediadas;
- 25 - procesos alérgicos y reacciones de hipersensibilidad (tipo I, II, III, y IV), incluyendo asma, rinitis, y otras reacciones de hipersensibilidad inmunomediadas;
- rechazo al trasplante o al injerto y enfermedad de injerto frente a hospedador, como se produce durante o posteriormente a, por ejemplo, trasplante de órganos, injerto de tejidos, transfusión de sangre, trasplante de médula ósea;
- respuestas inmunopatológicas a agentes infecciosos, incluyendo síndromes de choque séptico;
- 30 - procesos degenerativos, tales como procesos neurodegenerativos, que implican células inmunocompetentes tales como microglía.

Los inventores han encontrado también que los agonistas de CLEC9a pueden activar células dendríticas, y por tanto pueden ser útiles en la estimulación de la función inmunitaria.

- 35 Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, se cree que los agentes de unión que tienen más de dos sitios de unión (es decir, sitios de unión a anticuerpos) específicos para CLEC9a pueden ser agonistas particularmente eficaces de la actividad de CLEC9a, debido probablemente a que pueden reticular o producir la asociación o multimerización de CLEC9a sobre una superficie celular. Los agentes de unión pueden denominarse "bivalentes" si poseen dos de dichos sitios de unión o "polivalentes" si poseen más de dos de dichos sitios de unión. Por tanto, el agente de unión es preferentemente polivalente, y puede comprender al menos tres, cuatro, cinco, diez o incluso más sitios de unión. Dichos agentes de unión pueden comprender una pluralidad de sitios de unión inmovilizados en o sobre una partícula, tal como una perla (por ejemplo, de látex), un liposoma o vesícula, o cualquier otra partícula adecuada. De esta manera, los sitios de unión pueden estar inmovilizados o en una fase sólida particulada. Como alternativa, un agente de unión polivalente puede comprender simplemente más de dos sitios de unión unidos covalentemente o asociados de otra manera entre sí. Por ejemplo, los anticuerpos completos o sus fragmentos funcionales (véase a continuación) pueden estar asociados como proteínas de fusión y/o mediante reticulación química. La persona experta es muy consciente de las técnicas adecuadas para preparar dichos agentes de unión polivalentes. Cuando los métodos se llevan a cabo in vitro, los agentes de unión (tal como anticuerpos contra Clec9a) inmovilizados sobre la superficie del recipiente de cultivo se pueden usar como agonistas; en este caso, la superficie revestida del recipiente de cultivo puede considerarse por sí misma como un agente de unión polivalente.

- 50 Como ya se ha descrito, los métodos y composiciones descritos pueden ser particularmente útiles para la profilaxis y/o tratamiento de cualquier dolencia en la que sea deseable inducir una respuesta de LTC, tales como el cáncer, o una infección por un parásito o patógeno intracelular, tal como una infección vírica.

- 55 Los métodos y composiciones descritos pueden utilizarse también para la profilaxis y/o el tratamiento de cualquier dolencia en la que sea deseable inducir una respuesta Treg, por ejemplo, una dolencia que implica una respuesta inmunitaria indeseable o inadecuada contra una dolencia concreta, tal como una enfermedad autoinmune.

- 60 Un agente o adyuvante inmunoestimulador adicional como se ha descrito anteriormente puede también administrarse en asociación con el agonista y opcionalmente al antígeno. De esta manera, el adyuvante puede comprender, por ejemplo, un agonista de CD40 o un agonista de TLR. La naturaleza del adyuvante puede seleccionarse dependiendo de la naturaleza de la respuesta inmunitaria deseada. De esta manera, por ejemplo, si es deseable la respuesta de los linfocitos T CD4 de tipo Th17 o una respuesta de Treg, el adyuvante puede seleccionarse de acuerdo con ello.

La identificación de CLEC9a como marcador de un subconjunto de células dendríticas proporciona medios para la identificación y el aislamiento de dichas células procedentes de muestras biológicas.

5 De esta manera, en un aspecto adicional, la invención proporciona un método para aislar una célula presentadora de antígenos procedente de una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con un agente de unión (es decir, un anticuerpo o uno de sus fragmentos funcionales) que tiene afinidad por CLEC9a y aislar una o más células a las cuales se une el agente de unión. El agente de unión puede inmovilizarse sobre un soporte sólido (tal como una perla magnética) para facilitar el aislamiento.

10 Como resultara evidente de la descripción anterior, la célula presentadora de antígenos es normalmente una célula dendrítica, y puede ser capaz de presentar de forma cruzada un antígeno extracelular mediante moléculas MHC de tipo I.

15 Para confirmar que las células identificadas por el agente de unión para CLEC9a son células dendríticas, o para enriquecer una muestra de células dendríticas antes de poner en contacto las células con el agente de unión de CLEC9a, el método puede comprender la etapa de poner en contacto la muestra con un segundo agente de unión que tiene afinidad por un marcador de células dendríticas y determinar la unión del segundo agente de unión a una o más células. Los dos agentes de unión pueden ponerse en contacto con las células simultánea o secuencialmente, y en cualquier orden. En algunas realizaciones, solo se identifican o aíslan aquellas células a las cuales se unen el primer y segundo agentes de unión.

El marcador de células dendríticas puede ser un marcador de células dendríticas del dolor tales como CD11, especialmente CD11c (en ratones).

25 Para las muestras de células dendríticas humanas, el marcador de células dendríticas puede ser HLA-DR. Puede ser deseable confirmar que las células son de linaje negativo, es decir, que no expresan CD3, CD14, CD19 o CD56.

30 Para las muestras de células humanas, puede ser deseable confirmar que las células identificadas por el agente de unión para CLEC9a expresan también BDCA-3 (conocido también como CD141 o trombomodulina). El método puede comprender por tanto la etapa de poner en contacto la muestra con un agente de unión adicional que tiene afinidad por BDCA-3 y determinar la unión del agente de unión adicional a una o más células, y/o aislar células a las cuales se une el agente de unión adicional. Los agentes de unión a CLEC9a y BDCA-3 pueden ponerse en contacto con las células simultánea o secuencialmente, y en cualquier orden. En algunas realizaciones, solo se identifican o aíslan aquellas células a las cuales se unen los agentes de unión.

35 De manera adicional o alternativa, puede ser deseable enriquecer la muestra en el tipo de célula deseada mediante la selección negativa de uno o más tipos de células no deseadas. Los tipos de células no deseadas pueden comprender otros subgrupos de células dendríticas tales como células dendríticas plasmacitoides (DCp) que se pueden excluir mediante selección negativa de CD123 o Ly6C. La selección negativa puede llevarse a cabo antes, simultáneamente con, o después de la selección de células que expresan CLEC9a. La selección negativa puede llevarse a cabo para CD3, CD14, CD19, y/o CD56.

40 Puede ser también deseable determinar el nivel de expresión de CLEC9a sobre las células. Esto puede hacer posible seleccionar solo células que expresan un nivel deseado de CLEC9a, por ejemplo, un nivel mayor de CLEC9a diferente de otra población de células que expresan CLEC9a a un nivel detectable. Por ejemplo, sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, se cree que el subconjunto de DC que expresan CDB (o es equivalente al de este subconjunto en seres humanos) expresa un nivel mayor de CLEC9a que las DCp. Puede ser posible por tanto seleccionar CDB DC o sus equivalentes seleccionado solo aquellas células que expresan CLEC9a por encima de un determinado nivel umbral.

50 Los agentes de unión pueden marcarse para facilitar la detección y/o el aislamiento de las células, por ejemplo, con una marca que pueda emitir una señal detectable (tal como una marca fluorescente o radioactiva) o con una etiqueta de afinidad que puede unirse específicamente a un ligando. Los ejemplos de etiquetas de afinidad y de ligandos incluyen epítopos y antígenos análogos, los péptidos cargados positivamente (por ejemplo, poli-His) e iones metálicos (por ejemplo, níquel), avidina/estreptavidina y biotina, hidratos de carbono y lectinas, etc. La persona experta será capaz de diseñar un sistema adecuado dependiendo de sus requerimientos específicos.

55 La identificación o el aislamiento de las células pueden implicar poner en contacto la muestra con uno o más agentes de detección que pueden unirse al primer y/o segundo agente de unión. El agente de detección puede marcarse por sí mismo como se ha descrito anteriormente.

60 Para facilitar el aislamiento o la detección, el agente de unión o detección puede inmovilizarse sobre un soporte sólido.

65 Las células aisladas por estos métodos pueden utilizarse para varios fines, incluyendo el estudio in vitro y el tratamiento ex vivo. Por ejemplo, las células aisladas pueden pulsarse con un antígeno deseado in vitro. Las células

pueden administrarse a continuación a un sujeto para estimular una respuesta inmunitaria contra el antígeno.

De esta manera, la invención proporciona además un método para estimular una respuesta inmunitaria contra un antígeno peptídico que comprende proporcionar una célula presentadora de antígenos o una de sus poblaciones aislada mediante un método que se ha descrito anteriormente, y poner en contacto dicha célula o población de células in vitro con dicho antígeno.

Preferentemente, las células presentadoras de antígenos presentan dicho antígeno o uno de sus fragmentos en el contexto de las moléculas MHC de tipo I.

Tras dicha etapa de puesta en contacto, la célula o población de células puede administrarse a un sujeto. Preferentemente, las células se readministran al sujeto del cual se derivan.

La célula o población de células puede también ponerse en contacto con un adyuvante, tal como se ha descrito anteriormente. La puesta en contacto puede tener lugar in vitro, por ejemplo a o aproximadamente al mismo tiempo que la puesta en contacto con el antígeno, o durante, o tras la administración al sujeto receptor. La puesta en contacto con el adyuvante puede estimular la capacidad de la célula o población de células de activar o promover la proliferación de linfocitos T en respuesta al antígeno. El adyuvante puede administrarse simultáneamente con las células, o bien secuencialmente, en la misma composición o en composiciones diferentes. El adyuvante inmunoestimulador puede ser, por ejemplo, un agonista de CD40 o un agonista de TLR. La naturaleza del adyuvante puede seleccionarse dependiendo de la naturaleza de la respuesta inmunitaria deseada. De esta manera, por ejemplo, si es deseable la respuesta de los linfocitos T CD4 de tipo Th17 o una respuesta de Treg, el adyuvante puede seleccionarse de acuerdo con ello.

Una célula presentadora de antígenos cebada o una de sus poblaciones puede obtenerse por tanto mediante los métodos descritos anteriormente. Por "cebado" se entiende que la célula se ha puesto en contacto con un antígeno, se presenta este antígeno o uno de sus epítopos en el contexto de moléculas MHC, preferentemente moléculas MHC de tipo I, y puede activar o estimular linfocitos T para proliferar y diferenciarse en células efectoras en respuesta a las anteriores.

Se puede usar una célula presentadora de antígenos cebada o una de sus poblaciones, obtenida mediante los métodos descritos anteriormente, en un método de tratamiento médico, y especialmente en un método de estimulación de la respuesta inmunitaria contra un antígeno diana. Se puede usar una célula presentadora de antígenos cebada o una de sus poblaciones, obtenida mediante los métodos descritos anteriormente, en la preparación de un medicamento para la estimulación de una respuesta inmunitaria contra un antígeno diana.

Como alternativa, las células cebadas pueden ponerse en contacto con linfocitos T in vitro para generar linfocitos T (particularmente LTC, pero también linfocitos T CD4+ incluyendo linfocitos Th17 y linfocitos Treg) específicos del antígeno. De esta manera, tras dicha etapa de puesta en contacto, el método puede comprender poner en contacto dichas células presentadoras de antígenos con una población de células que comprenden uno o más linfocitos T. Puede permitirse que los linfocitos T de la población se expandan en el cultivo para aumentar el número o proporción de linfocitos T en la población que son específicos del antígeno. Los linfocitos T pueden a continuación administrarse a un sujeto. Opcionalmente, los linfocitos T se separan de otras células en la población antes de la administración.

La población de células puede también ponerse en contacto con un adyuvante, por ejemplo, en sustancialmente el mismo tiempo que se ponen en contacto con las células presentadoras de antígenos cebadas.

Preferentemente, los linfocitos T y las células presentadoras de antígenos son autólogos, es decir, se derivan del mismo sujeto, o de sujetos genéticamente idénticos.

Los linfocitos T pueden readministrarse al sujeto a partir del cual se derivaron (o lo hicieron sus progenitores).

De nuevo, puede administrarse un adyuvante con los linfocitos T, cuando se readministran al sujeto. El adyuvante puede ser un agonista de CD40 (tal como un anticuerpo específico de CD40) o un agonista de TLR. El adyuvante puede administrarse simultáneamente con los linfocitos T o secuencialmente, en la misma composición o en composiciones diferentes.

Los métodos de la invención pueden utilizarse para proporcionar una población aislada de células dendríticas humanas que expresan CLC9a. La población puede contener al menos 5, al menos 10, al menos 100, al menos 1000 o al menos 10.000 células dendríticas. Preferentemente al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, o al menos 95 % de células dendríticas en la población que expresa CLEC9a. Con este fin, se consideró que las células dendríticas eran de linaje negativo, células HLA-DR⁺. Las células de linaje negativo no expresan CD3, CD14, CD19 o CD56.

La población aislada puede estar incluida en una muestra que comprende otros tipos de células, siempre que la proporción requerida de células dendríticas en la muestra exprese CLEC9a. De esta manera, la muestra puede comprender linfocitos (por ejemplo, linfocitos T, y especialmente LTC), u otros tipos de células presentadoras de antígenos que no son células dendríticas.

Las células dendríticas que expresan CLEC9a serán normalmente BDCA-3+. Pueden ser también CD123-, CD34-, CD16- y CD11b/c.

En todos los aspectos anteriormente descritos, el antígeno puede ser cualquier antígeno contra el cual es deseable estimular una respuesta inmune, particularmente una respuesta de LTC, una respuesta de tipo Th17 o una respuesta Treg. Por ejemplo, el antígeno puede ser un antígeno expresado por un patógeno o parásito intracelular, o puede ser expresado por una célula cancerosa, como se describe en otra parte en esta memoria descriptiva. Como alternativa, puede ser un antígeno contra el cual tiene lugar una respuesta indeseable o inadecuada (por ejemplo, en una enfermedad autoinmune) y contra la cual se desea estimular una respuesta Treg.

El sorprendente hallazgo de que CLEC9a se una a un ligando que se encuentra sobre o en células de mamíferos, en lugar de a agentes infecciosos, también posibilita que estén disponibles ensayos para la identificación del ligando.

Un método de cribado de un ligando fisiológico de CLEC9a puede comprender poner en contacto una sustancia diana que comprende el dominio extracelular de CLEC9a o una de sus porciones suficiente para unir el ligando de CLEC9a con una sustancia de ensayo que es un componente de una célula de mamífero, y determinar la unión de la sustancia diana a la sustancia de ensayo.

La unión puede indicar que la sustancia de ensayo es un (o el) ligando fisiológico de CLEC9a.

Cuando se produce la unión, el método puede comprender además la etapa de identificar la sustancia de ensayo.

Se cree que el ligando de CLEC9a se expresa constitutivamente en alguna o en todas las células de mamíferos sanas, pero no es accesible para la interacción con CLEC9a mientras la célula permanece sana. Algunos tipos de daño celular o muerte celular (especialmente cuando los factores inmunógenos, tales como los de la necrosis primaria o secundaria) dan lugar a que el ligando se exponga de tal manera que se vuelve accesible para la interacción con CLEC9a o las células dendríticas.

De esta manera, la sustancia de ensayo puede ser un componente intracelular de una célula de mamífero (por ejemplo, una célula de mamífero sana, no infectada por un parásito o patógeno intracelular). Puede comprender o consistir en una proteína, hidratos de carbono, lípidos o ácidos nucleicos. Puede comprender más de uno de estos componentes, por ejemplo puede ser una proteína glicosilada que comprende componentes de hidratos de carbono y componentes lípidos, una proteína anclada a lípido que comprende componentes lípidos y proteínas (y opcionalmente también hidratos de carbono), o un glicolípido que comprende componentes lípidos y carbohidratos.

Se entenderá que la sustancia de ensayo puede no comprender la molécula o sustancia completa que estaría presente en la célula de mamífero en condiciones fisiológicas, pero puede comprender una de sus porciones que es suficiente para interactuar con CLEC9a. Por ejemplo, la sustancia de ensayo puede comprender un dominio aislado, o incluso un péptido (por ejemplo, de 5 a 10 aminoácidos, hasta 20 aminoácidos, hasta 50 aminoácidos, o hasta 100 aminoácidos) de una proteína celular.

Normalmente, la sustancia de ensayo será de la misma especie de mamífero que la de CLEC9a (o una de sus porciones) que está presente en la sustancia diana.

El método puede comprender la etapa de poner en contacto la sustancia diana con una muestra (por ejemplo, una muestra líquida, tal como una muestra acuosa) que comprende la sustancia de ensayo.

La sustancia diana puede proporcionarse en solución (por ejemplo, en una solución acuosa) o puede estar inmovilizada sobre un soporte sólido. La muestra puede comprender células de mamífero permeabilizadas. Por "permeabilizada" se entiende que la membrana plasmática se ha vuelto permeable mediante difusión para entidades que no serían capaces normalmente de cruzar la membrana plasmática (sin ser capturadas activamente por la célula). Colorantes tales como yoduro de propidio y TO-PRO3, a los cuales la membrana plasmática no es permeable en condiciones normales, se usan convencionalmente para ensayar la integridad/permeabilidad de la membrana plasmática. De esta manera, la membrana plasmática puede ser permeable a dichas sustancias. Por ejemplo, puede ser permeable a sustancias que tienen un peso molecular por encima de 500 Da, por encima de 1 kDa, por encima de 10 kDa, por encima de 50 kDa, por encima de 100 kDa, o incluso mayores. El término "permeabilizada" se usa en el presente documento para referirse a células que retienen sustancialmente su arquitectura celular (aparte de la permeabilidad aumentada de la membrana plasmática, y potencialmente de otras membranas del interior celular) de tal manera que las células individuales puedan seguir distinguiéndose (por ejemplo, al microscopio). Los términos "lisado", "extracto" u "homogenizado" se pueden usar para preparaciones en las que la arquitectura de la célula está perturbada de tal manera que las células individuales ya no se pueden

distinguir o ya no están presentes.

Las células permeabilizadas pueden ser necróticas. La necrosis puede ser primaria o secundaria. La necrosis primaria puede inducirse experimentalmente mediante (por ejemplo) irradiación (por ejemplo, con radiación ionizante tal como luz UV), con privación de suero, al menos un ciclo de congelación/descongelación, o mediante el tratamiento con sustancias químicas inductoras de la necrosis tales como antraciclinas (tales como doxorubicina y daunorubicina) y antracenedionas (tales como mitoxantrona). Se produce la necrosis secundaria cuando las células inducidas a entrar en apoptosis no son fagocitadas por las células adyacentes y la membrana plasmática posteriormente se rompe.

Como alternativa, las células sanas pueden permeabilizarse directamente con un agente que rompe o forma poros en la membrana plasmática. Los agentes permeabilizantes adecuados incluyen agentes formadores de poros tales como saponinas, (por ejemplo, beta-escina), con colesterol precipitado, eliminándolo de esta forma de la membrana y aumentando su permeabilidad, diversas toxinas bacterianas tales como citolisinas (por ejemplo, estreptolisina O de *Staphylococcus aureus*) y alfa toxina de *Staphylococcus aureus* y detergentes tales como Triton X-100, Brij-96, Tween, etc.

Opcionalmente, las células se pueden fijar tanto antes como después de la permeabilización. Puede preferirse la fijación antes de la permeabilización para reducir la posibilidad de que se pierda el ligando de la célula (por ejemplo, por difusión) tras la permeabilización. La fijación puede llevarse a cabo con un disolvente orgánico tal como acetona, metanol, etanol o sus mezclas (que generalmente elimina lípidos y deshidrata la célula, precipitando a la vez las proteínas sobre la arquitectura celular) y/o con un reactivo de reticulación tal como formaldehído (por ejemplo, como formol) o paraformaldehído (que reticula componentes celulares tales como proteínas, etc. mediante los grupos reactivos libres presentes en dichos componentes celulares, tales como grupos amino).

Cuando la muestra comprende células permeabilizadas, el método puede comprender la etapa de determinar la localización subcelular en la cual tiene lugar la unión de la sustancia diana, mediante la detección de la sustancia diana.

La detección puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, la sustancia diana puede comprender una marca, y el método puede comprender la etapa de determinar la localización subcelular de la marca. Como alternativa, el método puede comprender la etapa adicional de poner en contacto la sustancia diana con un agente de detección, que puede ser un agente de unión que puede unirse a la sustancia diana. El agente de detección puede por sí mismo comprender una marca. La detección puede conseguirse mediante cualquier técnica adecuada, tal como microscopio, por ejemplo, microscopio confocal. Por ejemplo, la marca puede ser fluorescente.

Como alternativa, la muestra puede ser, o puede comprender, un lisado celular, extracto o una fracción subcelular de una célula de un mamífero. Por ejemplo, puede comprender un lisado celular completo, o una fracción subcelular que no está expuesta al ambiente externo en una célula sana intacta. Por ejemplo, la muestra puede comprender una fracción citoplásmica aislada, una fracción nuclear aislada, una fracción del retículo endoplásmico aislada, una fracción de Golgi aislada, o una fracción mitocondrial aislada. "Aislado" en este contexto significa separado de al menos un componente normal de la célula intacta (tal como la membrana plasmática). Los orgánulos subcelulares de dichas fracciones, tales como núcleos o mitocondrias, pueden estar intactos o rotos.

Tras una reacción de unión positiva con una primera muestra, la primera muestra puede fraccionarse adicionalmente para proporcionar una segunda muestra que carece de uno o más componentes presentes en la primera muestra. El método puede repetirse a continuación. Esto puede ayudar a identificar una sustancia de ensayo que se une a la sustancia diana. Este proceso puede repetirse tanto como se desee, utilizando fracciones progresivamente más pequeñas.

Adicional o alternativamente, el método puede comprender la etapa de aislar un complejo que comprende la sustancia diana y la sustancia de ensayo. Esto puede conseguirse aislando un soporte sólido (por ejemplo, una perla) a la cual se une la sustancia diana. Como alternativa, se puede emplear un agente de unión que puede unirse a la sustancia diana. El agente de unión puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. La sustancia diana puede comprender un miembro de un ligando específico y el agente de unión puede comprender el segundo miembro del ligando específico. Por ejemplo, el agente de unión puede ser un anticuerpo específico para la sustancia diana. Como alternativa, uno del agente de unión y la sustancia diana puede comprender un resto de avidina/estreptavidina mientras que el otro comprende un resto de biotina.

El término "ligando específico" se usa para describir un par de moléculas que comprenden un miembro del ligando específico (sbm) y su miembro asociado (bp) que tienen una especificidad concreta entre sí y en el que en condiciones normales se unen entre sí preferentemente con respecto a la unión con otras moléculas. Los ejemplos de ligandos específicos son anticuerpos y sus epítopos/antígenos análogos, ligandos (tales como hormonas, etc.) y receptores, avidina/estreptavidina y biotina, lecitinas e hidratos de carbono, y secuencias de nucleótidos complementarios.

Para facilitar el aislamiento, un agente de unión único puede ser polivalente, es decir, que puede unirse simultáneamente a más de una sustancia diana. Si la sustancia diana es también polivalente (es decir, que puede unirse simultáneamente a más de un agente de unión del mismo tipo) puede formarse un complejo reticulado.

- 5 La persona experta será muy consciente de las técnicas adecuadas, tales como las técnicas de inmunoprecipitación, que se pueden emplear.

10 Por ejemplo, la sustancia diana puede ser una molécula soluble que comprende el dominio extracelular de CLEC9a asociado con (por ejemplo, conjugado a o en una proteína de fusión con) un monómero de avidina. Los monómeros de avidina tenderán a asociarse en tetrámeros, proporcionando un agente de unión que comprende cuatro dominios CLEC9a y cuatro subunidades de avidina. Esta construcción puede por tanto formar un complejo con una sustancia de ensayo en un ensayo como se describe en la presente memoria, que se puede aislar a continuación mediante contacto con biotina, que puede estar presente sobre un soporte sólido tal como una perla.

- 15 Como alternativa, la sustancia de ensayo puede inmovilizarse sobre un soporte sólido, tal como una membrana, placa de microvaloración, o un chip de una micromatriz. Este soporte puede ponerse en contacto con la sustancia diana, y determinarse la localización de cualquier sustancia diana unida.

20 Puede ser deseable ensayar una pluralidad de muestras (por ejemplo, fracciones celulares diferentes) sospechosas de contener un ligando de CLEC9a para ver si cualquiera de ellas contiene de hecho una sustancia que puede unirse a la secuencia diana. De manera adicional o alternativa, puede ser deseable ensayar una pluralidad de sustancias conocidas (por ejemplo, proteínas) para ver si cualquiera de ellas puede unirse a la sustancia diana.

- 25 De esta manera, un único soporte sólido puede comprender solo una muestra o sustancia de ensayo, o puede llevar una pluralidad de muestras o sustancias de ensayo, cada una en una localización definida en el soporte.

30 Dependiendo del formato del ensayo, el método puede comprender la etapa de identificación del soporte concreto sobre el cual tiene lugar una reacción de unión positiva, o de la localización sobre un soporte en el cual tiene lugar una reacción de unión positiva. Esto puede por tanto revelar la naturaleza de la muestra que contiene la sustancia de ensayo responsable de la reacción positiva, o puede revelar directamente la identidad de la sustancia de ensayo.

Como alternativa, puede ser posible aislar un complejo de la sustancia de ensayo y la sustancia diana procedente del soporte sólido y llevar a cabo un análisis adicional para identificar la sustancia de ensayo.

- 35 Sea cual sea el formato de ensayo, cuando la sustancia de ensayo es una proteína, puede ser posible usar técnicas proteómicas para identificar la sustancia de ensayo. Estas combinarán normalmente la espectrometría de masas y búsquedas en bases de datos. La sustancia de ensayo (o un complejo de sustancias de ensayo y diana) puede someterse a digestión con una o más proteasas con secuencias de escisión diana conocidas para dar como resultado péptidos con restos en el extremo N o C conocidos (dependiendo de la proteasa concreta utilizada). Los péptidos resultantes se someten a continuación a espectrometría de masas (por ejemplo, MALDI-TOF) para determinar sus pesos moleculares. Se pueden buscar en las bases de datos las secuencias de proteína adecuadas para identificar proteínas que pueden proporcionar un aumento de dichos péptidos.

- 45 Como alternativa, la sustancia de ensayo puede expresarse sobre la superficie de una célula o virus. Por ejemplo, se puede utilizar una técnica de expresión en fago para expresar sus sustancias o fragmentos sobre la superficie de un bacteriófago. Como alternativa, se puede diseñar mediante ingeniería genética una célula que exprese la sustancia de ensayo sobre su superficie. Como alternativa, puede tener lugar una interacción entre la sustancia de ensayo y la sustancia diana en una célula o un sistema de expresión exento de células y puede inducir una reacción detectable tal como la expresión de un gen indicador. Un ejemplo de dicho sistema es el sistema de doble híbrido en levadura, pero la persona experta será consciente de otros sistemas que se basan en una interacción de "cebo-presa" entre dos proteínas para impulsar la expresión de un gen indicador. Dichos formatos se pueden usar para cribar una población de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, una biblioteca de ADNc) para identificar una molécula de ácido nucleico que codifica una sustancia que se puede unir a la sustancia diana (si está presente), cuando una proteína codificada por el ácido nucleico se expresa en la célula o el sistema de expresión exento de células.
- 50 En dichos formatos, el método puede comprender la etapa de aislar (por ejemplo, clonar) un ácido nucleico responsable de un resultado positivo, y determinar la identidad de la proteína codificada por el ácido nucleico.

Cuando la sustancia de ensayo no es una proteína, se pueden emplear otras técnicas analíticas.

- 60 La invención se describirá ahora con más detalle, a modo de ejemplo y no de limitación, por referencia a los dibujos y ejemplos acompañantes.

Descripción de los dibujos

- 65 La Figura 1 muestra el ADNc y una secuencia de aminoácidos de la proteína CLEC9a humana.

La Figura 2 muestra el ADNc y una secuencia de aminoácidos de la proteína CLEC9a de ratón.

