

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 595**

51 Int. Cl.:

C12N 15/117 (2010.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61K 35/15 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2010 PCT/EP2010/007751**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11072871**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2010 E 10795952 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2513311**

54 Título: **Producción de IFN-lambda por células dendríticas convencionales y usos de las mismas**

30 Prioridad:

18.12.2009 US 287777 P
21.05.2010 EP 10005348

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.07.2017

73 Titular/es:

BAVARIAN NORDIC A/S (100.0%)
Hejreskovvej 10 A
3490 Kvistgaard, DK

72 Inventor/es:

HOCHREIN, HUBERTUS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 626 595 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

Producción de IFN-lambda por células dendríticas convencionales y usos de las mismas

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al campo de la inmunoterapia, en particular al campo de la producción de interferones (IF) por células dendríticas. La invención se refiere a un tipo de célula dendrítica específica responsable de la producción de IFN-lambda (IFN- λ) y métodos de regulación de esta producción. En particular, en el presente documento se desvelan composiciones y métodos para la producción de IFN- λ *in vitro* e *in vivo*. La presente invención se refiere a aplicaciones terapéuticas de ácidos nucleicos bicatenarios (bc) capaces de inducir una respuesta antiinfecciosa, en particular una respuesta antiviral en un sujeto induciendo la producción de IFN- λ en un tipo de célula dendrítica específica. Dentro del contexto de la presente invención se desvelan ácidos nucleicos bc que se dirigen a células dendríticas convencionales CD8+ (CDc CD8+) y/o equivalentes de las mismas (CDce CD8+) en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades infecciosas, especialmente producidas por infecciones virales, o cáncer. Adicionalmente se desvelan métodos *in vitro* de producción de IFN- λ y/o generación u obtención de CD8+ y/o CDce CD8+ que producen IFN- λ , en los que dichas CDc expresan Clec9a y/o Necl2. En el presente documento se desvelan métodos de detección o cribado de CD8+ y/o CDce CD8+. Además, se desvela un método *ex vivo* de inducción de la producción de IFN- λ en CDc.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Recientemente ha sido identificada la familia de las citocinas de IFN-lambda (IFN- λ) 1, 2, 3, también llamada IL-29, IL-28A e IL-28B, respectivamente (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003). Los IFN-lambda (IFN- λ) son potentes citocinas inmunomoduladoras y antivirales, recientemente implicadas en la eliminación del virus de la hepatitis C en seres humanos. El IL-28A (también llamado IFN- λ 2), IL-28B (IFN- λ 3) e IL-29 (IFN- λ 1) son interferones de tipo III que son ligandos de receptor de citocinas de clase II. Los IFN- λ están relacionados con IFN de tipo I (IFN-I), además de la familia de IL-10 de citocinas, y señalizan mediante un receptor heterodimérico, que consiste en una cadena única para IFN- λ (IFN- λ R1 o IL-28R α) y otra cadena (IL-10R2), que es compartida con citocinas relacionadas con IL-10. Los IFN- λ poseen funciones antivirales, antitumorales y diversas funciones inmunomoduladoras y se parecen en muchas formas a la función de IFN-I (Li et al., 2009). A diferencia de la expresión ubicua del receptor de IFN-I, la expresión del receptor de IFN- λ está restringida a tipos limitados de células que incluyen células epiteliales y células dendríticas plasmacitoides (CDp) (Ank et al., 2008; Sommereyns et al., 2008). La exposición a virus o análogos de ácidos nucleicos tales como poli IC o CpG-oligonucleótidos (ODN), condiciones conocidas por desencadenar la producción de IFN-I, también inducen IFN- λ y dependen en gran medida de componentes de señalización similares (Ank et al., 2008; Osterlund et al., 2007; Onoguchi et al., 2007). Los IFN- λ desempeñan una función en la protección inducida por receptores de tipo toll (TLR) contra infecciones virales mucosas e informes recientes asocian el gen IL-28B con una capacidad para eliminar y recuperar de infección de hepatitis C (Ank et al., 2008; Ge et al., 2009). Así, es de suma importancia entender el origen celular de IFN- λ y la regulación de su producción.

35 Se han descrito varios tipos de células para producir IFN- λ , que incluyen células dendríticas (CD) derivadas de monocitos y células dendríticas plasmacitoides (CDp), pero el origen celular de IFN- λ inducido por ácidos nucleicos bicatenarios (bc) *in vivo* es todavía impreciso (Coccia et al., 2004; Ank et al., 2008; Osterlund et al., 2005). Las CD derivadas de monocitos no son CD convencionales CD8+ (CDc CD8+) o equivalentes de CDc CD8+ (CDce CD8+), ya que las CDce CD8+ implican ligando (de Flt3) de ligando de tirosina cinasa 3 relacionado con Fms (FL), pero no GM-CSF, para el desarrollo. Las CD derivadas de monocitos dependen completamente de GM-CSF para el desarrollo, aún cuando GM-CSF podría combinarse con otras citocinas tales como IL-4 o TNF-alfa (TNF- α). Las CD dependientes de GM-CSF no son equivalentes de CD en estado estacionario debido a la falta de GM-CSF o el receptor de GM-CSF no tiene influencia sobre la presencia de subconjuntos de CDp o CDc normales en órganos linfoides (Naik et al. 2008). Si se generan células *in vitro* con la combinación de GM-CSF y FL, solo se desarrollan CD GM-CSF, pero no CDp o CDce CD8+ (Gilliet et al. 2002).

50 El ácido poliinosínico:policitidílico (poli IC) es un mimético de ARN bicatenario (bc) viral generado durante infecciones virales y es reconocido por TLR3 dependiente de TRIF o helicasas similares a Rig (RLH) dependientes de Cardif (IPS-1, MAVS, VISA) *in vivo*. Se usa comúnmente como estimulante inmunitario y es un excelente adyuvante para la inducción de respuestas de linfocitos T CD4 Th1 en un modelo de vacuna dirigido a CD (Longhi et al., 2009).

55 Las células dendríticas convencionales (CDc) no solo son células presentadoras de antígenos eficaces, sino que también son conocidas como una fuente innata de citocinas. Entre las CDc de ratón, se identificó un subconjunto definido por la expresión de homodímeros de CD8 $\alpha\alpha$ (CD8+) como los principales productores de IL-12p70 en diversos órganos que incluyen bazo, ganglios linfáticos, timo e hígado (Reis e Sousa et al., 1997; Hochrein et al., 2001; Pillarisetty et al., 2004). Otra característica funcional de las CDc CD8+ es su capacidad para la presentación cruzada (Shortman et al., 2009).

Las CDc CD8+ son claramente un subconjunto de CD funcionalmente distinto. Sin embargo, estos atributos funcionales pueden no siempre corresponderse con la expresión de CD8. Así, aparte de la molécula de CD8,

pueden usarse otras combinaciones de marcadores superficiales para identificar CDc CD8+ o sus equivalentes funcionales que pueden carecer de expresión de CD8 (eCD8+). Entre las células altas de clase II de MHC CD11c⁺, pueden usarse diversas combinaciones de alta expresión de CD205, CD103, Necl2, Clec9a, CD24 acompañada con expresión negativa o baja de CD11b y CD172a (Hochrein y O'Keeffe, 2008; Shortman et al., 2009).

5 Pueden generarse subconjuntos de CD *in vitro* a partir de células precursoras de la médula ósea en presencia de ligando de Flt3 (FL), FLDC (Brasel et al., 2000). Las CDC de FLDC carecen de expresión de CD8 y CD4, pero usando los marcadores descritos anteriormente, pueden dividirse en subconjuntos funcionalmente distintos que se parecen a CDc del bazo. Se ha identificado el subconjunto de FLDC como eCD8+, ya que depende de los mismos factores de transcripción para el desarrollo de CDc CD8+, expresa varios marcadores superficiales característicos, tales como alta expresión de Clec9a, pero baja expresión de CD11b y CD172a, y muestra un perfil de expresión similar de TLR. Funcionalmente, las CD eCD8+ demuestran una sensibilidad por el ligando de TLR similar, además de alta producción de IL-12p70 y eficiente presentación cruzada. Tras la transferencia *in vivo* y recuperación en el bazo, las CD eCD8+ expresan CD8 sobre su superficie (Naik et al., 2005).

15 La expresión de los diferentes sistemas de detección de ácidos nucleicos TLR3, TLR7, o TLR9 y RLH varía entre subconjuntos de CD (Hochrein y O'Keeffe, 2008). Las funciones en la dirección 3' después de la cooperación de estos receptores también se diferencia entre las diferentes CD. Las CDp usan predominantemente TLR7 y TLR9 para la detección de ácidos nucleicos, produciendo la alta producción de IFN-I e IFN-λ. Entre las CDc, las CDc CD8+ expresan altamente TLR3, pero carecen de expresión de TLR7 (Edwards et al., 2003). Además, se ha encontrado por proteómica que las CDc CD8+, a diferencia de las CDc CD8-, difícilmente expresan RLH y como consecuencia son incapaces de detectar los virus de ARN monocatenario (mc) virus de Sendai o de la gripe (Luber et al., 2010).

20 CD8 no se expresa en CD humanas, mientras que CD4 es expresada por todos los subconjuntos de CD, y así tienen que emplearse otros marcadores para definir subconjuntos de CD humanas y para alinear posiblemente los homólogos de ratón y humanos. Se ha establecido un conjunto de anticuerpos designado BDCA1-4 y se usa para diferenciar entre CDp y subconjuntos de CDc (Dzionek et al., 2000). Se han propuesto CD BDCA3-positivas humanas como las CD eCD8+ humanas ya que, al igual que las CD eCD8+ de ratón, expresan selectivamente altos niveles de Clec9a y Necl2, pero solo bajas cantidades de CD11b (Shortman et al., 2009). El análisis transcripcional de genoma completo confirmó una estrecha relación de CDc CD8+ murinas con CDc BDCA3+ humanas (Robbins et al., 2008). Al igual que con las CDce CD8+ de ratón, las CDc BDCA3+ humanas se han encontrado en diversos órganos que incluyen sangre, bazo, pulmón, amígdalas, ganglios linfáticos, colon e hígado. La correlación funcional entre estos subconjuntos de CD humanas y de ratón es escasa, aunque las CDc CD11b^{baja} de timo humano se correlacionaron con las CD CD11b^{baja} tímicas de ratón con alta producción de IL-12p70 (Vandenabeele et al., 2001; Hochrein et al., 2001).

25 Miyake et al., 2009, describen que poli IC activa células NK mediante vías dependiente de IPS-1 y TRIF. Ambas vías participaron en la supresión de tumores B16 mediante células NK. Se identificaron CDc CD8a+ como fuente de IFN de tipo I (IFN-alfa/beta), IL-6 e IL-12p40 y responsables de la activación de células NK como se mide por la producción de IFN-gamma por células NK.

30 Schulz et al., 2005, describen que el ARNbc presente en células viralmente infectadas es reconocido por células dendríticas mediante TLR3. Que poli IC activa CDc CD8a+ (aumento de marcadores superficiales tales como CD40, CD86, CD80 y activación génica de TNF-alfa, IL-6 e IFN-alfa/beta, pero solo podría detectarse la proteína IL-6). Se mostró que TLR3 era necesario para esta activación y que las CDc CD8a+ activadas indujeron la inducción de CTL más fuerte mediante presentación cruzada.

35 Diebold et al., 2009, describen que el plásmido de replicón induce productos intermedios de ARNbc que se detectan por CDc CD8a+ en una forma dependiente de TLR3. A diferencia, la activación de CTL fue independiente de TLR3.

40 El documento WO 2006/054177 describe que ciertos tumores expresan TLR3 y que estos tumores podrían tratarse con agonistas de TLR3 tales como poli AU.

45 El documento WO 2009/088401 describe que las combinaciones de ligandos de TLR, siendo una de ellas un agonista de TLR3, inducirían elevadas respuestas inmunitarias (adaptativas), especialmente respuestas de linfocitos T CD8 específicas de antígeno. Las reivindicaciones también incluyen activación de células dendríticas con combinaciones de agonistas de TLR3 y otros agonistas de TLR y la reivindicación potenció respuestas de linfocitos T CD8 que incluyen citocinas potenciadas producidas por los linfocitos T.

50 El documento WO 2004/060319 describe que las combinaciones de agonistas de TLR y agonista de TNF/R aumentan la cantidad de una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Estas respuestas específicas de antígeno fueron tanto de linfocitos T colaboradores (linfocitos T CD4) como de linfocitos T citolíticos (linfocitos T CD8). El documento WO 94/28391 describe que los ligandos para FLT3 pueden usarse para expansión de células madre hematopoyéticas u otras células inmunitarias. Se describen diferentes formas de ligandos de Flt3.

55 El documento WO 2008/131926 describe que M-CSF puede usarse independiente de ligandos de Flt3 o GM-CSF para inducir la generación de células dendríticas. En particular, la producción de CDp era independiente de FL y de CDc independientes de GM-CSF.

5 Ank et al., 2008, describen que muchos tipos de células diferentes producen IFN-lambda a ligandos de TLR o virus. También analiza la expresión de receptores de IFN-lambda y usos de modelos de infección de virus *in vivo*. La administración local (intravaginal) de poli IC o CpG-ODN protegió a los ratones de la exposición a HSV-2 intravaginal mortal. Describe también que las CDc, CDp, linfocitos B, linfocitos T y macrófagos del bazo produjeron ARNm de IFN-lambda en respuesta a HSV-2.

Sheppard et al., 2003, describen la existencia de los IFN-lambda y que están relacionados con la familia de citocinas IFN-I e IL-10. Muestra ARNm para IFN-lambda (IL-28A, IL-28B, IL-29), IFN-alfa e IFN-beta de CMSP humanas después del tratamiento con poli IC o infección por EMCV. El ARNm de los 3 IFN-lambdas e IFN-alfa e IFN-beta se regularon por incremento tras la exposición a tanto poli IC como virus.

10 O'Keeffe et al., 2002, describe el aumento de subconjuntos de CD en respuesta a diversos factores de crecimiento que incluye mostrar el aumento de CDc CD8a en respuesta a ligando de flt3. Se analizó la producción de IL-12p40 e IL-12p70 en respuesta a CpG y CDc CD8a+ y después de FL a ProGP (proteína de fusión de FL y G-CSF) las CDc CD8a^{int} fueron los principales productores de IL-12p70.

15 Sin embargo, ninguno de los documentos y solicitudes de patente anteriormente citados proporciona una pista sobre células que son la fuente de IFN-lambda.

Es, por tanto, un objetivo de la presente invención proporcionar el tipo de específico de CDc, que es el principal productor de IFN-λ inducido por ácidos nucleicos bc.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona los siguientes puntos:

20 Un primer aspecto de la invención proporciona un método *in vitro* de generación u obtención de una población de células dendríticas convencionales CD8+ o eCD8+ que producen IFN-λ, en el que dichas CDce CD8+ expresan Clec9a y/o Necl2, que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una población de células que comprende células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+;
- 25 (b) poner en contacto dicha población de células con un agente que aumenta el nivel de dichas células dendríticas convencionales, en el que el agente es ligando de Flt3 o ligando de receptor de M-CSF;
- (c) poner en contacto dichas células dendríticas convencionales con un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo; y
- 30 (d) aislar células positivas para Clec9a y/o Necl2 que producen IFN-λ de dichas células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+.

Un segundo aspecto de la invención proporciona el método del primer aspecto, en el que la población de células se incubaba además con un potenciador de la producción de IFN-λ, en el que el potenciador es

- a) un ligando de TLR, en el que el ligando de TLR es preferentemente un ligando de TLR2, un ligando de TLR4, un ligando de TLR9, un ligando de TLR10 y/o un ligando de TLR11; y/o
- 35 b) un miembro de la familia de TNF, en el que el miembro de la familia de TNF es preferentemente un ligando de CD40; y/o
- c) una citocina, en el que la citocina es preferentemente IL-3, GM-CSF, IL-4 o IFN-γ.

40 Un tercer aspecto de la invención proporciona una composición que comprende una población de células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+ humanas que producen IFN-λ obtenibles por el método de uno cualquiera del aspecto 1 o 2, en el que dichas células dendríticas convencionales expresan Clec9a y/o Necl2.

Un cuarto aspecto de la invención proporciona una composición del aspecto 3, en el que dicha composición es una composición farmacéutica.

45 Un quinto aspecto de la invención proporciona células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+ humanas que producen IFN-λ obtenibles por el método de uno cualquiera del aspecto 1 o 2 o la composición de uno cualquiera del aspecto 3 o 4 para su uso en un método de prevención y/o tratamiento de una enfermedad, en el que dicha enfermedad es una enfermedad infecciosa, en particular una infección viral, preferentemente una infección viral persistente, más preferentemente una infección viral del hígado y/o una infección por el virus del herpes, lo más preferentemente una infección por el virus de la hepatitis; o cáncer.

50 Un sexto aspecto de la invención proporciona una composición que comprende un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo para su uso en un método de prevención y/o tratamiento de una enfermedad por la inducción de

IFN- α en células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+ y en el que dichas CDc CD8+ expresan Clec9a y/o Necl2, en el que dicha enfermedad es una enfermedad infecciosa, en particular una infección viral, preferentemente una infección viral persistente, más preferentemente una infección viral del hígado y/o una infección por el virus del herpes, lo más preferentemente una infección por el virus de la hepatitis; o cáncer.

5 Un séptimo aspecto de la invención proporciona una composición para su uso en un método del aspecto 6 que comprende además un agente que aumenta el nivel de células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+ seleccionadas de ligando de Flt3 y/o un ligando de receptor de M-CSF, en el que dichas CDc CD8+ expresan Clec9a y/o Necl2.

10 Un octavo aspecto de la invención proporciona la composición para su uso en el método del aspecto 6 o 7, en el que dicho cáncer es un carcinoma de células escamosas o un adenocarcinoma.

Un noveno aspecto de la invención proporciona la composición para su uso en el método de uno cualquiera de los aspectos 6 a 8, que comprende además un agente que potencia la producción de IFN- λ basada en ácido nucleico bc, en el que el agente que potencia la producción de IFN- λ basada en ácido nucleico bc es

15 a) un ligando de TLR, en el que el ligando de TLR es preferentemente un ligando de TLR2, un ligando de TLR4, un ligando de TLR9, un ligando de TLR10 y/o un ligando de TLR11; y/o

b) un miembro de la familia de TNF, en el que el miembro de la familia de TNF es preferentemente un ligando de CD40; y/o

c) una citocina, en el que la citocina es preferentemente un ligando de Flt3, un ligando de receptor de M-CSF, IL-3, GM-CSF, IL-4, o IFN- γ .

20 Un décimo aspecto de la invención proporciona la composición para su uso en el método de uno cualquiera de los aspectos 7 a 9, en el que dicho análogo de un ácido nucleico bc es poli IC, poli AU, poli ICLC, poli dAdT.

DESCRIPCIÓN DETALLADA Y DIVULGACIÓN

Los siguientes puntos se desvelan en el presente documento:

25 [1] Una composición que comprende un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo para su uso en la inducción de IFN- λ , producción en células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+, en la que dichas CDc CD8+ expresan Clec9a y/o Necl2. Preferentemente, dichas CDc convencionales son CDc humanas.

30 [2] Uso de un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo para la preparación de una composición farmacéutica para la inducción de la producción de IFN- λ en células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+, en el que dichas CDc CD8+ expresan Clec9a y/o Necl2. Preferentemente, dichas CDc convencionales son CDc humanas.

[3] La composición del punto [1] o el uso del punto [2] para su uso en un método de prevención y/o tratamiento de una enfermedad dependiente de IFN- λ .

35 [4] La composición del punto [1] o [3] o el uso del punto [2] o [3], en el que dicho ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo se administra a células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+ de un sujeto *ex vivo*, dichas CDc se aíslan preferentemente de dicho sujeto.

[5] La composición o uso del punto [4], en el que un agente que aumenta el nivel de células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+ se administra a dichas CDc aisladas *ex vivo* antes de la administración de dicho ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo.

40 [6] La composición o uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en la que dicho ácido nucleico bc es ARNbc o ADNbc.

[7] La composición o uso de uno cualquiera de los puntos [1] a [6], en la que dicha inducción es independiente de TLR dependientes de MyD88.

45 [8] La composición o uso de uno cualquiera de los puntos [1] a [7], en la que dicha inducción es independiente de (la molécula adaptadora) MyD88.

[9] La composición o uso de uno cualquiera de los puntos [1] a [8], en el que dicha inducción es independiente de (la molécula adaptadora para helicasas similares a Rig) Cardif.

[10] La composición o uso de uno cualquiera de los puntos [1] a [9], en la que dicha inducción es independiente de TRIF.

- [11] La composición o uso de uno cualquiera de los puntos [1] a [10], en la que dicha inducción es independiente de TLR-7 y/o TLR-9.
- [12] La composición o uso de uno cualquiera de los puntos [1] a [11], en la que dicha inducción está mediada por TLR-3.
- 5 [13] La composición o uso de uno cualquiera de los puntos [1] a [12], en la que dicha inducción está mediada por IRF3 y/o IRF7.
- [14] La composición o uso de uno cualquiera de los puntos [1] a [13], en la que dicha inducción está mediada por IRF8.
- 10 [15] La composición o uso de uno cualquiera de los puntos [1] a [14], en la que dicha inducción está mediada por IFN-IR.
- [16] La composición o uso de uno cualquiera de los puntos [1] a [15], en la que dicha composición comprende además un agente que aumenta el nivel de células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+.
- 15 [17] La composición o uso del punto [16], en la que dicho agente que aumenta el nivel de células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+ es un ligando de Flt3 o un ligando de receptor de M-CSF.
- [18] La composición o uso de uno cualquiera de los puntos [1] a [17], en la que dicha composición comprende además un agente que potencia la producción de IFN-λ basada en ácido nucleico bc.
- 20 [19] La composición o uso del punto [18], en el que el agente que potencia la producción de IFN-λ basada en ácido nucleico bc es un agente que es un ligando de TLR, en el que el ligando de TLR es preferentemente un ligando de TLR2, un ligando de TLR4, un ligando de TLR9, un ligando de TLR10 o un ligando de TLR11; o un miembro de la familia de TNF, en el que el miembro de la familia de TNF es preferentemente un ligando de CD40 o una citocina, en el que la citocina es preferentemente un ligando de Flt3, un ligando de receptor de M-CSF, IL-3, GM-CSF, IL-4 o IFN-γ.
- 25 [20] Una composición que comprende un agente que aumenta el nivel de células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+, en la que dichas CDc CD8+ expresan Clec9a y/o Necl2, en combinación con un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo para su uso en un método de prevención y/o tratamiento de una enfermedad dependiente de IFN-λ, que comprende
- (a) administrar a un sujeto dicho agente que aumenta el nivel de células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+; y
- 30 (b) administrar a un sujeto un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo para inducir la producción de IFN-λ en células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+.
- [21] La composición del punto [20], en el que dicho agente que aumenta el nivel de células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+ es un ligando de Flt3 o un ligando de receptor de M-CSF.
- 35 [22] La composición o uso de uno cualquiera de los puntos [1] a [21], en la que dicha enfermedad dependiente de IFN-λ es una enfermedad infecciosa o cáncer.
- [23] La composición o uso del punto [22], en la que dicha enfermedad dependiente de IFN-λ es una enfermedad de sangre, bazo, pulmón, amígdalas, ganglios linfáticos, colon o hígado.
- [24] La composición o uso del punto [22] o [23], en el que dicha enfermedad infecciosa es una infección viral.
- 40 [25] La composición o uso del punto [24], en el que dicha infección viral es una infección por un virus que comprende ARNbc o ADNbc.
- [26] La composición o uso del punto [24] o [25], en el que dicha infección viral es una infección viral persistente, preferentemente una infección viral del hígado o una infección por el virus del herpes, más preferentemente una infección por el virus de la hepatitis.
- 45 [27] Un método *in vitro* de producción de IFN-λ y/o generación u obtención de una población de células dendríticas convencionales CD8+ o eCD8+ que producen IFN-λ, en el que dichas CDc CD8+ expresan Clec9a y/o Necl2, que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar una población de células que comprende células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+;

(b) poner en contacto dichas células dendríticas convencionales con un agente que aumenta el nivel de dichas células dendríticas convencionales, dicho agente es preferentemente un ligando de Flt3 o un ligando de receptor de M-CSF; y

5 (c) poner en contacto dichas células dendríticas convencionales con un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo.

[28] El método del punto [27], en el que la población de células se incuba además con un potenciador de la producción de IFN-λ.

10 [29] El método del punto [28], en el que el potenciador es un ligando de TLR, en el que el ligando de TLR es preferentemente un ligando de TLR2, un ligando de TLR4, un ligando de TLR9, un ligando de TLR10 o un ligando de TLR11; o un miembro de la familia de TNF, en el que el miembro de la familia de TNF es preferentemente un ligando de CD40 o una citocina, en el que la citocina es preferentemente IL-3, GM-CSF, IL-4 o IFN-γ.

15 [30] Una composición farmacéutica que comprende una población de células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+ humanas que producen IFN-λ obtenibles por el método de uno cualquiera de los puntos 27 a 29 y, opcionalmente, un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[31] Un método in vitro de detección o cribado de células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+ humanas, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una población de células que comprende células dendríticas;

(b) seleccionar células dendríticas BDCA3+;

20 (c) poner en contacto dichas células BDCA3+ con un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo;

(d) detectar la producción de IFN-λ; y

(e) correlacionar la producción de IFN-λ con la presencia de células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+.

25 [32] El método del punto [31] para cribar o detectar la presencia de células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+ en una biopsia, preferentemente una biopsia de un órgano o sangre.

[33] Un método de inducción de la producción de IFN-λ en una población de células dendríticas convencionales (CDc) (humanas) que comprende poner en contacto *ex vivo* CDc con un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo.

30 [34] El método del punto [33], en el que CDc pretratadas con ligando de Flt3 y/o ligando de receptor de M-CSF se ponen en contacto *ex vivo* con dicho ácido nucleico bc.

[35] La composición, uso o método de uno cualquiera de los puntos precedentes, en el que dicho análogo de un ácido nucleico bc es poli IC, poli AU, poli ICLC, poli dAaT

35 [36] Una composición que comprende un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo que se dirige a CD8+ y/o CDce CD8+ para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad infecciosa o cáncer, preferentemente una infección viral.

[37] Una preparación combinada que comprende un ácido nucleico bc o análogo del mismo que se dirige a CD8+ y/o CDce CD8+ y un agente que potencia la producción de IFN-λ basada en ácido nucleico bc.

40 [38] La preparación combinada según el punto [37], en la que el agente que potencia la producción de IFN-λ basada en ácido nucleico bc es un ligando de TLR, en la que el ligando de TLR es preferentemente un ligando de TLR2, un ligando de TLR4, un ligando de TLR9, un ligando de TLR10 o un ligando de TLR11; o un miembro de la familia de TNF, en la que el miembro de la familia de TNF es preferentemente un ligando de CD40 o una citocina, en la que la citocina es preferentemente un ligando de Flt3, un ligando de receptor de M-CSF, IL-3, GM-CSF, IL-4 o IFN-γ.