La Figura 3 muestra la detección de la proteína CLEC9a de ratón expresada en células Phoenix humanas. Transferencia Western utilizando anti-CLEC9a sobre lisados completos de células Phoenix que expresan CLEC9a (FNX-C9) o células progenitoras (FNX) en condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR).

La Figura 4 muestra la distribución de transcritos CLEC9a en DC de bazo y en BDMC cultivadas *in vitro*. ARNm de subconjuntos de DC de bazo o de subconjuntos purificados de GMCSF o Flt3L-BMDC se sometieron a RT-PCR utilizando cebadores específicos de CLC9a (bandas superiores) o cebadores de β -actina (bandas inferiores) como se ha indicado en los Métodos.

La Figura 5 ilustra la quimera CD3 ζ -NKRP1-CLEC9a generada en este trabajo, que muestra los dominios presentes en la molécula quimérica con el dominio extracelular de CLEC9a, el dominio transmembrana de NKRP1 y el dominio citoplásmico de CD3 ζ .

La Figura 6 muestra la expresión de CLC9a en células primarias. Los esplenocitos se tiñeron con biotina anti-CLEC9a (línea gruesa, 10 mg/ml) o biotina-IgG1 de rata (línea delgada, isotipo control) seguido por estreptavidina-PE (1:1000) y contrateñido con CD11c, CD4, CD8 o Ly6C. Los histogramas muestran la tinción de células CD11c negativas frente a células CD11c positivas, que se analizan a continuación adicionalmente en los subconjuntos de CD4/CD8 de las DC convencionales o en el subconjunto Ly6C+ que corresponde a pDC.

La Figura 7 es una transferencia Western que muestra Syk debilitado con un péptido citoplasmático de CLEC9a. Se usó un péptido biotinilado que correspondía al dominio citoplasmático de CLEC9a o a un control de Dectina-1 para debilitar Syk recombinante como se indica en la sección Métodos.

La Figura 8 muestra la activación de la quinasa con anti-CLEC9a. Las células LK que expresan CLEC9a se activaron durante los tiempos indicados con anticuerpos sembrados en placas y a continuación se lisaron y sometieron a SDS-PAGE y WB con anticuerpos dirigidos contra P-Syk o anticuerpos dirigidos contra P-Erk para detectar la activación de estas rutas. Los controles de proteínas con anti-Syk o anti-Erk indican las quinasas totales.

La Figura 9 muestra la inducción de citoquinas por hibridomas anti-CLEC9a. Se cultivaron células LK que expresaban CLEC9a (10^5 células/pocillo) con los hibridomas indicados antes de recoger los sobrenadantes y el ensayo de IL-2.

La Figura 10 muestra que anti-CLEC9a sembrado en placas induce la actividad de NFAT a través de la cola de WT de CLEC9a en presencia de Syk y dependiente de la presencia de Y7. B3Z que expresa CLEC9a-CD3 ζ (σ), o B3Z-Syk que expresa CLEC9a-WT (ν) o CLEC9a-Y7F (λ). Se midió la actividad de NFAT como se indica en la sección Métodos. El eje X muestra la concentración de anticuerpos dirigidos contra CLEC9a (μ g/ml) usados para revestir las placas.

La Figura 11 muestra que los anticuerpos dirigidos contra Clec9a inmovilizados sobre plástico inducen la protección de proteína IL12-23 p40 en Flt3L BMDC. Se incubaron Flt3L BMDC sobre placas revestidas con mAb dirigidos contra CLEC9a y después de cultivar durante la noche, se analizaron los sobrenadantes para determinar IL12-23 p40.

La Figura 12 muestra el direccionamiento de CD11c+CD8+ *in vivo* utilizando mAb dirigido contra CLEC9a-S1. S1 conjugado con mAb dirigido contra CLEC9a o mAb dirigido contra el isotipo control (5 μ g) se inyectaron por vía intravenosa, y los esplenocitos se procesaron el día siguiente como se indica en la sección Métodos. A y B. Se cultivaron esplenocitos CD11c positivos y negativos durante cuatro días con células OT-I marcadas con CFSE. A. Perfiles de células OT-I marcadas con CFSE en presencia de 25×10^3 esplenocitos CD11c- o CD11c+ dirigidos. B. Panel izquierdo: número absoluto de células OT-I por pocillo. Panel derecho: producción de IFN- γ en los sobrenadantes de células OT-I expandidas. C y D. Los esplenocitos CD11c+ en ratones S1-anti-CLEC9a se clasificaron como CD11c+B220-CD8+ (CD8+ DC), CD11c+B220-CD4+ (CD4+ DC) y CD11c+B220-CD4-CD8- (DN DC) y se cultivaron tres días con células OT-I marcadas con CFSE. C. Perfiles de células OT-I marcadas con CFSE en presencia de 25×10^3 CD8+, DN CD4+ DC dirigidos. D. Panel izquierdo: número absoluto de células OT-I por pocillo. Panel derecho: producción de IFN- γ en sobrenadantes al final del cultivo.

La Figura 13 muestra la inducción de inmunidad LTC utilizando mAb dirigido contra CLEC9a. A: S1 conjugado con mAb dirigido contra CLEC9a o mAb dirigido contra el isotipo control se inyectaron por vía s.c. con o sin anti-CD40 como se indica en la sección Métodos. Cinco días más tarde, células diana (CD45.1 congénitas) cargadas con 20 nM (0,03 μ M de CFSE), 200 nM (0,3 μ M de CFSE) de SIINFEKL o sin carga de péptido (3 μ M de CFSE) se inyectaron por vía intravenosa. Los resultados se expresan como media aritmética $\pm$ SEM del % de lisis específica de la elevada dosis de péptidos en el ensayo de muerte *in vivo* (n=5, p<0,001 de grupos DEC205 y CLEC9a en comparación con el control. ANOVA monolateral). B: Resultados de un experimento similar utilizando

S2 conjugado con el isotipo del control o anti-CLEC9a, administrado con o sin anti-CD40.

La Fig. 14 muestra el efecto terapéutico de anti-CLEC9a + anti-CD40 en el tratamiento del melanoma B16. A. Curso temporal de un experimento de tratamiento tumoral con células B16-OVA-GFP de melanoma. Se inyectaron células tumorales (2×10^5) por vía intravenosa en el día 0, se llevó a cabo el tratamiento con Ab-S1+anti-CD40 en el día 6, y se extrajeron los pulmones y se contaron los tumores en el día 18. B. Se muestran los recuentos tumorales de cada ratón en un experimento representativo. La reducción en la carga del tumor es significativa ($p < 0,001$, ANOVA monolateral) con anti-CLEC9a o anti-DEC205 más anti-CD40.

La Figura 15 muestra que la expresión de CLEC9a humana se restringe a BDCA-3 + DC sanguínea. (A) Se tiñeron PBMC humanas con anti-hCLEC9a (8F9) o un anticuerpo control emparejado por isotipo (IgG2a de ratón) y se contratiñeron para diversos marcadores de leucocitos en sangre. Los histogramas muestran la tinción de CLEC9a sobre los linfocitos T, linfocitos B, monocitos, células NK, células HLA-DR de linaje negativo y células HLA-DR de linaje negativo. El número indica el porcentaje de células hCLC9a en la última fracción. (B) PBMC procedentes de (A) se clasificaron en células HLA-DR de linaje negativo. Las gráficas de puntos muestran la tinción con mAb dirigido contra CLEC9a o mAb dirigido contra el isotipo control frente a diversos subconjuntos de marcadores de DC sanguínea. Los números representan el % de células en cada cuadrante. Se observa la tinción específica solo en BDCA-3+ DC. Un experimento representativo de cuatro réplicas.

La Figura 16 muestra la inmunoterapia del melanoma B16 mediante el direccionamiento de antígenos tumorales contra CLEC-9a. (A) Se llevaron a cabo experimentos de tratamiento tumoral como se ha representado gráficamente (parte superior izquierda) con péptidos que abarcan epítomos conocidos de antígenos endógenos de diferenciación de melanocitos ("Endo": gp100, TRP-1 y TRP-2) acoplados covalentemente con un anticuerpo dirigido contra CLEC9a o dirigido contra el isotipo control. Se usó Poli I:C + anti-CD40 como adyuvante. El panel de la parte inferior izquierda muestra imágenes representativas de pulmones de ratones tratados como se ha indicado. El panel de la derecha muestra la cuantificación de tumores pulmonares en cada ratón. Se han combinado los datos de dos experimentos independientes ($n=9$ ratones/grupo) y cada punto representa un ratón. (B) Los esplenocitos de ratones individuales del apartado (A) se reestimularon in vitro con los péptidos antigénicos de diferenciación de melanocitos utilizados para la inmunización ($10 \mu\text{M}$). Se muestran los niveles de IFN- γ después de 2 d de cultivo. Datos combinados de dos experimentos independientes ($n=9$ ratones/grupo). Se calcularon los valores p utilizando el test de la U de Mann Whitney. (C) Se llevaron a cabo experimentos como en la Figura 16 excepto que la vacuna se administró una vez al día antes de la infusión de células B16. Los datos muestran el número de tumores de pulmón por ratón. Se han combinado los datos de dos experimentos independientes ($n=7$ ratones/grupo) y cada punto representa un ratón. Se calcularon los valores p utilizando el test de la U de Mann Whitney.

La Figura 17 muestra que CLEC9a se une a un ligando sobre células teñidas/muertas. (A) La activación basal del indicador de BWZ de ratón y el indicador de CLEC9A ζ humano están correlacionados con el número de células TO-PRO3 $^+$ muertas. Se han generado células BWZ que expresan un indicador de NFAT acoplado con LacZ y que expresan de forma estable una molécula química con el dominio extracelular de CLEC9A de ratón o de CLC9A humano o la Dectina-1 control y la cola intracelular de CD3 ζ para cribar ligandos naturales de CLEC9A. Se permitió el crecimiento de diferentes concentraciones de células durante dos días, mostrando diferentes grados de crecimiento en exceso y un aumento de células muertas en el cultivo rastreado mediante la tinción de TO-PRO 3. A continuación, se sembró en placas la misma cantidad de células BWZ vivas en medio reciente y, tras cultivo durante la noche, se midió la actividad de NFAT en células BWZ en un ensayo colorimétrico como se ha indicado en la sección de Métodos.

(B) Las células muertas tratadas con VC se exponen a un ligando de CLEC9A. Se han cultivado MEF vivas (Ctrl) o MEF tratadas con UVC y mantenidas 24 h para inducir la muerte celular, con células indicadoras de BWZ NFAT que expresaban CLEC9A- ζ , química de ratón, CLEC9A- ζ humana, y Dectina-1- ζ . Cuando estuvo indicado, se añadieron al cultivo fragmentos Fab monovalentes de control (p21) o anti-mCLEC9A (1F6) o anti-hCLEC9A (8F9). Se midió la actividad de NFAT en células BWZ como en (A).

(C) Dosis respuesta en células tratadas con UV. Se expusieron las células LK a diferentes dosis de UVC como se ha indicado en la sección Métodos y se mantuvieron 24 h para inducir la muerte celular antes de cultivar con células BWZ que expresaban la quimera mCLEC9A- ζ o el control BWZ. Se midió la actividad de NFAT en células BWZ como en (A).

(D) El dominio lectina de tipo C recombinante soluble (rsCTLD) de CLEC9A reconoce selectivamente una molécula expuesta a células TO-PRO3 $^+$ muertas. Se utilizaron tetrámeros de PE del rsCTLD de CLEC9A o Dectina-1 (como control) para teñir los MEF inmortalizados irradiados con UV (gráficas de puntos). Los histogramas muestran la tinción de zimósán, positiva para la Dectina-1 rsCTLD.

(E) Diferentes tratamientos inductores de muerte estimulan las células indicadoras BWZ-CLEC9A ζ . Se cultivaron células BWZ-CLEC9A ζ durante la noche solas (Ctrl) o con células LK sin tratar (LK) o tratadas con UVC (UV), mitoxantrona (Mtx), con privación de suero (SD), choque osmótico (OS) o congelación y descongelación (FT). Se han representado gráficamente la actividad indicadora de BWZ (eje y en la parte izquierda) y de pro 3 $^+$ y la frecuencia de CLEC9A rsCTLD $^+$ en células LK cuando se inicia el cultivo simultáneo (eje y en la parte derecha).

(F) Tinción de MEF muertas utilizando tetrámeros de PE de CLEC9A rsCTLD. Se trataron las MEF con UV y se mantuvieron 24 h o se trataron con choque osmótico (OS) antes de la tinción.

(A) - (F) un experimento representativo mostrado al menos tres realizados.

5 La Figura 18 muestra que CLEC9A está implicado en el cebado cruzado de las células teñidas con CD8 α ⁺ DC in vitro.

(A), (B) El bloqueo de CLEC9A da como resultado un cebado cruzado deteriorado de células OT-I del antígeno asociado a la muerte celular.

10 **(A)** Se cultivaron linfocitos T específicos de OT-I OVA con Flt3L BMDC de tipo CD8 α estimulados con esplenocitos bm1 muertos cargados con OVA en presencia o ausencia de Fab anti-CLEC9A (1F6) o Fab control (p21). Tres días después, se midieron la proliferación (números absolutos de células OT-I), y la producción de IL-2 e IFN γ (% de producción relativa al control sin tratar). Se muestra un experimento representativo de seis. **(B)** se muestra la producción promedio de IL-2 e IFN γ de seis experimentos independientes como % de producción por control sin tratar para anti-CLEC9A Fab (1F6) o Fab control (p21).

15 **(C)** CLEC9A^{-/-} y WT Flt3L BMDC de tipo CD8 α tienen la misma capacidad de capturar material de células teñidas. WT o CLEC9A^{-/-} Flt3L BMDC de tipo CD8 α se incubaron durante 2 h con esplenocitos bm1 tratados con UVC y marcados con PKH26 a diferentes relaciones. La unión (4 °C) y la unión + captación (37 °C) se cuantificaron a continuación mediante citometría de flujo para cada tipo de DC.

20 **(D)** Expansión y diferenciación deterioradas de las células OT-I efectoras tras la incubación con CLEC9A^{-/-} Flt3L BMDC estimulada con células bm1 muertas que expresan OVA o cargadas con OVA. CLEC9A^{-/-} Flt3L BMDC se cultivaron con esplenocitos bm1 cargados con OVA tratados con UVC o bm1 MEF que expresan OVA tratados con UVC. A continuación se añadieron células OT-I T específicas de OVA y, después de 3 días de cultivo simultáneo, se midieron los números absolutos de células OT-I (panel izquierdo) o IFN- γ (panel derecho). Los resultados muestran el promedio $\pm$ SEM de dos ratones por grupo. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

25 **(E)** Diferenciación deteriorada de células OT-I tras incubación con CLEC9A^{-/-} Flt3L BMDC estimulada con bm1 MEF muertas UV que expresa OVA como en (D). Se muestra un ratón representativo por grupo de cuatro analizados utilizando el mismo ensayo.

30 La Figura 19 muestra que CLEC9A detecta la muerte celular inmunogénica para promover el cebado cruzado in vivo.

35 **(A), (B)** El bloqueo de CLEC9A reduce el cebado cruzado del antígeno asociado a muerte celular in vivo. Los ratones sin tratar o tratados con anti-CLEC9A(1F6, 400 μ g/ratón) o isotipo control (IgG1 de rata) se inmunizaron por vía intravenosa. Con 0,75x10⁶ de bm1 MEF irradiado con UV que expresa una proteína de fusión OVA-GFP truncada. Seis días después, las células H2K^b-OVA positivas para el tetrámero peptídico (A) y la producción de IFN γ en respuesta a SIINFEKL ex vivo (B) se midieron como lectura para la inducción de la respuesta efectora de los linfocitos T CD8⁺ que surgen del repertorio endógeno. Se muestran ratones individuales y el promedio de un experimento representativo (de tres).

40 **(C) - (E)** La deficiencia de CLEC9A reduce el cebado cruzado del antígeno asociado a muerte celular in vivo. Crías de ratones CLEC9a-l o de la camada control se inmunizaron como en (A). Se cuantificó la frecuencia de los linfocitos T CD8⁺ endógenos específicos (C-D) de OVA como en (A).

45 **(C)** Cada punto representa un ratón individual combinado a partir de seis experimentos independientes y normalizados como se indica en la sección Métodos. **(D)** El promedio de células positivas para tetrámeros se representa en cada camada de ratones CLEC9a^{-/-} y CLEC9a⁺. **(E)** Se midió la producción de IFN γ en respuesta a SIINFEKL ex vivo como en (B). Se muestran ratones individuales y el promedio de un experimento representativo (de tres).

50 La Figura 20 muestra que el ligando de CLEC9a se expone tras la fijación/permeabilización. Se fijaron células LK con formaldehído al 2 % o paraformaldehído al 2 %, y se permeabilizaron o no con Tween (0,5 %) y Tx-100 (0,5 %). Las células se lavaron extensamente y se cuantificó el porcentaje de células permeables utilizando To-pro 3. Las células permeabilizadas fijas o fijadas se cultivaron simultáneamente con células indicadoras BWZ NFAT que expresan CLEC9a-CD3 ζ de ratón quimérico o el control y se midió la actividad de NFAT.

La Figura 21 muestra la señal de las células muertas a través de la cola citoplásmica de CLEC9a wt. Se expusieron las células LK a diferentes dosis de UVC como se ha indicado en la sección Métodos y se mantuvieron 24 h para inducir la muerte celular antes de cultivar células B3Z transfectadas de forma estable con CLEC9a wt o CLEC9a con el Tyr7 mutado a Phe (Y7F) y que expresan simultáneamente, o no expresan, Syk. Se midió la actividad de NFAT en células B3Z como se describe en la sección Métodos.

Figura 22. Anticuerpos Fab monovalentes y completamente bivalentes dirigidos contra CLEC9a bloquean las señales de muerte celular a través de CLEC9a. Células LK tratadas con UVC y mantenidas 24 h para inducir la muerte celular se cultivaron con células B3z transfectadas de forma estable con CLEC9a wt o CLEC9a con el

Tyr7 mutado a Phe (Y7F) y que expresan simultáneamente Syk o B3Z-Dectina-1- ζ como control. Cuando estuvo indicado, se añadieron fragmentos Fab monovalentes del control (p21) o anticuerpos dirigidos contra CLEC9a (1F6) o completamente bivalentes, incluyendo isotipos control (IgG1 de rata, IgG2 de rata) y anti-mCLEC9a (1F6, 397, 7H11) al cultivo. Se midió la actividad de NFAT en células B3Z como se describe en la sección Métodos.

La Figura 23 muestra la proliferación de linfocitos T OT-II CD4 específicos de OVA en respuesta a anti-CLEC9a-OVA323-339. Se transfirieron linfocitos T OT-II CD4 no expuestos a tratamiento marcados con CFSE por vía intravenosa a ratones C57BL/6. Un día después el péptido OVA323-339 se inoculó por vía subcutánea en la pata, conjugado con el anticuerpo bien dirigido contra CLEC9a o bien contra el isotipo control. Se extrajeron el bazo y los ganglios linfáticos drenantes de tres a cuatro días después y se rastreó la proliferación *in vivo* de células OT-II tras la dilución de CFSE. Se muestran los números absolutos de células OT-II, normalizados entre las muestras.

La Figura 24 muestra que la adición de adyuvante durante el direccionamiento *in vivo* induce una fuerte respuesta de tipo Th1. Direccionamiento *in vivo* en presencia o ausencia de adyuvante (sistema OT-II). Se trataron los ratones como en la Figura 23. Panel superior: Número absoluto de linfocitos T CD4 específicos de OVA (tras la normalización). Paneles inferiores: Producción de IFN- γ en la población de linfocitos T OT-II CD4 expresada como porcentaje (izquierda) o número absoluto (derecha, tras la normalización). Los efectos sobre la proliferación y diferenciación observados en presencia de poli I:C no están restringidos a este adyuvante. Curdlan tiene un efecto similar.

La Figura 25 muestra que la respuesta de los linfocitos T CD4 puede modularse mediante el tipo de adyuvante/inmunomodulador inyectado simultáneamente con el reactivo de direccionamiento. Direccionamiento *in vivo* en presencia o ausencia de adyuvante. Se llevó a cabo el sistema OT-II como en la Figura 24. Paneles superiores: Producción de IL-17 en la población de linfocitos T OT-II CD4 expresada como porcentaje (izquierda) o número absoluto (derecha, tras la normalización). Curdlan, un agonista de Dectina-1, actuó como un adyuvante fuerte para la polarización de Th17 cuando se administró con el antígeno dirigido.

La Figura 26 muestra que el direccionamiento en ausencia de adyuvante conduce a tolerancia específica del antígeno. Linfocitos T DO.11.10 CD4 T específicos de OVA sin tratamiento previo se transfirieron a ratones BALB/c. Un día después, se inoculó anti-CLEC9a-OVA 323-339 por vía subcutánea en la pata, con o sin adyuvante (poli I:C). En diferentes puntos temporales tras la inmunización, se determinó el tamaño del compartimento DO.11.10 esplénico mediante citometría de flujo utilizando el anticuerpo clonotípico KJ.126. Los resultados se expresan como número absoluto de células KJ.126 específicas de OVA (tras la normalización) o como porcentaje de células KJ.126⁺ entre el compartimento de linfocitos T CD4.

En el día 20, la mitad de los ratones se estimularon por vía subcutánea con OVA en adyuvante completo de Freund. 5 días después se realizó un seguimiento de la respuesta de DO.11.10 mediante citometría de flujo. En los ratones que recibieron solamente inyección de PBS en el día 0, las células DO.11.10 restantes siguen siendo sensibles como se muestra por sus fuertes respuestas proliferativas tras el reestímulo. Se detectó una respuesta más intensa en ratones a los que se había inyectado previamente anti CLEC9a + adyuvante, lo que muestra que esta primera inmunización conduce probablemente a la generación de células con memoria. Por el contrario, no se detectó respuesta en ratones a los que se inmunizó en primer lugar solo con anti-CLEC9a, mostrando que las células restantes fueron tolerantes al antígeno.

Descripción detallada de la invención

CLEC9a

CLEC9a es una lectina de tipo C expresada en células dendríticas. Como se usa en esta memoria descriptiva, se pretende que el término CLEC9a abarque la proteína humana (las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas que se muestran en la Figura 1), las proteínas de murino (las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas que se muestran en la Figura 2), sus homólogos (especialmente ortólogos) en otras especies, y sus variantes y derivados que retienen la actividad de CLEC9a. Dichas variantes y derivados tienen preferentemente al menos un 30 % de identidad de secuencias, más preferentemente al menos aproximadamente 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencias con la secuencia de la proteína humana que se muestra en la Figura 1, o al menos aproximadamente una identidad del 35 %, más preferentemente al menos aproximadamente 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con el dominio extracelular de la secuencia de proteína humana que se muestra en la Figura 1.

En particular, las sustituciones conservativas en la secuencia de CLEC9a (en comparación con las secuencias de referencia) pueden ser particularmente bien toleradas, sin sustancial efecto sobre la función.

Una sustitución conservativa puede definirse como una sustitución en una clase de aminoácido y/o una sustitución que puntúa como positiva en la matriz BLOSUM62.

De acuerdo con una clasificación, las clases de aminoácidos son ácidos, básicos, polares no cargados y no polares, en las que los aminoácidos son Asp y Glu; los aminoácidos básicos son Arg, Lys e His; los aminoácidos polares no cargados son Asn, Gln, Ser, Thr y Tyr; y los aminoácidos no polares son Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met, Trp y Cys.

5 De acuerdo con otra clasificación, las clases de aminoácidos son hidrófilos pequeños, ácido/amida ácida/hidrófilo, básicos, hidrófobo pequeño y aromático, en el que los aminoácidos hidrófilos pequeños son Ser, Thr, Pro, Ala y Gly; los aminoácidos ácido/amida ácida/hidrófilo son Asn, Asp, Glu y Gln; los aminoácidos básicos son His, Arg y Lys; los aminoácidos hidrófobos pequeños son Met, Ile, Leu y Val; y los aminoácidos aromáticos son Phe, Tyr y Trp.

10 Las sustituciones con puntuación positiva en la matriz BLOSUM62 son de la siguiente forma:

Resto original	C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y	W
Sustitución	-	TAN	S	-	S	-	SDH	NE	DQK	ERK	NY	QK	EQR	ILV	MLV	MIV	MIL	YW	HFW	FY

Porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos de la secuencia de referencia, tras alineación de las secuencias e introducción de huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en cuenta las posibles sustituciones conservativas como parte de la identidad en la secuencia. Los valores del % de identidad se pueden determinar mediante WU-BLAST-2 (Altschul et al., *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)). WU-BLAST-2 utiliza varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se configuran para los valores por defecto. Los parámetros ajustables se configuran con los siguientes valores: tramo solapante = 1, fracción solapante = 0,125, umbral de palabras (T) = 11, Se determinó al valor de identidad de la secuencia de aminoácidos A en % mediante el número de restos idénticos emparejados correctamente según determinó WU-BLAST-2, dividido por el número total de restos de la secuencia de referencia (huecos introducidos por WU-BLAST-2 en la secuencia de referencia para maximizar la puntuación de alineación que se ha ignorado), multiplicado por 100.

Un agonista de CLEC9a es un agente que puede inducir la actividad de CLEC9a, normalmente mediante la unión a su dominio extracelular (ECD) e induciendo la señalización intracelular mediante su dominio intracelular. La señalización puede implicar una o más uniones de Syk al dominio intracelular, la fosforilación (y por tanto la activación) de Syk, y/o la fosforilación de Erk y/o la activación de NFAT. Se describe un ensayo ilustrativos en los Ejemplos, que utiliza células B3Z transfectadas con Clec9a y Syk. La persona experta comprenderá que se puede usar también la proteína quimérica que tiene el dominio extracelular de Clec9a y un dominio intracelular derivado de una proteína diferente para evaluar la actividad agonista de Clec9a. El dominio transmembrana puede ser de Clec9a, la misma proteína que el dominio intracelular, o de otra proteína. Un ejemplo es la CD3ζ-NKRP1-CLEC9a ilustrada en la Figura 5 y descrita con más detalle en los Ejemplos.

Un ácido nucleico que puede hibridarse con el ARNm o el ADN que codifica CLEC9a y que es un ARN o un ADN antisentido, un ARNip o una ribozima, es un agente que puede inhibir o bloquear la función de CLEC9a evitando su expresión normal.

Los anticuerpos y sus fragmentos funcionales se pueden considerar "agentes de unión", y pueden expresarse convenientemente en forma de scFv. Si fuera necesario, un anticuerpo puede codificarse como una proteína de fusión con el antígeno, o con un resto efector como se ha descrito anteriormente. Un ejemplo de solución de vacunación de ADN se describe en Nchinda et al., *J. Clin. Invest.* 118(4), 1427-36, 2008.

El ácido nucleico codificante comprende normalmente una región de codificación que codifica el agente de unión, opcionalmente junto con cualquier ligando, en unión operativa con secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción para asegurar la expresión y la secreción adecuadas de las proteínas de las células que captan el ácido nucleico. Dichas secuencias incluyen (pero no se limitan a) secuencias de inicio de la transcripción (por ejemplo, promotor y potenciador), secuencias de terminación de la transcripción, señales de corte y empalme adecuadas, secuencias de inicio y terminación de la traducción, y un péptido señal para permitir la secreción.

Ligando de CLEC9a

Los presentes inventores han descubierto que CLEC9a reconoce un ligando expresado por determinados tipos de células de mamíferos muertas y teñidas. En particular, determinados tipos de muerte celular parecen estimular la expresión del ligando. Esto es un hallazgo sorprendente ya que muchos miembros conocidos de la familia de las lectinas de tipo C (incluyendo la Dectina-1, que es la proteína más estrechamente relacionada con CLEC9a) son receptores de modelos moleculares asociados con patógenos, y de esta manera reconocen estructuras expresadas por patógenos, en lugar de automoléculas.

Es bien reconocido que determinados mecanismos de automuerte celular pueden estimular una respuesta inmunitaria. Esto puede considerarse como muerte celular inmunógena. Se ha propuesto que la muerte por apoptosis (que normalmente no da como resultado una ruptura de la membrana plasmática y liberación de los contenidos intracelulares) no es inmunógena, mientras que la muerte por otros mecanismos tales como necrosis (que implican la ruptura de la membrana plasmática y la liberación de los contenidos celulares) es inmunógena. Sin embargo, la situación fisiológica parece ser bastante más compleja que esto. Por ejemplo, las células apoptóticas in vivo se absorben normalmente (fagocitadas) por las células adyacentes tales como macrófagos antes de que el proceso de muerte celular esté completo. Sin embargo, si las células no son fagocitadas, se puede producir la denominada necrosis secundaria, en la que se puede romper la membrana plasmática y liberarse los contenidos. La muerte celular de este tipo puede ser inmunógena, a pesar de ser apoptótica al menos en parte.