45 [39] Un ligando de Flt3 o un ligando de receptor de M-CSF para su uso en aumentar el nivel de CD8+ y/o CDce CD8+ en un sujeto que padece una enfermedad infecciosa o cáncer, preferentemente una infección viral.

[40] La composición según el punto [36], o el ligando de Flt3 o ligando de receptor de M-CSF según el punto [39], en la que la infección viral es una infección viral persistente, preferentemente una infección viral

del hígado o una infección por el virus del herpes, más preferentemente una infección por el virus de la hepatitis.

5 [41] Un método *in vitro* de producción de IFN-λ y/o generación u obtención de una población de CD8+ o CDce CD8+ que producen IFN-λ, que comprende las etapas de: (a) proporcionar una población de células que comprende CD8+ y/o CDce CD8+; y (b) poner en contacto las CDc con un ácido nucleico bc o análogo del mismo.

[42] El método según el punto [41], en el que la población de células se incuba con un potenciador de la producción de IFN-λ.

10 [43] El método según el punto [42], en el que el potenciador es un ligando de TLR, en el que el ligando de TLR es preferentemente un ligando de TLR2, un ligando de TLR4, un ligando de TLR9, un ligando de TLR10 o un ligando de TLR11; o un miembro de la familia de TNF, en el que el miembro de la familia de TNF es preferentemente un ligando de CD40 o una citocina, en el que la citocina es preferentemente IL-3, GM-CSF, IL-4 o IFN-γ.

15 [44] Una composición farmacéutica que comprende una población de CD8+ y/o CDce CD8+ que producen IFN-λ obtenibles por el método según uno cualquiera de los puntos [41] a [43] y, opcionalmente, un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20 [45] Un método *in vitro* de detección o cribado de CD8+ y/o CDce CD8+, que comprende las etapas de: (a) proporcionar una población de células; (b) poner en contacto las células con un ácido nucleico bc o análogo del mismo capaz de estimular o inducir la producción de IFN-λ en CD8+ y/o CDce CD8+; (c) detectar la producción de IFN-λ; y (d) correlacionar la producción de IFN-λ con la presencia de CD8+ y/o CDce CD8+.

[46] El método según el punto [45] de cribado o detección de la presencia de CD8+ y/o CDce CD8+ en una biopsia, preferentemente una biopsia de un órgano o sangre.

[47] Un método de inducción de la producción de IFN-λ en una población de CDc que comprende poner en contacto *ex vivo* una CDc con un ácido nucleico bc o análogo del mismo.

25 [48] El método según el punto [47], en el que las CDc pretratadas con ligando de Flt3 y/o ligando de receptor de M-CSF se ponen en contacto *ex vivo* con dicho ácido nucleico bc.

30 Debe observarse que, como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias al plural, a menos que el contexto indique claramente de otro modo. Así, por ejemplo, referencia a "un agente" incluye uno o más de tales reactivos diferentes y referencia a "el método" incluye referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos para aquellos expertos habituales en la materia que podrían modificarse o sustituirse por los métodos descritos en el presente documento.

35 A menos que se indique lo contrario, el término "al menos" precediendo a una serie de elementos debe entenderse para referirse a cada elemento en la serie. Aquellos expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más de experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Tales equivalentes pretenden estar englobados por la presente invención.

40 En toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que la palabra "comprenden", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implican la inclusión de un número entero establecido o etapa o grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de número entero o etapa. Cuando se usa en el presente documento, el término "que comprende" puede estar sustituido con el término "que contiene" o algunas veces cuando se usa en el presente documento con el término "que tiene".

45 Cuando se usa en el presente documento, "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o componente no especificado en el elemento de reivindicación. Cuando se usa en el presente documento, "que consiste esencialmente en" no excluye materiales o etapas que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la reivindicación.

En cada caso en el presente documento, cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede sustituirse con cualquiera de los otros dos términos.

50 Como se describe en el presente documento, "realización preferida" significa "realización preferida de la presente invención". Asimismo, como se describe en el presente documento, "diversas realizaciones" y "otra realización" significan "diversas realizaciones de la presente invención" y "otra realización de la presente invención", respectivamente.

Se citan varios documentos en todo el texto de esta memoria descriptiva.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se basa en el hallazgo de que el ARNbc induce la producción de IFN- λ en CD convencionales CD8+ (CDc CD8+) y equivalentes de CDc CD8+ (CDce CD8+), mientras que se sabe en el estado de la técnica que las CD plasmacitoides (CDp) son responsables de la producción de IFN- λ por un mecanismo diferente.

5 Los inventores de la presente solicitud encontraron sorprendentemente que los ácidos nucleicos bc, como ARNbc o ADNbc, además de análogos de ácido nucleico bc sintéticos, tales como poli IC, inducen grandes cantidades de IFN- λ en CD convencionales CD8+ (CDc CD8+) y equivalentes de CDc CD8+ (CDce CD8+), pero no en CDp o en otros subconjuntos de CDc. Poner en contacto CD8+ o CDce CD8+ con ácido nucleico bc o un análogo del mismo estimula la producción de IFN- λ .

10 Las CD plasmacitoides (CDp) producen grandes cantidades de IFN- λ en condiciones que también inducen grandes cantidades de IFN-alfa (IFN- α). Esta producción mediante CDp es completamente dependiente de la presencia de la molécula adaptadora del receptor de tipo toll (TLR) MyD88. Usando varios ratones de genes inactivados, los presentes inventores fueron capaces de demostrar que la producción de IFN- λ de CDc CD8+ en respuesta a un análogo de ácido nucleico bc sintético es independiente de TLR dependientes de MyD88, independiente de la molécula adaptadora para TLR, MyD88, independiente de la molécula adaptadora para helicasas similares a Rig, Cardif, independiente de TRIF que es un interferón- β inductor de adaptador que contiene dominio de TIR (TRIF) que responde a la activación de receptores de tipo toll (TLR), independiente de TLR-7 y/o independiente de TLR-9.

15 TLR-7 reconoce ARNmc, TLR-9 reconoce ADNbc, mientras que TLR-3 reconoce ARNbc. De forma interesante, células dendríticas convencionales humanas (es decir, células BDCA3+) no expresan TLR-9, mientras que células dendríticas plasmacitoides humanas expresan TLR-9. Sin embargo, aún así las células dendríticas convencionales humanas pueden reconocer ADNbc y ser así inducidas para producir IFN- λ , como se muestra en los ejemplos adjuntos (véase el Ejemplo 11).

20 Además, usando ratones de genes inactivados adicionales, los presentes inventores encontraron que la producción de IFN- λ está mediada por TLR-3 (es decir, el receptor que reconoce ARNbc). Además, los presentes inventores encontraron que la producción de IFN- λ está mediada por IRF3 y/o IRF7, IRF8 y/o IFN-RI.

25 IRF3, IRF7 y IRF8 son miembros de la familia del factor de transcripción regulador de interferón (IRF), mientras que IFN-RI es el receptor de IFN tipo I.

30 Específicamente, en la presente invención se identificaron CD8+ y CDce CD8+ de ratón como los principales productores de IFN- λ en respuesta a ácidos nucleicos bc (ARNbc o ADNbc), además de análogos de ácido nucleico bc sintéticos, tales como poli IC, *in vitro* e *in vivo*. La naturaleza del estímulo y el medio de citocinas determinaron si las CDc CD8+ produjeron IFN- λ o IL-12p70. La producción de IFN- λ , pero no IFN- α , a poli IC *in vivo* se suprimió en ratones que carecieron de la mayoría de las CD debido a una ausencia del ligando de tirosina cinasa 3 relacionado con Fms. Se mostró que el TLR3, pero no RLH, estaba implicado en la producción de IFN- λ inducida por poli IC *in vivo*. También se mostró que IRF7, que se requiere para la producción de IFN de tipo I dependiente de MyD88, estaba implicado en esta producción de IFN- λ . Las CD humanas BDCA3+, que se propuso que eran equivalentes de CD CD8+ de ratón, presentaron la mayor producción de IFN- λ 1 e IFN- λ 2 tras la estimulación de poli IC. Se han identificado CDc CD8+ equivalentes en ratón y ser humano como la principal fuente de IFN- λ en respuesta a ácidos nucleicos bc (ARNbc o ADNbc), además de análogos de ácido nucleico bc sintéticos, tales como poli IC.

35 Dentro de todas las especies estudiadas, células dendríticas son células raras presentes en sangre, piel, y todos los órganos linfoides. En el bazo, por ejemplo, representan aproximadamente el 1 % de los esplenocitos totales. Aún, es evidente que estas células raras son cruciales para respuestas inmunitarias normales. Los ratones agotados en CD muestran respuestas inmunitarias defectuosas a infecciones virales (Ciavarra et al., 2006), parasíticas (Jung et al., 2002; Liu et al., 2006a) y bacterianas (Jung et al., 2002).

40 Se han llevado a cabo estudios más amplios de subtipos de CD en el sistema de ratón. Es evidente que dentro de cada órgano linfóide y sangre de ratón hay dos categorías distintas de CD: CD convencionales (CDc) y CD plasmacitoides (CDp). Existe el mismo escenario en otras especies de mamífero, que incluyen seres humanos. Por consiguiente, las CD8+ y CDce CD8+ de la presente invención pueden separarse además por fenotipo, función y origen. Dentro del bazo murino se han definido tres subconjuntos de CDc importantes (véase la Tabla 1). Basándose en su expresión selectiva de las moléculas CD8-alfa (CD8 α) y CD4 se llaman CDc CD8+ (CD8^{pos}, CD4^{neg}), CD CD4+ (CD8^{neg}, CD4^{pos}) y CD-DN de negativo doble (CD8^{neg}, CD4^{neg}).

TABLA 1. Expresión diferencial de moléculas seleccionadas sobre la superficie celular de subconjuntos de CDc de bazo.

	CD4(-) CD8(-)	CD4(+) CD8(-)	CD4(-) CD8(+)
CD1d	+/-	+/-	++
CD5	+	++	+/-
CD11b	++	++	+/-
CD22	+	++	+/-
CD24	+	+	+++
CD36	+/-	+/-	++
CD49f	+	+	+++
CD72	+	+	-
CD81	+	+/-	++
CD103	-	-	++
CD205	+	+	+++
CD207	-	-	+
F4/80	++	++	+/-
Clec9a	-	-	+
Nec12	-	-	++
XCR1	-	-	++
Sirp-α	++	++	+/-

5 Las CD8+ y CDce CD8+ de la presente invención pueden caracterizarse además por la expresión diferencial de moléculas seleccionadas según la Tabla 1 anterior. En particular, el experto, si fuera necesario, estará fácilmente en posición de encontrar las moléculas homólogas humanas sobre la superficie celular de subconjuntos de CDc de bazo en caso de que la Tabla 1 solo proporcione la molécula de ratón y viceversa.

10 Además de la diferenciación fenotípica se han identificado varias diferencias funcionales, por ejemplo las CD CD8+ son los principales presentadores cruzados, los principales productores de IL-12p70 y son capaces de responder a ARNbc mediante TLR3. A diferencia, no pueden responder a ARNmc debido a la falta de los receptores de ARNmc TLR7 y RIG-I.

Mientras que las CDp son conocidas por producir IFN-λ en respuesta a CpG-ADN o a virus de Sendai (SeV), los inventores de la presente solicitud han descubierto sorprendentemente que las CDc CD8+ son los únicos productores de IFN-λ en respuesta a ARNbc.

15 Además del aislamiento de subconjuntos de CD del animal, pueden generarse subconjuntos de CD utilizando ligando de Flt3 (o ligando de receptor de M-CSF) para conducir los precursores de médula ósea de ratón en CDc y CDp (Brasel et al., 2000; Brawand et al., 2002; Gilliet et al., 2002; Hochrein et al., 2002; Fancke et al., 2008). Estos sistemas generan altos números de CDc y CDp inmaduras y ha sido fundamental en definir las CDp de ratón en particular.

20 Subconjuntos de CD en cultivos de ligando de Flt3: se definen subconjuntos de CDp y CDc con la ayuda de marcadores superficiales del siguiente modo:

CDp: CD11c^{pos}, CD11b^{baja}, B220^{alta}, CD45RA^{alta}, CD24^{baja}, Sirp-α^{pos}

CDc equivalentes de CD CD8^{neg} (CD eCD8^{neg}): CD11c^{pos}, CD11b^{alta}, B220^{neg}, CD45RA^{neg}, CD24^{baja}, Sirp-α^{pos}

CDc equivalentes de CD CD8+ (CD eCD8+): CD11c^{pos}, CD11b^{baja}, B220^{neg}, CD45RA^{neg}, CD24^{alta}, Sirp-α^{neg}

El hallazgo de que CD8+ y CDce CD8+ son los principales productores de IFN-λ permite usar esta característica para identificar CD8+ y/o CDce CD8+ en diferentes poblaciones de células mixtas de diferentes órganos. En aquellas poblaciones mixtas la producción de IFN-λ se corresponde con la presencia de CD8+ y/o CDce CD8+ y así permite detectar la presencia de CDce CD8+ mediante su citocina específica que producen.

5 DEFINICIONES

En la presente invención, el IFN-λ puede ser IFN-λ1, IFN-λ2 o IFN-λ3, que también se denominan IL-29, IL-28A e IL-28B, respectivamente.

En la presente invención, el término "bc" se usa igualmente que los términos "de hebra doble" y "bicatenario", respectivamente. Asimismo, el término "mc" se usa igualmente que los términos "de hebra única" y "monocatenario".
10 Ácido nucleico bc incluye tanto ARNbc como ADNbc.

Poli IC es un ARNbc desapareado con una hebra que es un polímero de ácido inosínico, la otra un polímero de ácido citidílico. Poli IC es un ARN de hebra doble sintético y, así puede considerarse como un análogo sintético de ARNbc. Poli IC es una herramienta común para la investigación científica sobre el sistema inmunitario. En una realización preferida, el ácido nucleico bc o análogo del mismo según la presente invención es poli IC. Sin embargo, análogos sintéticos adicionales de ácidos nucleicos bc son igualmente adecuados según la presente invención como, por ejemplo, ácido poliadenílico-poliuridílico (poli AU), que es un ARNbc sintético, señalizando exclusivamente mediante TLR3 (Wang et al. 2002). Asimismo, igualmente adecuado es poli (ICLC), que es un poli IC complejo con carboximetilcelulosa y poli L-lisina (Longhi et al., 2009), o poli (dA:dT), que es un ADNbc sintético de poli (dA:dT)*poli (dA:dT) complejo con liposomas (Ishii et al., 2006). Los análogos sintéticos adicionales de ácidos nucleicos bc descritos en Wang et al. 2002, Longhi et al., 2009 y Ishii et al., 2006 se incorporan en el presente documento por referencia como análogos sintéticos de ácidos nucleicos bc, que son igualmente adecuados en la presente invención. También son adecuados oligonucleótidos bc artificiales (sentido y antisentido), que pueden proporcionarse en combinación con reactivos transfectantes.

Como se usa en el presente documento, la expresión "diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir sustancias que pueden co-administrarse con el compuesto activo del medicamento y permitir que el compuesto activo realice su función indicada. Ejemplos de tales vehículos incluyen disoluciones, disolventes, medios de dispersión, agentes de retardo, emulsiones y similares. Los usos de tales medios para las sustancias farmacéuticamente activas son muy conocidos en la técnica. Cualquier otro vehículo convencional adecuado para su uso en la presente invención entra dentro del alcance de la presente invención.

30 El término "cantidad eficaz" según la presente invención se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto deseado, en particular uno médico y/o biológico.

En la presente invención, el ácido nucleico bc o análogo del mismo que está estimulando o induciendo la producción de IFN-λ en CD8+ y/o CDce CD8+ es preferentemente ADNbc o ARNbc, que incluyen análogos de los mismos. El ADNbc adecuado puede comprender ADNbc natural tal como ADN genómico que podría ser de origen procariota o eucariota o viral, por ejemplo ADN mitocondrial, ADN de plásmido, ADN viral o ADN tímico. Para facilitar la captación del ADN, pueden emplearse métodos de captación potenciada tales como liposomas, electroporación o nanopartículas.

En una realización, el ácido nucleico bc o análogo del mismo según la presente invención se proporciona por un virus de ADNbc, un virus de ARNbc o un virus de ARNmc. El ARNbc o ADNbc según la presente invención, que incluye análogos del mismo, puede proporcionarse por un virus de ADNbc, un virus de ARNbc, un virus de ADNmc, o un virus de ARNmc positivo. Así, en una realización, el análogo de un ácido nucleico bc según la presente invención es un ácido nucleico mc, que se procesa o puede procesarse en un ácido nucleico bc. Análogos adicionales de un ácido nucleico bc son poli IC, poli AU, poli ICLC, poli dAdT. Se prevé que estos análogos se apliquen en las composiciones, usos y métodos de la presente invención.

45 En diversas realizaciones, el virus es un virus de ARNmc positivo, tal como un togavirus, un flavivirus, un astrovirus, un picornavirus, un calicivirus, un virus del herpes, un nodavirus, un arterivirus o un coronavirus. En diversas realizaciones, el virus es un virus de ARNbc, tal como reovirus o un birnavirus. En diversas realizaciones, el virus es un retrovirus, tal como un HIV-1, HIV-2, o SIV. En diversas realizaciones, el virus es un virus de ADNbc, tal como un asfarvirus, un iridovirus, un virus de la poliomielitis, un virus del papiloma, un papovavirus, un adenovirus, un virus del herpes, un poxvirus, o un hepadnavirus. En una realización preferida, el virus es un poxvirus, tal como un ortopoxvirus o un parapoxvirus. Preferentemente, el poxvirus es un virus de la viruela, un virus de la viruela de la vaca, un virus de la viruela del camello, o un virus de la variolovacuna. Particularmente se prefiere un virus de MVA. En diversas realizaciones, el virus es un virus del herpes, tal como un virus del herpes simple (HSV 1 o HSV 2), virus de la varicela zóster, citomegalovirus humano, virus de Epstein-Barr y virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi.
55

En diversas realizaciones, el ácido nucleico bc o análogo del mismo que estimula la producción de IFN-λ en CD8+ y/o CDce CD8+ se produce por un virus de ADNbc o un virus de ARNmc. En realizaciones preferidas, el virus es un poxvirus, virus del herpes, togavirus, o un coronavirus.

En diversas realizaciones, el ácido nucleico bc o análogo del mismo según la presente invención es reconocido mediante el receptor de tipo toll (TLR) 3 en CDc.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CD SEGÚN LA INVENCIÓN

5 Cuando se usa en el presente documento, el término "células dendríticas convencionales" o "células dendríticas convencionales CD8+", algunas veces también abreviadas como "CDc(s)", engloba células dendríticas convencionales CD8+ de ratón que se caracterizan por las características descritas en el presente documento tales como expresión de los marcadores superficiales (moléculas) (véase la Tabla 1).

10 Aunque CD8 no se expresa en CDc humanas, dicho término, sin embargo, también engloba células dendríticas convencionales humanas (CDc humanas). Las CDc humanas se caracterizan algunas veces en el presente documento como "equivalentes de CD CD8+ de ratón" o "células dendríticas convencionales eCD8+", algunas veces abreviadas "CDce CD8+". Las CDc humanas pueden caracterizarse por las características que se describen en el presente documento (véase, por ejemplo, la Tabla 1), en particular pueden caracterizarse por ser reconocidas por el anticuerpo contra BDCA3. En particular, ha sido desarrollado un conjunto de anticuerpos designados BDCA1-4 para diferenciar entre subconjuntos de CDp y CDc (Dzionek et al., 2000). Basándose en el reconocimiento del anticuerpo 15 contra BDCA3, se han propuesto las CDc positivas para BDCA3 humanas como el equivalente humano a CDc CD8+ de ratón. Común a las CD CD8+ de ratón, las CDc positivas para BDCA3 expresan selectivamente altos niveles de Clec9a y Necl2, pero bajas cantidades de CD11b (Shortman et al., 2009). Así, las CDc BDCA3+ humanas también pueden caracterizarse por la expresión de Clec9a y/o Necl2 como se describe en detalle más adelante.

20 Como se ha descrito anteriormente, las células dendríticas eCD8+ según la presente invención representan un subconjunto de CD convencionales, y las células dendríticas eCD8+ según la presente invención se llaman, por consiguiente, CDce CD8+.

25 Las células dendríticas (CD) son una población heterogénea de células que pueden dividirse en dos poblaciones principales: (1) CD migratorias de tejido no linfóide y residentes de tejido linfóide y (2) CD plasmacitoides (CDp). El término CD "clásicas" o "convencionales" (CDc) se ha usado recientemente para oponer las CD residentes de órgano linfóide a las CDp. Las CD no de órgano linfóide, por otra parte, se llaman principalmente CD de tejido. Mientras que las CD de tejido no linfóide también son diferentes de las CDp, y las CD de tejido no linfóide primarias pueden encontrarse en ganglios linfáticos en la migración, pero no con CDc, el término CDc se refiere a todas las no CDp tanto si están presentes en tejidos linfoides como no linfoides.

30 Dentro del contexto de la presente invención, una célula dendrítica eCD8+ se define como una célula dendrítica convencional no plasmacitoide que no depende de GM-CSF para su desarrollo. En una realización, las células dendríticas según la presente invención se aíslan como en el Ejemplo 2. En una realización, las células dendríticas se aíslan como en el Ejemplo 5.

35 Como se ha desvelado en el presente documento, pueden incubarse células precursoras con un agente que potencia la formación de CD8+ y/o CDc eCD8+ *in vitro* e *in vivo*. El agente que potencia las CD8+ y/o CDc eCD8+ puede ser un ligando de Flt3 o un ligando de receptor de M-CSF. La adición de un ligando de Flt3 puede aumentar los números de CD8+ o CDce CD8+ 30 veces o más. La administración de un ligando de Flt3 para aumentar CD8+ o CDce CD8+ puede combinarse con la estimulación de CD8+ o CDce CD8+ con un ácido nucleico bc o análogo del mismo para aumentar la producción de IFN- λ .

40 Además, pueden incubarse células precursoras con una citocina. Preferentemente, la citocina está seleccionada del grupo que consiste en IL-3, GM-CSF, IL-4 e IFN- γ .

45 En una realización, se aíslan células dendríticas según la presente invención usando anticuerpos contra CD8. En una realización, se aíslan células dendríticas usando anticuerpos contra BDCA3. En diversas realizaciones, se aíslan células dendríticas según la presente invención usando anticuerpos contra Clec9A y/o Necl2. En diversas realizaciones, se aíslan células dendríticas usando anticuerpos contra Clec9A y/o Necl2 y/o CD205. En diversas realizaciones, se aíslan células dendríticas usando anticuerpos contra Clec9A y/o Necl2 y/o CD205 y/o CD11c. En diversas realizaciones, se aíslan células dendríticas usando anticuerpos contra Clec9A y/o Necl2 y/o CD205 y/o CD11c y/o CD24. En diversas realizaciones, se aíslan células dendríticas usando anticuerpos contra Clec9A y/o Necl2 y/o CD205 y/o CD11c y/o CD24 y/o CD11b. En diversas realizaciones, se aíslan células dendríticas usando anticuerpos contra Clec9A y/o Necl2 y/o CD205 y/o CD11c y/o CD24 y/o CD11b y/o CD172a. En diversas realizaciones, se aíslan células dendríticas usando anticuerpos contra Clec9A y/o Necl2 y/o CD205 y/o CD11c y/o CD24 y/o CD11b y/o CD172a y/o MHC-II. En diversas realizaciones, se aíslan células dendríticas usando anticuerpos contra Clec9A y/o Necl2 y/o CD205 y/o CD11c y/o CD24 y/o CD11b y/o CD172a y/o MHC-II y/o CD103.

55 El aislamiento de CDc según la presente invención puede basarse en antígenos de superficie expresados positivos combinados con antígenos de superficie negativos o de baja expresión. Entre los marcadores superficiales altamente expresados en células eCD8+ están Clec9A, Necl2, CD8, CD103, CD24, CD205, CD36, CD97, CD162, MHC-I, MHC-II, CD11c y BDCA3 (=CD141), mientras que antígenos de superficie negativos o de expresión más baja que pueden usarse para discriminar subconjuntos de CD también de otras células inmunitarias son el antígeno

BDCA1 (=CD1c), BDCA2, BDCA4, CD3, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD45R, CD45RA, CD172a, PDCA1, BST2 y F4/80.

Las CDc CD8+ son claramente un subconjunto de CD funcionalmente distinto. Sin embargo, estos atributos funcionales pueden no siempre corresponderse con la expresión de CD8. Así, aparte de la molécula de CD8, pueden usarse otras combinaciones de marcadores superficiales para caracterizar CDc CD8+ o sus equivalentes funcionales que pueden carecer de expresión de CD8 (eCD8+). Entre las células altas de la clase II de MHC CD11c⁺ pueden usarse diversas combinaciones de alta expresión de CD205, CD103, Necl2, Clec9a, CD24 acompañada de expresión negativa o baja de CD11b y CD172a, como se ha mencionado en el presente documento anteriormente. Así, en diversas realizaciones, las células dendríticas CD8+ y eCD8+ según la presente invención se caracterizan por antígenos de superficie expresados positivos combinados con antígenos de superficie negativos o de baja expresión como se ha mencionado anteriormente. Además, en diversas realizaciones, las células dendríticas CD8+ y eCD8+ según la presente invención se caracterizan por los marcadores superficiales altamente expresados como se ha mencionado anteriormente. En una realización preferida, las células dendríticas CD8+ y eCD8+ según la presente invención tienen una alta expresión de Clec9A. En otra realización preferida, las células dendríticas CD8+ y eCD8+ según la presente invención tienen una alta expresión de Necl2. En una realización preferida todavía adicional, las células dendríticas convencionales CD8+ y eCD8+ según la presente invención tienen una alta expresión de Clec9A y/o Necl2. En diversas realizaciones según la presente invención, las CD8+ y CDce CD8+ según la presente invención son células dendríticas BDCA3+ humanas.

En diversas realizaciones según la presente invención, las CD8+ y/o CDce CD8+ tienen una alta expresión de Clec9A y Necl2. La alta expresión de Clec9a y Necl2 puede detectarse como se describe en Hochrein et al., 2008, y Shortman et al., 2009.

APLICACIONES TERAPÉUTICAS

Un aspecto dentro de la divulgación del contexto de la invención describe una composición que comprende un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo para su uso en la inducción de la producción de IFN-λ en células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+, en la que dichas CDce CD8+ expresan Clec9a y/o Necl2.

Otro aspecto describe el uso de un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo para la preparación de una composición farmacéutica para la inducción de la producción de IFN-λ en células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+, en el que dichas CDce CD8+ expresan Clec9a y/o Necl2.

Los IFN-λ poseen funciones antivirales, antitumores y diversas funciones inmunomoduladoras (Li et al., 2009). Por consiguiente, las CDc según la presente invención que producen IFN-λ tienen una posible función antiviral, antitumoral y/o inmunomoduladora. Cualquiera de estas funciones puede usarse para prevenir y/o tratar una enfermedad dependiente de IFN-λ, es decir, una enfermedad cuyo tratamiento con IFN-λ es beneficioso para un sujeto que padece una enfermedad tal. Una enfermedad dependiente de IFN-λ puede ser una enfermedad infecciosa o cáncer.

La enfermedad dependiente de IFN-λ puede ser una enfermedad de la sangre, bazo, pulmón, amígdalas, ganglios linfáticos, colon o hígado. Como se describe en el presente documento, las CDc residen en particular en la sangre, bazo, amígdalas, ganglios linfáticos y/o el hígado. Por consiguiente, se cree que en estas localizaciones es altamente beneficioso tener productores de IFN-λ de manera que las CDc puedan ejercer su actividad antiviral y/o inmunomoduladora con el fin de luchar contra los agentes causantes de una enfermedad infecciosa. La enfermedad infecciosa puede ser una infección viral. La infección viral puede producirse por un virus que comprende ARNbc o ADNbc, bien como su genoma o bien como producto intermedio de replicación.

En algunas realizaciones preferidas, la infección viral es una descrita en el presente documento, más preferentemente es una infección viral persistente, incluso más preferentemente es una infección viral del hígado o una infección por el virus del herpes, particularmente preferentemente es una infección por el virus de la hepatitis. Como se ha mencionado anteriormente, las CDc residen en el hígado y, así, es ventajoso inducir la producción de IFN-λ directamente en la localización donde la infección está perdurando.

Similarmente, se asume que IFN-λ ejerce una actividad inmunomoduladora, así puede activar células inmunitarias que reconocen y atacan/eliminan células cancerosas, tales como células de cáncer de hígado.

Dentro del contexto de la presente invención se desvela el uso de una composición que comprende un ácido nucleico bc o análogo del mismo que se dirige a CD8+ y/o CDce CD8+ en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad infecciosa, preferentemente una infección viral, o cáncer.

También se describe una preparación combinada que comprende un ácido nucleico bc o análogo del mismo que se dirige a CD8+ y/o CDce CD8+ y un agente que potencia la producción de IFN-λ basada en ácido nucleico bc.

El ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo puede administrarse a células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+ de un sujeto *ex vivo*. Se prefiere que dichas CDc se aislen, es decir, obtengan de un sujeto. Dicho sujeto está preferentemente en necesidad de prevención o tratamiento de una enfermedad dependiente de

IFN-λ. Dichas CD se obtienen del sujeto por medios y métodos comúnmente conocidos en la técnica. El término "ex vivo", que es intercambiable con el término "in vitro", se refiere a actividades realizadas en un entorno controlado que está separado del cuerpo humano. Como se usa en el presente documento y en la materia, este término se usa frecuentemente indistintamente con el término "in cultivo".

5 La composición, además de la preparación combinada, puede caracterizarse por que el ácido nucleico bc o análogo del mismo comprendido por la composición o preparación combinada se dirige a CD8+ y/o CDce CD8+. Con el fin de dirigirse a CD8+ o CDce CD8+, los estímulos para la producción de IFN-λ en aquellas células, es decir, ácidos nucleicos bc o análogos de los mismos, pueden acoplarse a o integrarse en vehículos, junto con una o más moléculas de unión de marcador superficial para CD8+ y CDce CD8+. Las moléculas de unión de marcador superficial para CD8+ y CDce CD8+ pueden ser anticuerpos para, por ejemplo, CD1d, CD8a, CD11c, CD24, CD36, CD40, CD49f, CD103, CD135, CD141, CD162, CD205, CD207, Necl2, Clec9a, XCR1, TLR10, TLR11, TLR12 y/o TLR13. Así, la composición, además de la preparación combinada, puede comprender un ácido nucleico bc o un análogo del mismo acoplado a o integrado en vehículos junto con una o más de tales moléculas de unión de marcador superficial para CD8+ y CDce CD8+.

15 Otras posibilidades incluyen ligandos naturales o artificiales para los marcadores superficiales expresados por CDc CD8+ o CDce CD8+, por ejemplo, glicolípidos (para CD1d), MHC-I (para CD8), fibronectina (para CD11c), laminina (para CD49f), CD62P (para CD24), lipoproteínas de baja densidad oxidadas (para CD36), ligando de CD40 (para CD40), E-cadherina (para CD103), ligando de Flt3 (para CD135), trombina (para CD141), P-selectina (para CD162), manosa, N-acetilglucosamina o moléculas que contienen fucosa (para DEC207), molécula asociada a linfocitos T restringidos a la clase I (CRTAM) (para Necl2), células muertas (para Clec9a), ligando de XCR1 (para XCR1), ligando de TLR10 (para TLR10), antígeno de toxoplasma o profilina (para TLR11), ligando de TLR12 (para TLR12) y/o ligando de TLR13 (para TLR13). En particular, la composición, además de la preparación combinada, puede comprender un ácido nucleico bc o un análogo del mismo acoplado a o integrado en vehículos junto con uno o más de tales ligandos naturales o artificiales para los marcadores superficiales expresados por CDc CD8+ o CDce CD8+.

20 Las moléculas de unión selectivas para CDc CD8+ anteriormente mencionadas pueden ser directamente o indirectamente conectadas a los estímulos (ácidos nucleicos bc o análogos de los mismos), por ejemplo por enlace covalente, complejos de unión a molécula adaptadora (por ejemplo, complejos de biotina-avidina) que se unen a microesferas, nanopartículas, partículas similares a virus y/o liposomas.

30 Cuando se usa en el presente documento, ácido nucleico bc o análogo del mismo que "se dirige a (o cualquier forma gramatical del mismo) células CD8+ y/o células dendríticas convencionales eCD8+" incluye también que los ácidos nucleicos bc son reconocidos mediante ciertos TLR. En particular, el ARNbc es reconocido mediante TLR-3, el ADNbc reconocido mediante TLR-9 y el ARNmc reconocido mediante TLR-7. En otras palabras, "dirigir" preferentemente incluye que el reconocimiento de ARNbc por CDc está mediado por TLR-3.

35 Por consiguiente, en caso de CDc humanas, el reconocimiento de ácidos nucleicos bc, en particular ARNbc está mediado por TLR-3, es decir, ácido nucleico bc, en particular el ARNbc se dirige a CDc mediante TLR-3.

En particular, las CDc humanas y de ratón no expresan TLR-7 y las CDc humanas no expresan TLR-9, tampoco. Sin embargo, el ADNbc es reconocido por CDc humanas como se muestra en el Ejemplo 11. Por consiguiente, el ADNbc puede ser dirigido a CDc humanas independientes de TLR, es decir, independientes de TLR dependientes de MyD88, en particular independientes de TLR-7 y/o TLR-9 como se describe en el presente documento.

40 También pueden aplicarse ácidos nucleicos bc conjuntamente con células muertas, que son selectivamente reconocidas por CD8+ y CDce CD8+ mediante Clec9a y hasta ahora receptores de captación desconocidos. Las células muertas y moribundas después de la infección viral *in vitro* serían otra aplicación dirigida de los ácidos nucleicos bc, que se generan por las células antes de la muerte, conjuntamente con una estimulación de CDc CD8+ y eCD8+ selectiva. Así, la infección viral de células *in vitro* proporciona células muertas o moribundas cargadas con ácido nucleico bc proporcionado por el virus infectante. Tales células muertas y/o moribundas son selectivamente capturadas por CD8+ y/o CDce CD8+ y provocan la producción de IFN-λ en dichas CD8+ y/o CDce CD8+ por estimulación con el ácido nucleico bc proporcionado por el virus infectante. Las células que van a usarse para la infección viral *in vitro* pueden ser cualquier célula, en tanto que tales células no sean inmunogénicas para el sujeto, al que se administran las células muertas y/o moribundas cargadas con ácido nucleico bc de un virus.

50 La preparación combinada como se desvela en el presente documento puede comprender un ácido nucleico bc o análogo del mismo que se dirige a CD8+ y/o CDce CD8+ y un agente que potencia la producción de IFN-λ basada en ácido nucleico bc, en la que dicho agente de potenciamiento es un ligando de Flt3, un ligando de receptor de M-CSF, un ligando de TLR2, un ligando de TLR4, un ligando de TLR9, un ligando de TLR10, un ligando de TLR11, un ligando de CD40, IL-3, GM-CSF, IL-4o IFN-γ. Como los inventores de la presente solicitud encontraron que CD8+ y CDce CD8+ producen cantidad potenciada de IFN-λ a modo de combinación de ácidos nucleicos bc y otros estímulos, en los que los últimos no inducen ellos mismos la producción de IFN-λ (por ejemplo, ciertos ligandos de TLR (véase Fig. 2A) o ligandos de CD40), el ácido nucleico bc puede aplicarse junto con un estímulo potenciador para aumentar la producción de IFN-λ. Así, el enlace de, por ejemplo, un ligando de CD40 y ácido nucleico bc, logra ambos, dirigirse a CDc CD8+ y CDce CD8+, respectivamente, y producción potenciada de IFN-λ derivado de CD8+ y/o CDce CD8+. Por consiguiente, el método anteriormente descrito para la prevención y/o el tratamiento de una

5 enfermedad infecciosa o cáncer que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una composición que comprende un ácido nucleico bc o análogo del mismo que se dirige a CD8+ y/o CDce CD8+ comprende además la administración de un agente que potencia la producción de IFN-λ basada en ácido nucleico bc. Dicho agente potenciador puede ser un ligando de Flt3, un ligando de receptor de M-CSF, un ligando de TLR2, un ligando de TLR4, un ligando de TLR9, un ligando de TLR10, un ligando de TLR11, un ligando de CD40, IL-3, GM-CSF, IL-4 o IFN-γ.

10 La composición o la composición aplicada en los métodos y el uso como se describen pueden comprender además un agente que potencia la producción de IFN-λ basada en ácido nucleico bc. El agente que potencia la producción de IFN-λ basada en ácido nucleico bc puede ser un agente que es un ligando de TLR, en el que el ligando de TLR es preferentemente un ligando de TLR2, un ligando de TLR4, un ligando de TLR9, un ligando de TLR10 o un ligando de TLR11; o un miembro de la familia de TNF, en el que el miembro de la familia de TNF es preferentemente un ligando de CD40 o una citocina, en el que la citocina es preferentemente un ligando de Flt3, un ligando de receptor de M-CSF, IL-3, GM-CSF, IL-4 o IFN-γ.

15 Dicho agente que potencia la producción de IFN-λ basada en ácido nucleico bc por células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+ puede administrarse a CD8+ y/o CDce CD8+ *ex vivo*. Antes de la administración, dichas CDc se aíslan de un sujeto.

20 La composición o la composición aplicada en los usos o métodos de la presente invención puede comprender además un agente que aumenta el nivel de células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+. Dicho agente puede ser un ligando de Flt3 o un ligando de receptor de M-CSF. En otras palabras, se desvela un ligando de Flt3 o un ligando de receptor de M-CSF para su uso en aumentar el nivel de CD8+ y/o CDce CD8+ en un sujeto que padece una enfermedad infecciosa o cáncer.

Dicho agente que aumenta el nivel de células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+ puede administrarse a CD8+ y/o CDce CD8+ *ex vivo*.

Antes de la administración, dichas CDc se aíslan de un sujeto.

25 Por ejemplo, se desvela un método o uso para aumentar el nivel de CD8+ y/o CDce CD8+ en un sujeto que padece una enfermedad infecciosa o cáncer que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo un agente que aumenta el nivel de células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+. Preferentemente, dicho agente es un ligando de Flt3 o un ligando de receptor de M-CSF.

30 El ligando de Flt3 o ligando de receptor de M-CSF puede administrarse al sujeto a una dosificación suficiente para aumentar el nivel de CD8+ y/o CDce CD8+ en dicho sujeto. El ligando de receptor de M-CSF puede ser M-CSF o IL-34. El método de aumento del nivel de CD8+ y/o CDce CD8+ en un sujeto que padece una enfermedad infecciosa o cáncer puede comprender administración de un ácido nucleico bc o análogo del mismo al sujeto, además de un ligando de Flt3 o un ligando de receptor de M-CSF. Dicha administración adicional de un ácido nucleico bc o análogo del mismo estimula la producción de IFN-λ en el sujeto que padece una enfermedad infecciosa o cáncer.

35 Suponiendo que parece ser beneficioso aumentar el nivel de CD8+ y/o CDce CD8+ en un sujeto, ya que dichas CDc no están abundantemente presentes en un sujeto, se desvela una composición que comprende un agente que aumenta el nivel de células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+, en la que dichas CDce CD8+ expresan Clec9a y/o Nec12, en combinación con un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo para su uso en un método de prevención y/o tratamiento de una enfermedad dependiente de IFN-λ, que comprende (a) administrar a un sujeto dicho agente que aumenta el nivel de células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+; y (b) administrar a un sujeto un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo para inducir la producción de IFN-λ en células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+.

45 Se prevé que las etapas (a) y (b) se realicen la una tras la otra. Sin embargo, puede haber un espacio entre la realización de ambas etapas. Por ejemplo, puede esperarse el aumento del número de CDc antes de que dichas CDc se pongan en contacto con un ácido nucleico bc o análogo del mismo con el fin de inducir la producción de IFN-λ.

50 El agente que aumenta el nivel (es decir, número) de células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+ puede administrarse en una cantidad suficiente para aumentar el nivel de células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+ en un sujeto. Un aumento se mide por el número de CDc en comparación con un sujeto al que no se administra dicho agente.

Similarmente, un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo puede administrarse en una cantidad suficiente para inducir la producción de IFN-λ en CD8+ y/o CDce CD8+.

Como se ha mencionado anteriormente, dicho agente que aumenta el nivel (es decir, número) de células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+ es un ligando de Flt3 o un ligando de receptor de M-CSF o ambos de ellos.

Dado lo anterior, se desvela un método de inducción de la producción de IFN-λ en una población de CDc que comprende poner en contacto *ex vivo* CDc con un ácido nucleico bc o análogo del mismo. Como se ha mencionado antes, se prefiere que dichas CDc se pongan en contacto, antes de ponerse en contacto con un ácido nucleico bc o análogo, con un agente que aumenta el nivel (número) de CDc. En particular, para inducir dicha producción de IFN-λ *ex vivo*, se obtienen CDc de un sujeto. En el método para inducir la producción de IFN-λ en una población de CDc, el sujeto del que se obtienen las CDc es preferentemente un sujeto en necesidad de un tratamiento con CDc inducidas para producir grandes cantidades de IFN-λ. Así, el sujeto puede ser un sujeto en necesidad de una prevención y/o tratamiento de una enfermedad dependiente de INF-λ, preferentemente una enfermedad infecciosa, preferentemente una infección viral, o cáncer. Las CDc pueden obtenerse preferentemente de un sujeto que padece una infección viral persistente, más preferentemente una infección viral del hígado o una infección por el virus del herpes, todavía más preferentemente una infección por el virus de la hepatitis. Tras la incubación *ex vivo* con un agente que aumenta el nivel (número) de CDc y/o un ácido nucleico bc o análogo del mismo, las CDc se recogen y se resuspenden en medios apropiados para terapia, es decir, para ser reintroducidas en el sujeto del que se derivaron. Así, en el método para inducir la producción de IFN-λ en una población de CDc, las CDc son preferentemente CDc autólogas. La re-introducción al sujeto en necesidad de las mismas puede llevarse a cabo por varios enfoques comúnmente conocidos, como, por ejemplo, inyección intravenosa. Además, la población de CDc inducida para la producción de IFN-λ puede ser re-introducida en una variedad de formulaciones farmacéuticas.

Como se ha mencionado, puede administrarse una población de CDc inducida para producir IFN-λ poniendo en contacto *ex vivo* CDc con nucleico bc o un análogo del mismo a un sujeto en necesidad de las mismas. Por consiguiente, se describe un método de inducción de una reacción contra una enfermedad dependiente de IFN-λ, preferentemente una enfermedad infecciosa o cáncer, *in vivo* que comprende poner en contacto *ex vivo* CDc con un ácido nucleico bc o análogo del mismo e introducirlas en un sujeto que padece una enfermedad infecciosa o cáncer. Preferentemente, dichas CDc se ponen en contacto antes con un agente que aumenta el número de CDc. En otras palabras, se desvela un método para la prevención y/o el tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad dependiente de IFN-λ, preferentemente una enfermedad infecciosa o cáncer, que comprende administrar a dicho sujeto CDc que producen IFN-λ generadas por a un método *ex vivo* para inducir la producción de IFN-λ en una población de CDc, comprendiendo dicho método poner en contacto *ex vivo* CDc con un ácido nucleico bc o análogo del mismo. Preferentemente, dichas CDc se ponen en contacto antes con un agente que aumenta el número de CDc.

Adicionalmente se desvela un método para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad infecciosa o cáncer que comprende: (a) proporcionar un sujeto que padece una enfermedad infecciosa o cáncer; (b) obtener CDc de dicho sujeto; (c) poner en contacto dichas CDc *ex vivo* con un ácido nucleico bc o análogo del mismo para generar una población de CDc que produce IFN-λ; y (d) re-introducir dicha población de CDc que producen IFN-λ en dicho sujeto para inducir una reacción terapéutica *in vivo* contra la enfermedad infecciosa o cáncer.

Preferentemente, la etapa (c) va precedida de la etapa (b'): poner en contacto dichas CDc con un agente que aumenta el número de CDc.

Preferentemente, la población de CDc se lava antes de la re-introducción en el sujeto. La población de CDc que producen IFN-λ puede resuspendirse en medios adecuados para administración al sujeto en necesidad de las mismas. Las poblaciones de IFN-λ que producen CDc pueden ser re-introducidas al sujeto por varios enfoques muy conocidos como, por ejemplo, inyección intravenosa.

Como se ha mencionado anteriormente, generalmente se prefiere que en la divulgación, que se refiere a y/o incluye poner en contacto *in vivo* o *ex vivo* CDc con un ácido nucleico bc o análogo del mismo para inducir la producción de IFN-λ en una población de CDc, preferentemente CDc que son pre-tratadas con un agente que aumenta el nivel (número) de CDc, dicho agente es preferentemente un ligando de Flt3 y/o ligando de receptor de M-CSF, se pongan en contacto *ex vivo* o *in vivo* con un ácido nucleico bc o análogo del mismo. Por ejemplo, esto significa que un ligando de Flt3 y/o un ligando de receptor de M-CSF se administra a un sujeto antes de obtener las CDc de dicho sujeto para inducir la producción de IFN-λ poniendo en contacto *ex vivo* las CDc obtenidas con un ácido nucleico bc o análogo del mismo. Alternativamente, un ligando de Flt3 y/o un ligando de receptor de M-CSF se administran a CDc obtenidas de un sujeto.

Por ejemplo, este pretratamiento con un ligando de Flt3 y/o un ligando de receptor de M-CSF proporciona aumentar la formación/nivel de CDc en dicho sujeto antes de la obtención de tales CDc pretratadas de dicho sujeto para poner en contacto *ex vivo* dichas CDc pretratadas con un ácido nucleico bc o análogo del mismo.

En el contexto de obtener CDc de un sujeto para poner en contacto *ex vivo* CDc con un agente que aumenta el número de CDc y/o un ácido nucleico bc o análogo del mismo para inducir la producción de IFN-λ en una población de CDc, métodos de obtención/aislamiento de CDc de un sujeto son muy conocidos para el experto en la materia. Como se ha desvelado en el presente documento, los términos "obtener CDc de un sujeto" y "aislar CDc de un sujeto" tienen el mismo significado.

En la divulgación, que se refiere a/incluye poner en contacto *ex vivo* CDc con un agente que aumenta el número de CDc y/o con un ácido nucleico bc o análogo del mismo para inducir la producción de IFN-λ en una población de CDc,

CDc obtenidas/aisladas de un sujeto pueden incubarse además con un ligando de TLR2, TLR4, TLR9, TLR10, TLR11 o de CD40. Esta incubación aumenta la expresión de IFN-λ. En diversas realizaciones, el ligando es Pam3Cys, LPS, CpG-ODN, profilina o un ligando de CD40. En diversas realizaciones, las CDc obtenidas/aisladas de un sujeto pueden incubarse además con una citocina, en las que la citocina es preferentemente IL-3, GM-CSF, IL-4 o IFN-gamma (IFN-γ).

En las aplicaciones terapéuticas según la presente invención, la enfermedad infecciosa es preferentemente una infección viral. Más preferentemente, en las aplicaciones terapéuticas según la presente invención la infección viral es una infección viral persistente. Todavía más preferentemente, la infección viral persistente es una infección viral del hígado o una infección por el virus del herpes. En una realización específicamente preferida, dicha infección viral del hígado es una infección por el virus de la hepatitis. En la presente invención, una infección por el virus de la hepatitis incluye una infección por el virus de la hepatitis A, una infección por el virus de la hepatitis B, una infección por el virus de la hepatitis C, una infección por el virus de la hepatitis D y una infección por el virus de la hepatitis E, en la que el infección por el virus de la hepatitis es preferentemente una infección por el virus de la hepatitis C. En otra realización preferida, en la presente invención la infección viral persistente es una infección retroviral.

El sujeto según la divulgación incluye animales y ser humano. Según la presente divulgación, un "sujeto" debe significar un animal humano o vertebrado que incluye un perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra, pollo, mono, rata y ratón. En las diversas realizaciones según la presente invención, el sujeto es preferentemente el ser humano y las CDc CD8+ son CDc BDCA3+ humanas.

El sujeto que padece cáncer puede ser un sujeto que padece una enfermedad tumoral. Preferentemente, la enfermedad tumoral es un carcinoma, es decir, un cáncer o tumor de las células epiteliales o tejido epitelial en un sujeto. Preferentemente, el carcinoma es un carcinoma de células escamosas o un adenocarcinoma. Más preferentemente, el carcinoma es cáncer de pulmón de células escamosas.

En las composiciones, usos y métodos, además de en las aplicaciones terapéuticas descritas anteriormente, un ácido nucleico bc puede usarse solo o en combinación con uno o varios de otros usos terapéuticos y métodos contra el cáncer o antitumorales, en los que tales usos terapéuticos y métodos están seleccionados preferentemente de quimioterapia antitumoral e inmunoterapia. Así, un ácido nucleico bc o análogo del mismo que se dirige a CD8+ y/o CDc CD8+ según la presente invención, es decir, que es capaz de estimular o inducir la producción de IFN-λ en CD8+ o CDc CD8+, puede administrarse antes de, junto con o después de la administración de una quimioterapia o inmunoterapia para aumentar la sensibilidad de las células malignas a la posterior quimioterapia o inmunoterapia. También se desvela un método para la producción de IFN-λ en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un ácido nucleico bc o análogo del mismo que se dirige a CD8+ y/o CDc CD8+.

Se desvela además una preparación combinada que comprende un ácido nucleico bc o análogo del mismo que se dirige a CD8+ y/o CDc CD8+ y un agente que potencia la producción de IFN-λ basada en ácido nucleico bc. El agente que potencia la producción de IFN-λ basada en ácido nucleico bc puede ser un ligando de Flt3, un ligando de receptor de M-CSF, un ligando de TLR2, un ligando de TLR4, un ligando de TLR9, un ligando de TLR10, un ligando de TLR11, IL-3, GM-CSF, IL-4 o IFN-γ.

En una realización preferida, el ácido nucleico bc o análogo del mismo usado para aplicaciones terapéuticas es ADNbc o ARNbc. Más preferentemente, el ácido nucleico bc o análogo del mismo según la presente invención se proporciona por un virus de ADNbc, un virus de ARNbc, un virus de ARNmc o un virus de ARNmc positivo. Así, en una realización, el análogo de un ácido nucleico bc es un ácido nucleico mc, que se procesa o puede procesarse a un ácido nucleico bc.

MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE IFN-λ Y/O GENERACIÓN U OBTENCIÓN DE UNA POBLACIÓN DE CD8+ Y/O CDc CD8+ QUE PRODUCEN IFN-λ

La descripción proporciona un método de producción de IFN-λ y/o generación u obtención de una población de CD8+ o CDc CD8+ que producen IFN-λ, que comprende las etapas de: (a) proporcionar una población de células que comprende CD8+ y/o CDc CD8+; y (b) poner en contacto las CDc con un ácido nucleico bc o análogo del mismo. El poner en contacto las CDc con el ácido nucleico bc o análogo del mismo estimula la producción de IFN-λ. Dicha población de células puede incubarse con un potenciador de la producción de IFN-λ. Más preferentemente, dicho potenciador es un ligando de TLR o un miembro de la familia de TNF. Todavía más preferentemente, el ligando de TLR es un ligando de TLR2, TLR4, TLR9, TLR10 o TLR11 y el miembro de la familia de TNF es un ligando de CD40 o una citocina. Incluso más preferentemente, la citocina es IFN-γ. La combinación de un ácido nucleico bc o análogo del mismo, por ejemplo poli IC, y un ADN de CpG inmunoestimulante, por ejemplo CpG-1668, induce sinérgicamente cantidades incluso mayores de IFN-λ por CDc CD8+.

En los métodos anteriormente descritos de producción de IFN-λ y/o generación u obtención de una población de CD8+ o CDc CD8+ que producen IFN-λ, la población de células puede incubarse además con una citocina. La citocina puede seleccionarse del grupo que consiste en IL-3, GM-CSF, IL-4 e IFN-γ.

Dentro del contexto de la presente invención se desvela un método *in vitro* de producción de IFN- λ y/o generación u obtención de una población de células dendríticas convencionales CD8+ o eCD8+ que producen IFN- λ , en el que dichas CDce CD8+ expresan Clec9a y/o Necl2, que comprende las etapas de:

- 5 (a) proporcionar una población de células que comprende células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+;
- (b) poner en contacto dichas células dendríticas convencionales con un agente que aumenta el nivel de dichas células dendríticas convencionales, preferentemente ligando de Flt3 o ligando de receptor de M-CSF; y
- 10 (c) poner en contacto dichas células dendríticas convencionales con un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo.

Dicho poner en contacto puede lograrse, por ejemplo, recogiendo dichas CDc en una bolsa recubierta con un agente que aumenta el nivel de dichas células dendríticas convencionales y/o con un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo. Alternativamente, dicho poner en contacto puede lograrse cultivando dichas CDc.

15 Preferentemente, la población de células se incuba además con un potenciador de la producción de IFN- λ . Dicho potenciador es preferentemente un ligando de TLR, en el que el ligando de TLR es preferentemente un ligando de TLR2, un ligando de TLR4, un ligando de TLR9, un ligando de TLR10 o un ligando de TLR11; o un miembro de la familia de TNF, en el que el miembro de la familia de TNF es preferentemente un ligando de CD40 o una citocina, en el que la citocina es preferentemente IL-3, GM-CSF, IL-4 o IFN- γ .