La muerte celular inmunógena puede jugar un papel en el comienzo, desarrollo o persistencia de la enfermedad autoinmune. Esto se ha revisado, por ejemplo, por Vioritto et al (*Clin Immunol* 122(2), 125-134 (2007)), Tesniere et al (*Curr Op Immunol* 21, 1-8 (2008)) y Kim et al (*Immunity* 27, 321-333 (2007)).

Las células dendríticas pueden jugar un papel en la inducción de cualquier respuesta inmunitaria producida por muerte celular inmunógena, capturando desechos celulares a partir de células muertas o teñidas (o incluso absorbiendo la célula completa) y presentando fragmentos procesados a los linfocitos T.

Los presentes inventores han descubierto ahora que CLEC9a puede unirse a un ligando expresado por células muertas o teñidas, y que la señalización de CLEC9a puede estimularse mediante esta interacción.

Se cree también que el ligando no se sintetiza de novo durante el proceso de muerte celular. En su lugar, puede expresarse constitutivamente por alguna o todas las células de mamíferos, pero no es accesible para la interacción con CLEC9a mientras la célula permanece sana. Determinados tipos de muerte celular dan como resultado la exposición del ligando y/o la liberación del ligando de la célula, en una forma que puede interactuar con CLEC9a. Esto puede implicar la rotura de la membrana plasmática.

De forma experimental, puede producirse la exposición del ligando mediante tratamientos tales como la irradiación (por ejemplo, con radiación ionizante tal como luz UV), con privación de suero, al menos un ciclo de congelación/descongelación, o mediante tratamiento con agentes quimioterapéuticos tales como antraciclinas (tales como doxorubicina y daunorubicina) y antracenodionas (tales como mitoxantrona). Sin embargo, la muerte por choque osmótico parece no exponer al ligando.

De esta manera, sin desear quedar ligado por teoría particular alguna, se cree que CLEC9a puede estar implicado en la generación de la respuesta inmunitaria producida por muerte celular inmunógena. La interacción entre CLEC9a y su ligando puede estar inhibida por los antagonistas de CLEC9a. Estos incluyen agentes de unión que pueden unirse a ((al) dominio extracelular de) CLEC9a. Otros ejemplos incluyen competidores de los sitios de unión a CLEC9 del ligando, tales como agentes solubles que comprenden el dominio extracelular de CLEC9a o una de sus porciones (por ejemplo, al menos 20 aminoácidos, al menos 50 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos, al menos 150 aminoácidos, o al menos 200 aminoácidos del dominio extracelular) que es que puede unirse al ligando de CLEC9a.

Los antagonistas que pueden inhibir la unión entre CLEC9a y su ligando podrán inhibir la señalización de CLEC9a cuando se ponen en contacto con las células de muerte o teñidas adecuadas (por ejemplo, células de mamífero irradiadas con UV) o un lisado, extracto o fracción de las mismas que puede inducir la señalización de CLEC9a. Puede usarse cualquier sistema de ensayo adecuado para evaluar esta capacidad. Por ejemplo, en las células dendríticas que expresan CLEC9a, la señalización de CLEC9a puede evaluarse determinando la fosforilación de la quinasa Syk. Como alternativa, se puede usar un sistema indicador artificial que comprende la funcionalidad del dominio extracelular de CLEC9a unida a un sistema indicador tal como la quimera CD3zeta descrita en los ejemplos.

Agentes aglutinantes

Los agentes de unión son anticuerpos contra CLEC9a y sus fragmentos funcionales.

El agente de unión tiene preferentemente una afinidad de unión (constante de afinidad) para CLEC9a, particularmente para CLEC9aECD, de al menos 10^5 M^{-1} , al menos 10^6 M^{-1} , al menos 10^7 M^{-1} , preferentemente al menos 10^8 M^{-1} , más preferentemente al menos 10^9 M^{-1} .

El agente de unión tiene preferentemente una afinidad de al menos 2x, y preferentemente al menos 5x, al menos 10x, al menos 50x o al menos 100x mayor de cualquier molécula no CLEC9a, incluyendo otros tipos de lectinas de tipo C.

Es bien sabido que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de antígenos de unión. Los ejemplos de fragmentos de unión funcionales son (i) el fragmento Fab consistente en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd consistente en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv consistente en los dominios VL y VH de un anticuerpo único; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv de cadena única (scFv), en el que un dominio VH y un dominio VL se unen mediante un enlazador peptídico que permite a los dos dominios asociarse para formar un sitio de unión a antígeno (Bird et al, Science, 242, 423-426, 1988; Huston et al, PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988); (viii) dímeros Fv de cadena única biespecífica (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos mediante fusión génica (documento WO94/13804; P. Holliger et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993).

Dado que los anticuerpos se pueden modificar de numerosas maneras, el término "anticuerpo" debe por tanto interpretarse para abarcar cualquier sustancia de unión específica que tiene un dominio de unión con la especificidad requerida. De esta manera, este término cubre los fragmentos de anticuerpos descritos anteriormente, así como los derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión de la inmunoglobulina, tanto natural como sintético. Se incluyen por tanto las moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión de la inmunoglobulina, o los equivalentes, fusionados con otro polipéptido. Se describen la clonación y la expresión de anticuerpos quiméricos en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023.

Se apreciará que los agentes de unión utilizados en los métodos descritos en el presente documento son generalmente necesarios para unirse al dominio extracelular de CLEC9a para ejercer el efecto requerido. La

referencia a un agente de unión que puede unirse a CLEC9a debe interpretarse de acuerdo con ello, a no ser que el contexto permita otra cosa.

En determinados aspectos de la invención, es deseable reticular un antígeno (por ejemplo, una proteína o antígeno peptídico) con un agente de unión como se ha descrito. La persona experta es muy consciente de los métodos y reactivos adecuados. Cuando el agente de unión es una proteína, el antígeno puede acoplarse mediante un grupo sulfhidrido del agente de unión. El grupo sulfhidrido puede estar normalmente libre, o normalmente formar parte de un enlace disulfuro, en cuyo caso puede exponerse por reducción selectiva del agente de unión. Por ejemplo, un anticuerpo puede reducirse suavemente de forma selectiva en la región bisagra utilizando el agente reductor mercaptoetanosulfonato. Después, el antígeno se activa utilizando sulfo-SMCC, un reactivo de reticulación heterobifuncional que reacciona con las aminas terciarias de la proteína, generando grupos reactivos con sulfhidrilos libres. Después, el anticuerpo y el antígeno activado se incuban juntos dando como resultado la proteína conjugada al anticuerpo monovalente¹⁸. Como alternativa, si se conoce una secuencia peptídica procedente del antígeno, dicho péptido que contiene una cisteína con un sulfhidrido libre puede sintetizarse y acoplarse al anticuerpo activado con sulfo-SMCC, que seguirá siendo bivalente y con algunos péptidos unidos por molécula de anticuerpo.

Composiciones farmacéuticas

Los polipéptidos, anticuerpos, péptidos, ácidos nucleicos y células descritos en el presente documento pueden formularse en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender, además de una de las anteriores sustancias, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos de los expertos en la técnica. Dichos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material puede depender de la ruta de administración, por ejemplo, rutas oral, intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraperitoneal.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, polvos o en forma líquida. Un comprimido puede incluir un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen generalmente un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse una solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución sacárida o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el sitio de la enfermedad, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está exenta de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos relevantes en la materia serán capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como una inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, o Ringer Lactado inyectable. Pueden estar incluidos conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y otros aditivos, según sea necesario.

La administración se realiza preferentemente en una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según sea el caso, aunque la profilaxis puede considerarse tratamiento), que sea suficiente para mostrar beneficio al individuo. La cantidad real administrada, y la tasa y el calendario de administración, dependerán de la naturaleza y de la gravedad de lo que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, etc., están comprendidas en la responsabilidad de los médicos generales y de otros doctores en medicina, y tienen generalmente en cuenta el trastorno que se va a tratar, la dolencia del paciente individual, el sitio de la administración, el método de administración y otros factores conocidos por los médicos a cargo del tratamiento. Se pueden encontrar ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª Edición, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins.

Se puede administrar una composición sola o en combinación con otros tratamientos, tanto simultánea como secuencialmente dependiendo de la dolencia que se va a tratar.

Ejemplos

Secuencias y estructura de CLEC9a

Una búsqueda en la base de datos genéticos NCBI muestra que la secuencia CLEC9a se ha identificado ya en *Mus musculus*, *Pan troglodytes*, *Homo sapiens* y *Macaca mulatta*. Una búsqueda mediante blast utilizando la secuencia de proteínas de CLEC9a de ratón muestra también las proteínas de CLEC9a previstas en *Rattus norvegicus*, *Canis familiaris* y *Bos taurus*. La secuencia de ADNc humano y la secuencia de proteína anotada con dominios relevantes se detallan en la Fig. 1. La secuencia de ADNc se ha clonado a partir de células DC CD8α+ de ratón y la secuencia de proteína anotada se detalla en la Fig. 2. Esta secuencia difiere de la secuencia de ADNc publicada que contiene un resto G adicional que produce un cambio de marco hacia el final de la molécula, lo que da lugar a una proteína más larga que la que se muestra en la Figura 2. La secuencia de los inventores parece ser correcta, ya que se empareja con la secuencia genómica publicada (NC_000072.4 GI:94471533); como se puede observar en esta página, la posición 13480 de (A₁TTT) genómica se empareja con la secuencia de ADNc de los inventores. Las

secuencias prevén una proteína de la familia de las lectinas de tipo C con un dominio de tipo lectina de tipo C (CTLD), una región de tallo, una región transmembrana y un dominio citoplásmico que contiene una especie tirosina conservada destacada en las Fig. 1 y 2. Los inventores han encontrado transcritos de tres isoformas de CLEC9a de ratón que los inventores han considerado una isoforma larga (exones 1-7), una isoforma corta que carece del exón 4, que incluye una presunta cisteína implicada en la dimerización, y una isoforma muy corta, que se acopla del exón 3 al exón 7, dando como resultado un ARNm que codifica una proteína transmembrana que, si se expresa, compartiría los dominios transmembrana intracelulares con CLEC9a pero tendría un dominio extracelular corto y diferente. Los inventores tienen solo evidencias de la expresión de proteínas para la isoforma larga.

Se analizó la estructura de CLEC9a de ratón. La proteína nuclear tiene un peso molecular previsto (Mw) de aproximadamente 29,67 KDa. Sin embargo, cuando se expresa en la línea de células HEK-293, el Mw es aproximadamente de 100 KDa en condiciones no reductoras, y un Mw de aproximadamente 45 KDa en condiciones reductoras (Fig. 3). Estos resultados indican que la molécula forma dímeros mediante la cisteína del tallo, similares a los de otras lectinas en la familia, y el monómero está fuertemente glicosilado.

Expresión de CLEC9a

CLEC9a se detectó por primera vez en el laboratorio de los inventores como resultado de un análisis de diferencias representativas entre muestras de células CD11c+CD8+ y CD11c+CD8 de bazo de ratón. Los resultados mostraron que las secuencias correspondientes al clon AW318446 de EST, correspondientes a CLEC9a, se encontraron selectivamente en los transcritos CD11c+CD8+.

El análisis de los transcritos en subconjuntos clasificados de DC esplénicas reveló una elevada expresión de CLEC9a en el subconjunto CD8+, aunque las DC esplénicas doble negativo (CD4-CD8-) y B220+ mostraron también algunos transcritos de CLEC9a (Fig. 4). No se encontró expresión significativa en BMDC derivadas de GMCSF (Fig. 4). Médula ósea de ratón cultivada durante 10 días en presencia de Flt3L (50 ng/ml) genera células CD11c+ que bien son CD11b+, correspondiendo funcionalmente a DC convencionales de bazo, e incluyendo un subconjunto de tipo CD8¹⁹, o B220+, que son equivalentes funcionales de DC plasmacitoide (pDC). Se encontró una expresión elevada de CLEC9a en el subconjunto CD11b+ clasificado, aunque el subconjunto pDC mostró alguna expresión de la molécula (Fig. 4).

Aunque la RT-PCR es una técnica sensible que puede detectar un nivel muy bajo de transcrito, está limitada por la calidad de purificación de la muestra. Para determinar de forma inequívoca el modelo de expresión de CLEC9a, los inventores generaron anticuerpos monoclonales de rata (mAb) contra CLEC9a de ratón, utilizando una quimera CD3ζ-NKRP1-CLEC9a expresada en células B3Z con un indicador β-Gal (Fig. 5) como se ha indicado en la sección Métodos. Los inventores seleccionaron 3 mAb denominados 1F6, 397, y 7H11. Utilizando estos mAb, los inventores han estudiado el modelo de expresión de la molécula en bazo y médula ósea de ratón. CLEC9a se expresó intensamente en DC CD8α+ convencionales (MFI-350-400) y mostró una expresión moderada (MFI-65-70) en pDC (Fig. 6). La molécula no se detectó en otros tipos de células exploradas incluyendo linfocitos B, linfocitos T, células NK, células NKT, monocitos, macrófagos y granulocitos.

Como modelo para el análisis de la función de CLEC9a in vitro, los inventores analizaron la expresión de BMDC derivadas de GMCSF y Flt3L. Los inventores no detectaron la expresión de la molécula en BMDC derivadas de GMCSF, mientras que CLEC9a se expresó selectivamente en CD11b^{lo}, CD24^{hi}, subconjunto B220 de Flt3L BMDC, funcionalmente homólogo a DC CD8+ esplénicas¹⁹, y también en un subconjunto del CD11b^{lo} B220+, equivalente a pDC (No se muestran los datos).

CLEC9a señala a través de la Syk quinasa y promueve la activación de DC.

El análisis de secuencias revela que es Tyr7 de ratón el que se conserva en todas las especies con la misma estructura EXXYXXL, que podría servir como presunto dominio de unión de SH2 y/o señal de clasificación basada en tirosina. Esta secuencia permite/media la unión de Syk en Dectina-1 de ratón y se denomina "HemITAM"²². Sin embargo, esta presunta secuencia es necesaria, pero no suficiente para prever la unión de Syk. En consecuencia, los inventores han diseñado péptidos biotinilados con la cola citoplásmica de CLEC9a de ratón que expresa Tyr7 fosforilada, o con esta Tyr7 sin fosforilación o incluso mutada con Phe. El péptido Tyr7 fosforilado pudo debilitar Syk recombinante (Fig. 7) en una extensión similar a la cola citoplásmica de la Dectina-1 de ratón que expresa Tyr fosforilada como control positivo²³.

Para determinar si CLEC9a actúa verdaderamente como un receptor de la señalización, los inventores han utilizado el mAb dirigido contra CLEC9a de ratón anteriormente descrito. Los inventores generaron transfectantes que expresaban CLEC9a en células LK, una línea de linfocitos B de ratón negativa para la expresión de CLEC9a pero que contiene niveles endógenos de Syk²³. La estimulación de CLEC9a con tres anticuerpos dirigidos contra CLEC9a sembrados en placa dio como resultado la fosforilación de Syk y Erk en células LK (Fig. 8).

Para determinar si Syk es necesaria para la señalización de CLEC9a, los inventores han utilizado transfectantes estables de la línea de linfocitos T B3Z indicadores, que no expresa Syk. Se analizó la contribución de Tyr7 a la

señalización de CLEC9a utilizando una versión mutante de CLEC9a con Tyr7 mutada a Phe (CLEC9a Y7F). Los inventores transdujeron células B3Z con CLEC9a wt o Y7F y transducidas simultáneamente con o sin quinasa Syk. Los mAb dirigidos contra CLEC9a sembrados en placas indujeron la activación de NFAT en B3Z-C9wt-Syk a través de la cola citoplásmica wt de C9, pero no en ausencia tanto de Syk como de Y7 (no se muestra).

Regulación de citoquinas inmunoregulatoras/moléculas coestimuladoras mediante CLEC9a.

Para determinar si la señalización a través de CLEC9a puede contribuir a la producción de citoquinas reguladoras o a la expresión de moléculas coestimuladoras en las células donde se expresan, los inventores analizaron transfectantes de LK con CLEC9 wt o el mutante Y7F. Las células de hibridoma expresan anti CLEC9a 397 y, en menor medida, 7H11 estimuló la producción de IL-2 específica a través de la molécula CLEC9a que se eliminó en el mutante Y7F (Fig. 9). El hibridoma DEC-205 del control no estimuló ninguna respuesta y el anti CLEC9a 1F6 estimuló una respuesta reducida que abre la posibilidad de que estos anticuerpos puedan comportarse diferencialmente en la producción de citoquinas, algo que sería muy atractivo desde la perspectiva de un direccionamiento de CLEC9a (anticuerpo agonista, 397, comparado con el anticuerpo de bloqueo, 1F6).

Para determinar los requisitos de activación de la cola de CLEC9a WT, los inventores analizaron transfectantes estables de la línea de linfocitos indicadora B3Z, que no expresa Syk. Se analizó la contribución de Tyr7 a la señalización de CLEC9a utilizando una versión mutante de CLEC9a con Tyr7 mutada a Phe (CLEC9a Y7F). Los inventores transdujeron células B3Z con CLEC9a wt o Y7F y transducidas simultáneamente con o sin quinasa Syk. Los mAb dirigidos contra CLEC9a sembrados en placas indujeron la activación de NFAT en B3Z-C9wt-Syk a través de la cola citoplásmica wt de C9, pero no en ausencia tanto de Syk como cuando se usó el mutante Y7F (Fig. 10).

Flt3L BMDC responde a los mAb dirigidos contra CLEC9a sembrados en placa mediante la producción de proteína IL12-23 p40 (Fig. 11).

Estos resultados demuestran que CLEC9a es una molécula de señalización que puede activar las DC.

CLEC9a es un receptor endocítico que se dirige selectivamente a CD11c+ CD8+ DC in vivo

Se analizó el potencial del mAb dirigido contra CLEC9a para internalizarse mediante CLEC9a endógeno expresado en Flt3L BMDC mediante FACS, que reveló que CLEC9a es una molécula endocítica. Los análisis confocales mostraron el direccionamiento del anticuerpo hacia los compartimentos intracelulares (no se muestran los datos). Estos resultados sugieren que CLEC9a es un receptor endocítico que puede estar dirigido por anticuerpos acoplados a antígenos (vacunación tumoral/vírica) para administrar específicamente la carga a los subconjuntos de células que expresan selectivamente la molécula. Para determinar si mAb dirigido contra CLEC9a sirve como herramienta de direccionamiento in vivo, los inventores inyectaron por vía intravenosa 7H11-Alexa-488 o isotipo control. Después de 16 h, los inventores analizaron los esplenocitos totales y el anticuerpo dirigido selectivamente a CD8 α + DC (MFI-350-400), y, con menor afinidad, PDC (MFI-65-70). El marcado de los esplenocitos con anticuerpo dirigido contra Cy5 de rata ha sugerido que la mayoría de mAb de rata dirigido contra CLEC9a de ratón fue objeto de endocitosis, ya que no se tiñó simultáneamente con el reactivo secundario dirigido contra Cy5 de rata (no se muestra).

Para explorar si el direccionamiento a través de CLEC9a conduce al procesamiento y a la presentación de antígenos mediante un subconjunto específico *in vivo*, los inventores aplicaron un derivado biotinilado de un péptido inmunodominante para determinar la respuesta de LTC a la proteína OVA (SIINEEKLC-biot, denominada S1) al isotipo control o al mAb dirigido contra CLEC9a como se indica en la sección Métodos. La biotinilación del péptido permitió a los inventores determinar que existían 1-1,2 péptidos por anticuerpo en todos los casos. Se inyectó a los ratones por vía intravenosa, tanto 5 μ g de S1 acoplada a anti-CLEC9a o el S1-isotipo control. Al día siguiente, los esplenocitos se enriquecieron en los subconjuntos CD11c+ o CD11c y sometieron a ensayo para determinar su capacidad de inducir la proliferación de células OT-I T y la producción de citoquinas (Fig. 12a y b). Solo el anti-CLEC9a dirigido contra las células CD11c+ dio como resultado la proliferación de la producción de IFN- γ por las células OT-I, mostrando que CLEC9a se dirige específicamente a DC CD11c+, dando como resultado la presentación de linfocitos T específicos de antígeno.

Para determinar además qué subconjunto de células dendríticas está dirigido por anti-C9, los ratones a los que se inyectó anti-C9 acoplado a S1 se clasificaron en tres subconjuntos principales de DC convencionales y se sometieron a ensayo con células OT-I T como anteriormente. Solo el subconjunto CD8+ de DC medió en la proliferación y la producción de IFN- γ por los linfocitos T, confirmando que CLEC9 se dirige específicamente a las DC CD11c+ CD8+, dando como resultado el cebado de linfocitos T específicos de antígenos (Fig. 12c y d).

El direccionamiento in vivo utilizando mAb dirigido contra CLEC9a más anti-CD40 da como resultado el cebado de los LTC y el rechazo del tumor

Los inventores han explorado si el direccionamiento de CLEC9a in vivo induciría la activación de linfocitos T específicos. La inyección de 2 μ g de anti-C9-S1, pero no del isotipo control, da como resultado la inducción de

actividad específica de LTC procedente del repertorio endógeno *in vivo* cuando se administra simultáneamente con anti-CD40 (Fig. 13). Este comportamiento es similar al observado con anti-DEC205-S1, anteriormente descrito ²⁴ como se ha evidenciado por los ensayos de muerte *in vivo* (Fig. 13A).

- 5 Los ratones a los que se administró el S1 acoplado al mAb control no eliminaron las células diana sin tener en cuenta la administración simultánea de CD40. Por el contrario, las células diana se eliminaron completamente de ratones a los que se había administrado S1 acoplado a anti-CLEC9a junto con anti-CD40. No se observó respuesta cuando se omitió el mAb dirigido contra CD40. Consistente con la eliminación de la célula diana, se encontraron números significativos de linfocitos T CD8+ específicos de OVA/H-2 Kb positivos para el tetrámero solo en los bazo
- 10 y la sangre de los ratones que habían recibido anti-CLEC9a-S1 junto con anti-CD40. La reestimulación de las mismas células con el péptido SIINFEKL *in vitro* dio como resultado una expansión secundaria, con producción de IFN- γ y actividad de muerte específica. Se obtuvieron resultados idénticos utilizando anti-CLEC9a conjugado con un péptido más largo de OVA que contiene el epítipo SIINFEKL ("S2"; SIINFEKLTEWTSSNVMEERC; Figura 13B).
- 15 De forma notable, el péptido S1 libre no pudo inducir respuestas de muerte *in vivo* o de estimular un número de células positivas para el tetrámero incluso cuando se administró un exceso de 100 veces sobre la cantidad presente en los conjugados anti-CLEC9a-S1 (no se muestra). Los inventores concluyen que el direccionamiento de antígenos exógenos a CLEC9a junto con un adyuvante adecuado permite un cebado cruzado eficaz de linfocitos T CD8+.
- 20 Para determinar si el cebado de CLEC9a de la actividad de LTC puede dar como resultado un tratamiento tumoral, los inventores utilizaron el modelo de metástasis pulmonar del melanoma B16. Los inventores inocularon por vía intravenosa 2×10^5 células de melanoma B16-OVA-GFP y 6 días después inyectaron diferentes anticuerpos conjugados con un derivado de S1 SIINFEKL (10 μ g) junto con anti-CD40 (25 μ g) por vía subcutánea en la pata (Fig. 14). Después de 18 días tras la inyección del tumor, se analizó el número de tumores pulmonares. Los resultados
- 25 revelaron que anti-CLEC9a más anti-CD40 es eficaz para el tratamiento tumoral ($p < 0,001$, ANOVA monolateral) (Fig. 14).

- Los inventores ampliaron los experimentos para determinar si el direccionamiento de anti-CLEC9a se puede usar también para inducir respuestas inmunes a las proteínas endógenas de diferenciación de melanocitos que pueden servir como antígenos asociados a tumores B16 (25-27). Los inventores sintetizaron péptidos biotinilados que abarcan epítipos antigénicos restringidos a H-2Kb y H-2Db procedentes de gp100, TRP-1 y TRP-2 (25-27), acoplados estos covalentemente a anti-CLEC-9a y ratones inmunizados con los conjugados de anticuerpos junto con poli I:C y anti-CD40 como adyuvantes. Tal como se muestra en la Figura 16, una única dosis de vacuna administrada terapéuticamente tres días después de la transferencia de células de melanoma B16 indujo la casi
- 30 completa erradicación de las pseudometástasis pulmonares. Esto se acompañó por la inducción de potentes respuestas de IFN- γ contra los antígenos de melanoma (Figura 16). Por el contrario, los mismos antígenos en forma no dirigida (conjugados con un mAb emparejado a un isotipo control) fracasaron en inducir la protección de respuestas de IFN- γ (Figura 16A, B). Se obtuvieron resultados similares en un modelo profiláctico en el que la vacuna se administró antes del estímulo de B16 (Figura 16C). Los inventores concluyen que el cebado de LTC mediante el direccionamiento de CLEC-9a se puede usar como vacunación profiláctica o terapéutica contra tumores de ratón.
- 40

La expresión de Clec9a humana está restringida a un pequeño subconjunto de DC de la sangre

- 45 Para extender estos hallazgos a seres humanos, los inventores clonaron hClec9a y generaron mAb de ratón contra el mismo (véase Materiales y Métodos). Se seleccionó uno de estos mAb para analizar el modelo de expresión de Clec9a entre células mononucleares de sangre periférica humana. La expresión de Clec9a humana no tenía linfocitos, monocitos, células NK y células HLADR de linaje negativo (Fig. 15A). Tampoco se detectaron en DC derivadas de monocitos generadas mediante cultivo en GM-CSF e IL-4 (no se muestran los datos). Sin embargo, la
- 50 expresión de Clec9a fue evidente en una subpoblación discreta de DC sanguínea, definida como células HLA-DR+ de linaje negativo (Fig. 15A).

- Se han notificado cinco subconjuntos distintos de DC sanguínea, incluyendo una población de CD123+ pDC y diferentes subconjuntos de CD123-DC presuntamente mieloides distinguibles sobre la base de la expresión de CD16, CD1b/c, BDCA-3, y CD34 (22). La subpoblación Clec9a+ de DC fue negativa para Cd123, lo que sugiere que pDC humana no expresa Clec9a, a diferencia de pDC de ratón (Fig. 15B). Las Clec9a+ DC sanguíneas también fueron negativas para CD34, CD16 y CD1b/c. Sin embargo, las Clec9a+ DC fueron uniformemente positivas para BDCA-3 (Fig. 15B). La Clec9a humana marca selectivamente, por tanto, una población distinta de DC BDCA-3+.
- 55

- 60 Finalmente, los inventores evaluaron si CLEC-9a humana, igual que su ortólogo de ratón, puede funcionar como un receptor endocítico en DC. Las BDCA-3+ DC se tiñeron a 4 °C con anti-CLEC-9a marcado con Alexa 488. Después de 1 h a 37 °C, pero no a 4 °C, se encontró fluorescencia en compartimentos intracelulares (no se muestra). Por tanto, CLEC-9a humana media la endocitosis del anticuerpo unido en las DC BDCA3+, lo que sugiere que podría utilizarse para el direccionamiento de antígenos a estas células en seres humanos.
- 65

Las células teñidas/muertas expresan un ligando de CLEC9A.

Las células BWZ que contienen la quimera CLEC9A-CD3 ζ tienen un tiempo de generación corto y pueden crecer en exceso fácilmente, generando una proporción significativa de células muertas en el cultivo. Los inventores observaron una activación basal en los transfectantes de BWZ que expresan CLEC9A sin ninguna estimulación adicional, que se correlaciona con el número de células muertas en el cultivo de BWZ (Fig. 17a).