20 Los métodos anteriormente descritos pueden comprender además una etapa de identificar y/o detectar IFN- λ producido por las CDc estimuladas por ácido nucleico bc. Los métodos anteriormente descritos todavía pueden comprender además una etapa de aislar y/o separar el IFN- λ producido por las CDc estimuladas por ácido nucleico bc. Dentro del contexto de la divulgación, los métodos anteriormente descritos pueden comprender además una etapa de identificar y/o aislar y/o separar el CD8+ y/o CDce CD8+ que producen IFN- λ .

25 El IFN- λ producido por CD8+ y/o CDce CD8+ puede detectarse y cuantificarse por técnicas muy conocidas en la técnica, tales como aquellas en los ejemplos. El IFN- λ producido por las CDc según la presente invención también puede recogerse, aislarse y purificarse por técnicas bioquímicas convencionales.

Así, se desvela una población de CDc que producen IFN- λ obtenibles por un método de inducción de la producción de IFN- λ en una población de CDc, además de una composición farmacéutica que comprende dicha población de CDc que producen IFN- λ . Dichas CDc son preferentemente CDc humanas.

30 Preferentemente, dicha población de CDc que producen IFN- λ contiene más del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de CD8+ y/o CDce CD8+. En diversas realizaciones preferidas, las CDc son preferentemente CDc BDCA3+ humanas. En una realización, la población de células que comprende CD8+ y/o CDce CD8+ comprende más del 50 % de CDce CD8+. En otra realización preferida, la población de células que comprende CD8+ y/o CDce CD8+ comprende más del 75 % de CDce CD8+.

35 En otra realización preferida, la población de células que comprende CD8+ y/o CDce CD8+ comprende más del 85 % de CDce CD8+.

40 En una realización, la población de células que comprende CD8+ y/o CDce CD8+ comprende más del 50 % de CDc BDCA3+ humanas. En otra realización preferida, la población de células que comprende CD8+ y/o CDce CD8+ comprende más del 75 % de CDc BDCA3+ humanas. En otra realización preferida, la población de células que comprende CD8+ y/o CDce CD8+ comprende más del 85 % de CDc BDCA3+ humanas.

45 Se describe una población de CD8+ y/o CDce CD8+ que producen IFN- λ o una línea celular de una CDc CD8+ y/o eCD8+ que produce IFN- λ obtenible por los métodos anteriormente descritos para generar u obtener una población de CD8+ o CDce CD8+ que producen IFN- λ . Además, se desvela una composición farmacéutica que comprende una población de CD8+ y/o CDce CD8+ que producen IFN- λ obtenibles por los métodos anteriormente descritos para generar u obtener una población de CD8+ o CDce CD8+ que producen IFN- λ . Dicha composición farmacéutica comprende opcionalmente además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

MÉTODOS DE DETECCIÓN O CRIBADO DE CD8+ Y CDce CD8+

50 La producción de IFN- λ en respuesta a un ácido nucleico bc o un análogo del mismo, por ejemplo poli IC, puede usarse para detectar, diagnosticar o cribar la presencia de CDce CD8+ incluso en mezclas complejas de diferentes células y aunque la cantidad de CDce CD8+ sea muy baja (véase la Fig. 3A). Puede usarse IFN- λ como marcador para el hallazgo de subconjuntos de células CD8+ y/o eCD8+, que así pueden ser dirigidas en ciertas situaciones, por ejemplo cuando se desea aumentar la cantidad de CD8+ y/o CDce CD8+.

También se desvelan métodos de detección o cribado de la presencia de CD8+ y/o CDce CD8+. En particular, se desvela un método *in vitro* de detección o cribado de CD8+ y/o CDce CD8+, que comprende las etapas de: (a)

proporcionar una población de células; (b) poner en contacto las células con un ácido nucleico bc o análogo del mismo capaz de estimular o inducir la producción de IFN- λ en CD8+ y/o CDce CD8+; (c) detectar la producción de IFN- λ ; y (d) correlacionar la producción de IFN- λ con la presencia de CD8+ y/o CDce CD8+. Dicho método puede ser un método de detección o cribado de la presencia de CD8+ y/o CDce CD8+ en una biopsia, preferentemente una biopsia de un órgano o sangre. Así, puede comprobarse una biopsia de un órgano o sangre para la presencia de aquellas células mediante su producción de IFN- λ única en respuesta a un ácido nucleico bc o un análogo del mismo. Como la producción de IFN- λ es bastante constante después de la inducción, puede cuantificarse la cantidad de CD8+ y/o CDce CD8+ específicas en, por ejemplo, el cuerpo de un sujeto o cultivo celular. Así, pueden detectarse/diagnosticarse y determinarse condiciones donde la cantidad de CD8+ y/o CDce CD8+ es elevada o reducida. El método de detección o cribado de CD8+ y/o CDce CD8+ puede comprender además una etapa de separar y/o aislar CD8+ y/o CDce CD8+ que producen IFN- λ . Los métodos pueden comprender además medir la producción de IFN- λ de dichas CDc que producen IFN- λ separadas y/o aisladas.

El IFN- λ producido por CD8+ y/o CDce CD8+ puede detectarse y cuantificarse por técnicas muy conocidas en la técnica, tales como aquellas en los ejemplos. El IFN- λ producido por las células dendríticas también puede recogerse, aislarse y purificarse por técnicas bioquímicas convencionales.

En un aspecto adicional, se desvela un método *in vitro* de detección o cribado de células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+ humanas, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una población de células que comprende células dendríticas humanas;

(b) seleccionar células dendríticas BDCA3+

(c) poner en contacto dichas células BDCA3+ con un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo;

(d) detectar la producción de IFN- λ ; y

(e) correlacionar la producción de IFN- λ con la presencia de células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+.

En el método *in vitro* como se desvela, la etapa (c) puede ir precedida de la etapa (b'): poner en contacto dichas células BDCA3+ con un agente que aumenta el número de dichas células BDCA3+. Dicha etapa b' puede ayudar en la amplificación de la detección de la producción de IFN- λ , ya que más células BDCA3+ estarán presentes que pueden así producir más IFN- λ .

Dicho método puede ser para cribar o detectar la presencia de células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+ humanas en una biopsia, preferentemente una biopsia de un órgano o sangre.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** representa CDc CD8+ esplénicas que son los principales productores de IFN- λ en respuesta a poli IC. Se estimularon subconjuntos de CDc esplénicas altamente purificadas a 5×10^5 /ml en presencia de IL-3 y GM-CSF con los estímulos como se indica en los ejemplos. Después de 18 horas, se analizaron los sobrenadantes para IFN- λ . Se muestran resultados representativos de 3 experimentos independientes. Los datos representan media +/- DE de muestras duplicadas.

Las **Figuras 2A-C** representan que la producción de IFN- λ o IL-12p70 por CDc CD8+ depende de los estímulos y las condiciones de citocinas. Se estimularon CDc CD8+ esplénicas clasificadas a 5×10^5 /ml y los sobrenadantes se analizaron después de 18 horas para IFN- λ e IL-12p70. (A) Estimulación en presencia de IL-3 y GM-CSF con los estímulos como se indica. (B) Estimulación con una combinación de poli IC + CpG-1668 con las citocinas como se indica. (C) Estimulación en presencia de IL-3 + IL-4 + IFN- γ + GM-CSF con los estímulos como se indica. Se muestran resultados representativos de al menos 2 experimentos independientes. Los datos representan media +/- DE de muestras duplicadas.

Las **Figuras 3A y B** representan que FL participa en la producción de IFN- λ *in vivo*. (A) Se estimularon células de hígado no parenquimatosas totales aisladas a $2,5 \times 10^9$ /ml en presencia de IL-3 + IL-4 + IFN- γ + GM-CSF con los estímulos como se indica. Después de 18 h se analizaron los sobrenadantes para IFN- λ e IL-12p70. Se muestran resultados representativos de 3 experimentos. Los datos representan media +/- DE de muestras duplicadas. (B) Se inyectaron i.v. ratones WT y FL-KO con 100 μ g de poli IC. Después de 3-4 h se analizaron los sueros para IFN- λ e IFN- α . Los círculos indican los resultados de ratones individuales y las columnas representan las medias de los mismos.

La **Figura 4** representa que TLR3, IFN-AR e IFR7, pero no MyD88 o Cardif, participan en la producción de IFN- λ a poli IC *in vivo*. Se inyectaron i.v. ratones con el genotipo indicado con 100 μ g de poli IC. Después de 3-4 h se analizaron los sueros para IFN- λ e IFN- α . Los círculos indican los resultados de ratones individuales y las columnas representan las medias de los mismos.

- 5 La **Figura 5** representa que CDc BDCA3+ humanas son productores importantes de IFN- λ tras la estimulación con poli IC. Se estimularon CMSP, CMSP agotadas en BDCA1 y 3, o células seleccionadas para BDCA1 o BDCA3, en presencia de IL-3, GM-CSF e IFN- γ con (donante 1) 100 $\mu\text{g/ml}$ de poli IC + 10 $\mu\text{g/ml}$ de Pam3Cys + 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS o con (donante 2 y 3) 100 $\mu\text{g/ml}$ de poli IC durante 18-24 h. Los sobrenadantes se analizaron para IFN- λ 1 e IFN- λ 2. Los experimentos se muestran para los donantes individuales y los datos representan media +/- DE de muestras duplicadas.
- 10 La **Figura 6** representa que CDc CD8+ esplénicas son los principales productores de IFN- λ en respuesta a virus de ADN. Se estimularon subconjuntos de CDc esplénicas altamente purificadas a $5 \times 10^5/\text{ml}$ en presencia de IL-3 y GM-CSF con los estímulos como se indica. Después de 18 h se analizaron los sobrenadantes para IFN- λ . Se muestran resultados representativos de 3 experimentos independientes. Los datos representan media +/- DE de muestras duplicadas.
- 15 La **Figura 7** representa que las CDc CD8+ esplénicas son los principales productores de IFN- λ en respuesta a virus de ARNm. Se estimularon subconjuntos de CDc esplénicas altamente purificadas a $5 \times 10^5/\text{ml}$ en presencia de IL-3 y GM-CSF con los estímulos como se indica. Después de 18 h se analizaron los sobrenadantes para IFN- λ . Los datos representan media +/- DE de muestras duplicadas.
- 20 La **Figura 8** representa que CDp esplénicas producen grandes cantidades de IFN- λ para CpG-2216. Se estimularon CDp esplénicas altamente purificadas a $5 \times 10^5/\text{ml}$ en presencia de IL-3 y GM-CSF con los estímulos como se indica. Después de 18 h se analizaron los sobrenadantes para IFN- λ . Se muestran resultados representativos de 3 experimentos independientes. Los datos representan media +/- DE de muestras duplicadas.
- 25 Las **Figuras 9A y B** representan que CDce CD8+ derivadas de FLDC clasificadas son productores importantes de IFN- λ para poli IC. Se estimularon subconjuntos de FLDC clasificados a $2,5 \times 10^5/\text{ml}$ durante 18 h y se analizaron los sobrenadantes para IFN- λ e IL-12p70. (A) Estimuladas en presencia de IL-4 e IFN- γ con los estímulos como se indica. (B) Estimuladas en presencia de poli IC + CpG-1668 con las citocinas como se indica. Se muestran resultados representativos de 2 experimentos independientes. Los datos representan media +/- DE de muestras duplicadas.
- 30 Las **Figuras 10A-D** representan que TLR3 e IFN-AR, pero no MyD88 o Cardif, participan en la producción de IFN- λ a poli IC por CDce CD8+ derivadas de FLDC. Se estimularon FLDC eCD8+ clasificadas a $5 \times 10^5/\text{ml}$ de ratones como se indica durante 18 h y se analizaron los sobrenadantes para IFN- λ . (A) Se estimularon CD eCD8+ WT y MyD88-KO con poli IC en presencia de IL-4 e IFN- γ . (B) Se estimularon CD eCD8+ WT y TLR3-KO con poli IC en presencia de IL-3 + IL-4 + IFN- γ + GM-CSF. (C) Se estimularon CD eCD8+ WT y Cardif-KO con poli IC + CpG-1668 en presencia de IL-3 y GM-CSF. (D) Se estimularon CD eCD8+ WT e IFN-AR-KO con poli IC + profilina en presencia de IL-3 y GM-CSF. Se muestran resultados representativos de al menos 2 experimentos independientes. Los datos representan media +/- DE de muestras duplicadas.
- 35 Las **Figuras 11 A y B** representan que la producción de IFN- λ *in vivo* puede aumentarse con tratamiento de FL o M-CSF. Se trataron ratones FL-KO durante 7 días consecutivos con 10 μg de FL recombinante (A) o M-CSF (B) por día. Al día siguiente después del tratamiento con factor de crecimiento los ratones se inyectaron i.v. con 100 μg de poli IC. Después de 3-4 h los sueros se analizaron para IFN- λ . Los círculos indican los resultados de ratones individuales y las columnas representan las medias de los mismos.
- 40 La **Figura 12** representa que poli AU induce la producción de IFN- λ pero no de IFN- α *in vivo*. Los ratones se inyectaron (i.v.) con poli IC (100 μg) o poli AU (100 o 500 μg). Después de 3-4 h los sueros se analizaron para IFN- λ e IFN- α . Los círculos indican los resultados de ratones individuales y su número total (n) se indica en el gráfico. Las columnas representan la media de todos los ratones usados. Se han realizado dos experimentos independientes.
- 45 La **Figura 13** representa que CDc CD8 α + y CDc eCD8 α expandidas con FL *in vivo* producen selectivamente IFN- λ a poli AU *in vitro*. Se estimularon esplénicas aisladas *ex vivo* expandidas con FL altamente purificadas a $5 \times 10^5/\text{ml}$ en presencia de IL-3 + GM-CSF + IL-4 + IFN- γ con tanto poli IC (100 $\mu\text{g/ml}$) como poli AU (100 $\mu\text{g/ml}$). Después de 18 h se analizaron los sobrenadantes para IFN- λ .
- 50 La **Figura 14** representa que la coestimulación de CD40 potencia la producción de IFN- λ inducida por poli IC *in vivo*. Se inyectaron (i.v.) ratones con poli IC (100 μg), mAb anti-CD40 (100 μg) o la combinación de poli + anti-CD40 (100 μg de cada uno). Después de 3-4 h se analizaron los sueros para IFN- λ e IFN- α . Los círculos indican los resultados de ratones individuales y su número total (n) se indica en el gráfico. Las columnas representan la media de todos los ratones usados. Se han realizado tres (IFN- λ) o dos (IFN- α) experimentos independientes.
- 55 La **Figura 15** representa que la producción de IFN- λ para poli IC *in vivo* depende de IRF3 y IRF7. Se inyectaron i.v. ratones con el genotipo indicado con 100 μg de poli IC. Después de 3-4 h se analizaron los sueros para IFN- λ e IFN- α . Los círculos indican el resultado de ratones individuales y su número total (n) se indica en el

gráfico. Las columnas representan la media de todos los ratones por genotipo. Se han realizado tres experimentos independientes.

La **Figura 16** representa que la producción de IFN- λ para poli IC *in vivo* depende de células hematopoyéticas, FL y IRF8. Se inyectaron i.v. ratones con el genotipo indicado con 100 μ g de poli IC y después de 3-4 h los sueros se analizaron para IFN- λ (A) Ratones reconstituidos con BM como se indica; (B) WT, IL-15R-KO y RAG1-KO; (C) WT y FL-KO; (D) WT y IRF8-KO. Los círculos indican el resultado de ratones individuales y su número total (n) se indica en el gráfico. Las columnas representan la media de todos los ratones por genotipo. Se han realizado (A) uno (quimeras de BM), (B) dos (WT y RAG-KO) o uno (IL-15R-KO), (C) tres (WT y FL-KO) y (D) dos (WT y IRF8-KO) experimentos independientes.

La **Figura 17** representa que la producción de IFN- λ para inyección de poli IC *in vivo* se separa con esplenocitos CD45R-/CD11c+/CD8 α +. 1,5 - 2 h después de la inyección i.v. de poli IC se recogieron los bazos y se procesaron. Se analizaron los sobrenadantes libres de células para IFN- λ después del cultivo *in vitro* durante 18 h. (A) Se separaron 5×10^6 células/ml de células del bazo totales o células por centrifugación de densidad en células de densidad ligera o células de densidad pesada. (B) Células del bazo totales a 25×10^6 células/ml de ratones WT o CD11c-DTR-tg tratados 2 días antes con toxina diftérica (DT). (C) Células del bazo totales antes de la separación o después de la separación con perlas magnéticas en las poblaciones indicadas. El número inicial de células de esplenocitos añadidas sobre la columna fue 20×10^6 . Sin recuento adicional, cada fracción se distribuyó en 2 pocillos con 200 μ l de medio/pocillo. Las barras representan la media \pm DE de 2 experimentos independientes (A + C) o 1 experimento (B) usando 2 ratones por experimento.

La **Figura 18** representa que la producción de IFN- λ o IL-12p70 por CD8 α + CDc depende de los estímulos y las condiciones de citocinas. Se estimularon CDc CD8 α + esplénicas clasificadas a 5×10^5 /ml y los sobrenadantes se analizaron después de 18 h para IFN- λ e IL-12p70. (A) Estimulación en presencia de IL-3 y GM-CSF con los estímulos como se indica. (B) Estímulos y citocinas como se indica. Las barras representan la media \pm DE de 2 experimentos independientes usando un conjunto de al menos 8 ratones por experimento.

La **Figura 19** representa que las CDc CD8 α + y CDc eCD8 α generadas por FL *in vivo* e *in vitro* son productores importantes de IFN- λ e IL-12p70. Se estimularon (A) esplénicas aisladas *ex vivo* expandidas con FL altamente purificadas o (B) generadas *in vitro* a partir de BM con subconjuntos de CDc de FL a 5×10^9 /ml en presencia de IL-3+GM-CSF+IL-4+IFN- γ con los estímulos como se indica. Después de 18 h se analizaron los sobrenadantes para IFN- λ e IL-12p70. Las barras representan la media \pm DE de 2 experimentos independientes cada uno usando un conjunto de al menos 2 ratones por experimento.

La **Figura 20** representa que las CDc CD8 α +, CDc eCD8 α y CDp generadas por FL *in vivo* e *in vitro* son productores importantes de IFN- λ para HSV-1 y parapoxvirus. Se estimularon (A) esplénicas aisladas *ex vivo* expandidas con FL altamente purificadas o (B) generadas *in vitro* a partir de BM con subconjuntos de CD de FL a 5×10^5 /ml en presencia de IL-3 + GM-CSF + IL-4 + IFN- γ con los estímulos como se indica. Después de 18 h se analizaron los sobrenadantes para IFN- λ . Las barras representan la media \pm DE de 2 experimentos independientes cada uno usando un conjunto de al menos 2 ratones por experimento.

La **Figura 21** representa que la producción de IFN- λ para inyección de HSV-1 *in vivo* se separa con esplenocitos CD45R+ y CD45R-/CD8 α +. Se separaron células del bazo 1,5 h después de la inyección *in vivo* con DISC HSV-1 con anti-CD45R y perlas magnéticas en fracciones positivas y negativas. La fracción CD45R-negativa se separó además en células positivas o negativas para CD8 α . Las células separadas se cultivaron *in vitro* durante las siguientes 18 h y se analizaron los sobrenadantes libres de células para IFN- λ . □ □ Las barras representan la media \pm DE de 2 experimentos independientes usando un ratón por experimento.

EJEMPLOS

La presente invención se ilustra además por los siguientes ejemplos, que de ninguna forma deben considerarse como adicionalmente limitantes.

1. Ratones

Los ratones MyD88-KO fueron de S. Akira (Adachi et al., 1998), los ratones Cardif-KO fueron de J. Tschopp (Meylan et al., 2005), los ratones TLR3-KO fueron de The Jackson Laboratory (Alexopoulou et al., 2001), los ratones IRF7-KO de Tadatsugu Taniguchi (Honda et al., 2005) y los ratones IFN-AR-KO fueron originalmente de Michel Aguet (Muller et al., 1994). Los ratones C57BL/6 WT se compraron de Harlan Winkelmann.

2. Células y clasificación por citometría de flujo

Se aislaron subconjuntos de CD de bazos de ratón reunidos como se ha descrito (Vremec et al., 2007). Brevemente, se cortaron los bazos, se digirieron con colagenasa (Worthington Biochemical) y DNasa (Roche) a temperatura ambiente, y se trataron con EDTA. Se enriquecieron células de baja densidad por centrifugación de densidad; células de linaje no CD se recubrieron con mAb (anti-CD3, KT3-1.1; anti-Thy-1, T24/31.7; anti-Gr-1, 1A8; anti-CD19, ID3; anti-eritrocitos, TER119 y anti-células NK, DX5) y se agotaron usando perlas magnéticas anti-Ig de rata

(Qiagen). Las células muertas se excluyeron por tinción con yoduro de propidio. Se clasificaron poblaciones de CDc basándose en la expresión de CD11c, CD45RA, CD4, CD8 α y CD172a y las CDp se purificaron basándose en la expresión de CD11c, CD45RA y CD172a (todos de BD Biosciences). La clasificación de células se realizó en un instrumento FACS Aria (BD Biosciences).

- 5 Se prepararon células dendríticas derivadas de cultivo de médula ósea de FL (FLDC) como se ha descrito (Hochrein et al., 2004). Se clasificaron subconjuntos de CDp y eCD8⁺ y CDc eCD8⁻ basándose en la expresión de CD11c, CD45R, CD11b, CD24, y CD172a o CD103 (todos de BD Biosciences).

3. Exposición *in vivo* a poli IC

- 10 Se inyectaron i.v. ratones en la vena lateral de la cola con 100 μ g de poli IC (Axxora) y se recogió suero 3-4 h después de la exposición. Los sueros se pre-diluyeron 1/5, se analizó IFN- α por ELISA como se ha descrito (Hochrein et al., 2004). Se determinó IFN- λ por un ELISA de IFN- λ 3 (IL-28B) (R&D Systems). Este ELISA reacciona ampliamente de forma cruzada con IFN- λ 2 (IL-28A) y no diferencia entre estos dos IFN- λ de ratón.

4. Estimulación *in vitro* y detección de citocinas

- 15 Se estimularon *in vitro* células con agonistas de TLR individuales o combinaciones de los mismos que contenían 10 μ g/ml de Pam3Cys (InvivoGen), 100 μ g/ml de poli IC (Axxora), 10 μ g/ml de LPS (E. coli; Sigma-Aldrich o Axxora), 10 μ g/ml de R848 (Axxora), CpG-1668 o CpG-2216 1 μ M (TIB-Molbiol), 1 μ g/ml de profilina de toxoplasma (Axxora). Se añadieron las citocinas recombinantes IL-3 de ratón, IL-4 de ratón, IFN- γ de rata (PeproTech) y GM-CSF de ratón (Tebu-Bio) (10 ng/ml de cada una) como se indica. La adición de IL-3 y GM-CSF se basó en observaciones previas de que GM-CSF promovió la producción de IL-12p70 y que la combinación de IL-3 y GM-CSF aumentó la producción de IFN- α inducida por virus en CDp y CDc (Hochrein et al., 2000; Hochrein et al., 2004). Como fuente de un parapoxvirus se compró Zylexis, que se usa para fines veterinarios, de una farmacia. Se usó HSV-1, en forma deficiente en la replicación conocido como disc HSV-1 (HSV-1d), como se describe (Hochrein et al., 2004). Se analizó IFN- λ en sobrenadantes por ELISA e IL-12p70 se determinó por el ensayo de perlas FlowCytomix (Bender Medsystems) según el protocolo del fabricante.

- 25 **5. Aislamiento y estimulación de CD humanas**

Se prepararon CMSP a partir de sangre periférica de donantes de sangre no atópicos por centrifugación en gradiente de densidad y se purificaron CD BDCA3⁺ de CMSP usando el kit de aislamiento de células dendríticas BDCA3/CD141⁺ (Miltenyi Biotech) en un separador AutoMACSTM. Posteriormente, se purificaron CD BDCA1⁺ de las CMSP agotadas en BDCA3 usando el kit de aislamiento de células dendríticas BDCA1/CD1c⁺ (Miltenyi Biotech). Experimentos preliminares con CMSP y fracciones enriquecidas en CD de CMSP han indicado que la adición de las citocinas humanas recombinantes IL-3, GM-CSF e IFN- γ (todas de PeproTech) (10 ng/ml de cada una) potenció la producción de IFN- λ 1 e IFN- λ 2 y, por consiguiente, esta combinación de citocinas se añadió a todas las estimulaciones mostradas. Después de la estimulación durante 18-24 h se analizaron los sobrenadantes para IFN- λ 1 e IFN- λ 2 por ELISA según recomendaciones del fabricante (Tebu-bio).

- 35 **6. Las CDc CD8⁺ son los principales productores de IFN- λ en respuesta a poli IC**

Poli IC, bien conocido por su capacidad para inducir grandes cantidades de IFN-I, también se ha descrito como un potente inductor de IFN- λ (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003). Se identificaron CDp como los principales productores de IFN- λ en respuesta a varios virus o a estimulación por CpG-ODN, pero la fuente celular de IFN- λ inducido por poli IC sigue siendo imprecisa (Coccia et al., 2004; Ank et al., 2008).

- 40 La estimulación de células del bazo fraccionadas con un panel de ligandos de TLR reveló que las principales fracciones de linfocitos que consisten en linfocitos T y B fueron incapaces de producir IFN- λ , mientras que toda la producción de IFN- λ se confinó a preparaciones enriquecidas de CD. Entre subconjuntos de CD esplénicas altamente purificadas, las CDp, como se ha informado previamente, fueron la principal fuente de IFN- λ en respuesta a ODN CpG-2216 de tipo A (Fig. 8). Sin embargo en respuesta a estimulación por poli IC, las CDc CD8⁺ fueron los principales productores, siendo CDp y CDc CD8⁻ en gran medida incapaces de participar en la producción de IFN- λ (Fig. 1 y Fig. 8). También se examinaron subconjuntos de FLDC generados *in vitro*. En cuanto a los subconjuntos de CDp y CDc aislados *ex vivo*, las eCD8⁺, pero no las CDc eCD8⁻ o las CDp, produjeron IFN- λ a poli IC (Fig. 9 A). Así, las CDc CD8⁺ y sus equivalentes *in vitro* son los principales productores de IFN- λ en respuesta a estimulación por poli IC.

- 50 **7. La producción de IFN- λ e IL-12p70 por CDc CD8⁺ depende del tipo de estímulo y las condiciones de citocinas**

Las CDc CD8⁺ son muy conocidas por su excepcional capacidad para la producción de IL-12p70. Como se encontró que las CDc CD8⁺ también eran capaces de producir grandes cantidades de IFN- λ , se compararon las condiciones que gobernarían IFN- λ con aquellas que gobernarían la producción de IL-12p70. Usando un panel de estímulos de TLR, se encontró que los ligandos de TLR conocidos por su alta inducción de IL-12p70, tales como CpG-ODN o profilina de toxoplasma (Hochrein et al., 2000; Yarovinsky et al., 2005), indujeron grandes cantidades de IL-12p70,

como era de esperar, pero sorprendentemente bajo estas condiciones las CDc CD8+ no produjeron ninguna IFN- λ . A diferencia, poli IC indujo la producción de IFN- λ , pero no de IL-12p70, por CDc CD8+ (Fig 2A). Combinaciones de poli IC junto con Pam3Cys, LPS, CpG-ODN o profilina, ligandos para TLR2, TLR4, TLR9, TLR10 o TLR11, respectivamente, aumentaron sinérgicamente la producción de IFN- λ (Fig. 2A). En línea con una falta de TLR7 y así insensibilidad de CDc CD8+ a estimulación de TLR7, R848 fue incapaz de soportar la producción de IFN- λ inducida por poli IC (Fig 2A). Estos datos demuestran un aumento sinérgico de IFN- λ inducido por poli IC con estímulos dependientes del gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MyD88) y confirman los efectos sinérgicos descritos sobre la producción de IL-12p70 por CDc CD8+ (Fig. 2A) (Napolitani et al., 2005).

Se ha mostrado previamente que el medio de citocinas durante la estimulación es altamente influyente para la producción de IL-12p70 en CD murinas y humanas, siendo la IL-4 un principal potenciador para la producción bioactiva de IL-12 (Hochrein et al., 2000; Kalinski et al., 2000). Usando un estímulo combinatorio (poli IC + CpG-1668), que indujo tanto IFN- λ como IL-12p70, se encontró que IFN- λ potenció la producción de IFN- λ con pocos efectos sobre la producción de IL-12p70, mientras que IL-4 aumentó IL-12p70, pero no la producción de IFN- λ (Fig. 2B). El combinar IL-12p70 e IFN- λ que potencia las citocinas (IL-3 + GM-CSF + IL-4 + IFN- γ) con estímulos individuales (poli IC o profilina) demostró que se preservó la producción mutuamente exclusiva dependiente de estímulo de IFN- λ o IL-12p70 por CDc CD8+ (Fig. 2C). Sin embargo, combinaciones de estímulos (poli IC + CpG-1668 o poli IC + profilina) más citocinas permitió la producción de grandes cantidades de IFN- λ e IL-12p70 al mismo tiempo (Fig. 2, B y C).

En comparación con los subconjuntos de CD esplénicas aisladas *ex vivo*, CDp, CDce CD8+ y CDc eCD8- clasificadas por FACS de FLDC demostró una especificidad por subconjunto muy similar, además de dependencia de estímulo y citocinas para la producción de IFN- λ (Fig. 9). Así, como se describe para otros parámetros funcionales tales como la producción de IL-12p70 o presentación cruzada, la producción de IFN- λ de CDce CD8+ de cultivos de FL demuestra un alto grado de similitud funcional con CDc CD8+ aisladas *ex vivo*.

8. FL participa en la producción de IFN- λ a poli IC *in vivo*

FL es un factor de crecimiento implicado en el desarrollo de CD en el estado estacionario y ratones deficientes para FL (FL-KO) tienen cantidades drásticamente reducidas de CD que incluyen CDp y CDc CD8+ (McKenna et al., 2000). Para definir la función de las CD como una fuente de IFN- λ en órganos distintos del bazo, se aislaron células del hígado de ratones no mutantes y FL-KO y se estimularon bajo condiciones de citocinas para la expresión de tanto la inducción de IFN- λ como de IL-12p70 con tanto únicamente poli IC como profilina o una combinación de ambos. Como se encontró con CD8+ o CDce CD8+ clasificadas (Fig. 2 y Fig. 8B), las células del hígado de ratones WT produjeron IFN- λ a poli IC e IL-12p70 a profilina, mientras que la combinación de ambos estímulos soportó la producción de IFN- λ e IL-12p70 simultáneamente (Fig. 3A). A diferencia, las células del hígado de ratones FL-KO presentaron una producción ampliamente suprimida de IFN- λ , además de IL-12p70, a esta estimulación (Fig. 3A). Como se cree que las células no hematopoyéticas y la mayoría de las poblaciones no de CD son normales en ratones FL-KO, esto sugiere que las CD fueron la principal fuente del IFN- λ producido. CD8+ o CDce CD8+, pero no CDp u otros subconjuntos de CDc, expresan selectivamente TLR11 y así son selectivamente capaces de responder a profilina y producir IL-12p70 (Fig. 2 y Fig. 9A) (Yarovinsky et al., 2005). La supresión concomitante de IFN- λ e IL-12p70 en células del hígado de FL-KO tras la estimulación selectiva por CD8+ y CDce CD8+ sugiere fuertemente que este subconjunto de CDc es la fuente del IFN- λ producido y apunta a una función notoria para CDce CD8+ como una fuente importante de IFN- λ en el hígado *in vivo*. Así, la producción de IFN- λ bajo aquellas condiciones estimulantes selectivas podría servir de indicador para CDc CD8+, incluso en una mezcla compleja de diferentes tipos de células.

Para extender estas observaciones a una exposición directa *in vivo*, se comparó la respuesta de ratones WT y FL-KO a inyección de poli IC. Niveles en suero de IFN- λ en respuesta a poli IC fueron fácilmente detectables en ratones WT como fueron los niveles de IFN- α . A diferencia, en ratones FL-KO, los niveles de IFN- λ estuvieron casi suprimidos, mientras que IFN- α permaneció fácilmente detectable (Fig. 3B). La administración de FL recombinante en ratones FL-KO no solo restauró, sino que incluso aumentó su capacidad de producción de IFN- λ por encima del nivel de WT (Fig. 11A). La administración de M-CSF en ratones FL-KO también fue capaz de aumentar la producción de IFN- λ a poli IC, demostrando que M-CSF es capaz de aumentar el número de productores de IFN- λ a poli IC (Fig. 11 B). Junto con aquellas líneas, los ratones WT tratados con FL que mostraron elevados números de CD, que incluyen CDc CD8+, tuvieron una respuesta de IFN- λ sistémica enormemente elevada a la exposición a poli IC. La dependencia de FL sugiere fuertemente que la producción de IFN- λ a poli IC *in vivo* está en gran medida mediada por CD. Además, estos datos indican que CD8+ y subconjuntos de CDc eCD8+ son sensibles.

9. TLR3, IFN-AR e IRF7 participan en la producción de IFN- λ a poli IC *in vivo*

Se detecta poli IC por el sistema inmunitario en vías redundantes y se han descrito funciones para RLH, además de TLR3 (Alexopoulou et al., 2001; Gitlin et al., 2006). Para determinar los receptores de reconocimiento de patrones implicados en la producción de IFN- λ inducida por poli IC *in vivo*, se inyectó poli IC en ratones deficientes para diversos receptores de reconocimiento de patrones o sus molécula adaptadoras, específicamente TLR3, MyD88 o Cardif e IFN- λ , además se midió IFN- α en los sueros correspondientes (Fig. 4). Se indujeron grandes cantidades de IFN- λ e IFN- α en ratones WT y MyD88-KO, demostrando que no estuvieron implicados TLR dependientes de MyD88

y sugiriendo que las CDp, que dependen en gran medida de MyD88 para la producción de IFN, no contribuyeron probablemente a la producción de ambas citocinas bajo aquellas condiciones. Sin embargo, la deficiencia de TLR3 produjo producción de IFN- λ suprimida sin efecto sobre la producción de IFN- α . La participación de TLR3 *in vivo* soporta que CD8+ y CDce CD8+ son la fuente de IFN- λ debido a que este subconjunto es particularmente conocidos por su alta expresión de TLR3 y por reconocer poli IC en un modo dependiente de TLR3 (Edwards et al., 2003; Schulz et al., 2005). A diferencia, la deficiencia de Cardif no reveló efectos sobre la producción de IFN- λ pero, de acuerdo con informes previos, supresión completa de IFN- α de suero (Fig. 4; Gitlin et al., 2006). Así, mientras que poli IC indujo grandes niveles sistémicos de tanto IFN- λ como IFN- α en ratones WT, la participación de TLR3 o Cardif parece ser mutuamente exclusiva. Podría detectarse una participación similar de TLR3, pero no Cardif o MyD88, para la producción de IFN- λ con CDce CD8+ generadas *in vitro* a partir de los ratones KO correspondientes (Fig. 10 A-C). Estos hallazgos, junto con la participación observada de FL, sugieren fuertemente que la producción de IFN- λ a poli IC *in vivo* depende en gran medida de CD de los subconjuntos CD8+ y eCD8+. Se ha descrito que la producción de IFN-I óptima *in vivo* requiere la expresión de un receptor de IFN-I funcional (IFN-AR). También se ha propuesto una función para IFN-AR para la producción de IFN- λ en respuesta a tanto el virus de Sendai como el virus del herpes simple (Ank et al., 2008). Aquí se encontró, en línea con los datos de Ank y colaboradores, que la producción sistémica de IFN- λ e IFN- α en respuesta a poli IC fue en gran medida dependiente de la presencia de IFN-AR (Ank et al., 2008). Se detectó una dependencia similar de IFN-AR usando eCD8+ generadas *in vitro* de tanto ratones WT como IFN-AR-KO (Fig. 10D).

Para arrojar más luz sobre la regulación de la producción de IFN- λ a poli IC *in vivo*, se analizó la respuesta de ratones deficientes en factor regulador 7 de IFN (IRF7). La producción de IFN- α estuvo casi suprimida en ratones IRF7-KO (Fig. 4). Una función esencial para IRF7 se ha demostrado previamente para la producción de IFN- α dependiente de MyD88 por CDp y se ha propuesto una participación de IRF7 en la producción de IFN-I dependiente de TRIF por CD (Honda et al., 2005; Tamura et al., 2008). Se encontró que la producción de IFN- λ en el suero se reducía ampliamente en ausencia de IRF7, que indica una función prominente para IRF7 para la producción de IFN- λ por CDce CD8+ (Fig. 4). Los hallazgos *in vivo* de una función prominente para IRF7 para la producción de IFN- λ en respuesta a poli IC están en línea con los estudios basados en promotor previos que proponen una función de IRF7 en la inducción de IFN- α e IFN- λ (Osterlund et al., 2007).

10. Las CD BDCA3+ humanas son productores importantes de IFN- λ tras la estimulación con poli IC

En ratones, la separación en varios subconjuntos de CDc está bien establecida y se correlaciona con fenotipo y función específico de subconjunto, tal como la capacidad de CDc CD8+ para producir grandes cantidades de IL-12p70 o de antígenos presentes de forma cruzada. Aún cuando la evidencia de una discriminación de subconjuntos de CDc similar en el ser humano ha aumentado en los últimos años, esto se basa principalmente en similitudes fenotípicas con solo algunas analogías funcionales. Se encontró que la producción de IFN- λ en respuesta a poli IC en ratones es una característica específica del subconjunto de CDc CD8+. Fue deseable establecer si esta característica se correlacionó con cualquier subconjunto de CD humanas. Basándose en similitudes fenotípicas, tales como la expresión de Clec9a y Necl2, se han propuesto CD humanas BDCA3 positivas como posibles CDc CD8+ humanas. En CMSP y fracciones de CMSP enriquecidas en CD, se encontró que poli IC indujo IFN- λ 1 (IL-29) e IFN- λ 2 (IL-28A). La separación de subconjuntos de CDc usando los marcadores BDCA1 o BDCA3 reveló que las células BDCA3 positivas para todos los donantes probados fueron los principales productores de IFN- λ 1, además de IFN- λ 2 (Fig. 5). Así, en términos de la producción de IFN- λ tras la estimulación con poli IC, las CDc BDCA3 humanas se parecen funcionalmente a las CDce CD8+ murinas.

11. CDce CD8+ son productores importantes de IFN- λ en respuesta a virus de ADN

Herpesviridae es una familia de virus de ADN bicatenario también llamada el virus del herpes que produce infecciones recurrentes persistentes y en el ser humano incluyen patógenos importantes tales como el virus del herpes simple (HSV) 1 y 2; virus de la varicela zóster (VZV), citomegalovirus humano (HCMV), virus del herpes asociado a sarcoma de Kaposi (KSHV) y virus de Epstein-Barr (EBV). Previamente, se encontró que HSV-1 es reconocido por CDp mediante TLR9 mediante una vía dependiente de MyD88, pero esto se observa por CDc independiente de MyD88 mediante una vía de reconocimiento desconocida hasta la fecha (Hochrein et al., 2004). IFN- λ fue capaz de proteger contra infección de la mucosa con HSV y la protección dependiente de TLR fue en gran medida dependiente de IFN- λ (Ank et al., 2008).

La familia de poxviridae, también llamada poxvirus, representa virus de ADN bicatenario que pueden separarse en varias subfamilias tales como ortopoxvirus, parapoxvirus y otros. Entre los poxvirus, son patógenos importantes para el ser humano y animales, tales como el virus de la viruela, el agente causante de la viruela, virus de la viruela de la vaca, viruela del camello y virus de la variolovacuna. Los parapoxvirus son patógenos importantes para el ganado vacuno y otros animales. Los ortopoxvirus y parapoxvirus son reconocidos por CD mediante vías dependientes e independientes de TLR9 (Samuelsson et al., 2008; Siegemund et al., 2009). Algunos poxvirus codifican una proteína de unión a IFN- λ y los poxvirus que codifican IFN- λ recombinantes fueron altamente atenuados, sugiriendo una función para IFN- λ en la protección contra infecciones por poxvirus (Bartlett et al., 2005; Bartlett et al., 2004).

Para determinar si las CDc eCD8+ también son productores de IFN- λ en respuesta a virus de ADN, se probó la respuesta de subconjuntos de CDc a HSV-1 y un parapoxvirus, que representan las familias del virus del herpes y poxvirus.

5 Se encontró que entre las CDc aisladas *ex vivo* de bazo, las CDc CD8+ son los principales productores de IFN- λ en respuesta a tanto HSV-1 como parapoxvirus (Fig. 6). Usando subconjuntos de CDc generados *in vitro*, se encontró otra vez que las CDce CD8+ eran los principales productores de IFN- λ para HSV-1 y parapoxvirus. Las CDce CD8+ generadas a partir de los ratones mutantes que carecieron tanto de Cardif, MyD88 como TLR3 revelaron que ninguna de las RLH ni los TLR fueron importantes para la generación de IFN- λ por CDce CD8+ en respuesta a HSV-1 o parapoxvirus.

10 Como parece que los IFN- λ inducen actividad antiviral contra el virus del herpes y poxvirus, y basándose en el novedoso conocimiento de eCD8+ como una fuente importante de IFN- λ , esto puede conducir a nuevos enfoques terapéuticos tales como inducción de grandes números de CDce CD8+ con factores de crecimiento, por ejemplo, ligandos de FL o M-CSF-R (M-CSF, IL-34). Los propios virus pueden reconocerse por los potenciados números de CDce CD8+ que pueden inducir IFN- λ antiviral, limitando así el crecimiento de los virus patógenos. Alternativamente, 15 pueden usarse estímulos externos tales como miméticos para ADN o ARN, por ejemplo poli IC, para inducir la producción de IFN- λ por CDce CD8+ *in vivo*.

12. CDce CD8+ son productores importantes de IFN- λ en respuesta a virus de ARN

Como se encontró que el ARN bicatenario (bc), por ejemplo, poli IC está induciendo IFN- λ por CDce CD8+, se determinó a continuación si los virus de ARN inducirían IFN- λ también. Se sabe que el ARNbc no solo está presente 20 tras la infección con virus de ARNbc, sino que se producen productos intermedios de ARNbc tras la infección con virus de ARN monocatenario (mc), especialmente de virus de ARNmc positivos. Las familias de ARNmc positivas, tales como picornavirus, flaviviridae, coronaviridae, togaviridae, incluyen patógenos humanos y animales tales como el virus del Nilo occidental, virus del dengue, virus de la hepatitis C, SARS, virus de la rubeola y otros. Para probar diferentes virus de ARNmc positivos que representan dos familias de virus de ARNmc diferentes, se usaron virus del 25 bosque de Semliki (SFV) y virus de la hepatitis de ratón (MHV), que representan togaviridae y coronaviridae, respectivamente.

Entre las CDc aisladas *ex vivo*, la respuesta de IFN- λ a SFV y MHV se restringió al subconjunto de CDc CD8+ sin producción de IFN- λ por los subconjuntos de CDc CD8- (Fig. 7A). Se encontraron resultados similares para CDce 30 CD8+ generadas *in vivo*. Con CDce CD8+, se encontró que la producción de IFN- λ a SFV y MHV era todavía robusta en ausencia de MyD88, pero que la producción de IFN- λ a aquellos virus se perdía en ausencia de TLR3. Así, las CDce CD8+ usan TLR3 para producir IFN- λ en respuesta a virus de ARNmc, supuestamente mediante productos intermedios de ARNbc.

Una función importante para IFN- λ en la susceptibilidad y cura contra el virus de la hepatitis C (HCV) se ha implicado recientemente por análisis genómico (Ge et al., 2009; Suppiah et al., 2009; Tanaka et al., 2009; Thomas et al., 2009).

35 Se encontró que las CDce CD8+ producen IFN- λ en respuesta a virus de ARNmc positivos (Fig. 7). Además, se encontró que pueden identificarse CDce CD8+ en el hígado (Fig. 3 A). Y, lo que es más importante, las CDce CD8+ no dependen de MyD88 o RLH para la producción de IFN- λ . Se sabe que HCV inhibe la señalización de RLH y así inhibe la producción de IFN- α de células del cuerpo que incluyen CDc CD8- que se basan en RLH para el reconocimiento de HCV (Meylan et al., 2005). Como se encontró que las CDce CD8+ no usan RLH, sino TLR3, para 40 la detección de poli IC y virus de ARNmc positivos, esto puede producir CDce CD8+ todavía capaces de producir la citocina antiviral IFN- λ a HCV, mientras que se inhiben otras células que se basan en RLH. El aumentar la cantidad de CDce CD8+ puede aumentar drásticamente la cantidad de IFN- λ producida en respuesta a virus que incluyen virus de ARNmc y puede ser además potenciada por la aplicación de estímulos externos tales como poli IC o virus de ADN deficientes en la replicación (por ejemplo, HSV-1d). La administración de CDce CD8+ o el potenciamiento *in vivo* mediante factores de crecimiento pueden, con o sin combinaciones con terapias estándar tales como terapia de 45 IFN-I, aumentar la respuesta antiviral a virus persistentes tales como HCV o virus del herpes.

La producción de IFN- λ tras poli IC es una función distintiva novedosa de CDce CD8+, conservada entre especies evolutivamente distantes. Es probable que la producción de IFN- λ contribuya al excelente efecto adyuvante de la 50 administración de poli IC. Además, es probable que CDc CD8+ y sus equivalentes, muy conocidos por su presentación cruzada y capacidades de IL-12p70, sean contribuyentes a las respuestas antivirales mediadas por TLR3 mediante su alta producción de IFN- λ . Estos nuevos hallazgos pueden transferirse a novedosos enfoques terapéuticos que pueden impactar fuertemente para tratar infecciones persistentes tales como infecciones del virus de la hepatitis C.

13. Inducción por poli AU de IFN- λ

55 El ARN bicatenario (ARNbc) es reconocido mediante TLR3 o mediante helicasas tipo Rig (RLH). Sin embargo, las longitudes, la composición o modificaciones del ARN pueden influir en la detección mediante los diferentes receptores de ARN. Se ha observado que en respuesta a ácido poliinosínico:policitidílico (poli IC) la producción temprana de IFN- λ depende completamente de la presencia de TLR3 y de ciertos subconjuntos de CD (CDc CD8 α +

y eCD8 α), mientras que la producción sistémica de IFN- α era independiente de TLR3 e independiente de CDc CD8 α +, pero era completamente dependiente de las RLH (como se observa con ratones Cardif-KO que carecen de una molécula adaptadora esencial para RLH). El ácido poliadenílico:poliuridílico (poli AU) de ARNbc es otra forma de ARNbc y los presentes inventores probaron si poli AU puede usarse para inducir IFN- λ *in vivo*. De forma interesante, la inyección de poli AU indujo IFN- λ en los sueros de ratones, pero IFN- λ sistémico no era detectable. Así, usando cierta forma de estímulos es posible inducir IFN- λ sistémico sin la inducción de IFN- λ sistémico (véase la Figura 12).

Para ver si la producción de IFN- λ a poli AU observada se correspondió con las mismas células como en respuesta a poli IC, los presentes inventores potenciaron la cantidad de CD en ratones con tratamiento de FL y clasificaron CD8 α + CDc, eCD8 α CDc y CD11b+/CD172a+ CDc. Aquellas células se estimularon con poli IC o poli AU. De hecho, solo CDc CD8 α + y CDc eCD8 α , pero no las otras CDc (CDc CD11b+/CD172a+), fueron capaces de producir IFN- λ a poli IC y a poli AU similarmente. Los resultados se muestran en la Figura 13.

14. Inducción de IFN- λ con poli IC y estimulación de CD40

Pueden estimularse células dendríticas (CD) con patrón molecular asociado a patógeno (PAMP) tales como ligandos de TLR y responder con maduración y producción de citocinas. Además, existen estímulos endógenos de PAMPS y uno de los mejores mecanismos activadores descritos es la interacción de CD40 con su ligando, el ligando de CD40. Las CD expresan CD40 y los linfocitos T activados expresan ligando de CD40 y la interacción de linfocitos T y CD activa CD. Una de las consecuencias de esta activación es la producción de citocinas que incluyen IL-12p70. Como los presentes inventores encontraron que la combinación de inductores de IL-12, tales como profilina o CpG-ODN, junto con poli IC indujeron *in vitro* un aumento sinérgico de la producción de IFN- λ , los presentes inventores probaron si la combinación de poli IC y la estimulación de CD40 afectaría la producción de IFN- λ *in vivo*. Como estímulo para CD40 se usó un anticuerpo monoclonal (mAb) para CD40, que se sabe que es estimulante *in vivo*. Los resultados se muestran en la Figura 14.

REFERENCIAS

Adachi et al., 1998. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9:143-150.

Alexopoulou et al., 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738.

Ank et al., 2008. An important role for type III interferon (IFN-lambda/IL-28) in TLR-induced antiviral activity. *J. Immunol.* 180:2474-2485.

Bartlett et al., 2005. Murine interferon lambdas (type III interferons) exhibit potent antiviral activity in vivo in a poxvirus infection model. *J. Gen. Virol.* 86:1589-1596.

Bartlett et al., 2004. A new member of the interleukin 10-related cytokine family encoded by a poxvirus. *J. Gen. Virol.* 85:1401-1412.

Brasel et al., 2000. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* 96:3029-3039.

Coccia et al., 2004. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 34:796-805.

Diebold et al., 2009. Role of TLR3 in the immunogenicity of replicon plasmid-based vaccines. *Gene Therapy.* 16:359-366.

Dzionek et al., 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 165:6037-6046.

Edwards et al., 2003. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur. J. Immunol.* 33:827-833.

Ge et al., 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461:399-401.

Gilliet et al. 2002. The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 2002 195(7):953-8.

Gitlin et al., 2006. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:8459-8464.

Hochrein and O'Keeffe 2008. Dendritic cell subsets and toll-like receptors. *Handb. Exp. Pharmacol.* 183:153-79.

- Hochrein et al., 2000. Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 192:823-833.
- Hochrein et al., 2004. Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:11416-11421.
- 5 Hochrein et al., 2001. Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J. Immunol.* 166:5448-5455.
- Honda et al., 2005. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434:772-777.
- 10 Ishii et al. 2006. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat. Immunol.* 7(1):40-48.
- Miyake et al., 2009. Poly I:C-Induced Activation of NK Cells by CD8[alpha]+ dendritic cells via the IPS-1 and TRIF-dependent pathways. *J. Immunol.* 183:2522-2528.
- Kalinski et al., 2000. IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells. *J. Immunol.* 165:1877-1881.
- 15 Kotenko et al., 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 4:69-77.
- Luber et al., 2010. Quantitative Proteomics Reveals Subset-Specific Viral Recognition in Dendritic Cells. *Immunity* 32:279-289.
- 20 Li et al., 2009. Interferon-lambdas: the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. *J. Leukoc. Biol.* 86:23-32.
- Longhi et al., 2009. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *J. Exp. Med.* 206(7):1589-1602.
- McCartney et al., 2009. Distinct and complementary functions of MDA5 and TLR3 in poly(I:C)-mediated activation of mouse NK cells. *J Exp Med.* 206(13):2967-76.
- 25 McKenna et al., 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95:3489-3497.
- Meylan et al., 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437:1167-1172.
- Muller et al., 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264:1918-1921.
- 30 Naik et al., 2005. Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8- dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J. Immunol.* 174:6592-6597.
- Naik 2008. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol. Cell. Biol.* 86(5):439-52.
- Napolitani et al., 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.* 6:769-776.
- 35 O'Keeffe et al., 2002. Effects of administration of progenipietin, Flt-3 ligand, G-CSF and pegylated GM-CSF on dendritic cell subsets in mice. *Blood.* 99:2122-2130.
- Onoguchi et al., 2007. Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J. Biol. Chem.* 282:7576-7581.
- 40 Osterlund et al., 2005. Gene expression and antiviral activity of alpha/beta interferons and interleukin-29 in virus-infected human myeloid dendritic cells. *J. Virol.* 79:9608-9617.
- Osterlund et al., 2007. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes. *J. Immunol.* 179:3434-3442.
- Pillarisetty, et al., 2004. Liver dendritic cells are less immunogenic than spleen dendritic cells because of differences in subtype composition. *J. Immunol.* 172:1009-1017.
- 45 Reis e Sousa et al., 1997. 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.* 186:1819-1829.

- Robbins et al., 2008. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.* 9:R17.
- Samuelsson et al., 2008. Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection. *J. Clin. Invest.* 118:1776-1784.
- 5 Schulz et al., 2005. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 433:887-892.
- Sheppard et al., 2003. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* 4:63-68.
- Shortman et al., 2009. Improving vaccines by targeting antigens to dendritic cells. *Exp. Mol. Med.* 41:61-66.
- Siegemund et al., 2009. Conventional bone marrow-derived dendritic cells contribute to toll-like receptor-independent production of alpha/beta interferon in response to inactivated parapoxvirus ovis. *J. Virol.* 83:9411-9422.
- 10 Sommereyns et al., 2008. IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS. Pathog.* 4:e1000017.
- Suppiah 2009. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat. Genet.* 41:1100-1104.
- 15 Tamura et al., 2008. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 26:535-584.
- Tanaka et al., 2009. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat. Genet.* 41:1105-1109.
- 20 Thomas et al., 2009. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461:798-801.
- Vandenabeele et al., 2001. Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations. *Blood* 97:1733-1741.
- Vremec et al., 2007. Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells. *Blood* 109:1165-1173.
- 25 Wang et al., 2002. Noncoding RNA danger motifs bridge innate and adaptive immunity and are potent adjuvants for vaccination. *J. Clin. Invest.* 110(8):1175-84.
- Yarovinsky et al., 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308:1626-1629.