Para confirmar estos resultados, los inventores utilizaron una línea celular que no induce una respuesta cuando se añade a los transfectantes BWZ-CLEC9A ζ . Las células LK no inducen una respuesta cuando se exponen a las células indicadoras. Sin embargo, cuando las células LK se irradiaron con UV para inducir la muerte celular, se convirtieron en potentes inductores del indicador (Fig. 17b), lo que sugiere que las células alteradas tras el tratamiento con UV expresan ligandos de CLEC9A. Como los anticuerpos bivalentes estimulan la reticulación de la molécula expresada en la línea de células B3Z y la activación del indicador, los anticuerpos de bloqueo no se pueden someter a ensayo con este sistema para demostrar la especificidad de la interacción. Sin embargo, los fragmentos Fab monovalentes de anticuerpos dirigidos contra CLEC9A no estimulan la actividad indicadora y la inducción bloqueada por células tratadas con UV de una manera específica de especie (Fig. 17b), lo que demuestra que el anticuerpo actúa bloqueando de forma específica el receptor de CLEC9A para evitar la interacción con el ligando.

Este resultado se confirmó en otros tipos de células irradiadas con UV independientes (3T3 de murino, células LK, MEF, EL-4), células RBL de rata, y células HEK-293 humanas. Cuando las células se preincubaron con cafeína (que evita el daño al ADN inducido por UV y la apoptosis) y se expusieron a radiación UV, no se indujo la exposición del ligando.

Los inventores expusieron células LK a diferentes dosis de UV y encontraron que la expresión del ligando en células LK está correlacionada con el número de células LK muertas (Fig. 17c), lo que muestra que el ligando se ha expresado selectivamente en esta población.

Para confirmar esto de una manera independiente, los inventores generaron un dominio extracelular soluble recombinante (rsCTLD) de CLEC9A de ratón y Dectina-1 de ratón como control, acoplada cada una de ellas a una secuencia BirA para la monobiotinilación. Se usaron rsCTLD monobiotinilados para generar tetrámeros de PE. Los inventores tiñeron células tratadas con UV 24 h antes y detectaron la unión específica de tetrámeros de CLEC9a rsCTLD a células positivas para TO-PRO 3 (Fig. 17d, gráficas de puntos). Como control, los tetrámeros de Dectina-1 rsCTLD no se unieron a células muertas, sino que se unieron a su ligando específico zimosán (Fig. 17d, histograma).

Como el tratamiento con UV induce daño en el ADN y una serie de marcadores relacionados con el estrés, los inventores han ensayado si la inducción de ligandos estaba producida por daños en el ADN o eran debidos principalmente a procesos implicados en la muerte celular. No solo los reactivos producen daño al ADN, sino también la privación de suero o incluso la congelación-descongelación, que han mostrado promover la necrosis primaria dando como resultado la muerte celular inmunógena, condujeron a la exposición del ligando (Fig. 17e). Sin embargo, el choque osmótico, que induce la muerte celular instantánea y ha mostrado que se comporta como tolerogénica, no expone el ligando de CLEC9A (Fig. 17e y f). En conclusión, el ligando de CLEC9A queda expuesto en células tras determinados tipos de necrosis primaria y secundaria. Además, Los inventores han descubierto que la fijación (o fijación y permeabilización) de las células instantáneamente promueve cambios que hacen que las células sean permeables a TO-PRO3 y "exponen" los ligandos de CLEC9A (Figura 20) demostrando además que la síntesis del ligando no se induce como resultado de la respuesta al daño producido por la radiación UV, sino que se expone como resultado del proceso de tñido en respuesta a determinados estímulos.

CLEC9A media una señal de adyuvante liberada por las células moribundas a las células dendríticas.

Las células muertas por radiación UV envían una señal a través del dominio citoplásmico de CLEC9A de manera dependiente de Syk e Y7 (Figura 21). El sistema ha permitido a los inventores explorar si los anticuerpos dirigidos contra CLEC9A podrían actuar como reactivos de bloqueo específicos para esta interacción y los inventores han encontrado que los anticuerpos tanto Fab como completos en forma soluble eran potentes reactivos de bloqueo (Figura 22). Para ensayar los efectos de las células teñidas sobre las células dendríticas y su función efectora *in vitro*, los inventores diseñaron un ensayo de presentación cruzada en el que se permitió que las células bm-1 tratadas con UV cargadas con proteína OVA interactuaran con Flt3L BMDC en presencia o ausencia de anti-CLEC9A de bloqueo. Las células Bm-1 son de un haplotipo B6 pero expresan un H2K^b mutado que no se une al péptido de clase I inmunodominante para OVA (SIINFEKL). Como lectura de las DC, se añadieron al ensayo células OT-I específicas con capacidad de cebado cruzado. La proliferación de células OT-I, como lectura de la cantidad de antígeno que se presentó de forma cruzada, no quedó afectada en demasía (Fig. 18a). Sin embargo, la producción de citoquinas por las células OT-I, que es dependiente de la ayuda promovida por las DC activadas por un efecto adyuvante, quedó fuertemente inhibida cuando se utilizaron anticuerpos dirigidos contra CLEC9a bloqueantes (Fig. 18a y b).

Para confirmar estos resultados, los inventores generaron ratones deficientes en CLEC9A, que expresaban EGFP bajo el control del promotor *Clec9a* (*Clec9a^{egfp/-}*). Los inventores generaron Flt3L BMDC deficiente o no en CLEC9A y analizaron si la captación de células teñidas se vio afectada. La Fig. 18c no muestra diferencias en la capacidad de captación de células teñidas entre CLEC9A⁺ y CLEC9A⁻ Flt3L BMDC. Después, los inventores evaluaron el efecto de la deficiencia de CLEC9A en Flt3L BMDC en la presentación cruzada de la proteína OVA cargada tanto con células bm-1 tratadas con UV como expresadas intracelularmente en una proteína de fusión OVA-GFP no secretada en MEF bm-1 tratadas con UV (fig. 18d). Se vio afectada la proliferación de OT-I, lo que sugiere un efecto más profundo en el bloqueo de la presentación cruzada que el del anticuerpo de bloqueo. Sin embargo, a dosis mayores de OVA, incluyendo OVA expresada por las bm1MEF, la proliferación no se vio afectada, y la producción de IFN γ se inhibió fuertemente (Fig. 18d y e). Estos resultados sugieren que existe un bloqueo en el efecto del adyuvante asociado a las células teñidas durante el cebado cruzado in vitro en ausencia de CLEC9A en las DC.

CLEC9A detecta la muerte celular inmunogénica para promover el cebado cruzado in vivo

Como las DC CD8 α ⁺ que expresan CLEC9A son el tipo principal de células caracterizado por promover el cebado cruzado del antígeno asociado a muerte celular in vivo, los inventores ensayaron el efecto del bloqueo de CLEC9A en esta función. Los ratones que recibieron MEF bm1 tratadas con UV que expresaban OVA mostraron linfocitos T CD8⁺ expandidos frente a OVA procedentes del repertorio endógeno 6 días después (Fig. 19a, panel izquierdo). Estos linfocitos T CD8⁺ fueron capaces de producir IFN- γ en respuesta a SIINFEKL, mostrando que las células efectoras y las células muertas se comportan como un vehículo inmunógeno del antígeno asociado a la actividad adyuvante de las células muertas (Fig. 19a, panel derecho). El pretratamiento con anticuerpo de bloqueo dirigido contra CLEC9A, pero no con un isotipo control, bloqueó tanto la generación de una respuesta específica de CD8 como su actividad efectora (Fig. 19a).

Para determinar el papel preciso de CLEC9A en el proceso de inmunogenicidad de las células muertas relacionado con el cebado cruzado del antígeno asociado a muerte celular, los inventores aprovecharon el ensayo realizado en ratones *CLEC9a^{egfp/-}*. Los resultados mostraron una inhibición muy significativa y parcial del cebado cruzado con antígeno asociado a muerte celular in vivo en ausencia de CLEC9A (Fig. 19b, panel izquierdo). Como los ratones inactivados genéticamente se habían generado en un fondo de C57BL/6-129 mixto y se habían retrocruzado con C57BL/6 (N3), los inventores agruparon las 12 hembras de la camada cuyos individuos se habían combinado en la Fig. 19b, panel izquierdo, y compararon el promedio entre ratones CLEC9A⁺ y CLEC9A⁻, mostrando que 12 de las 12 crías mostraron reducción, con un promedio de 30,05 % de inhibición ($p < 0,0001$, test de la t de Student) (Fig. 19b, panel derecho). Como se muestra en la Fig. 19b, panel derecho, las diferencias en la penetración del fondo entre diferentes crías de la camada explican una variabilidad significativa en la capacidad del cebado cruzado entre las crías de camada y amortiguan la diferencia real entre ratones CLEC9A⁺ y CLEC9A⁻, que sigue siendo muy significativa, aunque solo parcial. Además, la producción de IFN γ en respuesta a SIINFEKL ex vivo se vio muy afectada, mostrando la deficiencia en la respuesta efectora generada mediante cebado cruzado con un antígeno asociado a muerte celular en ausencia de CLEC9A (Fig. 19c). En conclusión, la deficiencia en CLEC9A da como resultado una adyuvancia reducida del antígeno asociado con muerte celular que conduce a un bloqueo en la respuesta efectora de los linfocitos T específicos del antígeno asociado con muerte celular.

Métodos

Ratones

Los ratones C57BL/6, los ratones OT-I con fondo Rag^{-/-} C57BL/6 y ratones con fondo B6.SJL (CD45.1⁺ congénicos) se criaron en el Cancer Research UK en condiciones específicas exentas de patógenos. Los ratones K^{bm-1} se adquirieron del The Jackson laboratory (Bar Harbor, Maine; número de stock 001060), y, junto con los ratones C57BL/6, los ratones OT-I con fondo Rag^{-/-} C57BL/6, MyD88-TRIF inactivados genéticamente dos veces, los ratones *Clec9a⁺*, y *Clec9a^{-/-}*, se criaron en el Cancer Research UK en condiciones específicas exentas de patógenos. Se prepararon quimeras de médula ósea a partir de hepatocitos fetales deficientes en Syk como se ha descrito anteriormente (Turner et al. Nature 378, 298 (1995)). Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo según las directrices nacionales e institucionales para el cuidado animal.

Reactivos

El medio de cultivo fue RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con glutamina, penicilina, estreptomicina, 2-mercaptoetanol (todo de Invitrogen) y suero de feto de ternera inactivado térmicamente al 10 % (Bioclear). Los anticuerpos utilizados en los experimentos mediante análisis de citometría de flujo fueron de BD Pharmingen e incluían los específicos para CD11c (Clon HL3, IgG1 de hámster), CD24, CD11b, B220, Ly6C, CD4 (RM4-5, IgG2a de rata), CD8. Los anticuerpos utilizados para el ELISA fueron, para la captura, IFN- γ (XMG1.2, IgG1 de rata), para detección/IL12-23 p40. Purificado 2.4G2 (anti-Fc γ RIII/II, IgG2b de rata, utilizados para bloquear la unión de Ab no específica) procedían del servicio de producción de anticuerpos del Cancer Research UK. Para la citometría de flujo, las suspensiones celulares se tiñeron con PBS enfriado en hielo suplementado con EDTA 2 mM, FCS al 1 % y azida de sodio al 0,02 %. Se adquirieron los datos en un equipo FACSCalibur (BD Biosciences) y se analizaron con el programa informático FlowJo (Treestar, San Carlos, CA).

Células

Se generaron DC derivadas de médula ósea de ratón (BMDC) utilizando GM-CSF y se purificaron a partir de cultivos a granel mediante selección magnética con microperlas dirigidas contra CD11c (GM-CSF BMDC). Como alternativa, Se generaron BMDC cultivando células de médula ósea en presencia de 100 ng/ml de Flt3L (R&D) durante 10 días, momento en el que todas las células vivas fueron positivas para CD11c (Flt3L BMDC). Los esplenocitos se prepararon mediante digestión con liberasa/ADNasa y se enriquecieron en DC mediante selección positiva con microperlas dirigidas contra CD11c. Las células OT-I T (procedentes de ganglios linfáticos y bazo) se purificaron mediante selección negativa utilizando un cóctel de anticuerpos biotinilados (anti-CD11c, CD11b, B220, FcγR, Gr-1, y CD4) seguido por microperlas de estreptavidina. Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de una capa leucocitaria procedente de un único leucocito donante (National Blood Transfusion Service) mediante sedimentación sobre Ficoll-Hypaque (GE-Healthcare).

PCR/RT-PCR

Se extrajo el ARN total utilizando Trizol (Invitrogen) a partir de subconjuntos de DC esplénicas enriquecidos en CD11c con microperlas dirigidas contra CD11c (Miltenyi) y clasificadas para la expresión de CD4 y CD8 en un clasificador FacsAria (BD). Además, se extrajo el ARN de los subconjuntos de GM-CSF y Flt3L in vitro derivados de BMDC. Se preparó el ARN mediante digestión de la ADNasa (exenta de ADN, Ambion) y se sometió a transcripción inversa utilizando la transcriptasa inversa Superscript II (Gibco), 1 μM de dNTP y 10 μM de hexanucleótidos aleatorios (Gibco). Se amplificó el ADNc utilizando 35 ciclos de la PCR, consistiendo de 30 s 94 °C, 30 s 55 °C, 1 m 72 °C. Las secuencias de los cebadores fueron: mCLEC9a Fw 5' AGACTGCTTCACCACTCCAA; mCLEC9a Rv: 5' CTTGGCACAAT-GGACAAGGT; b-actina Fw: 5' GTTTGAGACCTTCAACACCCC, b-actina Rv: 5' GTGGCCATCTCCTGCTCGAAGTC; hClec9a Fw: 5' CCCAAGTCTCATTGGAGGA; hClec9a-1 Rv: 5' AAATCTGGACGGTGTGGAAG.

Generación de mAb dirigidos contra anti-CLEC9a

mAb contra Clec9a de murino

Se inmunizaron ratas Wistar con células RBL-2H3 transfectadas con CLEC9a fusionadas a un epítipo HA y se llevó a cabo la fusión de esplenocitos procedentes de ratas hiperinmunizadas con la línea de células Y3 de mieloma de rata siguiendo los procedimientos normalizados. Para la detección de positivos, los inventores utilizaron la línea celular B3Z²⁵ que expresa una quimera con el dominio extracelular de CLEC9a, la región transmembrana de NKRP1B y la cola intracelular de CD3ζ y seguido por un IRE-GFP, una estrategia ya descrita²¹. La secuencia de ADNc de la quimera de fusión de mCLEC9a se muestra en la Fig. 3. La línea celular B3Z incluye un indicador de NFAT acoplado a la actividad de β-Gal y cualquier implicación de la molécula quimérica da como resultado la activación de NFAT y del indicador, que se puede revelar a continuación siguiendo los ensayos normalizados para la actividad de β-Gal. El cribado de anticuerpos se realizó mediante la activación funcional de las B3Z que expresaban la quimera en comparación con la línea celular progenitora. Aquellos anticuerpos que se seleccionaron como positivos se confirmaron mediante el análisis FACS en la línea celular progenitora en comparación con la quimera de CLEC9a que expresaba las células (EGFP+). Este método permitió la selección de tres mAb denominados 1F6, 397, y 7H11 como se muestra en la Fig. 4. Los mAb se conjugaron a continuación con biotina o con Alexa488 para la tinción (Invitrogen), o se usaron para la conjugación con el péptido S1.

mAb contra Clec9a humana

Se inmunizaron ratones BALB/c 3-4 veces con células RBL-2H3 que expresaban Clec9a humana fusionada con un epítipo HA. Se llevó a cabo la fusión de los esplenocitos con la línea SP2/0 de mieloma de ratón utilizando procedimientos normalizados. Para el cribado del hibridoma, los inventores utilizaron la línea celular B3Z, que expresa un indicador β-gal de NFAT (23). Esta línea celular se transdujo con un retrovirus que codificaba una quimera del dominio extracelular de Clec9a humana fusionado a la región transmembrana de NKRP1B y la cola intracelular de CD3ζ seguido por una secuencia IRES y el gen GFP (24). Los sobrenadantes del hibridoma se cribaron por su capacidad de unirse a la quimera Clec9a, dando como resultado la activación del indicador de NFAT y la inducción de la actividad de β-gal (24). Los sobrenadantes que dieron un resultado positivo en el ensayo se cribaron adicionalmente mediante citometría de flujo usando una mezcla de células B3Z que expresaba la quimera Clec9a (GFP+) y las células B3Z progenitoras (GFP-). Este método permitió la selección de un mAb de ratón específico de hClec9a (8F9 (IgG2a)).

Citometría de flujo

Los anticuerpos marcados con fluorocromo o biotina específicos de CD11c, CD24, CD11b, B220, Ly6C, CD4 y CD8α eran de BD Pharmingen. Purified 2.4G2 (anti-FcγRIII/II) era del servicio de producción de anticuerpos del Cancer Research UK. Las suspensiones de células de ratón se incubaron con 10 μg/ml del mAb 2.4G2 para bloquear los receptores de Fcγ, y a continuación se tiñeron en PBS enfriado con EDTA 2 mM, FCS al 1 % y azida de sodio al 0,02 %. Para los estudios de endocitosis, las células bloqueadas con FcγR se

marcaron con 5 µg/ml de mAb dirigido contra Clec9a biotinilado durante 30 min a 4 °C. A continuación, las células se lavaron dos veces y se incubaron durante tiempos diferentes a 4 °C o 37 °C, antes de transferirse a hielo y añadir estreptavidina PE. Para los estudios de marcado *in vivo*, Los mAb dirigidos contra CLEC9a conjugado con Alexa-488 o los anticuerpos de control emparejados por isotipo se inyectaron por vía intravenosa a la dosis indicada y se prepararon y analizaron los tejidos después de 16 h. Los anticuerpos específicos de CD3, CD14, CD19, CD56, HLA-DR, CD34, CD123 y CD16 humanos se adquirieron de BD, y CD1b/c, y BDCA-3 eran de AbCam (Cambridge, Reino Unido). Las células mononucleares humanas se bloquearon con 100 µg/ml de IgG humana (Sigma-Aldrich) y se tiñeron como anteriormente. Se adquirieron los datos en un equipo FACSCalibur (BD Biosciences) y se analizaron con el programa informático FlowJo (Treestar, San Carlos, CA).

Cultivo y estimulación de BM-DC

GM-CSF BM-DC se generaron como se ha descrito²⁶ y las DC se purificaron a partir de cultivos a granel con microperlas dirigidas contra CD11 antes del uso (Miltenyi Biotec). Se comprobó la pureza de BM-DC mediante FACS y fue de forma rutinaria >98 % (no se muestran los datos). Se generaron Flt3L BMDC a partir de médula ósea cultivada en presencia de 75 ng/ml o 50 ng/ml de Flt3L (R&D) durante 10 días. Para los análisis de producción de citoquinas y de expresión de marcadores superficiales, se cultivaron 5-10x10⁴ Flt3L BM-DC por pocillo durante 18-24 horas en 200 ml de medio de cultivo que contenía Flt3L en placas de fondo plano de 96 pocillos revestidas previamente con mAb isotipo control o dirigido contra CLEC9a. se midieron los niveles de citoquinas en los sobrenadantes mediante ELISA de tipo sándwich utilizando anti-IL-12 p40-p70 de captura (C15.6) y detección mediante biotina anti-IL12p40-p70 (C17.8), ambos de BD. Para la endocitosis en Flt3L BMDC, se bloquearon FcγR con 10 µg/ml de mAb 2.4G2 y a continuación se cultivaron las células con 5 µg/ml de mAb biotinilado durante 30 min a 4 °C, o 37 °C, se lavaron y se dejaron durante 1,5 h o 0,5 h a la temperatura de ensayo antes de lavar y añadir simultáneamente el reactivo secundario (estreptavidina PE) a 4 °C. Para el análisis confocal, se añadieron mAb conjugados con Alexa 488 a las Flt3L-BMDC bloqueadas con FcγR a 5 mg/ml durante 30 min at 4 °C o 37 °C, y a continuación se lavaron y se dejaron durante 5 h más a la temperatura del ensayo antes de dejarlas adherirse a cubreobjetos revestidos de poli-L-lisina y fijación en PFA al 2 % durante 20 min a TA. Las muestras se montaron en portaobjetos con Fluoromont (Southern Biotech, Birmingham, AL). Se obtuvo una serie confocal de imágenes de contraste mediante interferencia diferencial e imágenes de fluorescencia simultáneamente con un microscopio confocal de barrido por láser (AxioPlan 2, Zeiss, Alemania) con un objetivo de inmersión 63"-Plan-Apochromat NA 1.4. Se llevó a cabo el análisis de imágenes con el programa informático LSM 510 (Zeiss, Alemania).

Debilitación de péptidos y transferencia Western

Para debilitar los péptidos, los péptidos conjugados con biotina se disolvieron en DMSO al 40 % antes de su dilución en tampón de lisis. Se incubó Syk humano recombinante (Upstate) diluido en tampón de lisis con los péptidos biotinilados indicados correspondientes a CLEC9a y a la cola de la Dectina-1 intracelular (Cancer Research UK Peptide Synthesis Laboratory) y estreptavidina-sefariosa (Sigma Biosciences AB Uppsala, Suecia). Tras la purificación por afinidad, las perlas de sefariosa se lavaron una vez en tampón de lisis y se hirvieron en un tampón cargado con gel SDS que contenía β-mercaptoetanol al 10 %. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), se transfirieron a membranas de PVDF Immobilon (Millipore Corporation, Bedford, MA), y se sondearon con anticuerpos de conejo dirigidos contra Syk (una combinación de suero 2131 sensibilizado frente a un péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 318-330 de Syk²⁰ de murino y anti-Syk procedente de Cell Signaling Technology, Inc., número de catálogo 2712, sensibilizado contra un péptido sintético correspondiente al extremo C de Syk humano) seguido por detección quimioluminiscente.

En el ensayo de activación de células LK, las células LK se sembraron en placas de 6 pocillos, con anti-C9 o isotipo control durante los tiempos indicados. Los extractos celulares se prepararon en tampón de lisis (HEPES 50 mM (pH 7,4), cloruro de sodio 150 mM, fluoruro de sodio 100 mM, pirofosfato de tetrasodio 10 mM, ortovanadato de sodio 1 mM [pH 10,0], EDTA 1 mM [pH 8,0], cloruro de magnesio 1,5 mM, glicerol al 10 %, 1 % de Triton X-100, PMSF 1 mM, y comprimidos del cóctel inhibidor de la proteasa "Complete" [Roche]); se descartó el material insoluble y se analizó una cantidad fija de lisado mediante SDS-PAGE como se ha descrito anteriormente. Para el anticuerpo de conejo WB dirigido contra Sik y anti P-Syk, anti-Erk, anti-P-Erk fueron de Cell Signaling.

Ensayo del indicador NFAT en células B3Z y BWZ

Se han descrito previamente las células B3Z que contienen un plásmido indicador de NFAT acoplado a la actividad de LacZ²⁵. CLEC9a WT o una versión mutante Y7F (Stratagene) se transdujeron en células B3Z wt o transducidas con Syk. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos revestidas con mAb isotipo control o anticuerpo dirigido contra CLEC9a y después del cultivo durante la noche, se lavaron en PBS y se lisaron en tampón que contenía CPRG tal como se ha descrito²¹. Cuatro horas después se midió A595, utilizando una DO 655 como referencia.

Para la detección de los ligandos de CLEC9A, Esta línea celular se transdujo con un retrovirus que codificaba una quimera del dominio extracelular de CLEC9A humana fusionado a la región transmembrana de NKRP1B y la cola intracelular de CD3ζ seguido por una secuencia IRES y el gen GFP (24). La unión del ligando a la quimera CLEC9A daría como resultado la activación del indicador de NFAT y la inducción de la actividad de β-gal. Para evaluar la

activación basal de células BWZ que expresaban los receptores quiméricos de CLEC9A-CD3 ζ humanos, 4, 2, 1, o 0,5x10⁶ células/ml se cultivaron en 3 ml en una placa de 6 pocillos y se dejaron (sobre)crecer durante dos días. Se determinó la frecuencia de células muertas utilizando el colorante TO-PRO3 (Invitrogen) y las células vivas se sembraron en medio reciente a 2x10⁵/pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos. Tras cultivo durante la noche, se midió la actividad de Lacz como anteriormente.

Para determinar la exposición del ligando en diferentes tipos de células, LK (línea de linfocitos B), fibroblastos embrionarios de ratón immortalizados con SV-40 (MEF) derivados de ratones bm-1 {Ref} utilizando protocolos normalizados, leucemia de rata RBL, fibroblastos 3T3, y células HEK-293 de riñón de embrión humano se irradiaron con UV (240 mJ/cm²) y se dejaron reposar 24 h para inducir la muerte celular antes de añadir a 2x10⁵ transfectantes de BWZ en una placa de fondo plano de 96 pocillos en una relación 1:1 en presencia o ausencia de Fab control o anticuerpo dirigido contra CLEC9A (1F6) de ratón y Fab dirigido contra CLEC9A (8F9) humano (Sancho et al, J Clin Invest. 2008; 118(6):2098-110). Tras cultivo durante la noche, se midió la actividad de Lacz como anteriormente. En algunos ensayos, Las células BWZ transfectadas con CLEC9A wt se utilizaron para determinar si las señales del ligando viajaban por la cola citoplasmática y para evaluar los anticuerpos completos como reactivos de bloqueo comparables al Fab.

La respuesta a la dosis de UV se realizó irradiando las células LK con las siguientes dosis de UV (mJ/cm²): 0, 0,5, 1,5, 5, 15, 50, 240. Se determinó la frecuencia de células muertas 24 h después utilizando colorante to-pro3 y las células se sembraron 1:1 con transfectantes de BWZ (2x10⁵ células/pocillo) en medio reciente. Tras cultivo durante la noche, se midió la actividad de Lacz como anteriormente.

Se evaluaron diferentes tratamientos de células LK y de MEF immortalizadas con bm-1 en la exposición del ligando. Las células se cultivaron durante 24 h con mitoxantrona (1 μ M) o en ausencia de suero (privación de suero). Se llevó a cabo el choque osmótico como se ha descrito previamente (Liu et al. 2002. J. Exp. Med. 196: 1091-1097). Se llevaron a cabo tres ciclos de congelación-descongelación en el aglomerado de células, congelando en N₂ líquido y descongelando a 37 °C. Tras estos tratamientos, se determinó la frecuencia de células muertas utilizando colorante to-pro3 y se tiñeron las células para rsCTLD como se indica a continuación. Las células se sembraron 1:1 con transfectantes de BWZ (2x10⁵ células/pocillo) en medio reciente. Tras cultivo durante la noche, se midió la actividad de Lacz como anteriormente.

Acoplamiento de SIINFEKLC-biot (S1) con el mAb.

Para conjugar el péptido SIINFEKL de OVA inmunodominante con el anticuerpo bivalente, se sintetizó el derivado del péptido SIINFEKL, denominado S1, que contiene una cisteína añadida (C) para generar un grupo sulfhidrilo libre y biotina para rastrear el marcado y se purificó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en el Cancer Research UK. Los mAb se trataron con sulfo-SMCC 30 min a TA, generando grupos sulforeactivos en las aminas terciarias, seguido por la purificación del anticuerpo activado en una columna de cromatografía de exclusión molecular (Pierce). Después, el péptido S1 se preparó de forma reciente y se dejó reaccionar en cantidades equimoleculares con el anticuerpo activado 1 h a 37 °C, y se purificó en una columna de cromatografía. La extensión de la biotilación del mAb permitió a los inventores cuantificar en 1-1,2 péptidos acoplados por molécula de mAb en todos los conjugados de anticuerpos generados, utilizando el kit Fluoreporter (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Acoplamiento del péptido S2 y de los péptidos antigénicos de diferenciación de melanocitos con el mAb

Se sintetizó el péptido S2 (SIINFEKLTEWTSSNVMEERC-biotina) que se purificó mediante HPLC en el Cancer Research UK. Los mAb en PBS se trataron con sulfo-SMCC durante 30 min a temperatura ambiente para generar grupos sulforeactivos en aminas terciarias. El anticuerpo activado se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular (Pierce), se añadió el péptido S2 (relación molar 2.1) y se dejó proceder la reacción durante 1 h a 37 °C. Se purificaron los conjugados utilizando una columna de sefrosa Immunobind. Se evaluó la extensión de la biotilación del mAb utilizando el kit Fluoreportes (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante.

Se usó la misma estrategia para sintetizar péptidos a partir de antígenos de diferenciación de melanocitos, gp100 (EGSRNQDWL y KVPRNQDWL; restringidos por H-2Db (25)), TRP-1 (TWHRYHLL y TAYRYHLL; restringidos por H-2Kb (26)) y TRP-2 (SVYDFFVWL; restringidos por H-2Kb (27)), modificado cada uno por la adición de cisteína-eahx-biotina en el extremo C.