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro de generación u obtención de una población de células dendríticas convencionales CD8+ o eCD8+ que producen IFN-λ, en el que dichas CDce CD8+ expresan Clec9a y/o Necl2, que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar una población de células que comprende células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+;
 - 5 (b) poner en contacto dicha población de células con un agente que aumenta el nivel de dichas células dendríticas convencionales, en el que el agente es ligando de Flt3 o ligando de receptor de M-CSF;
 - c) poner en contacto dichas células dendríticas convencionales con un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo; y
 - 10 (d) aislar células positivas para Clec9a y/o Necl2 que producen IFN-λ de dichas células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la población de células se incuba además con un potenciador de la producción de IFN-λ, en el que el potenciador es
 - un ligando de TLR, en el que el ligando de TLR es preferentemente un ligando de TLR2, un ligando de TLR4, un ligando de TLR9, un ligando de TLR10 y/o un ligando de TLR11; y/o
 - 15 - un miembro de la familia de TNF, en el que el miembro de la familia de TNF es preferentemente un ligando de CD40; y/o
 - una citocina, en el que la citocina es preferentemente IL-3, GM-CSF, IL-4 o IFN-γ.
3. Una composición que comprende una población de células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+ humanas que producen IFN-λ obtenibles por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dichas células dendríticas convencionales expresan Clec9a y/o Necl2.
- 20 4. La composición de la reivindicación 3, en el que dicha composición es una composición farmacéutica.
5. Células dendríticas convencionales CD8+ y/o eCD8+ humanas que producen IFN-λ obtenibles por el método de una cualquiera de la reivindicación 1 o 2 o la composición de una cualquiera de la reivindicación 3 o 4 para su uso en un método de prevención y/o tratamiento de una enfermedad, en el que dicha enfermedad es una enfermedad infecciosa, en particular una infección viral, preferentemente una infección viral persistente, más preferentemente una infección viral del hígado y/o una infección por el virus del herpes, lo más preferentemente una infección por el virus de la hepatitis; o cáncer.
- 25 6. Una composición que comprende un ácido nucleico bicatenario (bc) o análogo del mismo para su uso en un método de prevención y/o tratamiento de una enfermedad por la inducción de IFN-λ en células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+ y en la que dichas CDce CD8+ expresan Clec9a y/o Necl2, en la que dicha enfermedad es una enfermedad infecciosa, en particular una infección viral, preferentemente una infección viral persistente, más preferentemente una infección viral del hígado y/o una infección por el virus del herpes, lo más preferentemente una infección por el virus de la hepatitis; o cáncer.
- 30 7. Una composición para su uso en un método de la reivindicación 6 que comprende además un agente que aumenta el nivel de células dendríticas convencionales (CDc) CD8+ y/o eCD8+ seleccionadas de ligando de Flt3 y/o un ligando de receptor de M-CSF, en la que dichas CDce CD8+ expresan Clec9a y/o Necl2.
- 35 8. La composición para su uso en el método de la reivindicación 6 o 7, en la que dicho cáncer es un carcinoma de células escamosas o un adenocarcinoma.
9. La composición para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende además un agente que potencia la producción de IFN-λ basado en ácido nucleico bc, en la que el agente que potencia la producción de IFN-λ basado en ácido nucleico bc es
 - un ligando de TLR, en el que el ligando de TLR es preferentemente un ligando de TLR2, un ligando de TLR4, un ligando de TLR9, un ligando de TLR10 y/o un ligando de TLR11; y/o
 - 40 - un miembro de la familia de TNF, en el que el miembro de la familia de TNF es preferentemente un ligando de CD40; y/o
 - 45 - una citocina, en la que la citocina es preferentemente un ligando de Flt3, un ligando de receptor de M-CSF, IL-3, GM-CSF, IL-4 o IFN-γ.
10. La composición para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que dicho análogo de un ácido nucleico bc es poli IC, poli AU, poli ICLC, poli dAdT.

Figura 1

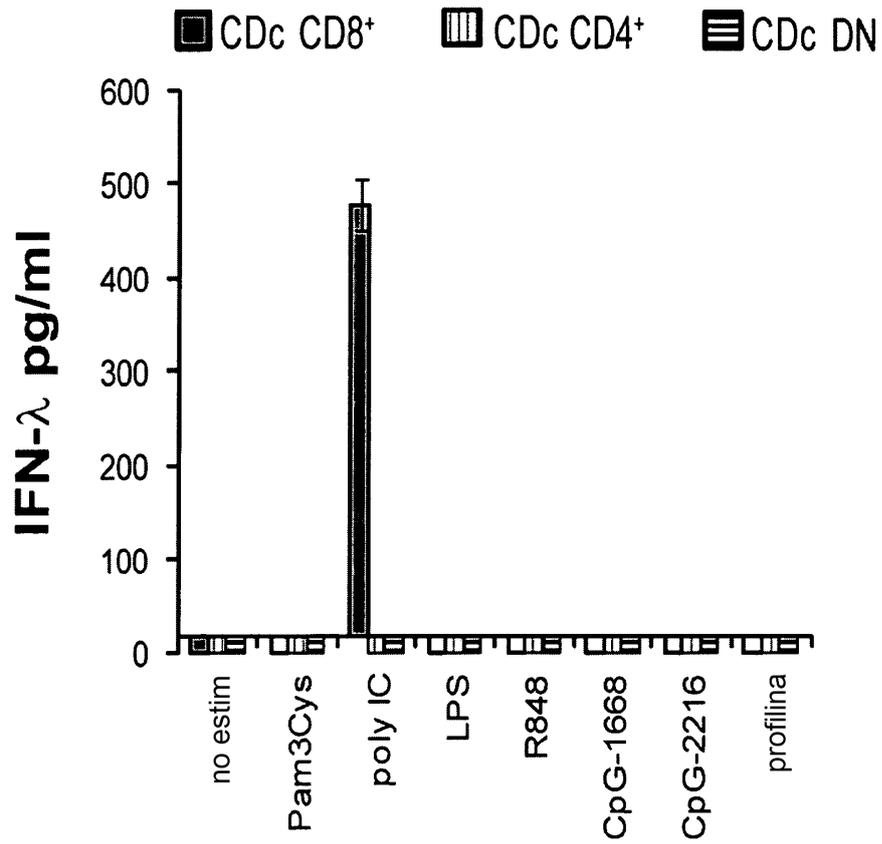


Figura 2 A

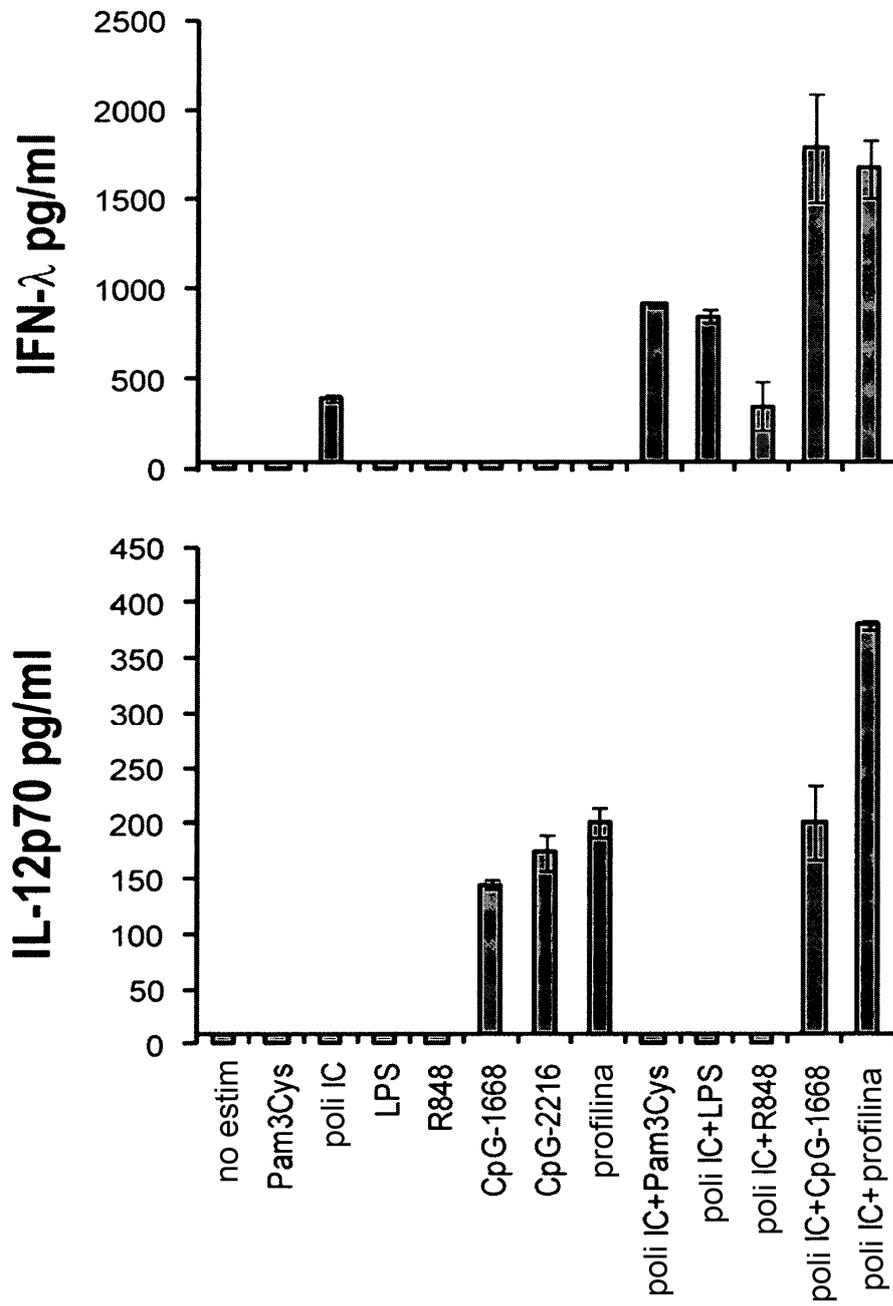


Figura 2 B

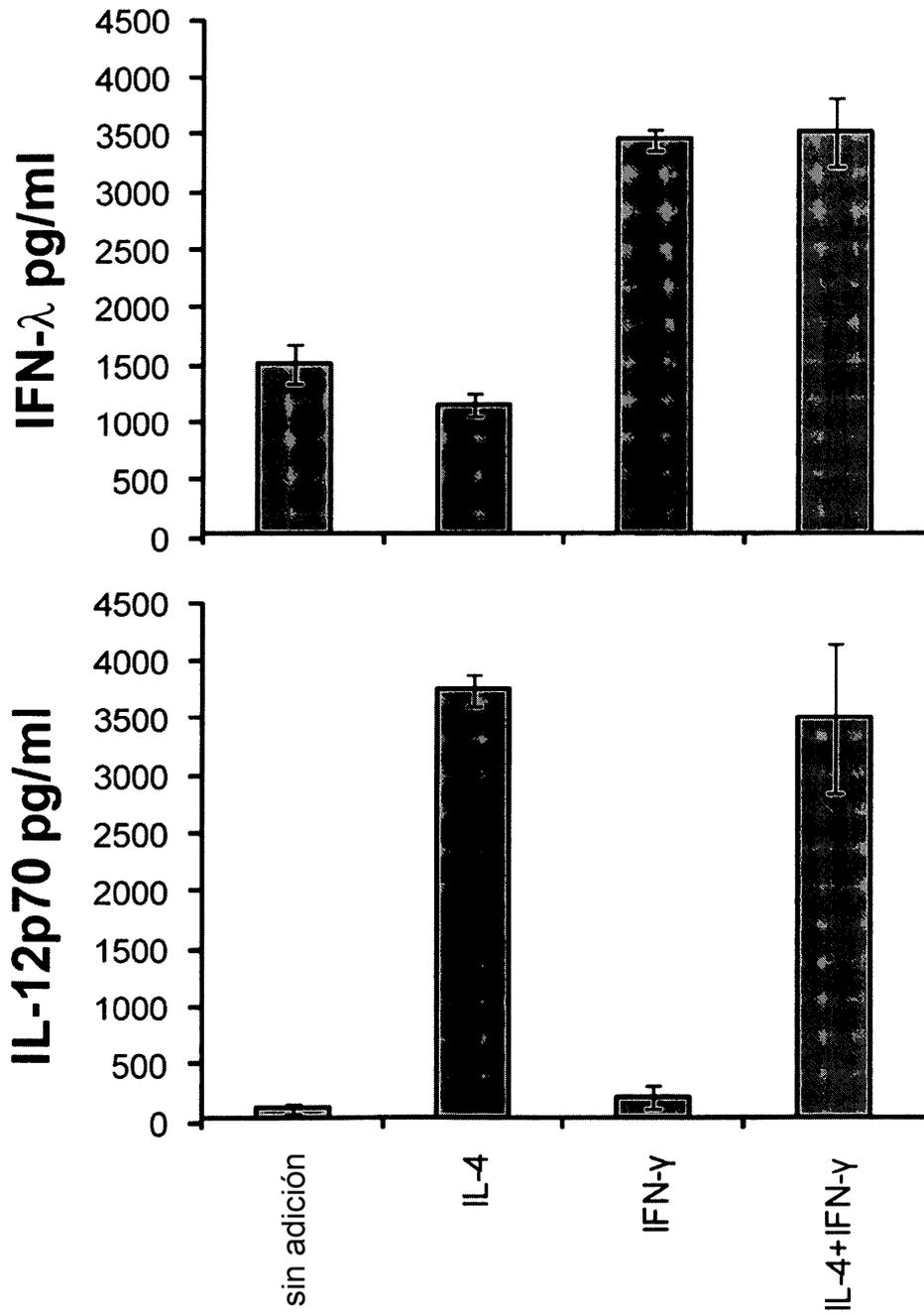


Figura 2 C

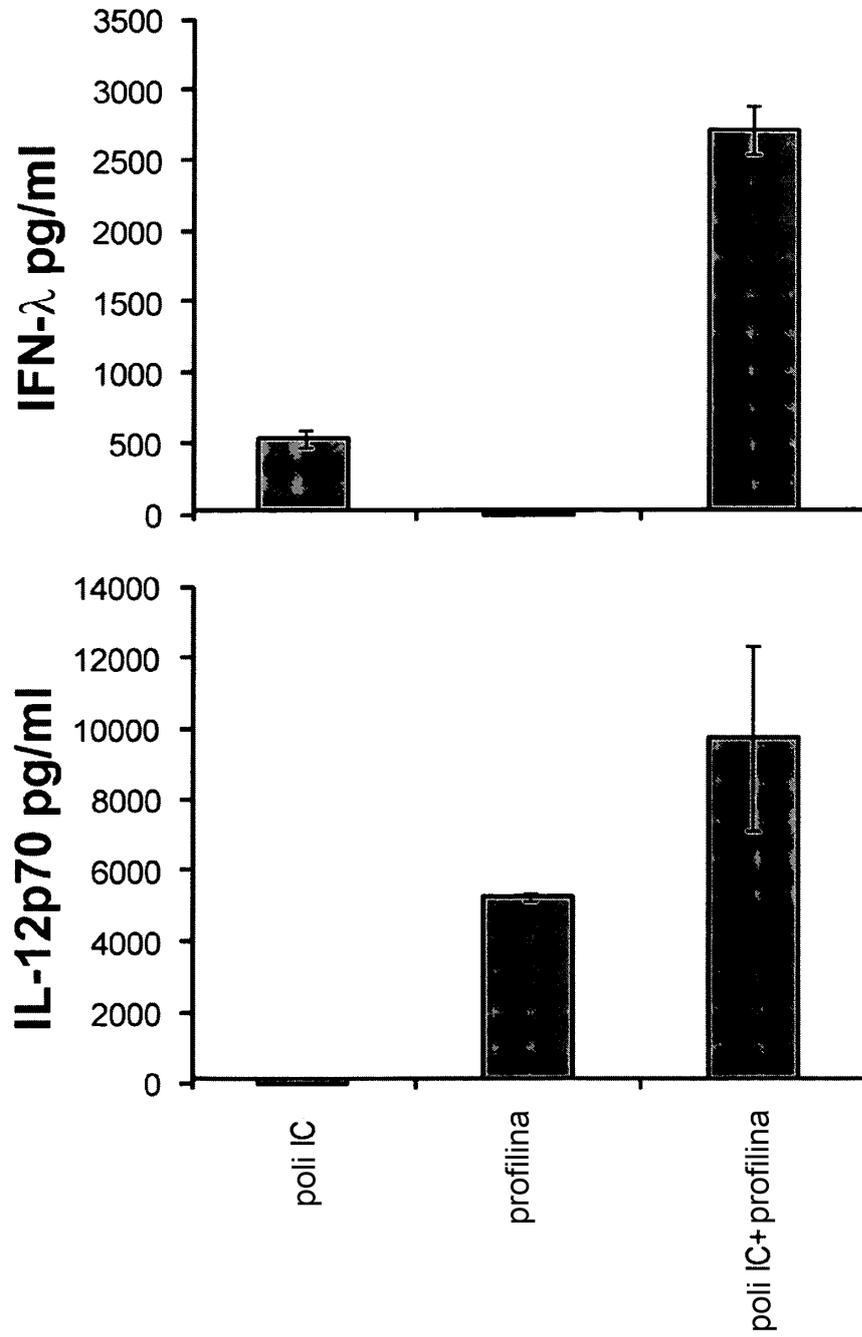


Figura 3 A

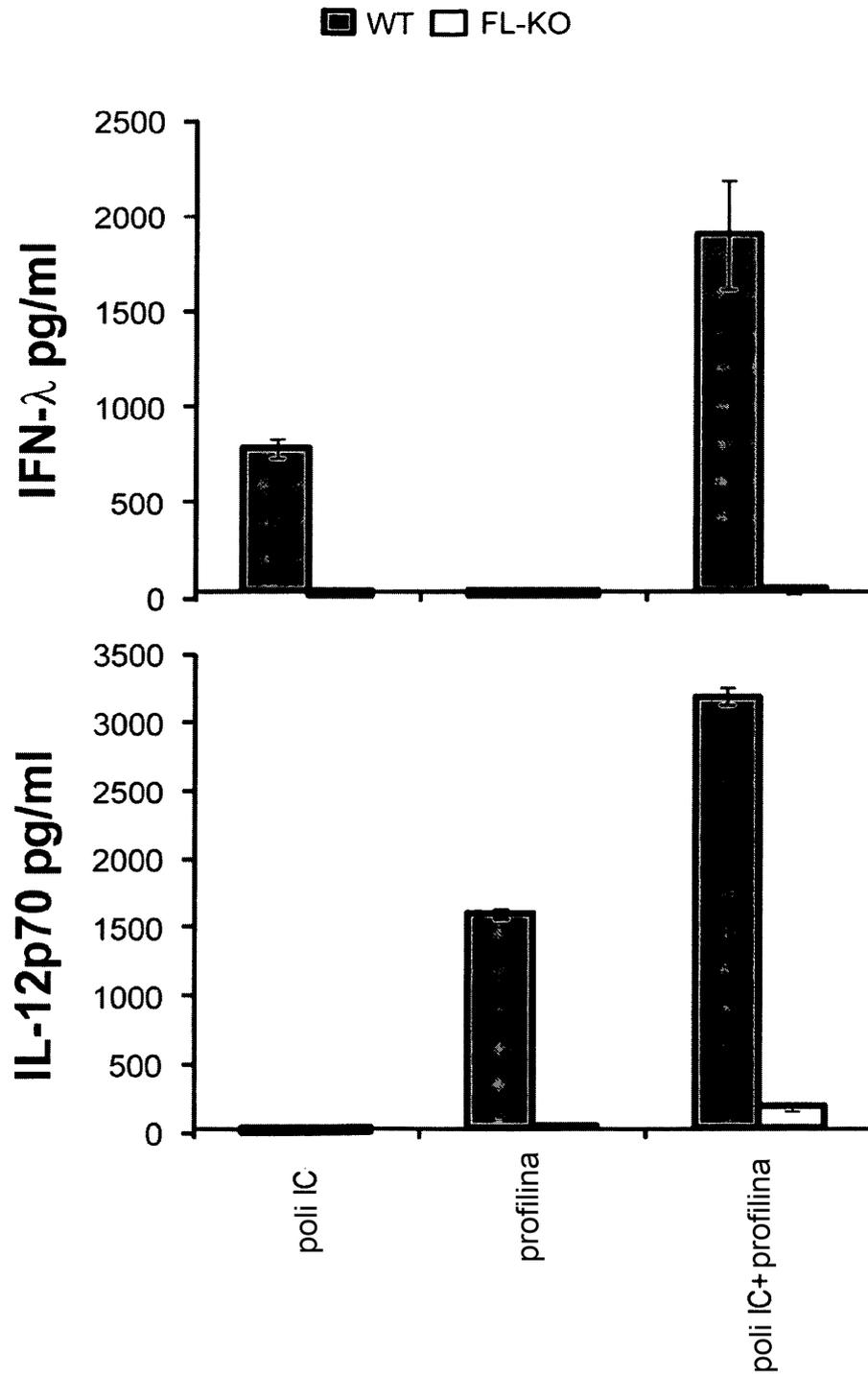


Figura 3 B

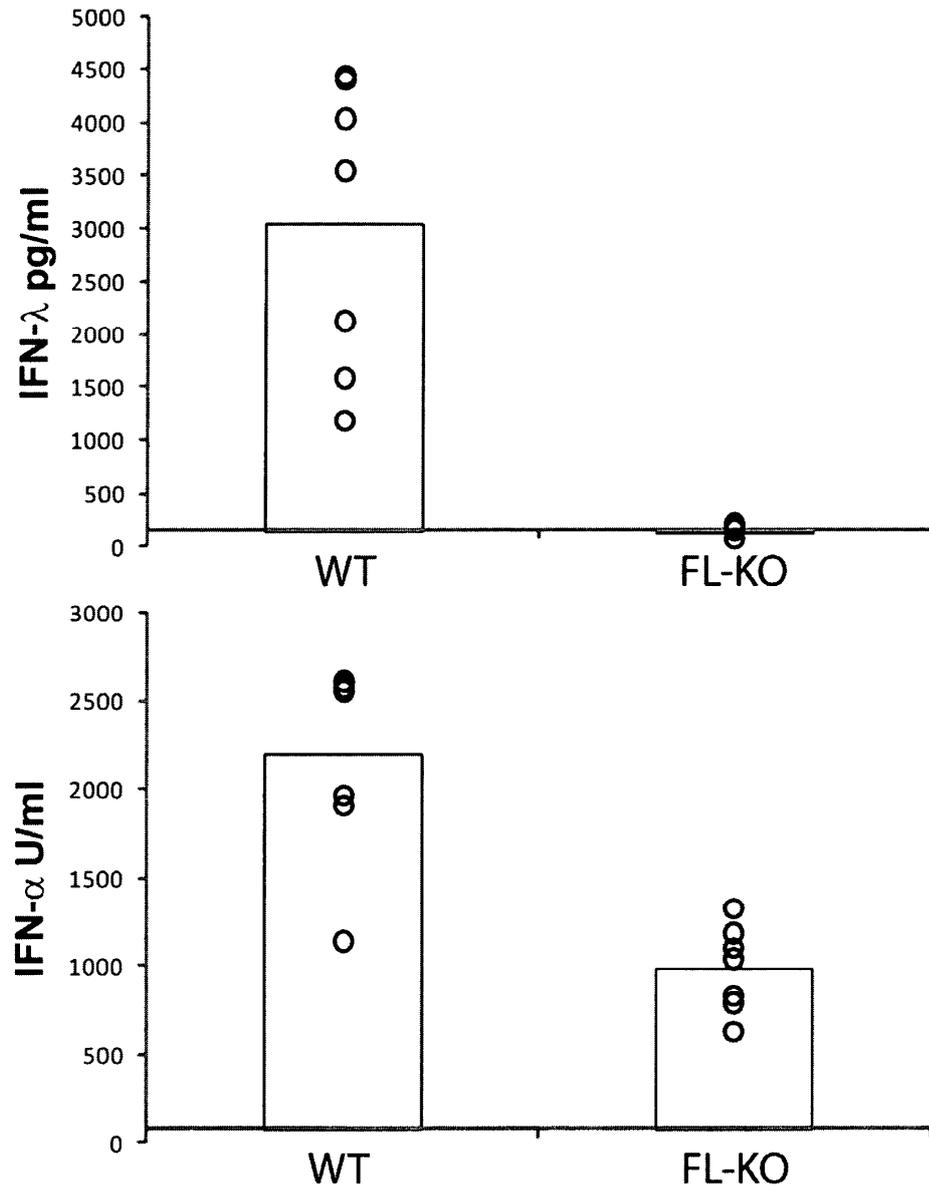


Figura 4

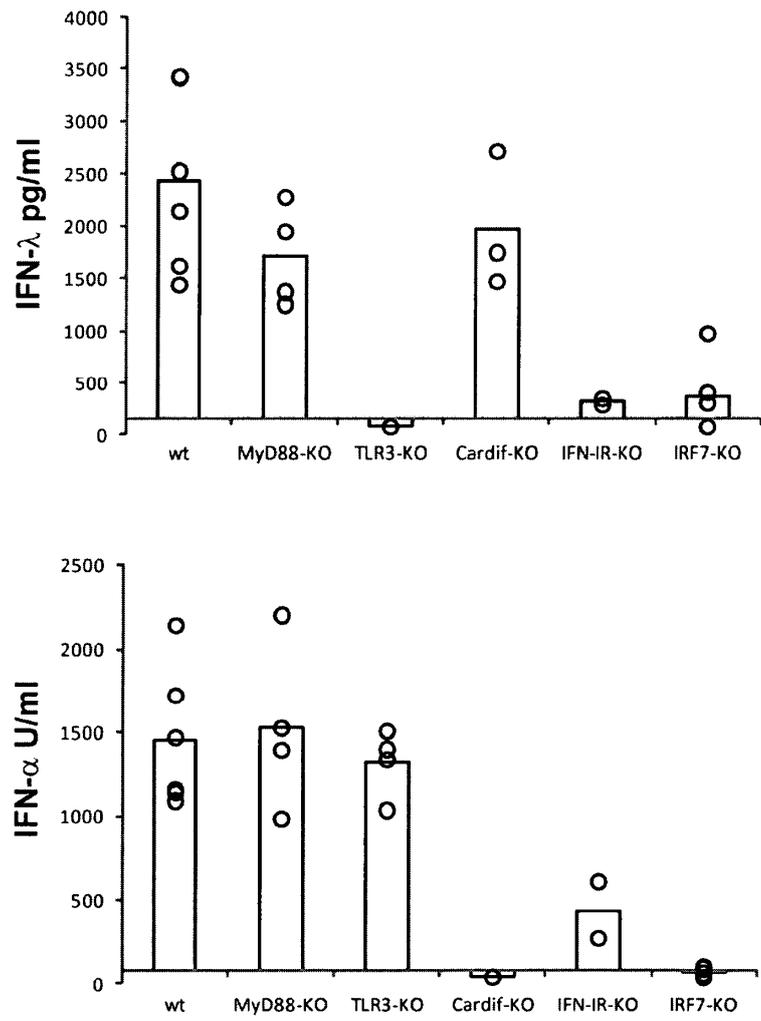


Figura 5

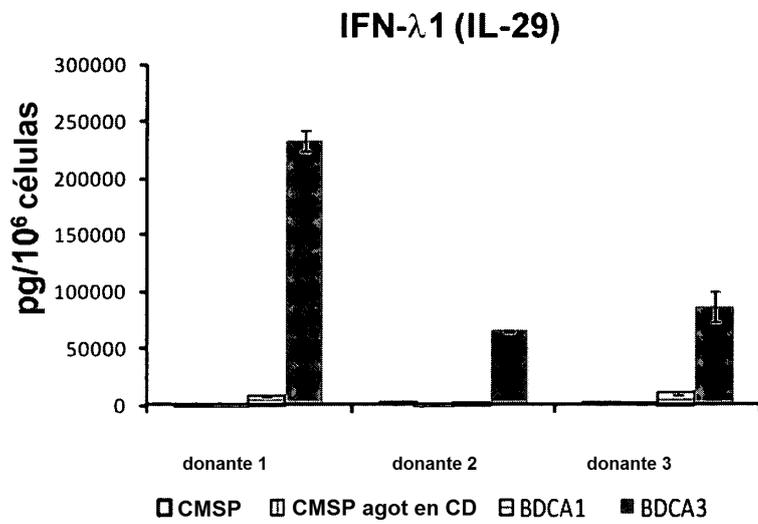
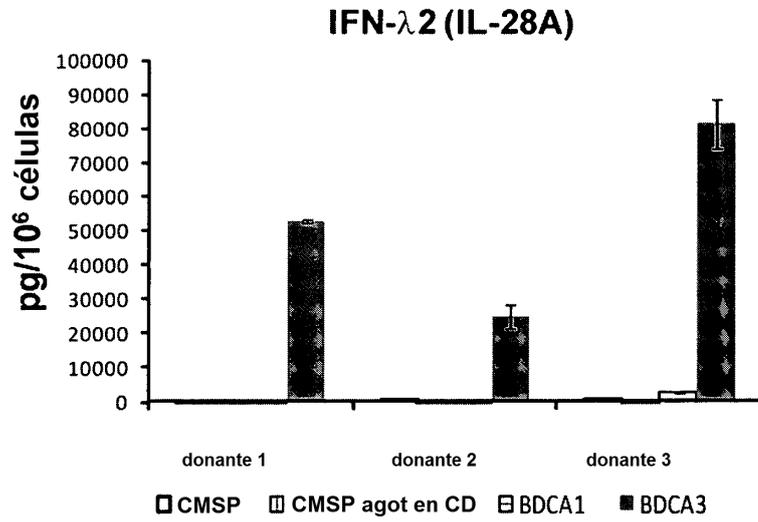