Direccionamiento in vivo del mAb dirigido contra CLEC9a

Anti-CLEC9a, isotipo control, o anti-DEC-205 se acoplaron con Alexa488 (Invitrogen) o con el péptido S1. Para el experimento de direccionamiento utilizando Alexa488 Abs, se inyectaron mAb-Alexa488 por vía intravenosa (20 μ g) y se extrajeron y analizaron los esplenocitos después de 16 h.

En el experimento de direccionamiento del antígeno a subconjuntos específicos *in vivo*, los S1-Abs se inyectaron por vía intravenosa (5 μ g) y se extrajeron y purificaron los esplenocitos de la fracción positiva y negativa de CD11c con

microperlas dirigidas contra CD11c (Miltenyi Biotec). Se obtuvieron células OT-I de ganglios linfáticos y esplenocitos de ratones OT-I Rag-/- que se purificaron mediante selección negativa utilizando un cóctel de anticuerpos biotinilados (anti-CD11c, CD11b, B220, FcγR, Gr-1, y CD4) seguido por microperlas de estreptavidina. (Miltenyi Biotec). Se cultivaron diferentes cantidades de DC dirigidas *in vivo*, como se ha indicado en la leyenda de la Figura, con 10⁵ células OT-I marcadas con 2 μM de CFSE (Invitrogen) en placas de fondo en U. Tres días después, se determinó la proliferación mediante dilución CFSE en células positivas para vβ5.1 y CD8 y negativas para TO-PRO 3. Se adquirieron las células con perlas de recuento verdaderas (...) para cuantificar el número absoluto de células. Se determinó IFN-γ en los sobrenadantes mediante ELISA de tipo sándwich.

En el experimento de direccionamiento *in vivo* para evaluar la respuesta específica de LTC, se inyectaron mAb-S1 por vía subcutánea, en las patas traseras (2 μg) junto con 25 μg o no de anti-CD40 (3/23, BD Pharmingen) y cinco días después se llevaron a cabo ensayos de muerte *in vivo* como se ha descrito²⁷. En resumen, los esplenocitos diana del fondo B6.SJL (CD45.1 + congénico) se cargaron con 20 nM, 200 nM o nada de péptido SIINFEKL y se marcaron respectivamente con 0,03 μM, 0,3 μM o 3 μM de CFSE durante 20 min a 37 °C. Los esplenocitos marcados se inyectaron (10⁷) por vía intravenosa. Al día siguiente se extrajeron los esplenocitos, y la población positiva para CD45.1 se analizó para determinar CFSE. Además, se cultivaron 5x10⁵ esplenocitos en presencia o ausencia de 1 μM de SIINFEKL durante 24 h y se cuantificaron los sobrenadantes para IFNγ mediante ELISA. Se marcaron también las células sanguíneas y los esplenocitos con el tetrámero SIINFEKL-H2Kb (Beckman Coulter), anti-CD8 y anti-Thy 1,2 y se analizaron para determinar el % de tetrámeros + células entre la población de linfocitos T CD8+.

Modelo de tratamiento tumoral de melanoma B16

Se transdujeron células de melanoma B16 con la proteína de fusión OVA-GFP y se clasifica por su expresión de GFP. Se inyectaron células tumorales (2x10⁵) por vía intravenosa en la cola de ratones B6 congénicos y 6 días después se inyectó el tratamiento terapéutico consistente en Ab-S1+anti-CD40 por vía subcutánea en la pata. En el día 18 después de la inyección del tumor, se contaron los tumores de pulmón. Se llevaron a cabo experimentos de tratamiento tumoral de una manera análoga excepto que los ratones recibieron B16-OVA 3 días antes del tratamiento con anticuerpos.

Se llevaron también a cabo el tratamiento tumoral y los experimentos de profilaxis con células B16 progenitoras no transducidas. Estas se administraron por vía intravenosa. (5x10⁵/ratón) tanto 3 días antes (tratamiento) como 1 día después (profilaxis) de la inmunización con anticuerpos dirigidos contra CLEC-9a o anticuerpos control acoplados covalentemente a una mezcla de 5 péptidos derivados de gp100, TRP-1 y TRP-2 (1 μg/pata) junto con anti-CD40 (12,5 μg/pata) y poli I:C (5 μg/pata). Se evaluó la carga tumoral contando los foci pulmonares. Cuando estos fueron demasiado numerosos para contarlos (>250 por ratón), se muestran como 250. Se vigiló las respuestas de los LTC como se ha descrito anteriormente.

Generación de ratones Clec9a^{-/-}

Se generaron ratones utilizando ingeniería genética recombinante de Red/ET (Gene Bridges, Heidelberg, Alemania) para capturar directamente la región del gen a modificar del clon BAC, RP-23 248-K14 (clon C57BL/6 BAC de Invitrogen). Un vector de sustitución de direccionamiento génico convencional: pFloxRI+tk, que usa la estrategia de selección positiva (gen de resistencia a la neomicina) y negativa (gen de la timidina quinasa del virus del herpes simple) para el aislamiento de clones de células ES recombinantes homólogas se amplificó mediante la PCR utilizando los cebadores indicados emparejando 20 nucleótidos con el vector y emparejando 70 nucleótidos con las regiones de Clec9a a capturar. Los cebadores utilizados fueron Fw 3arm 24330 pFlox 5' ATAATATCAT ATTTCTATAA TATCATTGTA ATGACAAAAC CACTGAACCTA GTGCCTGTAA AGGCAGGAGG GGTACCGAGC TCGAATTCTA CCG 3'; Rv pFlox 5arm 5'TGCTATATTA CAGATTTTCA AGTGGGGTAG CCTGGAGTAA CAAGATGGCA GGCATAATC ACTAGTGCGG CCGCCACCGC GGTGGAGCTC CAGCTTT 3'.

Una vez que se incluyó la región a modificar en el vector resistente al Amp, un casete incluyendo EGFP farnesilado, y el promotor PGK-gb2 seguido por Kan/Neo permitió repetir la etapa de recombinación homóloga mediante ingeniería genética recombinante con selección de Kan. Los cebadores utilizados para la amplificación del casete resistente al EGFP-F Kan-Neo fueron: Rv NeoKan 3arm 5' TGCTTTTGTA CTTACACTTG ATGCCCAAGA AAATGGACGT TGCTAACAAAG CCCATACAGA CCACACCTCG AGATAACTTC GTATAATGTA T3' y Fw 5arm EGFP-F 5' TTTGTGCCAG GCTCCTATGT AGACTGCTTC ACCACTCCAA GCGCCTTCAG CATGCATGTC GACATGGTGA GCAAGGGCGA GGAG 3'.

Se preparó el vector director para expresar EGFP-F con un fuerte poliA inmediatamente en dirección 3' de los primeros dos aminoácidos de CLEC9A y los exones rotos 1 y 2, terminado la transcripción con el poliA fuerte. El vector director se linealizó antes de la transfección utilizando *Not* I. Se consiguió la transfección del híbrido 129S6/C57BL/6 F1 S6B6 derivado de citoblastos embrionarios (ES) mediante electroporación, y los clones recombinantes se aislaron tras el cultivo en G418 y ganciclovir. La selección de células ES supervivientes se cribó mediante PCR utilizando dos parejas de cebadores independientes con uno de los cebadores externos del brazo corto. Las parejas de cebadores utilizados fueron: Scr Fw1 5' GATCTGTGTG TTGGTTTTTG TGTGC 3'; Scr Rv1, 5'

TAGCATGGCA CTTCTCCATT ACCTT 3' Amplicón Fw1Rv1: 2138 pb. Scr Fw2, 5' GCGAATTCGG TACCAATAAA AGAGC 3'; Scr Rv2, 5' CAGAAGCTTC CTGGTTTTGG TTTT 3' Amplicón Fw2Rv2: 2352.

Se microinyectaron clones ES cariotípicamente euploides, dirigidos correctamente 3,5 días después de la cópula a blastocistos C57BL/6 y la descendencia resultante con quimerismo de revestimiento-color se crio con hembras C57BL/6 para identificar la transmisión de la línea germinal. Las quimeras transmitidas por la línea germinal se criaron posteriormente con hembras C57BL/6 para asegurar el alelo dirigido al gen en el fondo C57BL/6 puro. Los animales heterocigóticos se cruzaron para generar animales homocigóticos deficientes y controles de crías de camada emparejadas. La expresión del gen NK1.1 C57BL/6, ligado a Clec9a, en los ratones inactivados genéticamente muestra que la recombinación homóloga del clon C57BL/6 BAC dirigido se había integrado en la copia de C57BL/6 del F1 en células S6B6 ES.

Los ratones Clec9a ^{-/-} utilizados en este trabajo eran una mezcla del fondo genético 129/Sv x C57BL/6 en la tercera generación de retrocruzamiento con C57BL/6.

Generación de CTLD soluble recombinante.

Se clonaron independientemente los CTLD de CLEC9A y Dectina-1 de ratón en marco en el vector de expresión p3xFlag-CMV-9 de Sigma con una secuencia de monobiotinilación de BirA añadida. Los cebadores utilizados para la amplificación de CTLD fueron mCLEC9A Fw 5'GGATCC mCLEC9A Rv 5'GGATCC mDectin Fw 5'GGATCC3' mDectin Rv 5'GGATCC3'. Se transfectaron y seleccionaron células CHO con G418 (1 mg/ml). Los transfectantes estables se clonaron dos veces mediante dilución limitante, seleccionando clones que secretaban rsCTLd procedente de Dectina-1 o CLEC9A al sobrenadante, detectados mediante un ELISA de tipo sándwich que utiliza como captura M2 dirigido contra flag (Sigma) y para la detección de biotina-2A11 anti-Dectina 1 o biotina-16F anti-CLEC9A. Se generaron sobrenadantes concentrados procedentes de clones CHO en biorreactores CELLline (Integra Biosciences, Chur, Suiza) y se purificaron utilizando agarosa M2 contra flag (Sigma). A continuación se llevó a cabo la monobiotinilación utilizando procedimientos normalizados {Ref} y se generaron tetrámeros utilizando PE-Estreptavidina (Sigma). A continuación se utilizaron PE-tetrámeros de rsCTLd para la tinción de células muertas o zimosán durante 30 min a 40 °C en tampón FACS normal. Las muestras se contratiñeron con to-pro3 y se adquirieron mediante citometría de flujo.

Penetración cruzada in vitro.

En el ensayo de penetración cruzada in vitro, los inventores cultivaron simultáneamente tres tipos de células: células muertas cargadas con OVA o que expresaban OVA, Flt3L BMDC de diferentes orígenes en presencia o ausencia de anticuerpos que bloquean CLEC9a y la lectura, linfocitos T transgénicos específicos de OT-I OVA. Los inventores sometieron a ensayo Flt3L BMDC procedente de crías de ratones CLEC9a^{-/-} o CLEC9a⁺. Además, se cultivaron Flt3L BMDC procedentes de C57BL/6 en ausencia o presencia de Fab control, o Fab contra CLEC9A (1F6) (10 µg/ml), así como con anticuerpos completos contra CLEC9A o isotipo control (20 µg/ml). Cuando estuvo indicado, se clasificaron Flt3L BMDC de tipo CD8α con CD11b^{lo} y CD24^{hi}, como se ha descrito (19). Como fuente de células muertas asociadas al antígeno de OVA para la presentación cruzada, se utilizaron esplenocitos bm-1, un ratón C57BL/6 congénico que expresa una mutación en la molécula H2K^b que evita la unión de SIINFEKL, el péptido OVA de clase I inmunodominante para H2K^b. De esta manera, las células cargadas con OVA no podrán presentar directamente el péptido OVA que debe procesarse y presentarse de forma cruzada para generar una respuesta. Para cargar el OVA mediante adsorción, los inventores incubaron las dosis indicadas de OVA soluble (Calbiochem) con bajos niveles de endotoxina junto con esplenocitos bm-1 en PBS durante 20 min antes de lavar cinco veces en PBS. Como alternativa, los inventores generaron fibroblastos embrionarios bm-1 de ratón (MEF) y los immortalizaron con el antígeno grande T SV-40. Después, se sometió a transducción con una proteína de fusión OVA-GFP truncada no secretada y se clasificaron por la expresión homogénea de OVA-GFP. Ambos, los esplenocitos cargados con OVA y los MEF que expresan OVA se irradiaron a continuación con UV (240 mJ/cm²) y se cultivaron durante la noche en medio completo. Al día siguiente, los esplenocitos se cultivaron simultáneamente en una relación 5:1 con Flt3L BMDC (10⁵ células/pocillo, 96 pocillos, fondo en U) y las OVA-MEF se cultivaron con Flt3L BMDC en una relación 1.1. Se añadieron al ensayo células OT-I seleccionadas negativamente (pureza > 80 %) utilizando perlas MACS (Miltenyi) y marcadas con CFSE (2 µM) (10⁵ células/pocillo). Tres días después, se cosecharon los sobrenadantes para detectar IL-2 e IFN-γ mediante ELISA de tipo sándwich y se estimularon las células con PMA (10 ng/ml) y Ionomicina (500 ng/ml) durante 4 h, añadiendo Brefeldina A (10 µg/ml, Sigma) durante las últimas 3 h de cultivo. A continuación las células se tiñeron para vβ5, CD8 e IFN-γ mediante tinción intracelular y se adquirieron mediante citometría de flujo para determinar los recuentos absolutos, cargando las muestras con un número fijo de perlas de calibración (BD) y producción de IFN-γ mediante tinción intracelular.

Captación de células muertas

Flt3L BMDC WT o CLEC9a^{-/-} de tipo CD8α se incubaron durante 2 h con diferentes relaciones de esplenocitos que se habían tratado 24 h antes con UVC (240 mJ/cm²) y se marcaron con PKH26 (Sigma). Como las Flt3L BMDC estaban marcadas para CD24, el resultado de positivo doble para PKH26 y CD24 podría ser debido a la unión (4 °C) o unión + captación (37 °C) de células moribundas y se cuantificaron las frecuencias mediante citometría de flujo

para cada tipo de DC.

Presentación cruzada in vivo

Se trataron MEF bm-1 immortalizadas que expresaban OVA generadas como se ha indicado anteriormente con UVC (240 mJ/cm²) y se cultivaron durante la noche antes de inyectarse por vía intravenosa. (0,75x10⁶ células/ratón). Se pretrataron ratones (C57BL/6) con una inyección intraperitoneal de PBS o 400 µg de isotipo control (AFRO-MAC 49, IgG1 de rata) o 1F6 anti-CLEC9A 30 min antes de la inyección intravenosa. Como alternativa, Se utilizaron crías de camada Clec9a^{-/-} o Clec9a⁺. Seis días después, se rastreó la inducción de la respuesta efectora de linfocitos T CD8⁺ que surge del repertorio endógeno por el número por el número de células positivas para los tetrámeros peptídicos de H2K^b-OVA y la producción de IFN γ en respuesta a SIINFEKL ex vivo en el subconjunto CD8. En las Figuras 19c y 19d, se combinaron los datos de diversas camadas obtenidos en experimentos independientes, los inventores llevaron a cabo una normalización de los datos antes de la combinación. Cada camada (hembras) se consideró un experimento independiente y se normalizaron los datos brutos de cada camada al promedio de ratones Clec9a⁺ en dicha camada y se multiplicaron por la media aritmética obtenida para la población total de ratones Clec9a⁺ de todas las camadas en experimentos independientes. Para el análisis de las veces de cambio en las camadas, se calculó la media aritmética para ratones Clec9a⁺ o ratones Clec9a^{-/-} de cada camada. 12 camadas de 12 analizadas mostraron una reducción del número de veces en la media aritmética del % de células positivas para el tetrámero en subconjuntos de linfocitos T CD8 de ratones Clec9a⁺ en comparación con Clec9a⁺.

Estadística

Se llevó a cabo el análisis estadístico con un test de la t de Student bilateral para las diferencias entre grupos o un test de la U de Mann-Whitney cuando no se podía inferir la normalidad de los datos. p<0,05 se consideró estadísticamente significativo. Los datos cuantitativos se expresan como promedio $\pm$ SEM a no ser que se indique otra cosa.

Referencias:

1. Reis y Sousa, C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 16, 21-5 (2004).
2. Engering, A. et al. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* 168, 2118-26 (2002).
3. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. y Lanzavecchia, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182, 389-400 (1995).
4. Mahnke, K. et al. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 151, 673-84 (2000).
5. Ariizumi, K. et al. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem* 275, 20157-67 (2000).
6. Ariizumi, K. et al. Cloning of a second dendritic cell-associated C-type lectin (dectin-2) and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem* 275, 11957-63 (2000).
7. Bates, E.E. et al. APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Immunol* 163, 1973-83 (1999).
8. Dzionek, A. et al. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon α induction. *J Exp Med* 194, 1823-34 (2001).
9. Brown, G.D. y Gordon, S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 413, 36-7 (2001).
10. Ardavin, C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 3, 582-90 (2003).
11. Huang, Q. et al. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* 294, 870-5 (2001).
12. Reis y Sousa, C. et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 186, 1819-29 (1997).

13. Schulz, O. et al. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* 13, 453-62 (2000).
14. Edwards, A.D. et al. Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. *J Immunol* 169, 3652-60 (2002).
15. Maldonado-Lopez, R. et al. CD8alpha+ and CD8alpha-subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* 189, 587-92 (1999).
16. Maldonado-Lopez, R., Maliszewski, C., Urbain, J. y Moser, M. Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. *J Immunol* 167, 4345-50 (2001).
17. Boonstra, A. et al. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med* 197, 101-9 (2003).
18. Bonifaz, L.C. et al. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* 199, 815-24 (2004).
19. Naik, S.H. et al. Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8- dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J Immunol* 174, 6592-7 (2005).
20. Turner, M. et al. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 378, 298-302 (1995).
21. Bijker, M.S. et al. CD8+ priming by exact peptide epitopes in incomplete Freund's adjuvant induces a vanishing CTL response, whereas long peptides induce sustained CTL reactivity. *J. Immunol.* 179(8), 5033-5040 (2007).
22. MacDonald KP, et al. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100(13):4512-20 (2002).
23. Karttunen, J., S. Sanderson, y N. Shastri. 1992. Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:6020-6024.
24. Mesci, A., y J. Carlyle. 2007. A rapid and efficient method for the generation and screening of monoclonal antibodies specific for cell surface antigens. *J. Immunol. Methods* 323:78-87.
25. Overwijk, W.W., Tsung, A., Irvine, K.R., Parkhurst, M.R., Goletz, T.J., Tsung, K., Carroll, M.W., Liu, C., Moss, B., Rosenberg, S.A., et al. 1998. gp100/pmel 17 is a murine tumor rejection antigen: induction of "self"- reactive, tumoricidal T cells using high-affinity, altered peptide ligand. *J Exp Med* 188:277-286.
26. Dylla, R., Bowne, W.B., Weber, L.W., LeMaout, J., Szabo, P., Moroi, Y., Piskun, G., Lewis, J.J., Houghton, A.N., y Nikolic-Zugic, J. 1998. Heteroclitic immunization induces tumor immunity. *J Exp Med* 188:1553-1561.
27. Bloom, M.B., Perry-Lalley, D., Robbins, P.F., Li, Y., el-Gamil, M., Rosenberg, S.A., y Yang, J.C. 1997. Identification of tyrosinase-related protein 2 as a tumor rejection antigen for the B16 melanoma. *J Exp Med* 185:453-459.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un antígeno peptídico, en la que el antígeno está acoplado covalentemente a un anticuerpo que tiene afinidad por CLEC9a o a uno de sus fragmentos funcionales que tiene afinidad por CLEC9a, y en donde dicha composición comprende además opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que el antígeno y el anticuerpo o el fragmento funcional del mismo forman parte de la misma cadena peptídica.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el anticuerpo o el fragmento funcional del mismo es un agonista de CLEC9a.
4. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que el antígeno comprende un péptido de una proteína expresada por un patógeno o un parásito, tal como una proteína vírica, o una proteína de una célula cancerosa, tal como un antígeno específico de tumor.
5. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 formulada para administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, nasal, subcutánea o intradérmica.
6. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para utilizar en un método de tratamiento médico, por ejemplo, para su uso en la estimulación de una respuesta inmunitaria contra el antígeno o para su uso en la inducción de tolerancia hacia el antígeno.
7. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 6 en la que la respuesta inmunitaria que hay que estimular es una respuesta de LTC, una respuesta de tipo Th1, una respuesta de tipo Th2, una respuesta de tipo Th17 o una respuesta Treg.
8. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde la composición se administra, o se formula para su administración con un adyuvante, por ejemplo, ácido retinoico, un agonista de CD40 o un agonista de TLR, IL-1 o TNF-alfa.
9. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 7 en donde la respuesta es una respuesta Treg y en donde el antígeno es uno para el que es deseable inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria indeseable.
10. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la preparación de un medicamento para estimular una respuesta inmunitaria contra el antígeno o para su uso en la inducción de tolerancia hacia el antígeno.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10 en la que la respuesta inmunitaria que hay que estimular es una respuesta de LTC, una respuesta de tipo Th1, una respuesta de tipo Th2, una respuesta de tipo Th17 o una respuesta Treg.
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que la composición se administra, o se formula para su administración con un adyuvante, por ejemplo, ácido retinoico, un agonista de CD40 o un agonista de TLR, IL-1 o TNF-alfa.
13. Uso de acuerdo con la reivindicación 11 en donde la respuesta es una respuesta Treg y en donde el antígeno es uno para el que es deseable inhibir o suprimir una respuesta inmunitaria indeseable.
14. Un método para dirigir un antígeno peptídico contra una célula presentadoras de antígeno, que comprende poner en contacto *in vitro* la célula presentadora de antígenos con una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y en donde la célula presentadora de antígenos expresa CLEC9a.
15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14 en el que la célula presentadora de antígenos es una célula dendrítica, opcionalmente en el que la célula dendrítica es capaz de una presentación cruzada de un antígeno extracelular mediante moléculas MHC de tipo I.
16. Un ácido nucleico que puede hibridarse con el ARNm o el ADN que codifica CLEC9a y que es un ARN o un ADN antisentido, un ARNi o una ribozima, o un anticuerpo que tiene afinidad por CLEC9a o uno de sus fragmentos funcionales que tiene afinidad por CLEC9a y que comprende una molécula de toxina capaz de destruir una célula o una enzima capaz de convertir una molécula no tóxica en una molécula tóxica, para utilizar en un método de tratamiento médico, por ejemplo, para su uso en la inhibición de una respuesta inmunitaria.
17. Un ácido nucleico, o un anticuerpo o un fragmento funcional, para el uso de acuerdo con la reivindicación 16 en donde la respuesta inmunitaria que hay que inhibir es una dolencia inflamatoria o autoinmune.

18. Un ácido nucleico, o un anticuerpo o un fragmento funcional, para uso de acuerdo con la reivindicación 17 en donde la dolencia es:

- 5 - artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, escleroderma, síndrome de Sjögren, diabetes autoinmune (particularmente de Tipo I), tiroiditis o psoriasis;
- esclerosis múltiple o miastenia grave;
- enfermedad de Crohn, colitis, enfermedad celíaca o hepatitis;
- aterosclerosis, cardiomiopatía, fiebre reumática, endocarditis o vasculitis;
- 10 - enfisema, infecciones de las vías aéreas respiratorias;
- procesos alérgicos, reacción de hipersensibilidad (tipo I, II, III o IV), asma o rinitis;
- rechazo al trasplante o al injerto o enfermedad de injerto frente a hospedador; o
- síndrome de choque séptico.

15 19. Uso de (i) un ácido nucleico que puede hibridarse con el ARNm o el ADN que codifica CLEC9a y que es un ARN o un ADN antisentido, un ARNip o una ribozima, o (ii) un anticuerpo que tiene afinidad por CLEC9a o uno de sus fragmentos funcionales que tiene afinidad por CLEC9a que comprende una molécula de toxina capaz de destruir una célula o una enzima capaz de convertir una molécula no tóxica en una molécula tóxica, en la preparación de un medicamento para la inhibición de una respuesta inmunitaria.

20 20. Uso de acuerdo con la reivindicación 19 en donde la respuesta inmunitaria que hay que inhibir es una dolencia inflamatoria o autoinmune.

21. Uso de acuerdo con la reivindicación 20 en donde la dolencia es:

- 25 - artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, escleroderma, síndrome de Sjögren, diabetes autoinmune (particularmente de Tipo I), tiroiditis o psoriasis;
- esclerosis múltiple o miastenia grave;
- enfermedad de Crohn, colitis, enfermedad celíaca o hepatitis;
- aterosclerosis, cardiomiopatía, fiebre reumática, endocarditis o vasculitis;
- 30 - enfisema, infecciones de las vías aéreas respiratorias;
- procesos alérgicos, reacción de hipersensibilidad (tipo I, II, III o IV), asma o rinitis;
- rechazo al trasplante o al injerto o enfermedad de injerto frente a hospedador; o
- síndrome de choque séptico.

35 22. Un método para aislar una célula presentadora de antígenos procedente de una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo que tiene afinidad por CLEC9a o uno de sus fragmentos funcionales que tiene afinidad por CLEC9a y aislar una o más células a las cuales se une el agente de unión, en donde la célula presentadora de antígenos es opcionalmente una célula dendrítica, y además opcionalmente es capaz de una presentación cruzada del antígeno extracelular mediante moléculas MHC de tipo I.

40 23. Un método para estimular una respuesta inmunitaria contra un antígeno peptídico que comprende aislar una célula presentadora de antígenos o una de sus poblaciones mediante el método de acuerdo con la reivindicación 22, y poner en contacto *in vitro* dicha célula o dicha población de células con dicho antígeno y opcionalmente un adyuvante.

45 24. Un método de acuerdo con la reivindicación 23 que comprende, tras dicha etapa de puesta en contacto, poner en contacto *in vitro* dicha célula presentadora de antígenos con una población de células autólogas que comprende uno o más linfocitos T, y opcionalmente expandir los linfocitos T de la población.

Fig.1

Secuencia de ADNc de CLEC9A humano

ATGCAGGAGAGAAATATACACCTCTCTTCAGTGGGATAGCCAGCACCAGACACTTACCAGAAATGTCT
 GTCTTCCAACAATGTTCAAGAGCATGCTGTCTTGATGGTGATTTTCATGTGTTTTCTGCATGGGATTATTA
 ACAGCATCCATTTCTTGGCGTCAAGTTGTCAGGTGCCACCATTCGATGCAGCAGCAAGAAAACT
 CATCCAACAAGAGAGGGCACTGCTAACTTTACAGAATGGAAGAGAAAGCTGTGCCCTTCAGATGAAATATT
 GCCAAGCCTTCATGCAAACTCATTAAGTTCAGCCCATAAACAGCAGTCCTTGTCCAACAATTGGATTCAGA
 ACAGAGAAAGTTGTTACTATGTCTCTGAAATTTGGAGCATTTGGCACACCAGTCAAGAGAAATTGTTAAAGG
 AAGGTTCCACGCTGCTACAAATAGAGAGCAAGAGAAATGGATTTTATCACTGGCAGCTTGAGGAAGATTA
 AAGGAAGCTATGATTACTGGGTGGGTGTCTCAGGATGGACACAGCGGACGCTGGCTTTGGCAAGATGG
 CTCCTCTCCTCTCCTGGCCTGTTGCCAGCAGAGAGATCCCAGTCAGTAACCAAGTCTGTGGATACGTGA
 AAAGCAATCCCTTCTTTCGTCTAACTGCAGCACGTCGGAAGTATTTTATCTGTGAGAAAGTATGCCGTTGAGAT
 CCTCTGTCTGA

Secuencia de la proteína CLEC9A humana Cola citoplasmática/transmembranal/cuello/CTL

MHEEEIYSLQWDSPADTYQKCLSSNKCAGACCLVMVISCVFCMGLLTASIFLGVKLLQVSTIAMQQEKLIQKERALLN
 FTEWKRSCALQMKYCQAFMQNSLSAHNSPCPNWQNRRESCYYVSEIWSIWHTSQENCLKEGSTLLQIESKEEMDFIT
 GSLRKIKGSYDYWVGLSQDGHSGRWLWQDGSPPGLLPAERSQSANQVCGYYVKSNSLLSSNCSTWKFICEKYALRS
 SV

Fig. 2.

Secuencia de ADNc de CLEC9A de ratón

ATGCATGCGAAGAAATATATACCTCTCTTCAGTGGGACATTCCTACCTCAGAGGCCTCTCAGAAAGTGCCAATC
 CCTAGCAAAATGTTCAGGAGCATGGTGTGTGTGACGATGATTCCTGTGTGTCTGTATGGGCTTGTAGCAA
 CGTCCATTTCTTGGGCATCAAGTTCTTCCAGGTATCCTCTCTGTCTTGGAGCAGCAGGAAAGACTCATCCAAC
 AGGACACAGCATTTGGTGAACCTTACACAGTGGCAGAGGAAATACACACTGGAATACTGCCAAGCCTTACTGCAG
 AGATCTCTCCATTTCAGGCACAGATGCTTCTACTGGACCAGTTCTTCTGACCTCTCCACAGATGGTTCCACAGAC
 CCTGGACAGCAAGGAACAGGTAGTGACTGCAGCCCTTGTCCACACAACTGGATTCAGAAATGGAAAAGTTGTT
 ACTATGCTTTGAACGCTGGGAAATGTGGAACATCAGTAAGAAGAGCTGTTTAAAGAGGGCGCTAGTCTCTT
 CAAATAGACAGCAAGAAAGAAATGGAGTTTCATCAGCAGTATAGGGAACCTCAAAGGAGGAAATAAATATTGGGT
 GGGAGTGTTCAGATGGAAATCAGTGGATCTTGGTCTGGGAAGATGGCTCTTCTCCTCTCTGACTTGTTC
 CTGCAGAAAGACAGCGATCAGCCGGCCAGATCTGTGGATACCTCAAAGATTCTACTCTCATCTCAGATAAGTGC
 GATAGCTGGAAATATTTTATCTGTGAGAAGAAGGCAGTTTGGATCCTGCATCTGA

Secuencia de la proteína CLEC9A de ratón Cola citoplasmática/transmembrana/cuello/CTLD

MHAEIYTSLQWDIPTSEASQKQSPSKCSGAWCVVVTMISCVVCMGLLATSI/FLG/KFFQVSSLVLEQQLIQDIALVN
 LTQWRKYTLEYCQALLQRSLSHSGTDASTGPVLLTSPQMVPQTLDKETGSDCSPCPHNWIQNGKSCYYVFERWEMWN
 ISKKSCLKEGASLFQIDSKKEEMEFISSIGKLKGGNKYWWGVFQDGISGSWFWDGSSPLSDLLPAERQRSAGQICGYLKD
 STLISDKCDSWKYFICEKKAFGSCI

Fig. 3

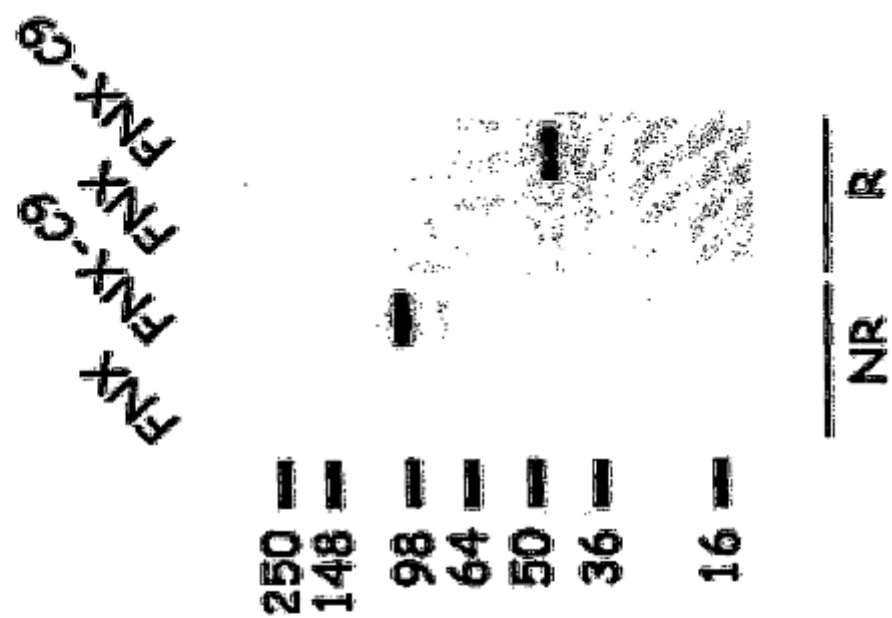


Fig. 4

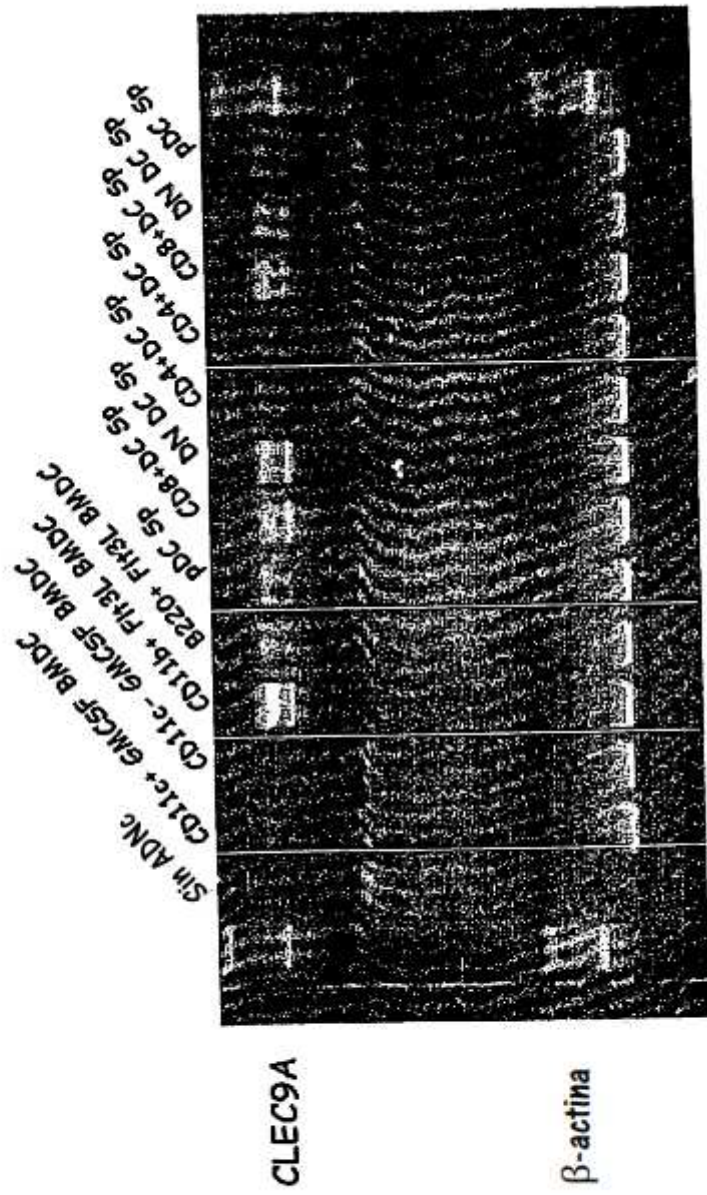
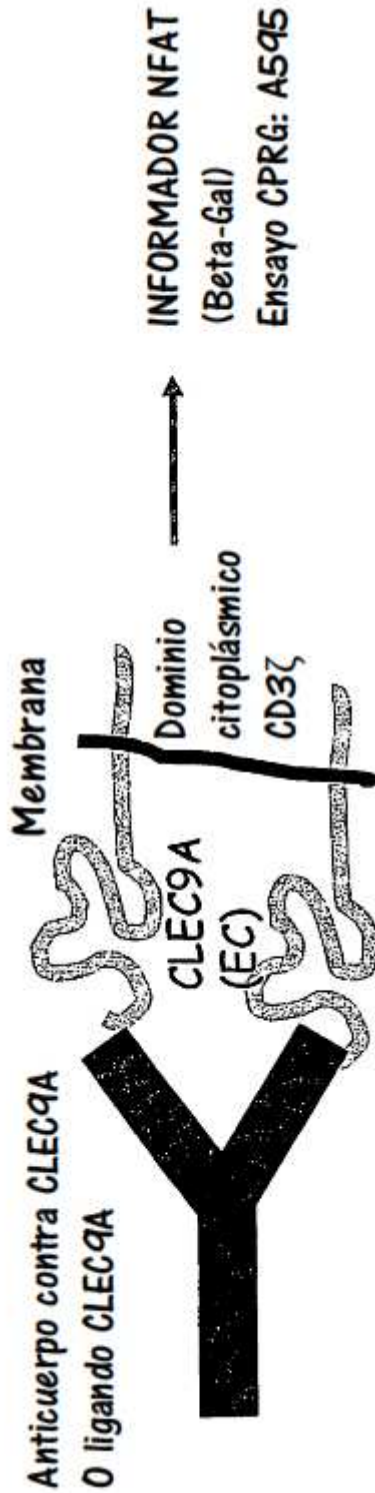


Fig. 5



(Secuencia de la quimera de ADNc: Citoplásmico CD3 ζ - transmembrana NKRP1B - CLEC9a extracelular

ATGAGAGCAAAATTCAGCAGGAGTGACAGAGACTGCTGCCAACCTGCAGGACCCCAACCAGCTCTACA
 ATGAGCTCAATCTAGGGCGAAGAGAGGAATATGACGTCTTGGAGAAAGAGCGGGCTCGGGATCCAGA
 GATGGAGGCCAACAGCAGAGGAGGAGAACCCAGGAGCGGTATACAAATGCATGCAGAAAGA
 CAAGATTGCAGAGCCTACAGTGAGATCGGCACAAAGGCGAGAGGCGGAGAGGCAAGGGGCACGA
 TGGCCTTACCAGGGTCTCAGCACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCCCTGCATATGCAGACCCTGG
 CCCCTCGCTCGGTGCCCTCGCTGGCATCGGTGGCTCTGAAATTTGGCTGTGCTGGCCTCATCCTTC
 TTGTGCTGGTGTGATTGGACTCTGTGCTTGGTGTATCAGTACAAATCATCATCGAGGGTAGTG
 ACTGCAGCCCTTGTCACACACACTGGATTGAGAAATGGAAAGTTGTACTATGCTTTGAACGCTGGG
 AAATGTGGAAACATCAGTAAGAAGAGCTGTTTAAAGAGGGCGCTAGTCTCTTCAATAGACAGCAAA
 GAAATAATGGATTCAICAGCAGTATAGGAAACTCAAGGAGGAAATAAATAATTGGGTGGGAGTGT
 TCAAGATGGAAATCAGTGGATCTTGGTTCIGGGAAGATGGCTCTTCTCTCTGACTTGTGCTGC
 AGAAGACAGCGATCAGCCGGCCAGATCTGTGGATACCTCAAGATTCTACTCTCATCTCAGATAAGI
 GCGATAGCTGGAAATATTTTATCTGTGAGAAAGGCAATTGGATCCTGCACTGA

Fig. 6

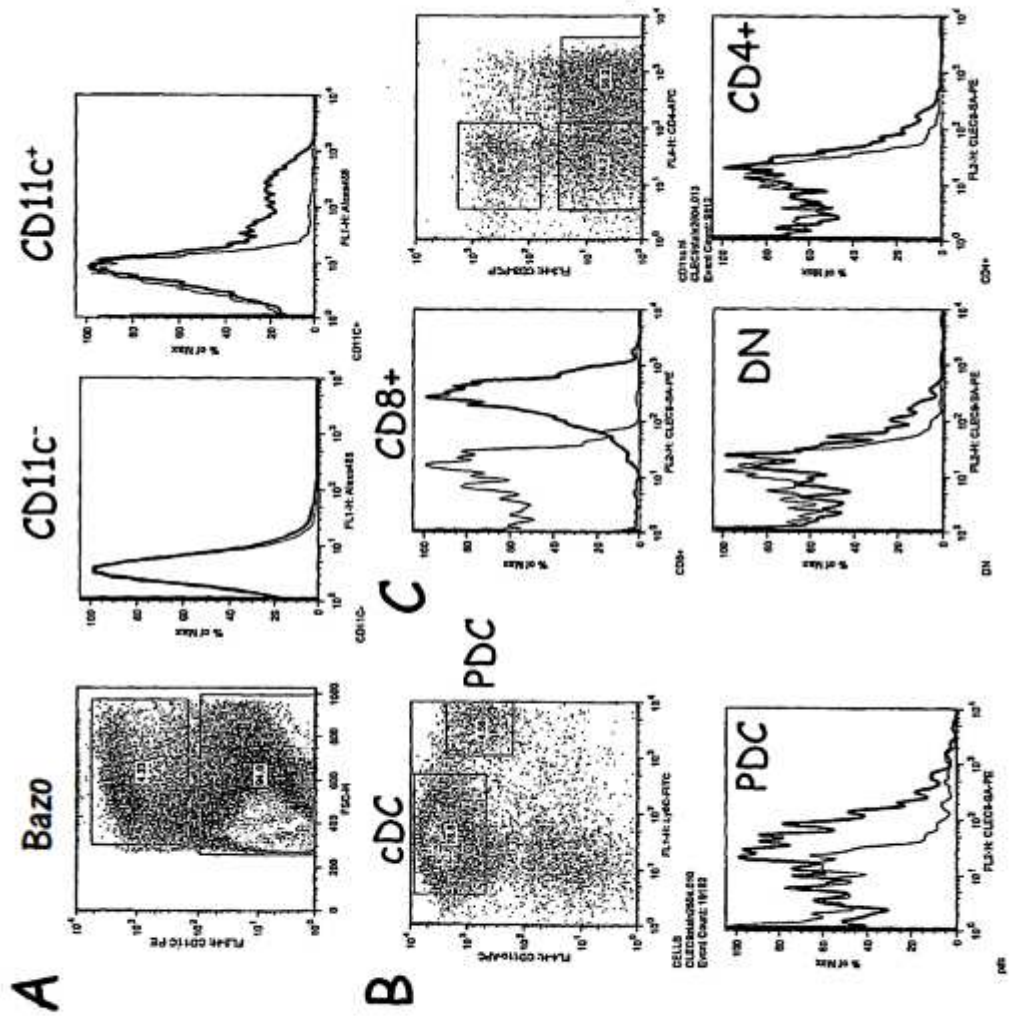


Fig. 7

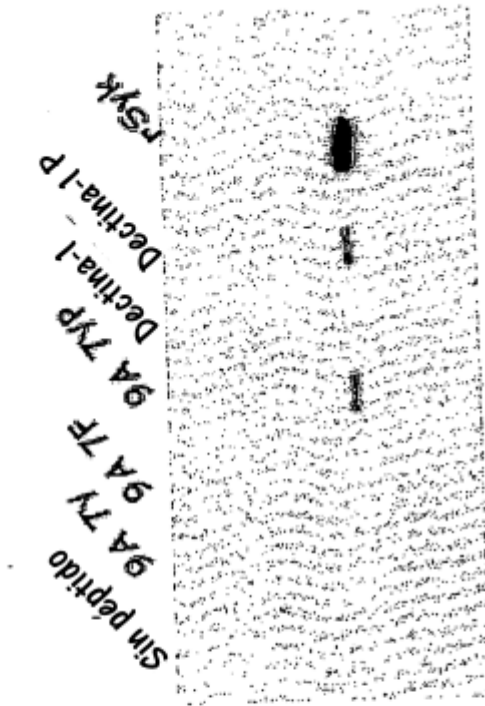


Fig. 8

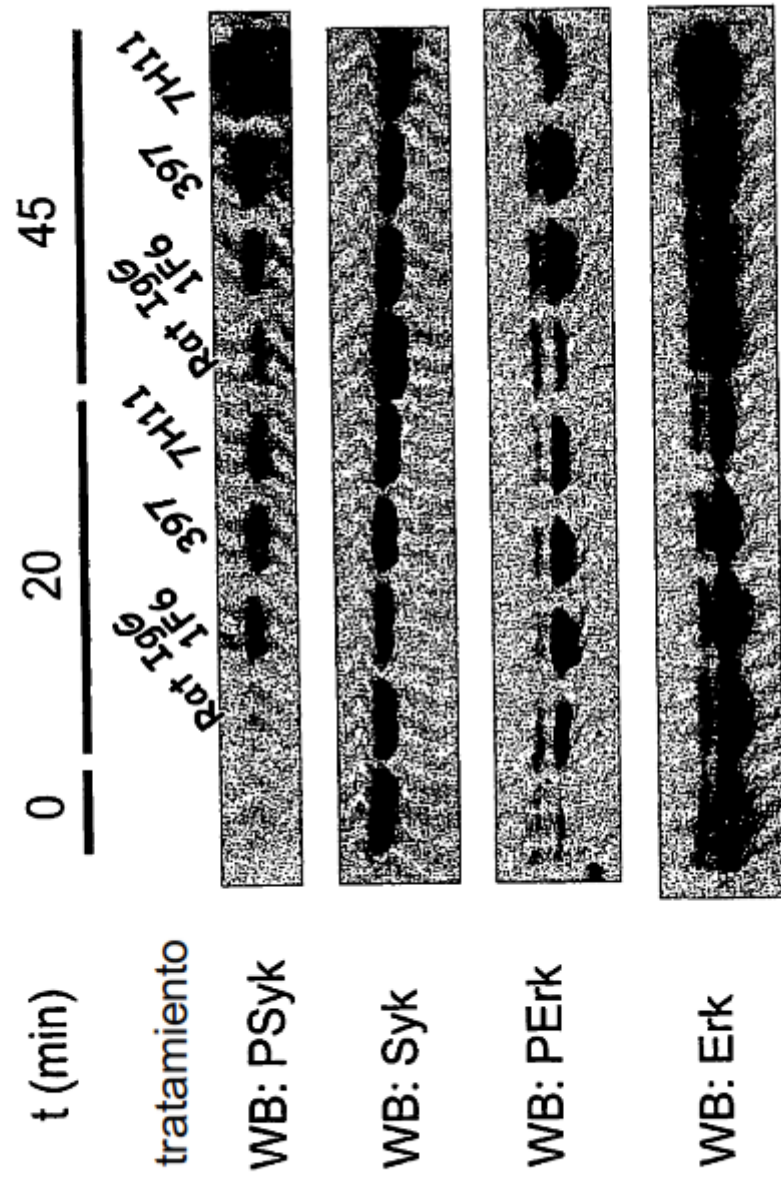


Fig. 9

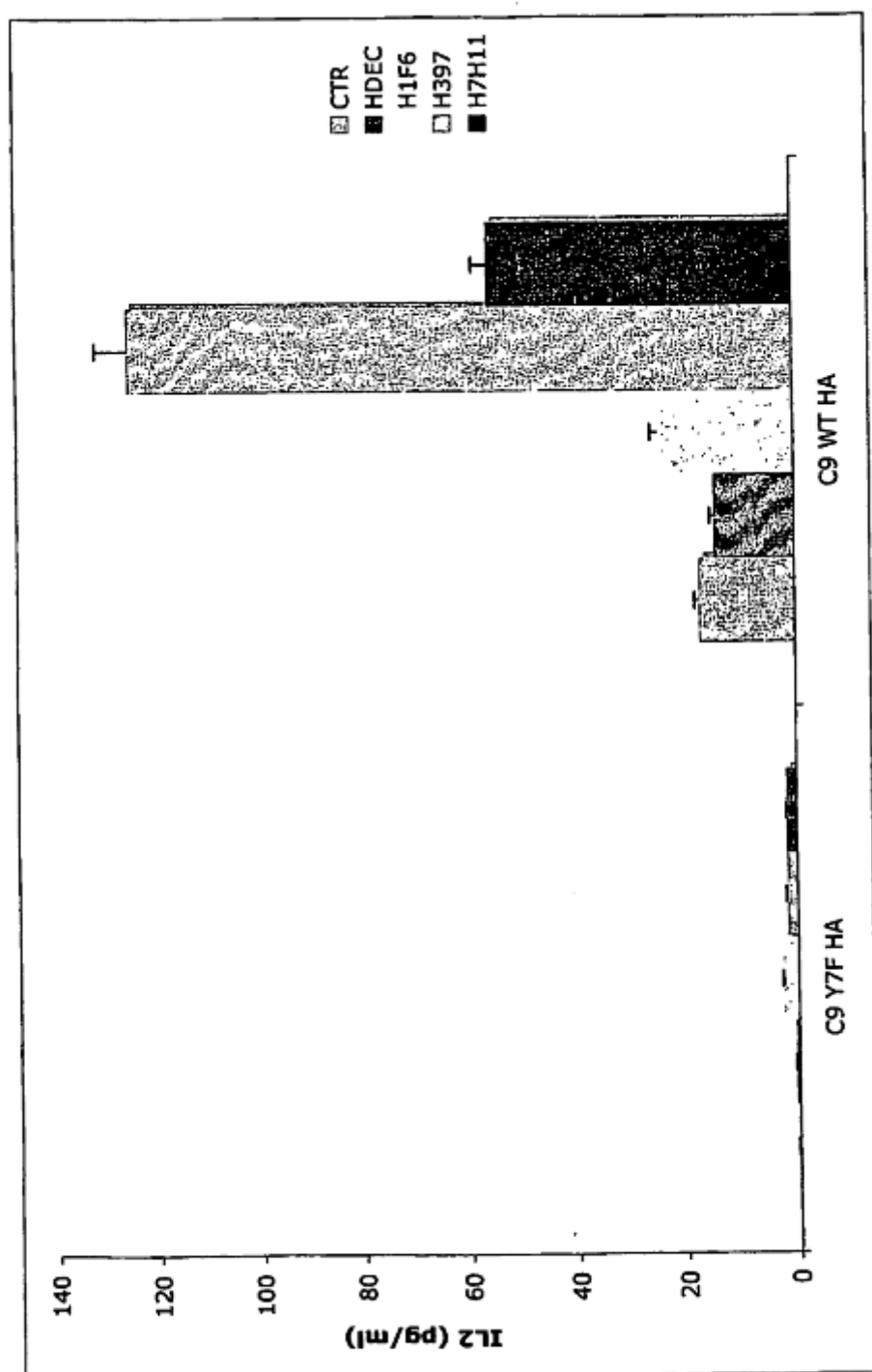


Fig. 10

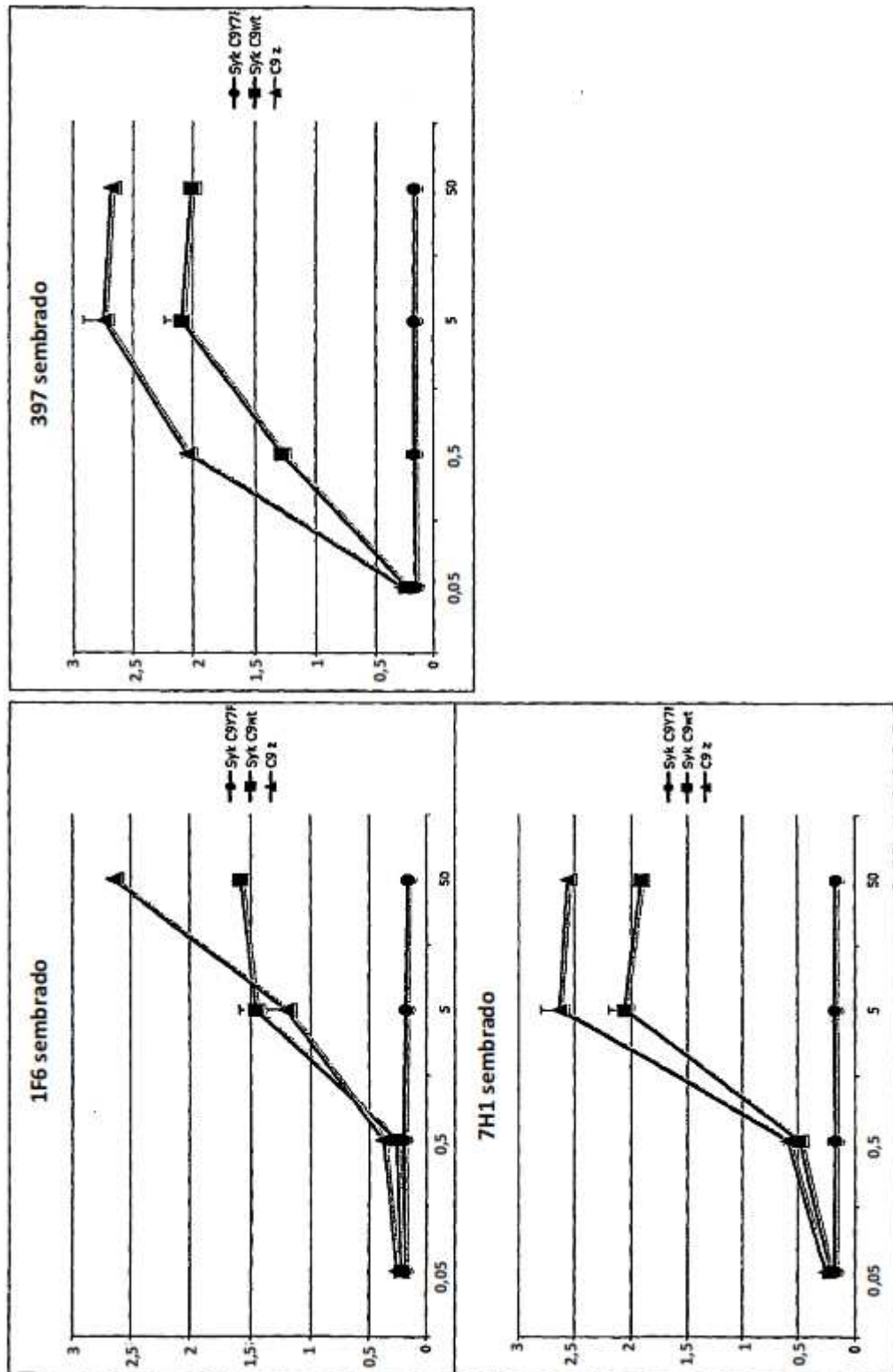


Fig. 11

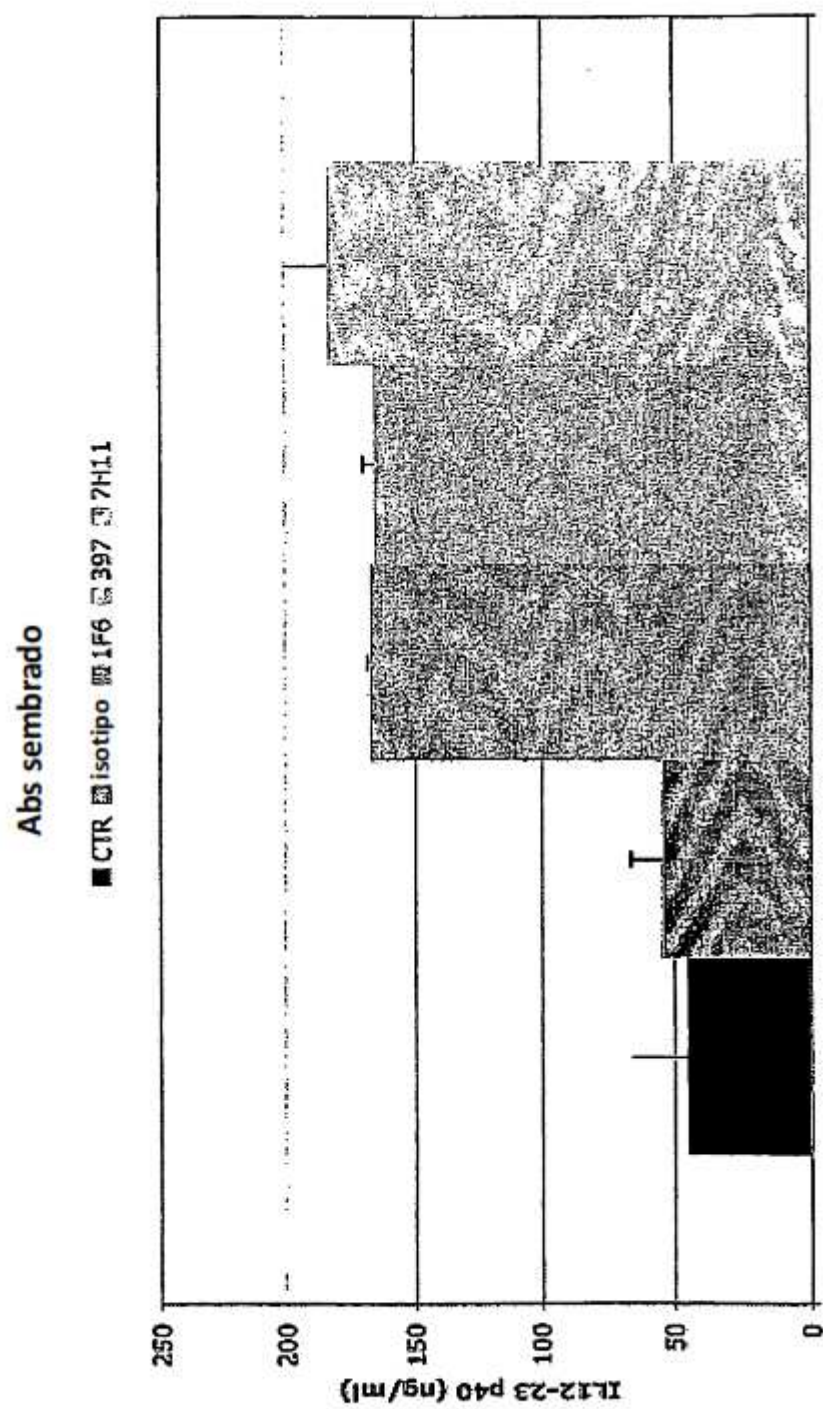


Fig. 12A-B.