Figura 6

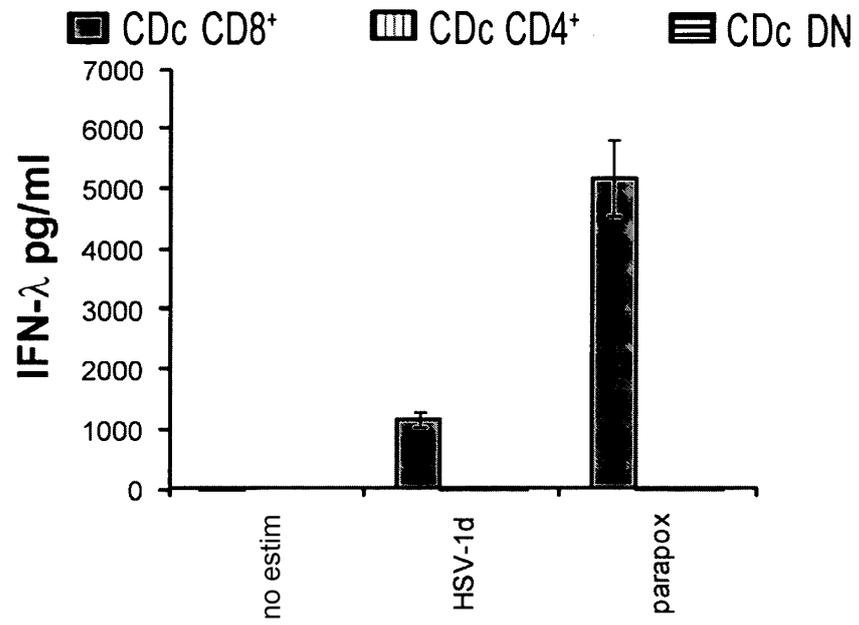


Figura 7

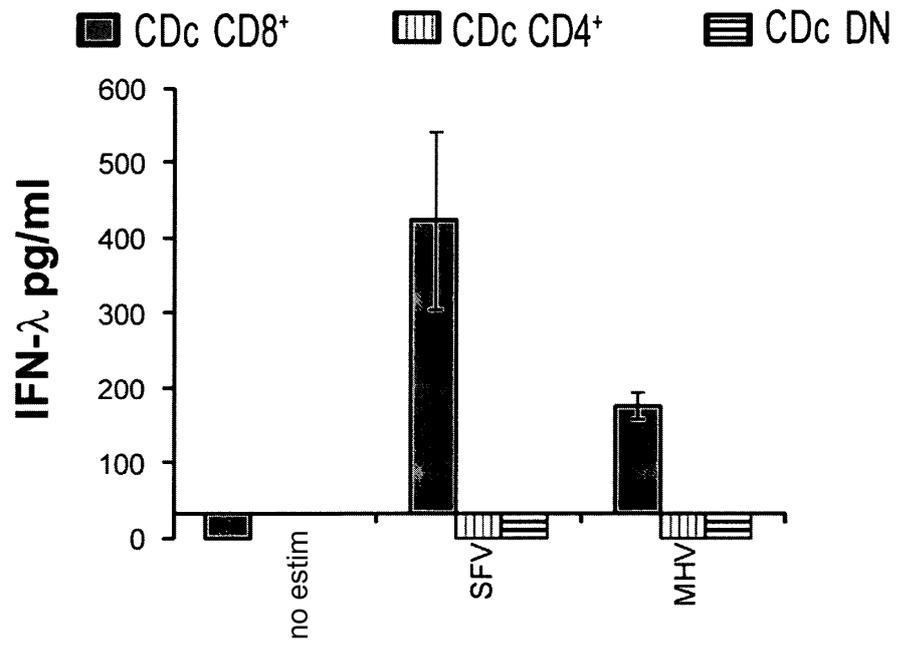


Figura 8

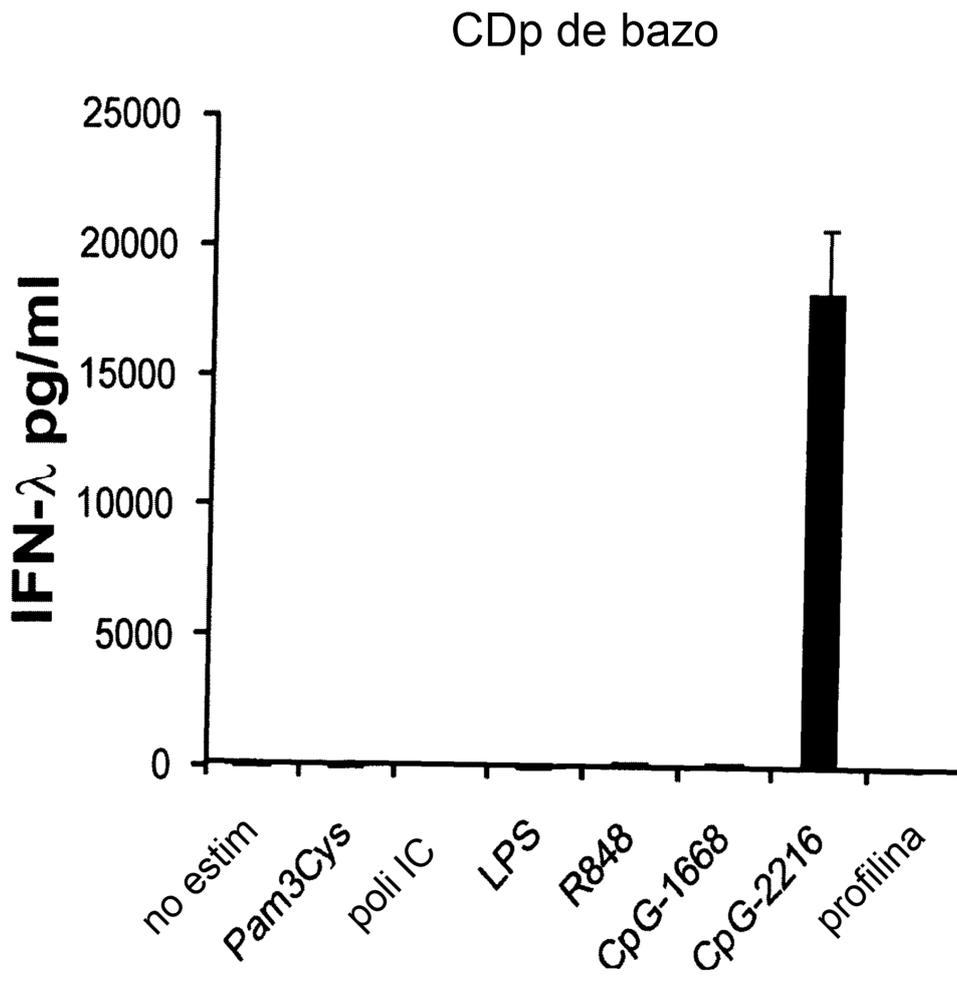


Figura 9 A

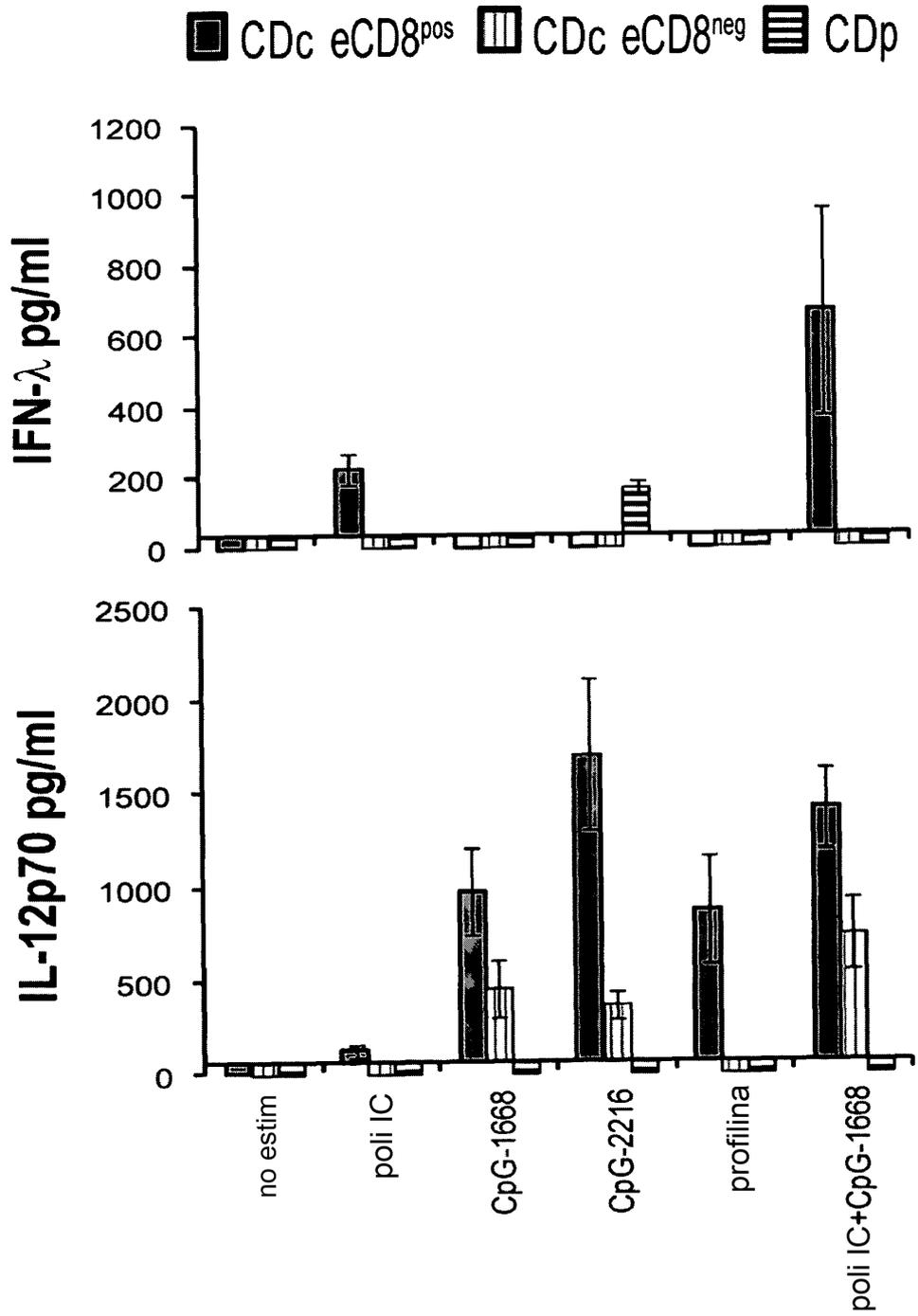


Figura 9 B

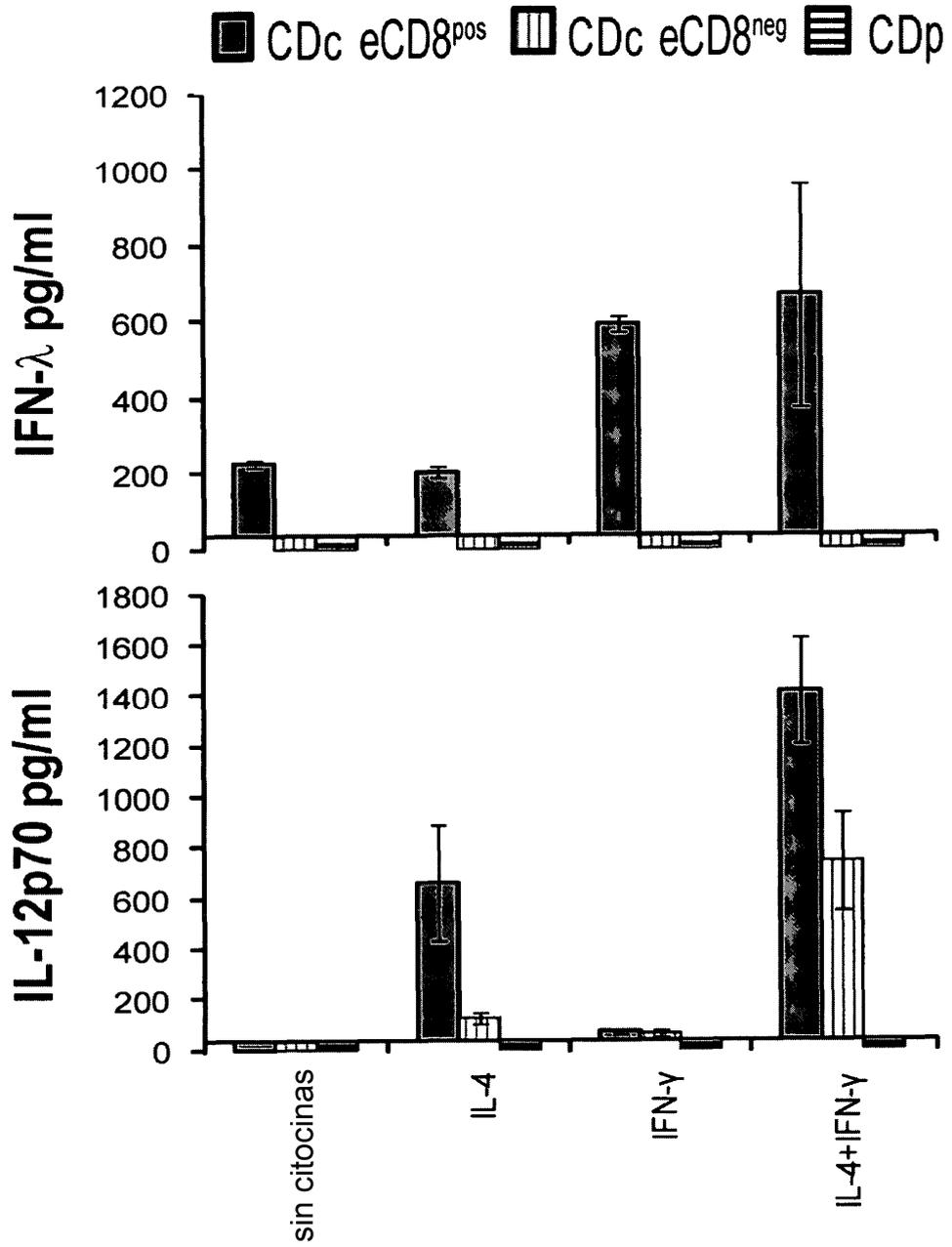


Figura 10 A-B

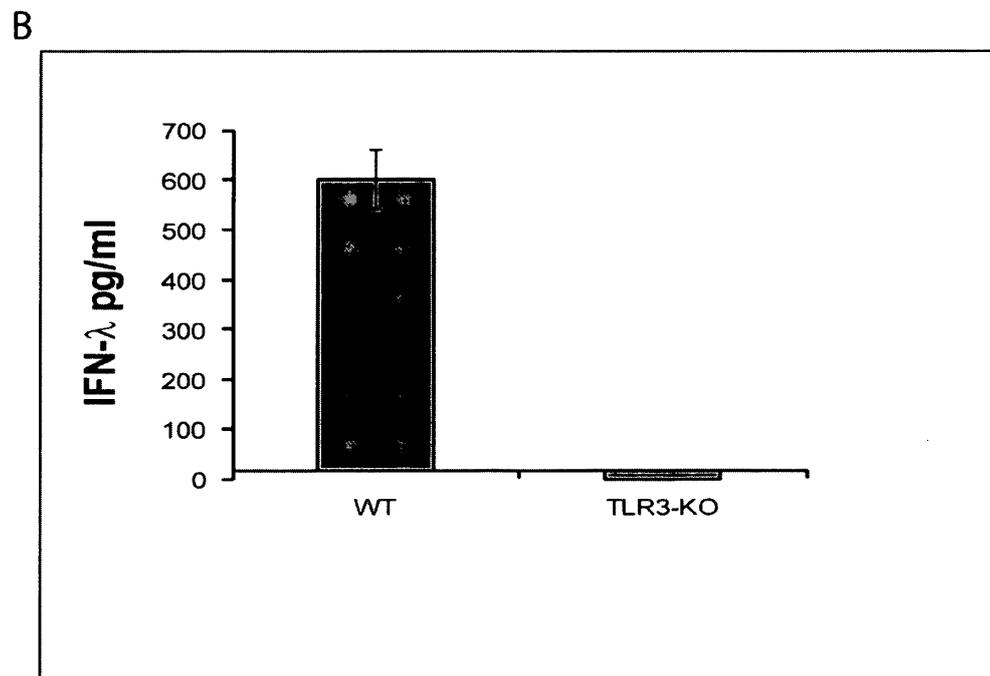
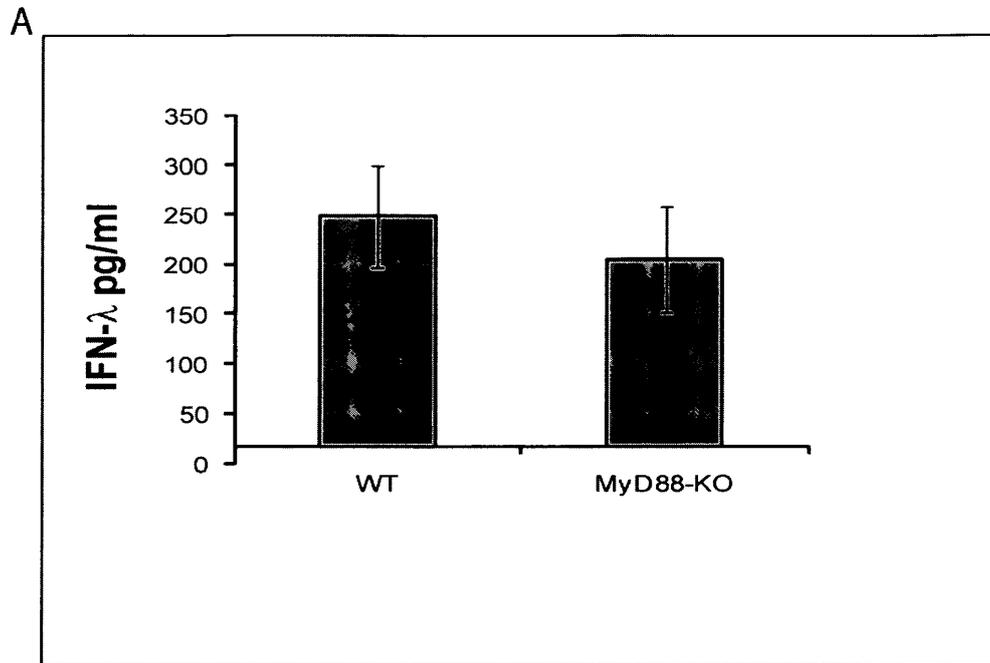


Figura 10 C-D

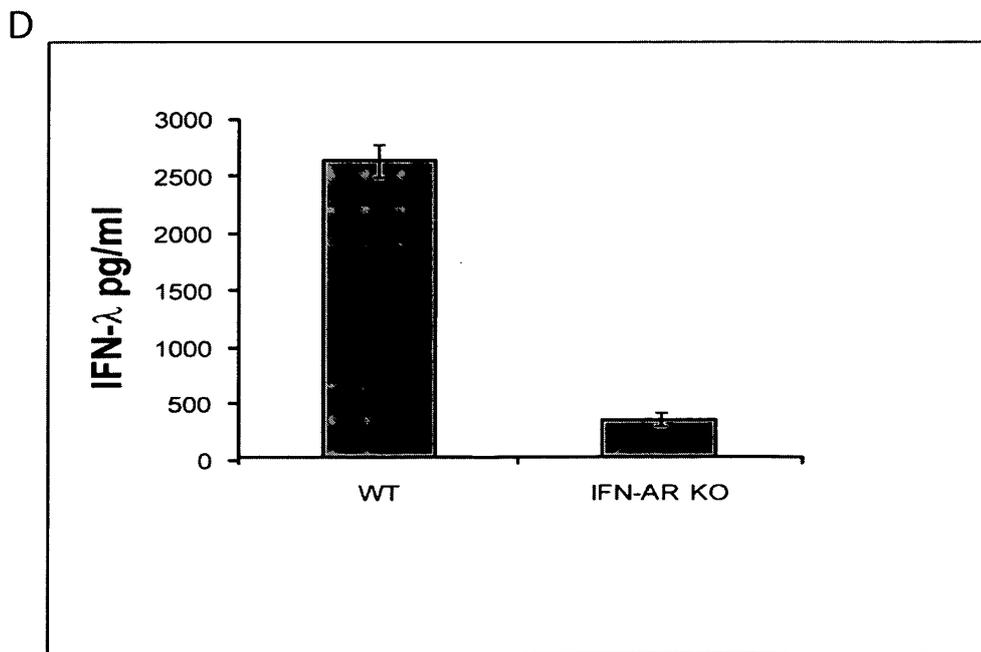
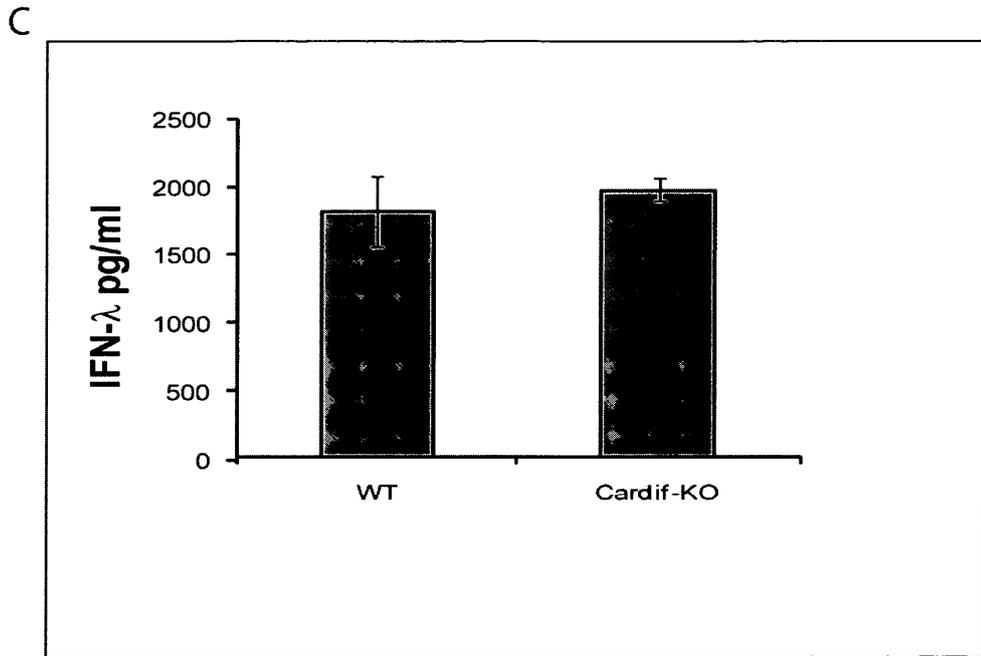