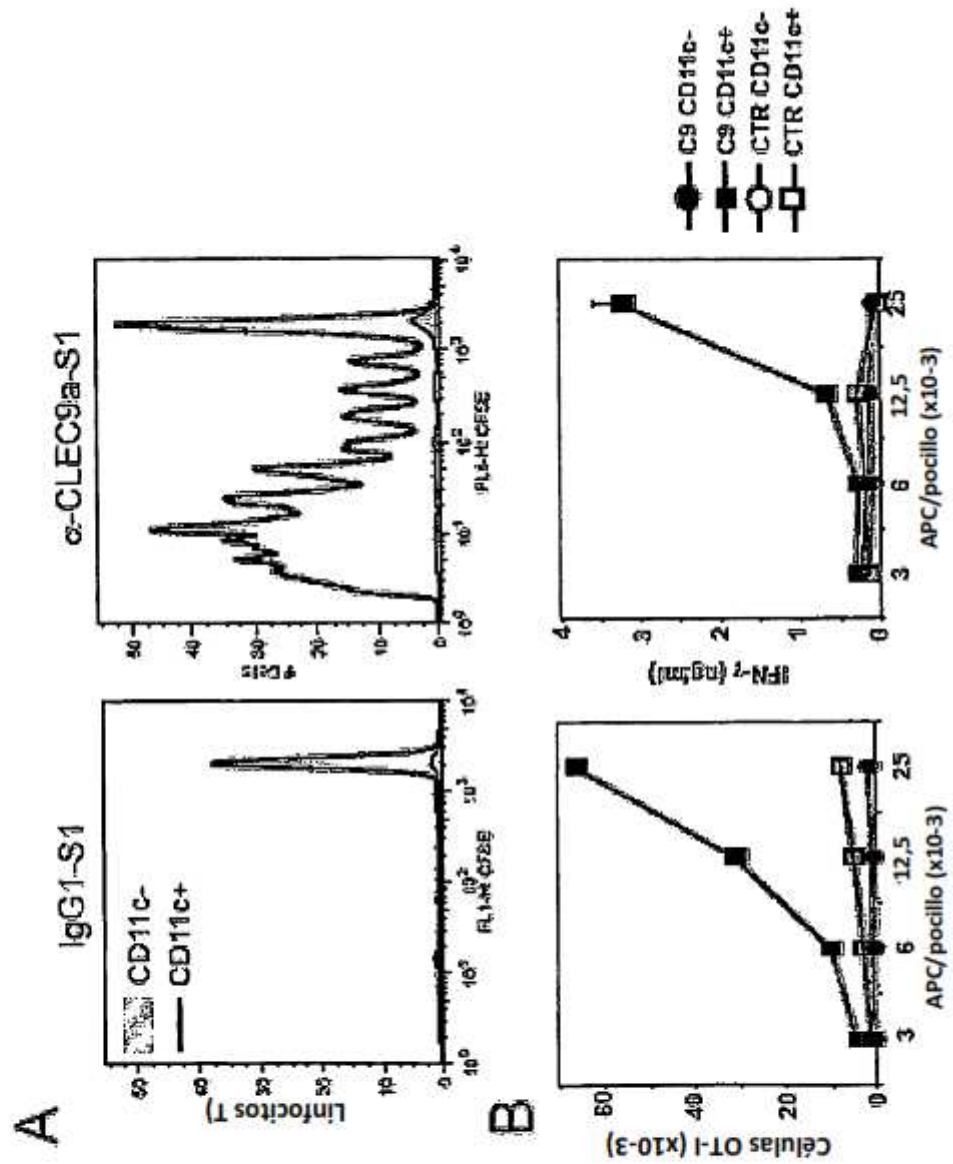


Fig. 12C-D.

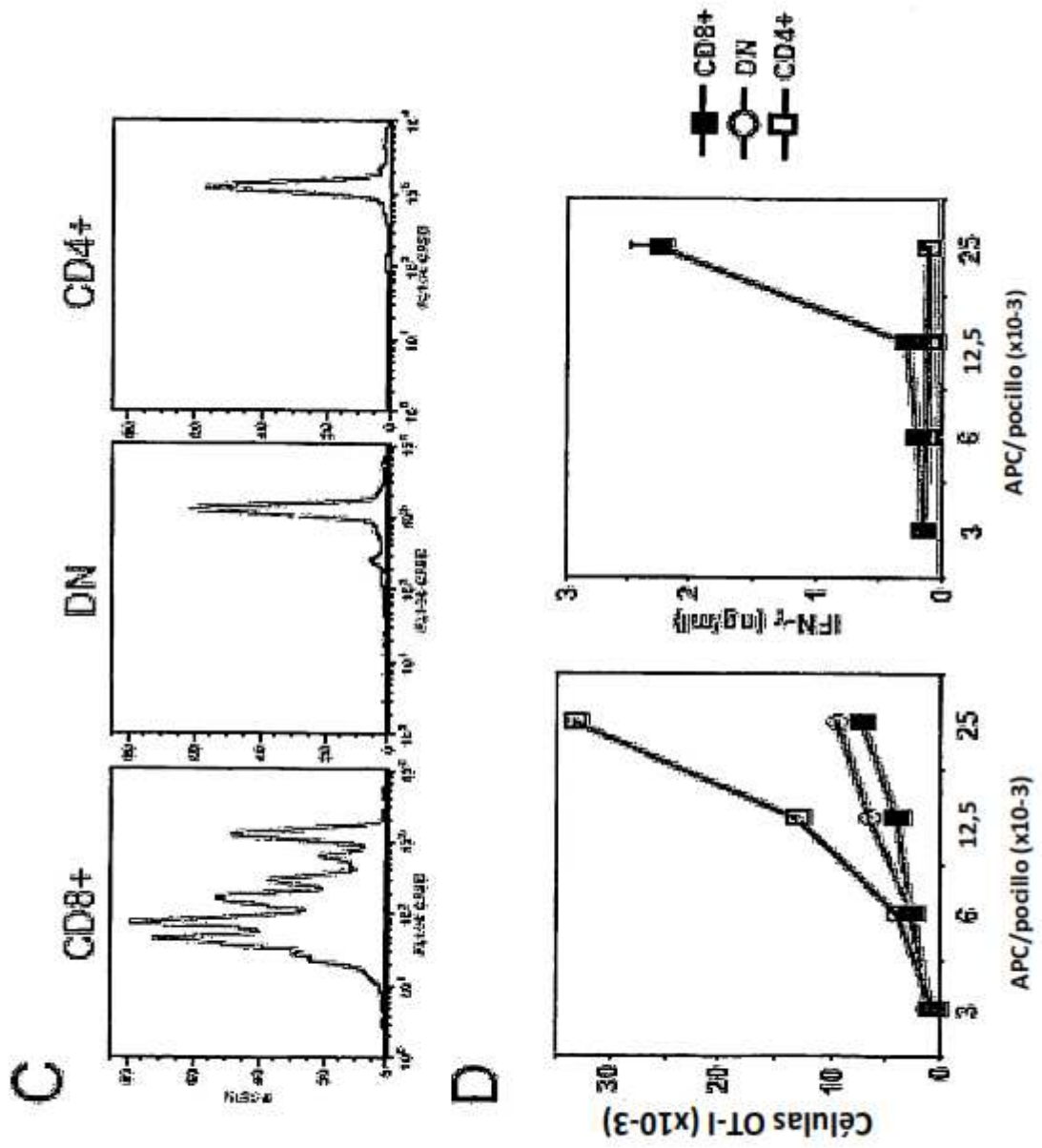


Fig. 13A.

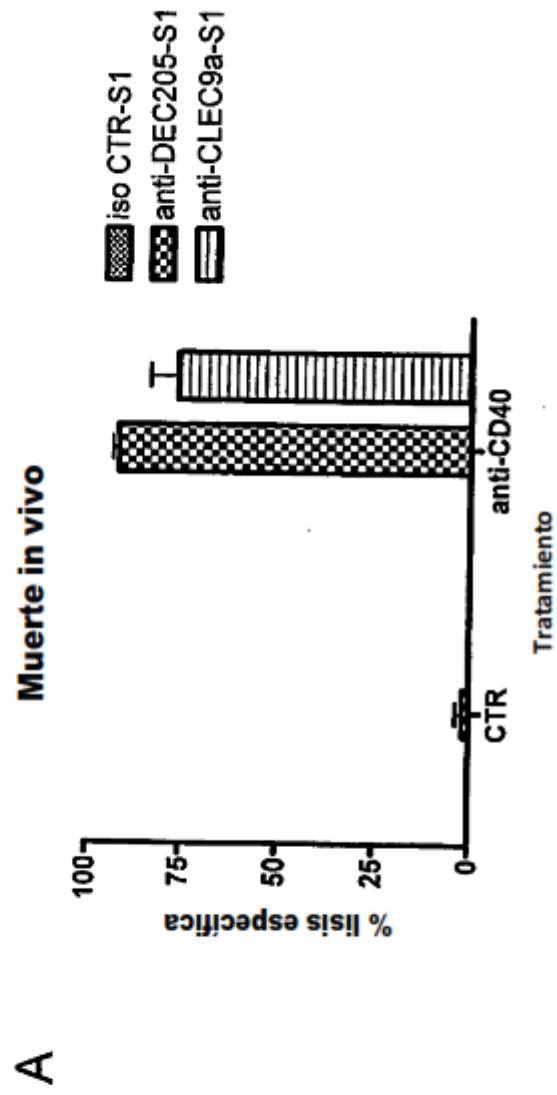
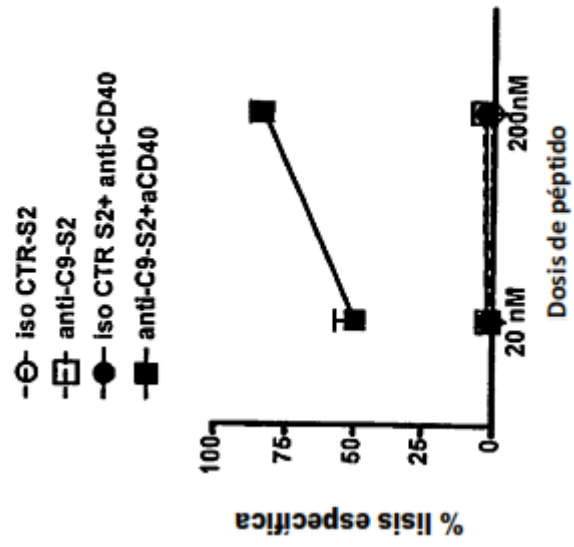
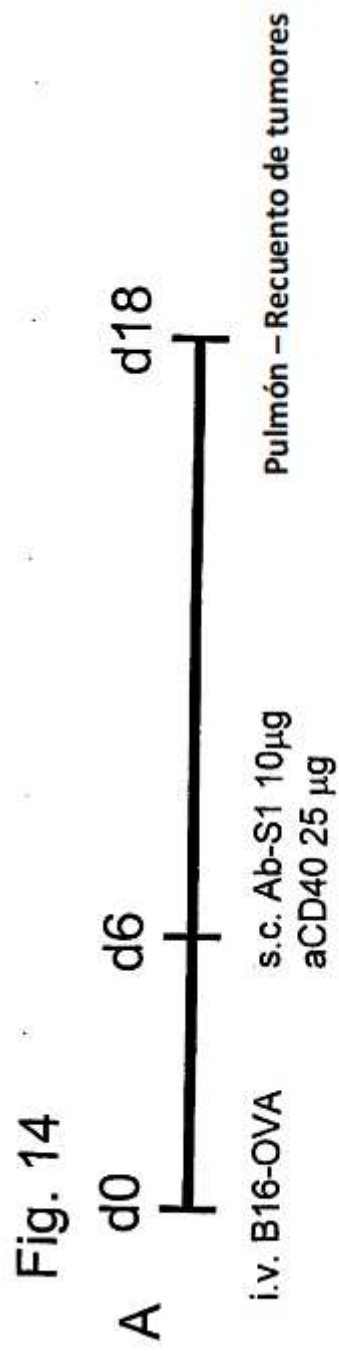


Fig. 13B.

B





B

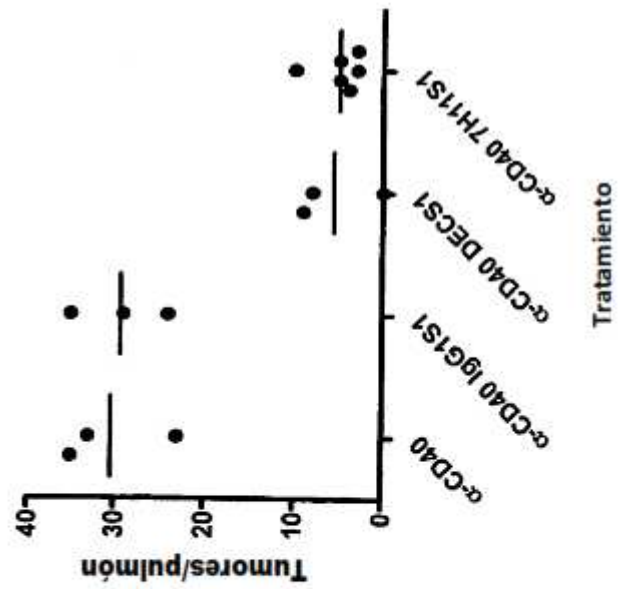


Fig. 15

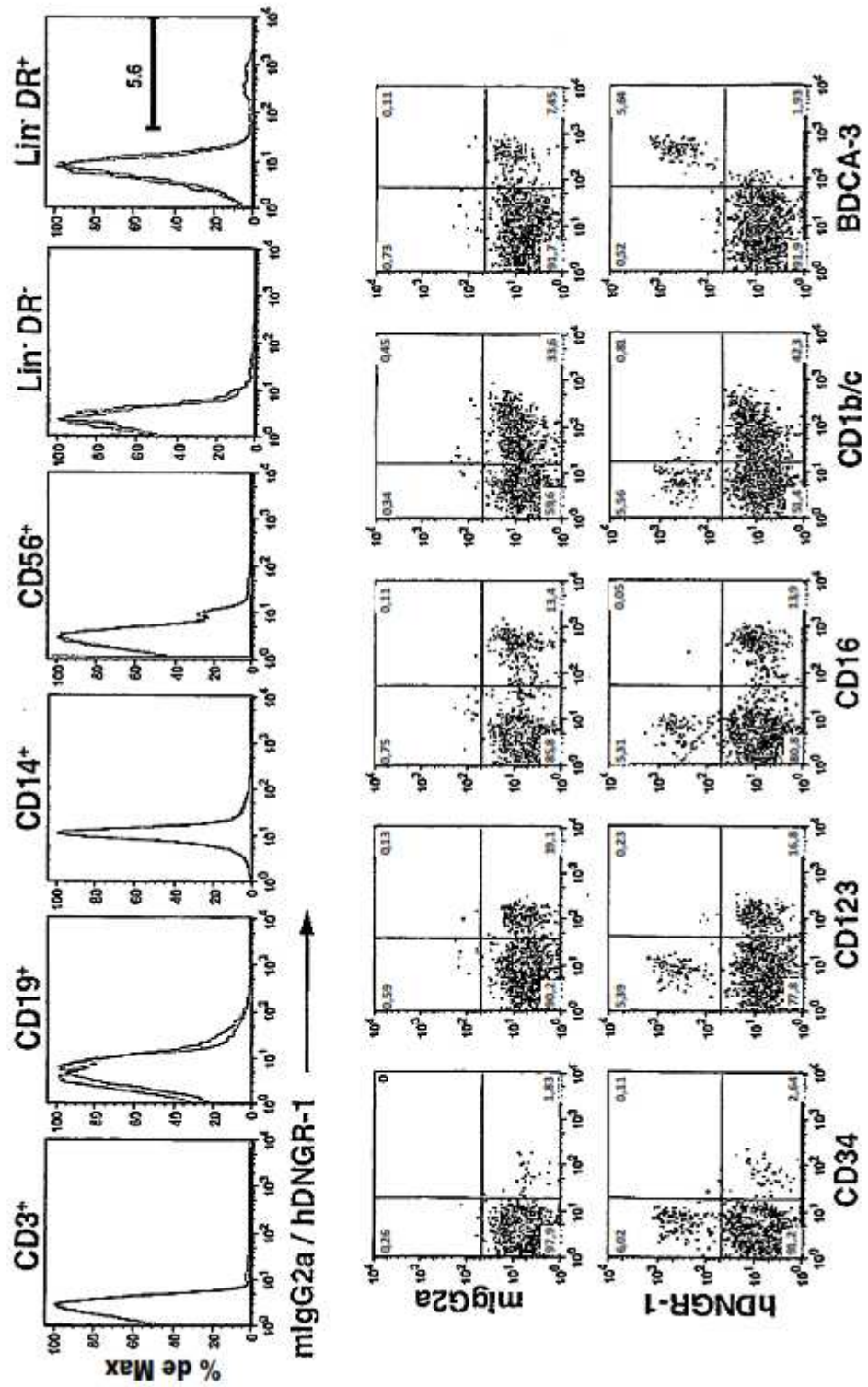
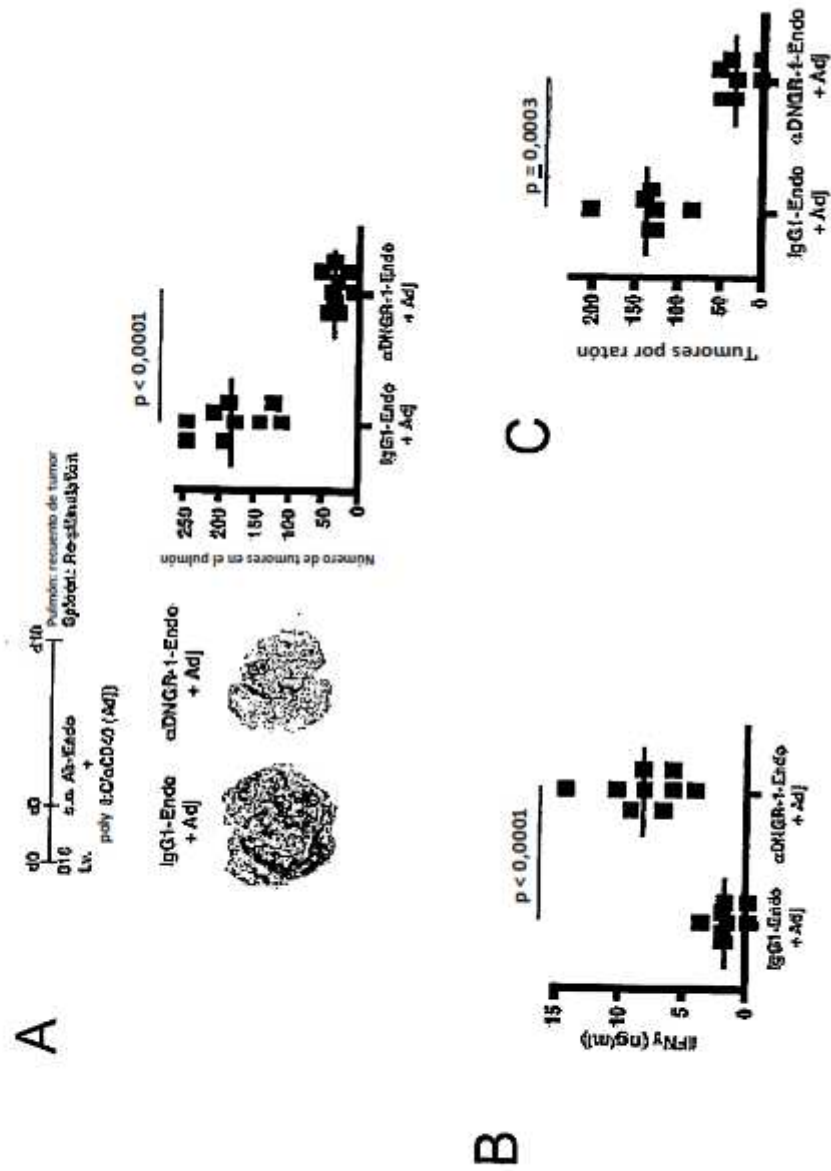
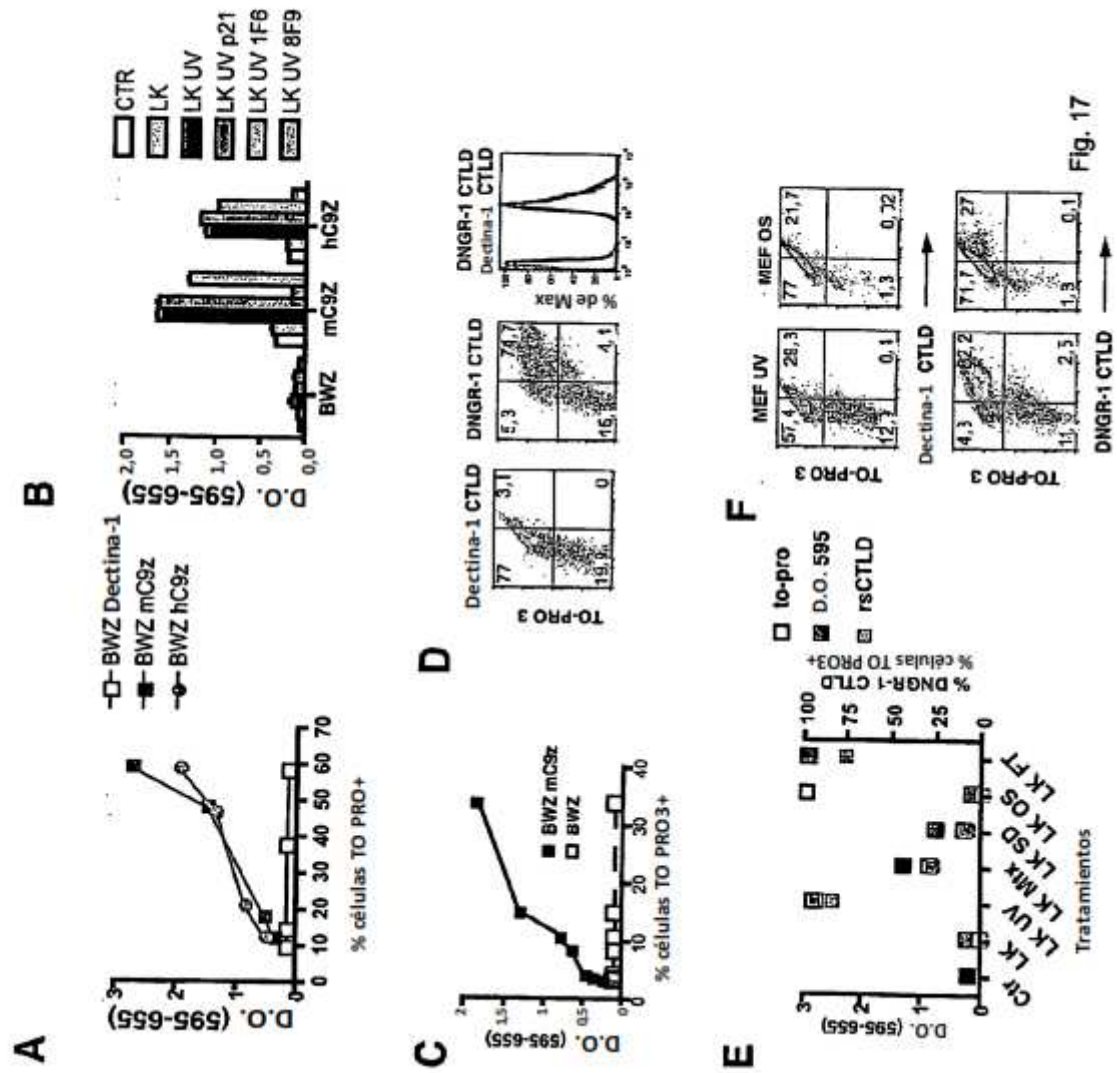


Fig. 16





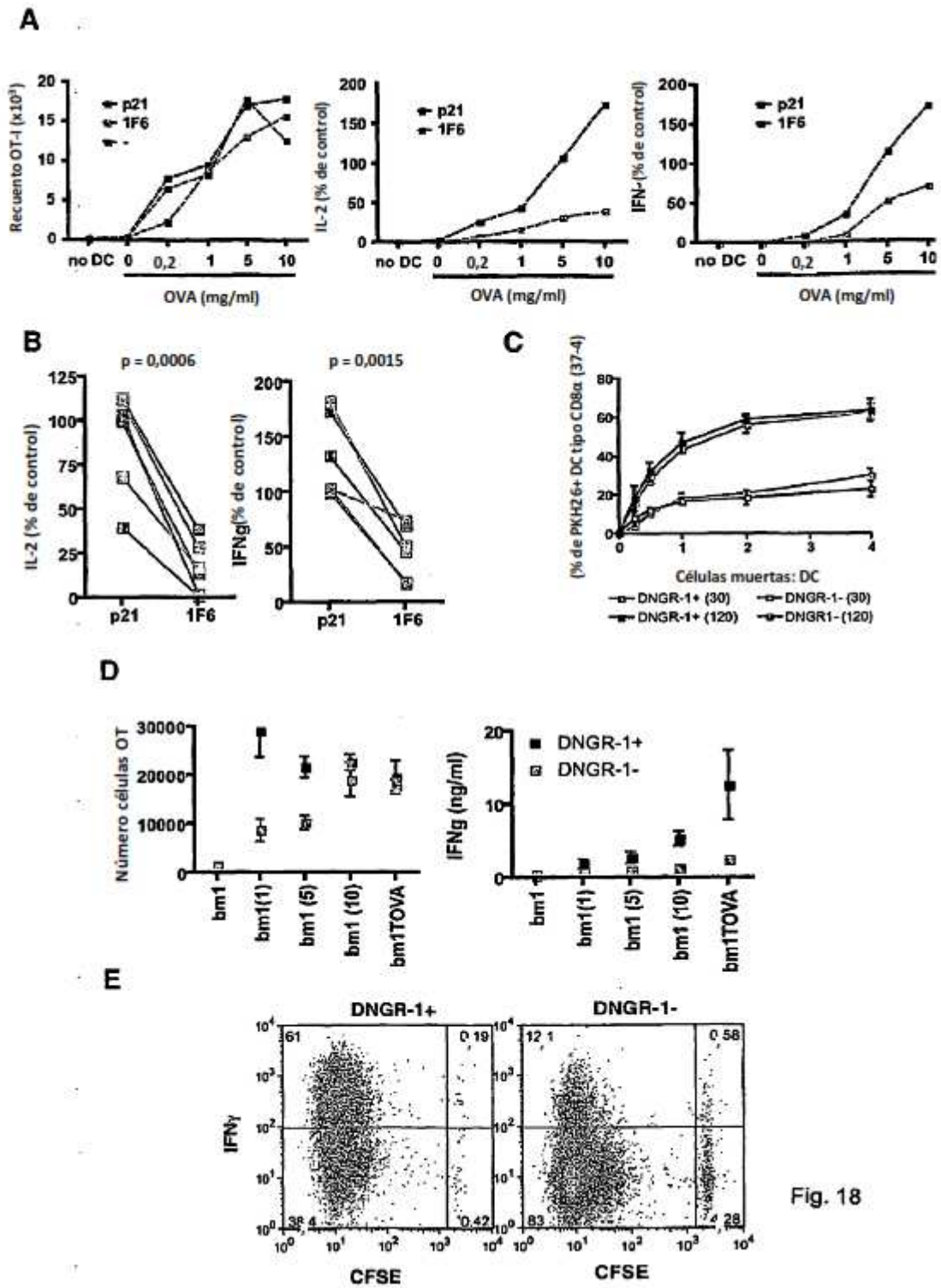


Fig. 18

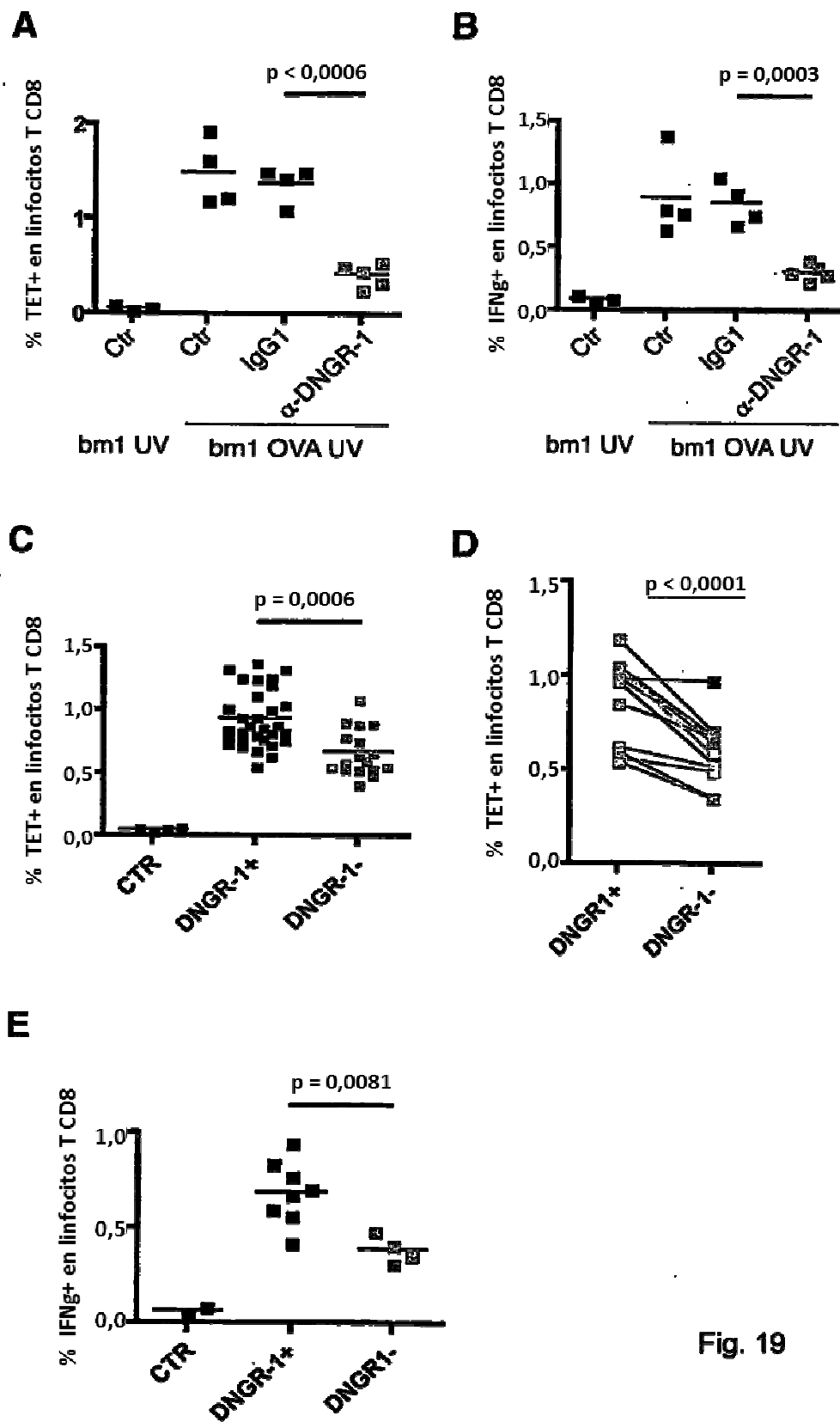
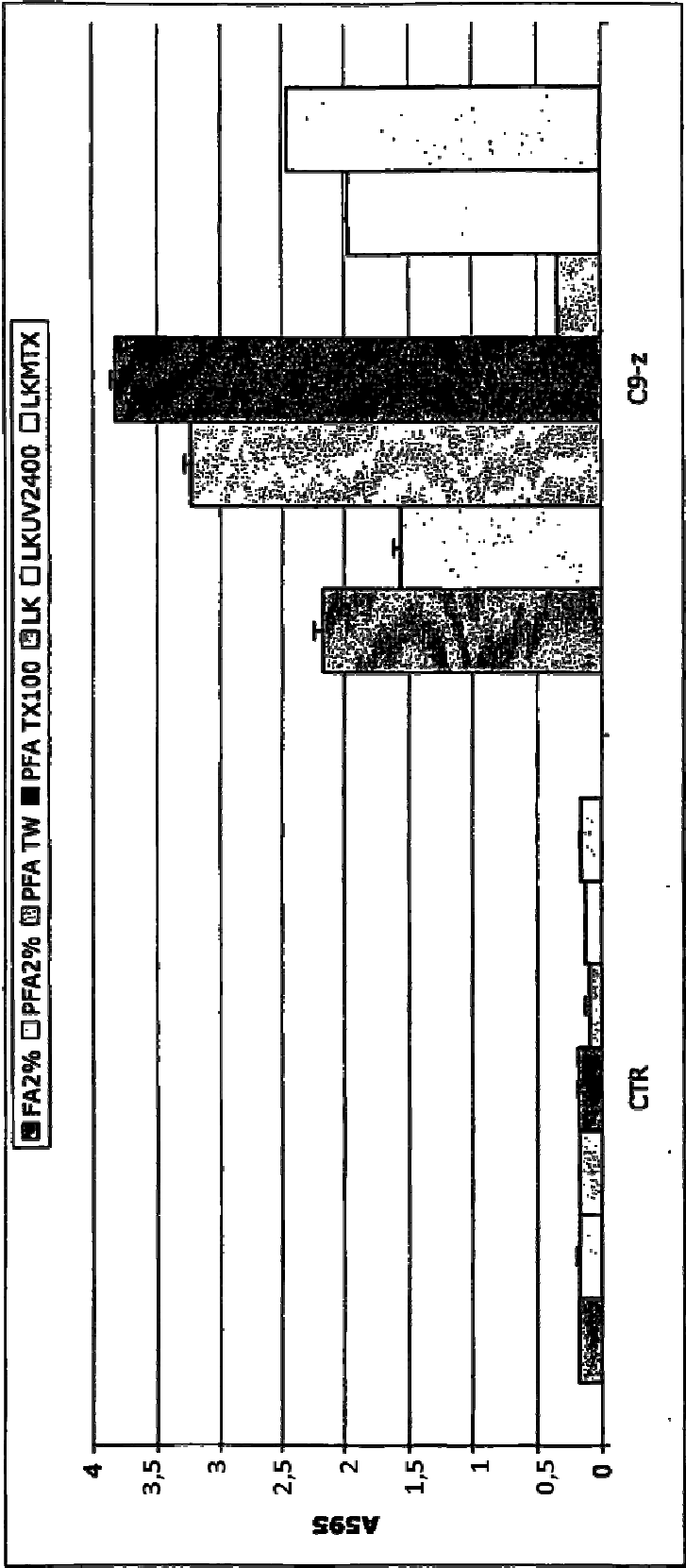


Fig. 19



Tratamiento	FA2%	PFA 2%	PFA Tween	PFA Tx100	LK	LK UV 2400	LK MTX
% células PI+	15,7	30,2	100	100	2,8	33,3	32,7

Fig. 20

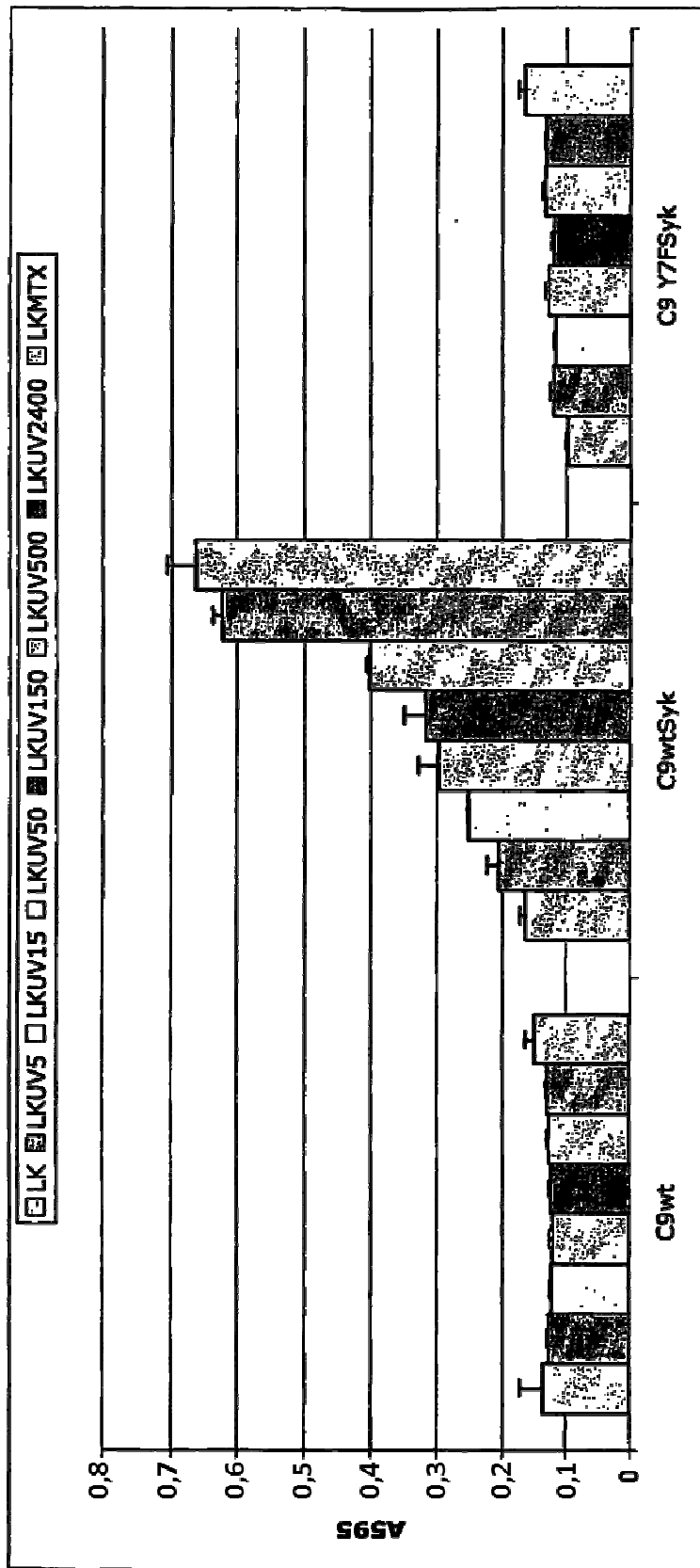


Fig. 21

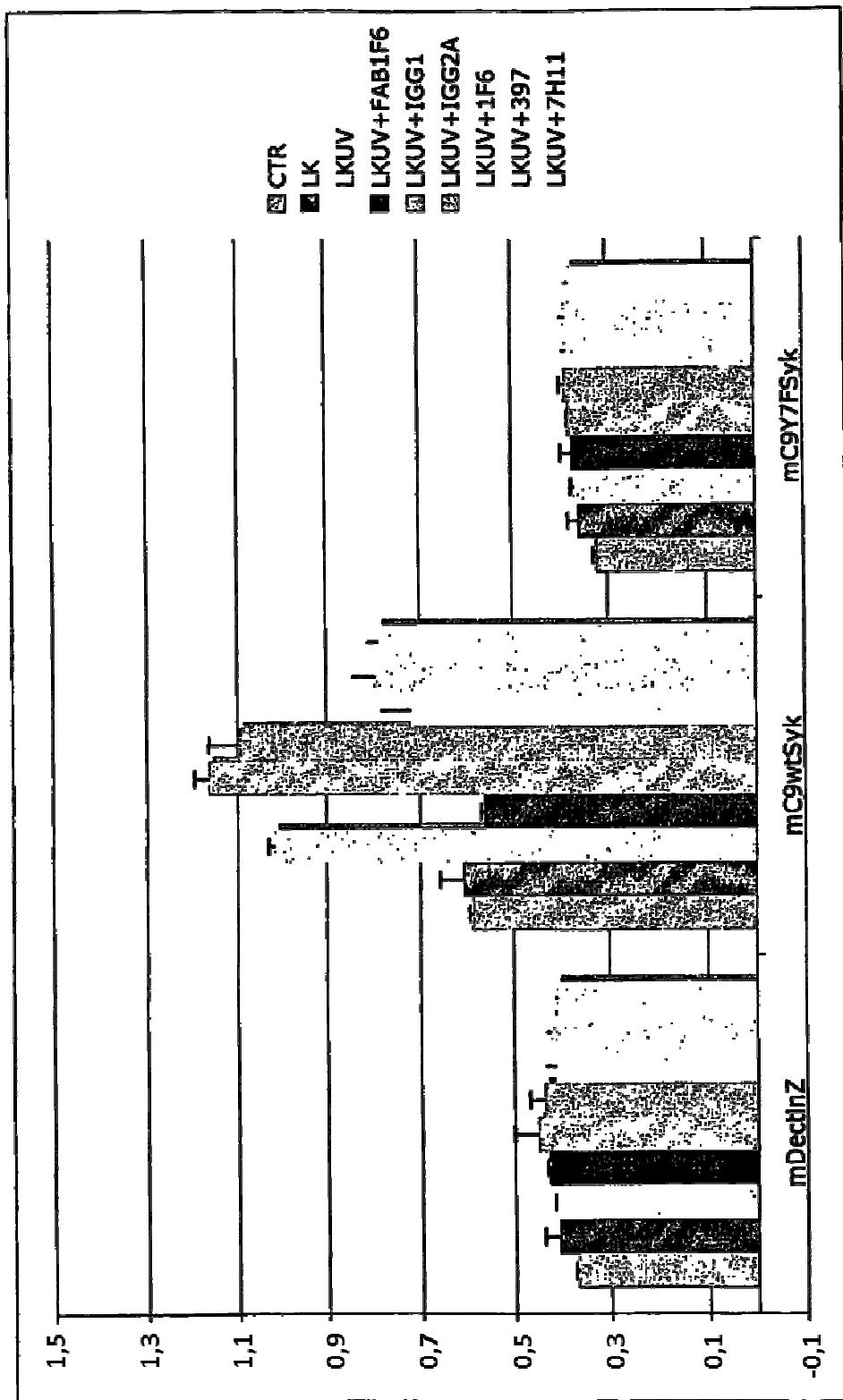


Fig. 22

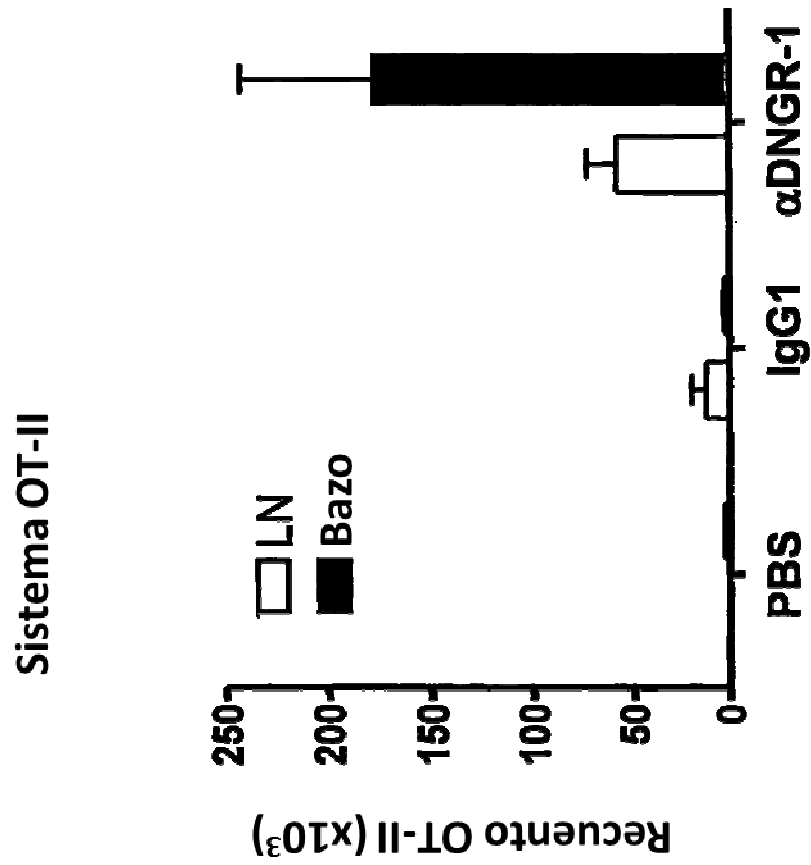


Fig. 23

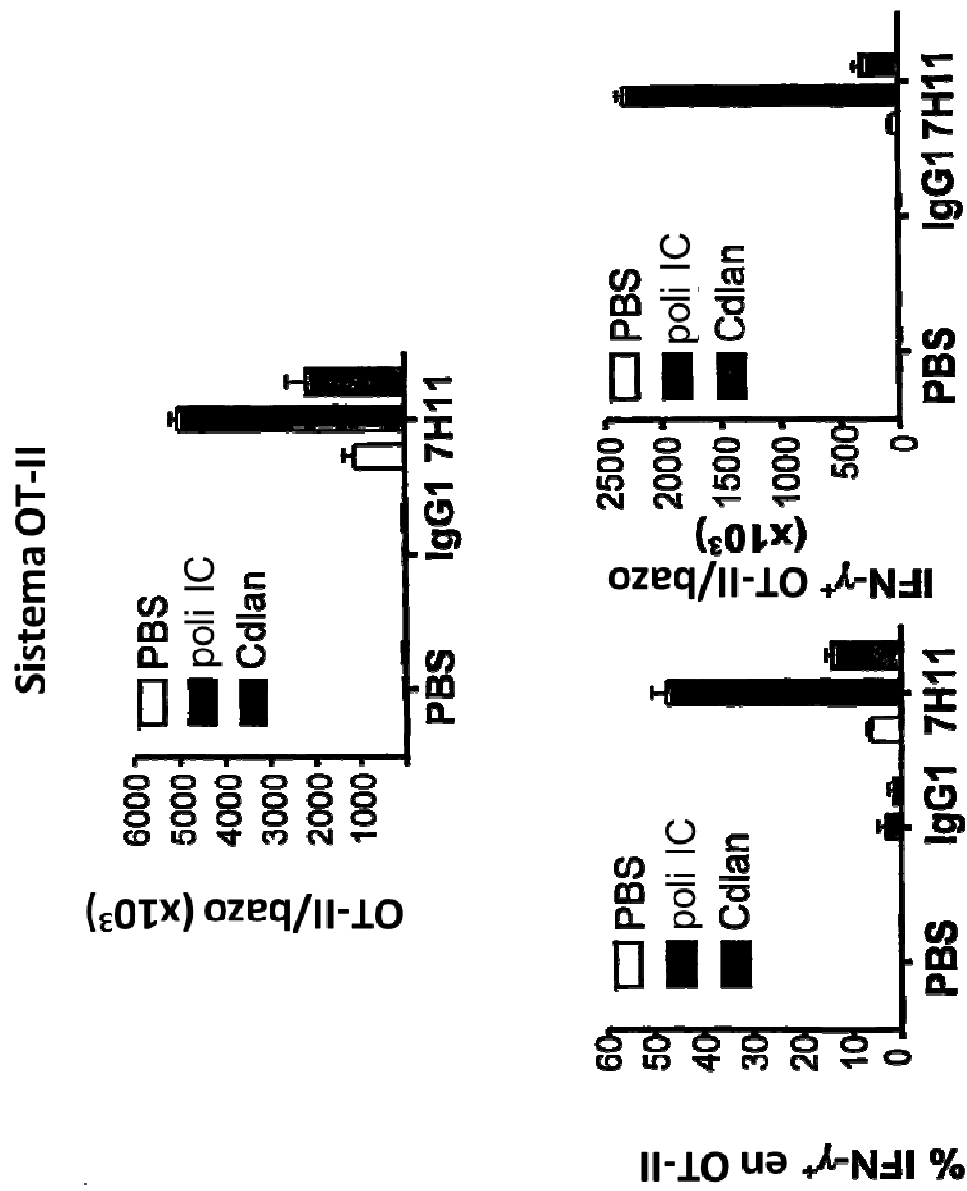


Fig. 24

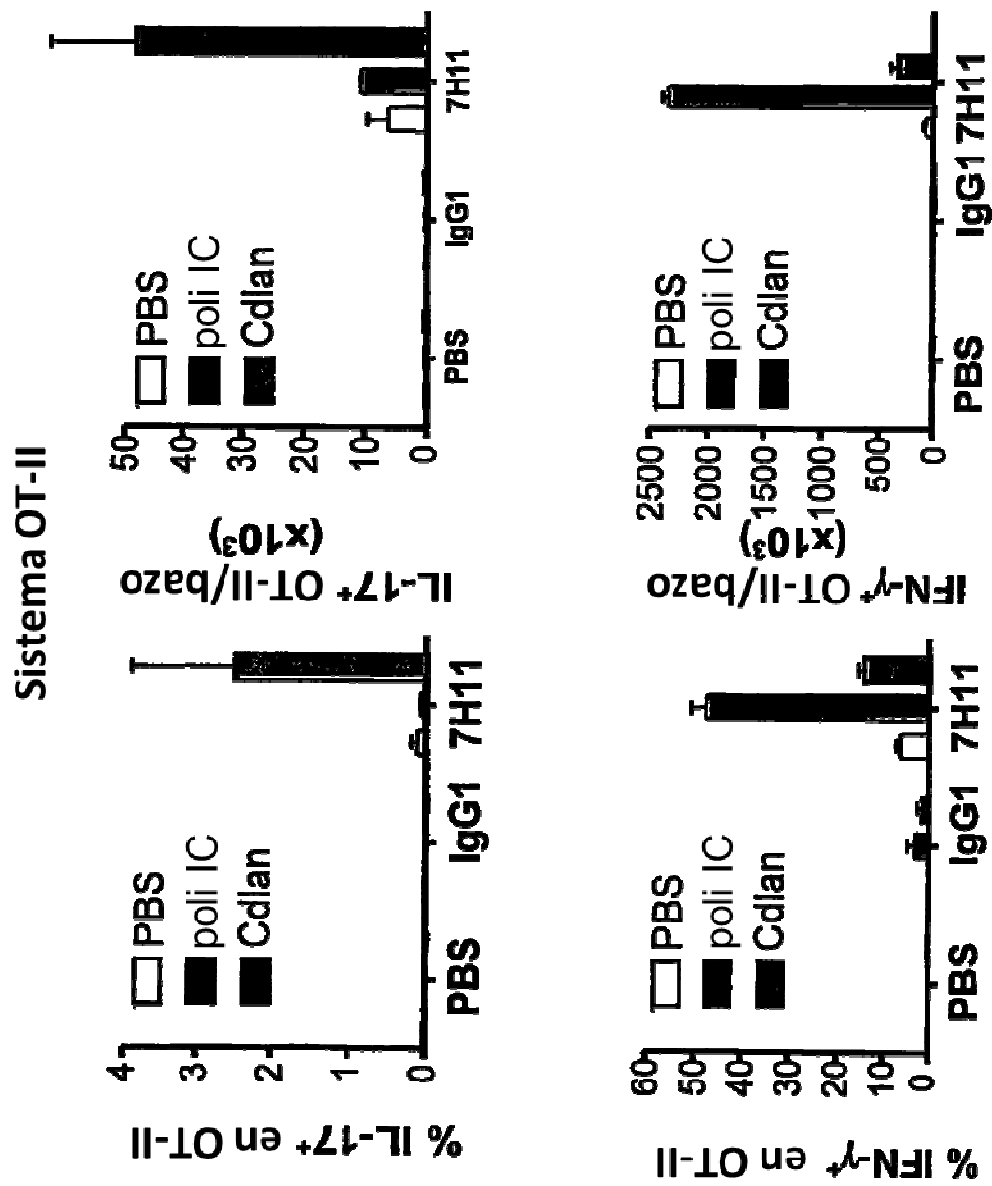


Fig. 25

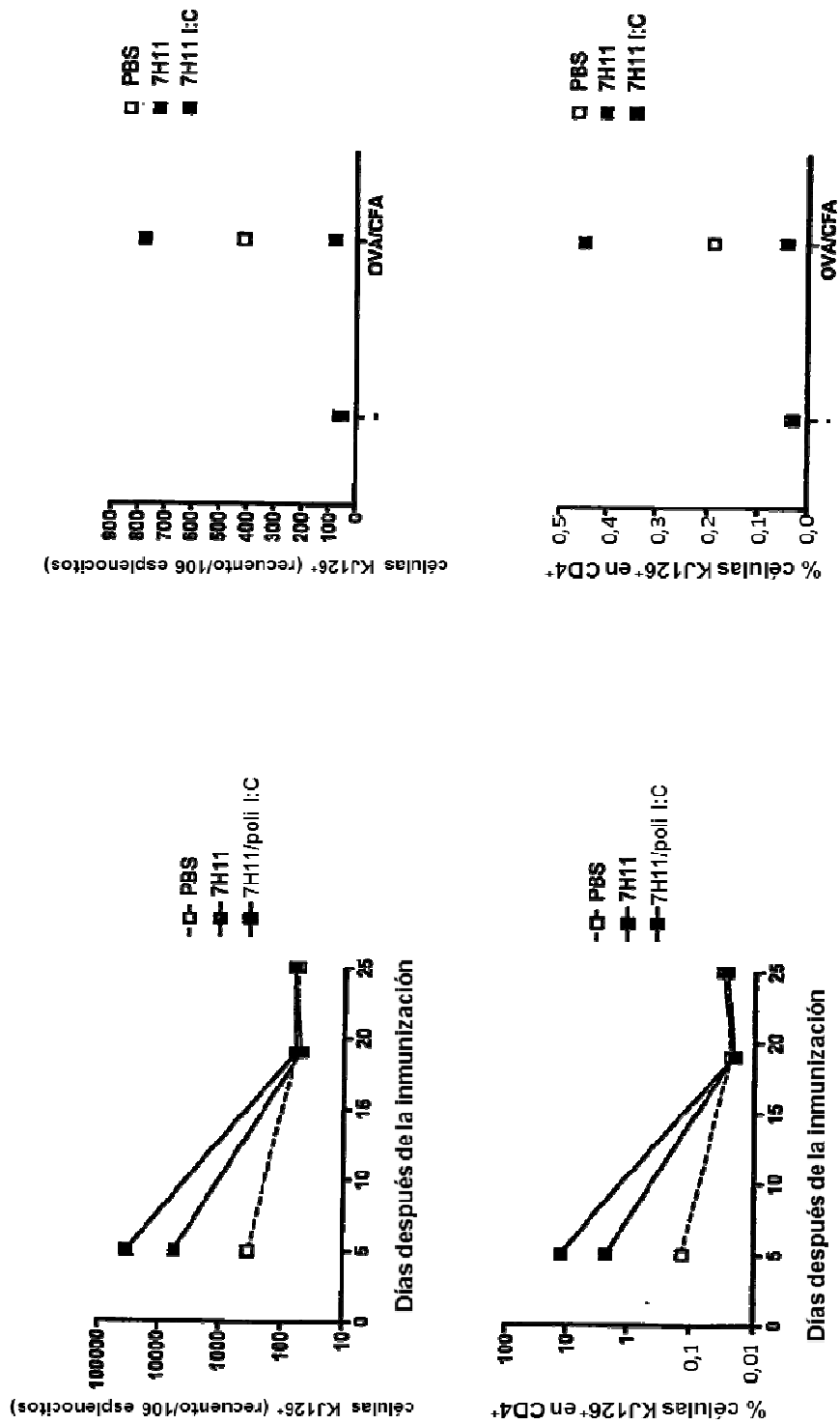


Fig. 26