Figura 11 A

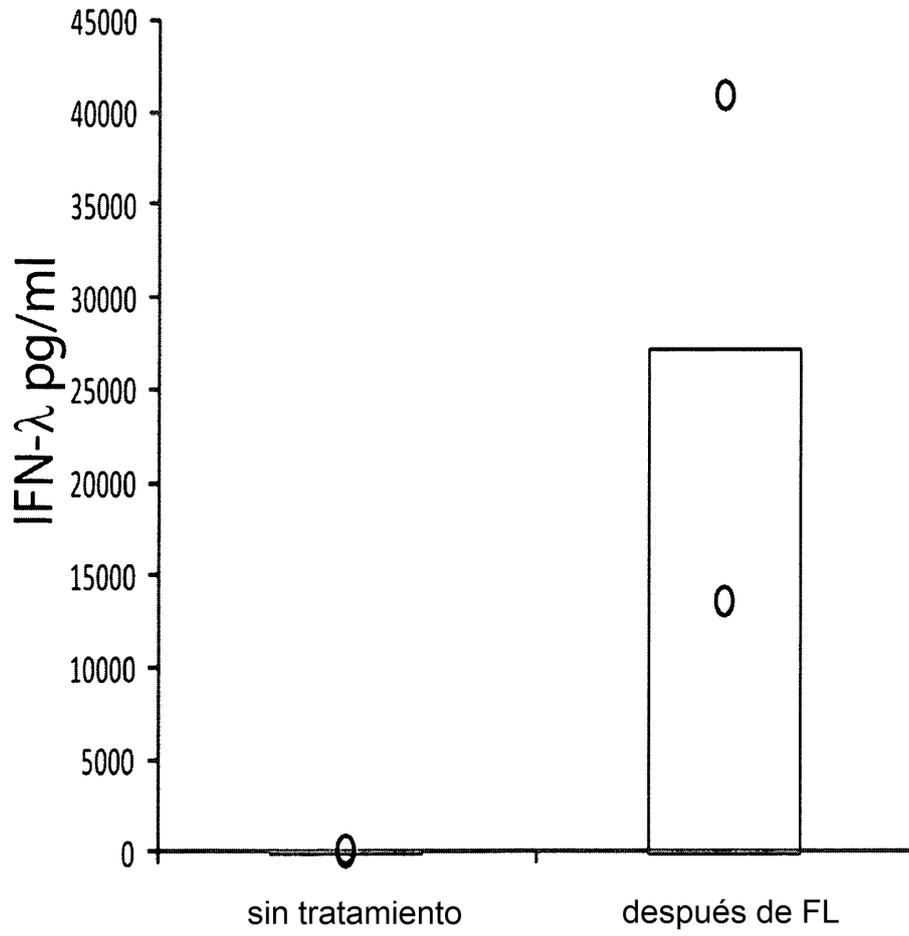


Figura 11 B

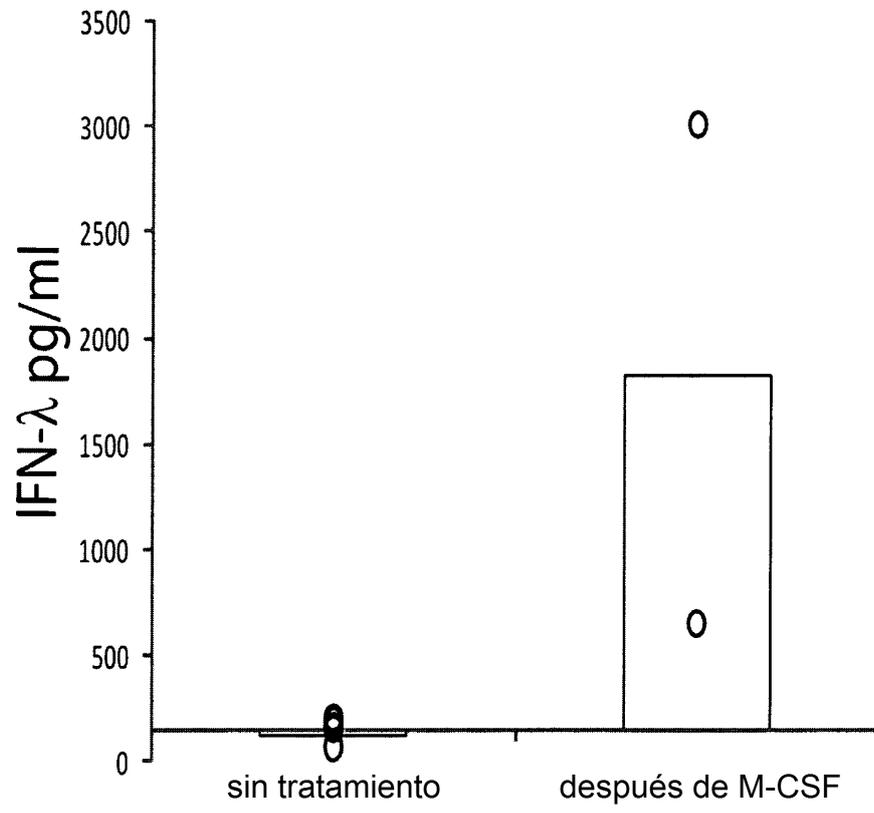


Figura 12

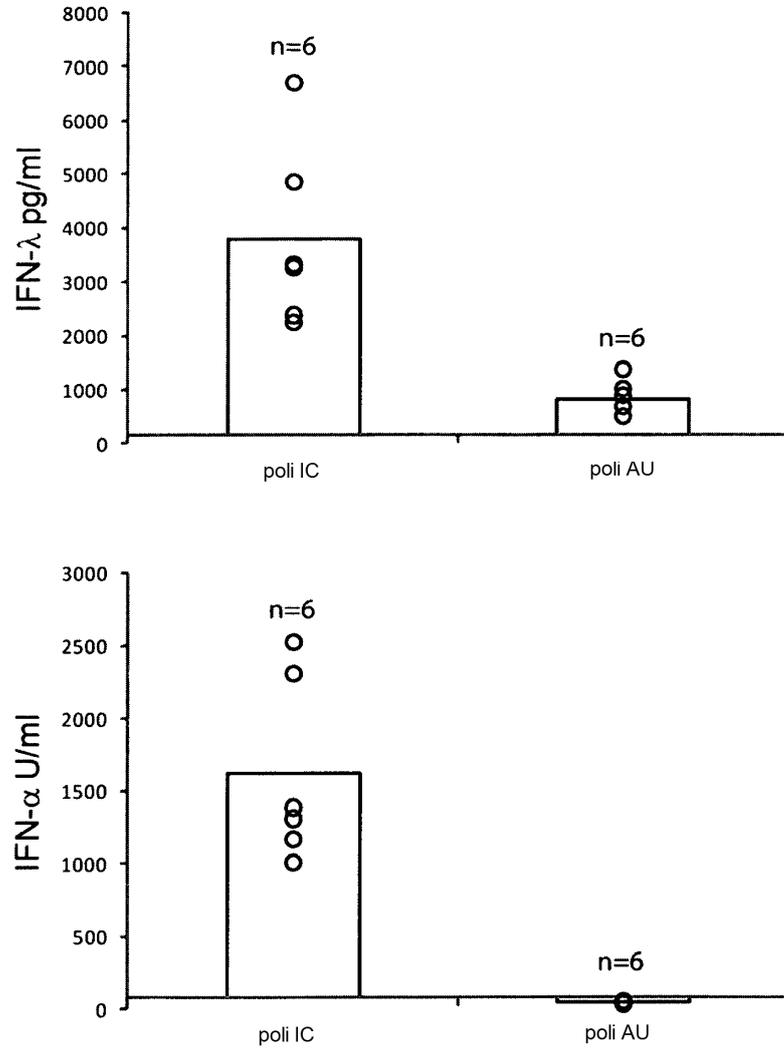


Figura 13

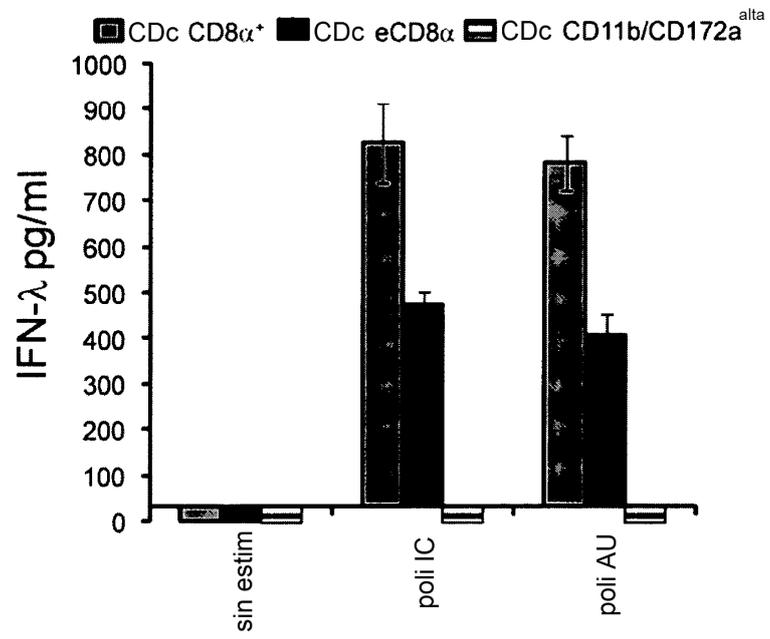


Figura 14

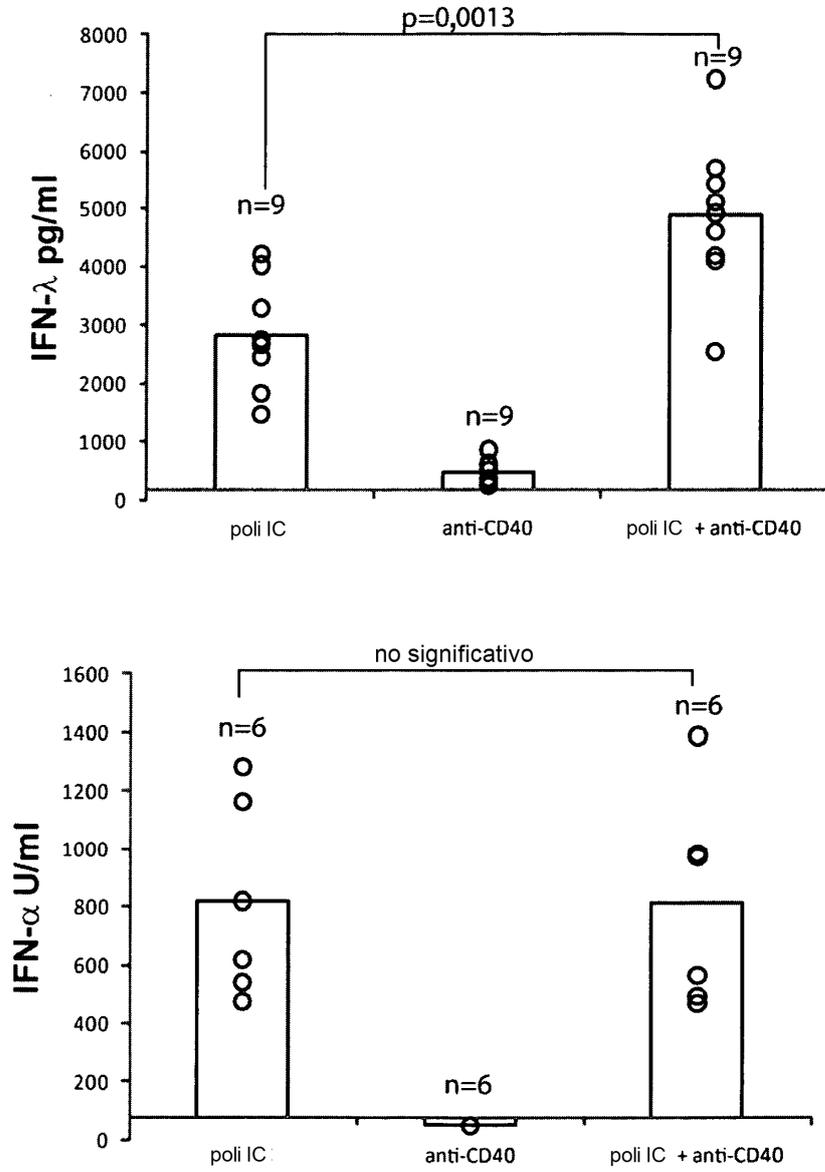


Figura 15

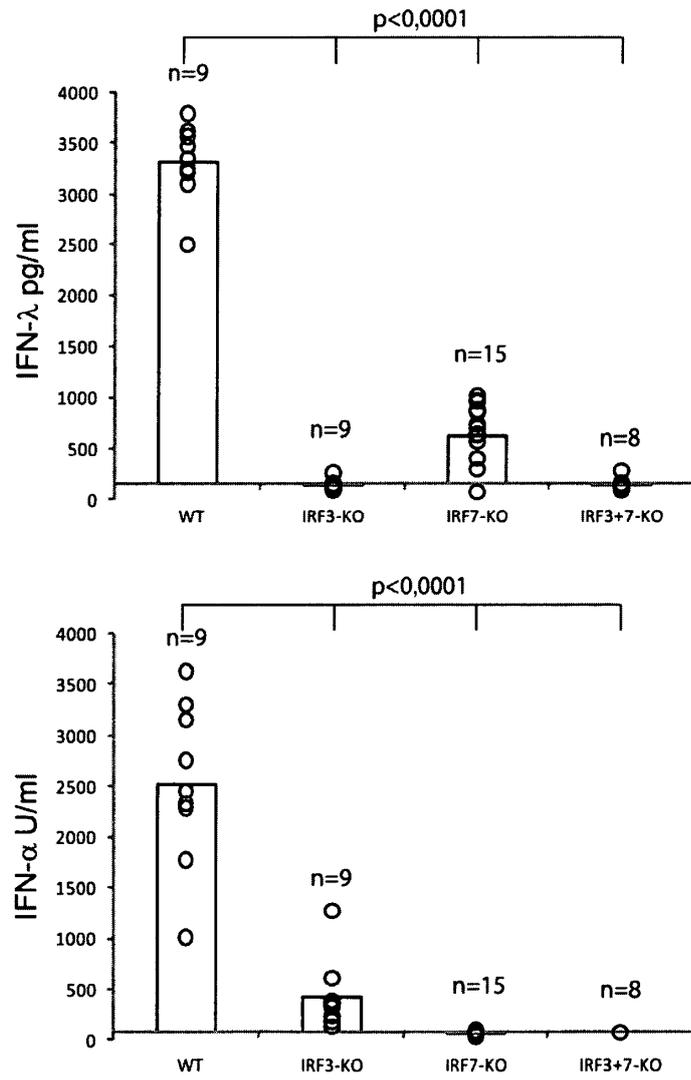


Figura 16

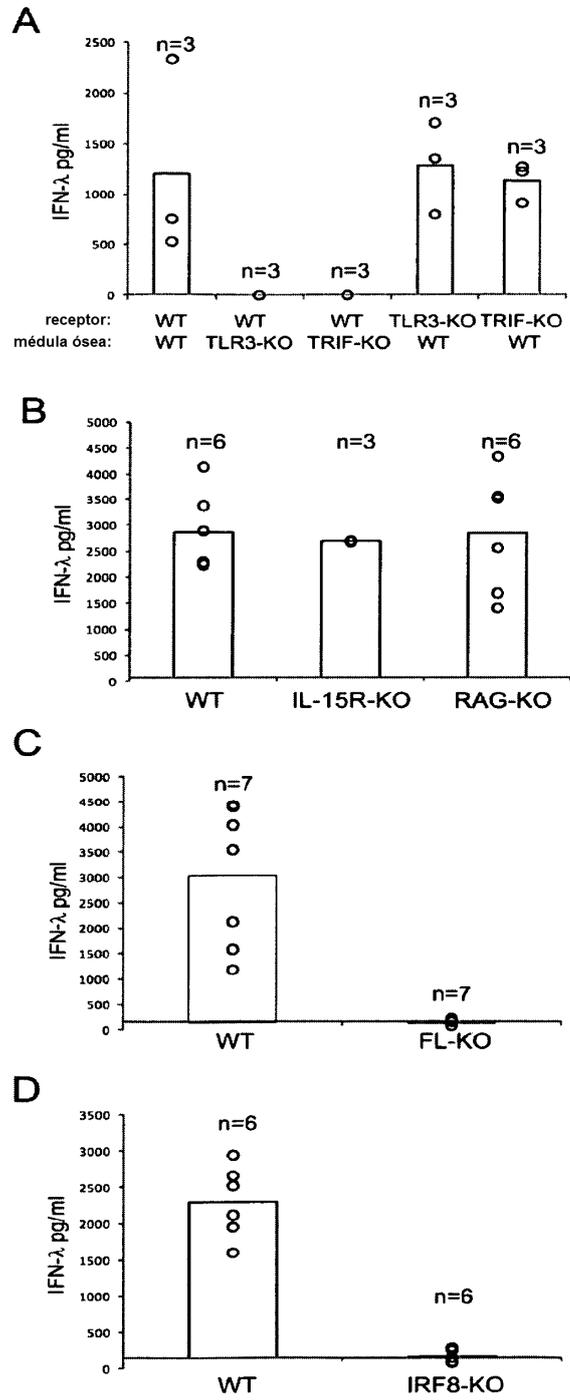


Figura 17

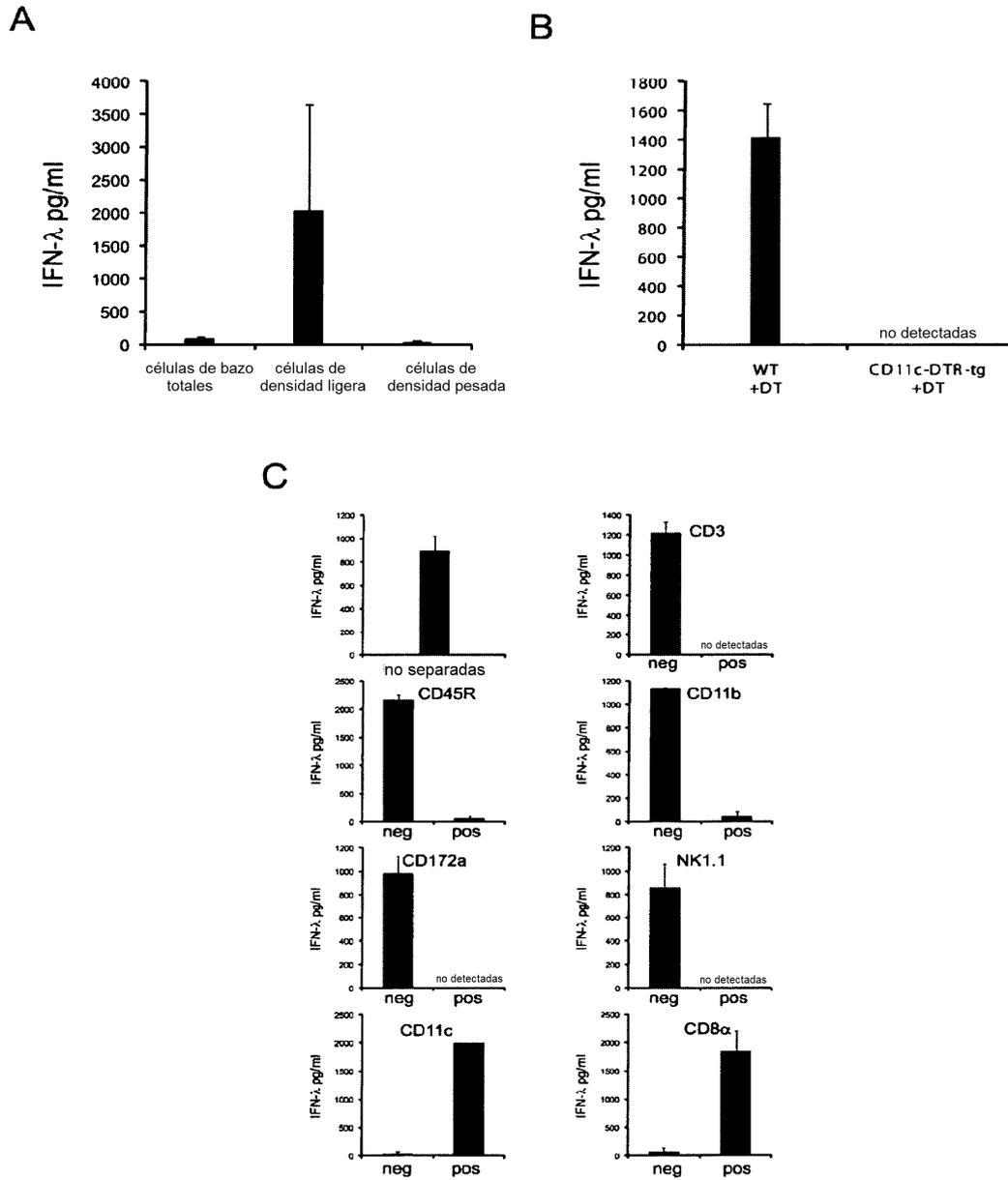


Figura 18

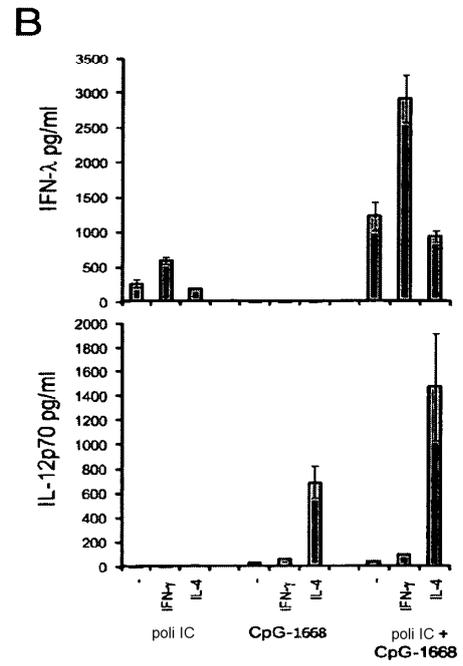
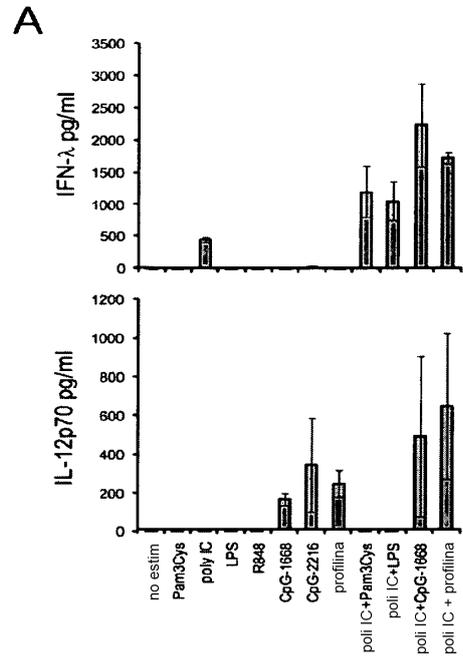
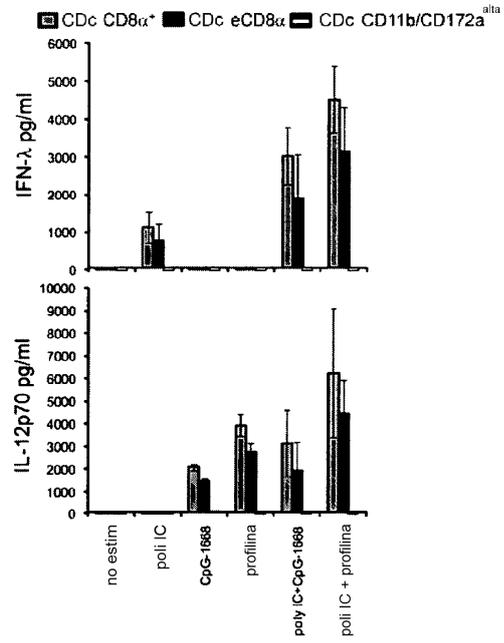


Figura 19

A



B

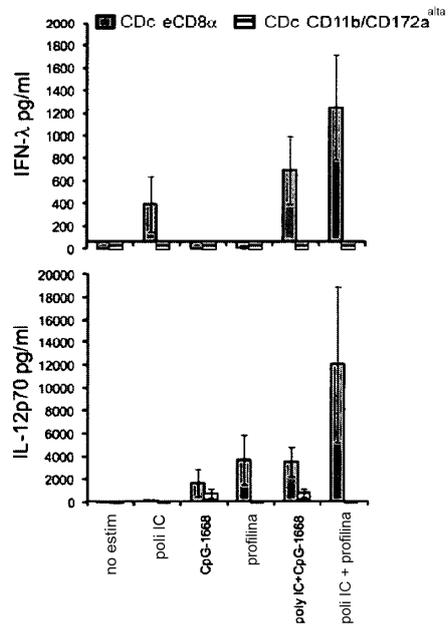
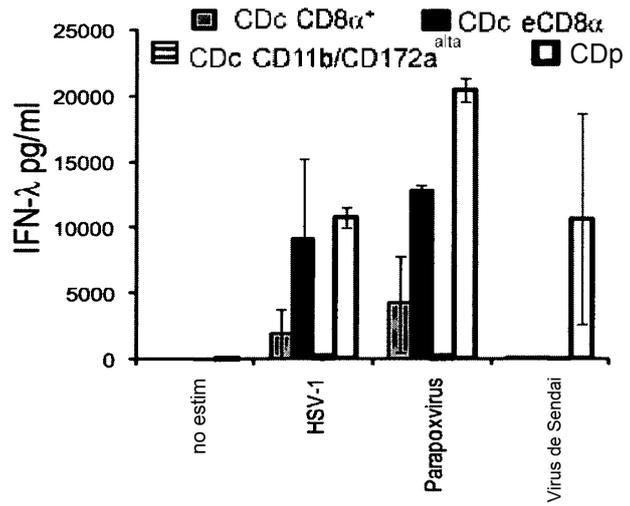


Figura 20

A



B

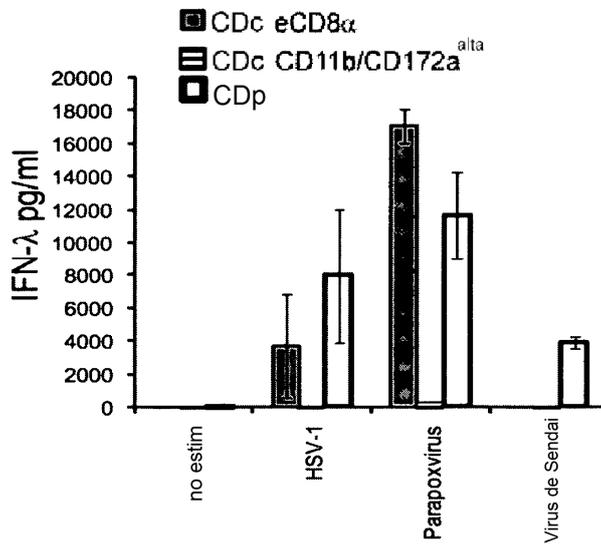


Figura 21

