

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 470**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 5/0784</b>	(2010.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/86</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/705</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/47</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/90</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2009 PCT/US2009/057738**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.03.2010 WO10033949**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2009 E 09815355 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2331680**

54 Título: **Métodos y composiciones de generación de una respuesta inmune mediante la inducción de CD40 y adaptadores de receptores de reconocimiento de patrones**

30 Prioridad:

**27.05.2009 US 181572 P**  
**18.02.2009 US 153562 P**  
**22.09.2008 US 99163 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.09.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SPENCER, DAVID y**  
**PRIYADHARSHINI, NARAYANAN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 633 470 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

Métodos y composiciones de generación de una respuesta inmune mediante la inducción de CD40 y adaptadores de receptores de reconocimiento de patrones

5

**Solicitudes de patente relacionadas**

Se reivindica prioridad con respecto a la solicitud provisional de EE.UU. n.º serie 61/181.572, presentada el 27 de mayo de 2009 y titulada "Methods and Compositions for Generating an Immune Response by Inducing CD40 and Pattern Recognition Receptor Adapters", a la solicitud provisional de EE.UU. n.º serie 61/153,562, presentada el 18 de febrero de 2009 y titulada "Methods and Compositions for Generating an Immune Response by Inducing CD40 and Pattern Recognition Receptor Adapters" y a la solicitud provisional de EE.UU. n.º serie 61/099.163, presentada el 22 de septiembre de 2008 y titulada "Methods and Compositions for Generating an Immune Response by Inducing CD40 and Pattern Recognition Receptor Adapters", a las que se hace referencia en su totalidad.

10

15

**Campo de la invención**

La invención se refiere, en general, al campo de la inmunología y, en particular, a métodos y composiciones para activar células presentadoras de antígenos y para inducir respuestas inmunes.

20

**Declaración de la investigación patrocinada a nivel federal**

La presente invención se realizó con apoyo gubernamental en virtud de la subvención del NIH número R01-CA120411. El Gobierno puede tener ciertos derechos en la presente invención.

25

**Antecedentes**

Debido a su método único de procesamiento y presentación de antígenos y al potencial para la expresión de alto nivel de moléculas coestimulantes y citocinas, las células dendríticas (DC) son células presentadoras de antígenos (APC) eficaces para cebar y activar los linfocitos T sin tratamiento previo (Banchereau J., Paczesny S., Blanco P., *et al.* "Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy". *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 987:180-187). Dicha propiedad ha conducido a su uso generalizado como una plataforma celular para la vacunación en una serie de ensayos clínicos con resultados alentadores (O'Neill D. W., Adams S., Bhardwaj N. "Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer". *Blood.* 2004; 104:2235-2246; Rosenberg S. A. "A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens". *Immunity.* 1999; 10:281-287). Sin embargo, la eficacia clínica de las vacunas de DC en pacientes con cáncer ha sido insatisfactoria, probablemente debido a una serie de deficiencias clave, incluyendo una activación subóptima, una migración limitada a los ganglios linfáticos drenantes y una vida útil insuficiente para la activación óptima de los linfocitos T en el medio linfático.

30

35

40

Un parámetro en la optimización de las vacunas contra el cáncer basadas en DC es la interacción de las DC con células efectoras inmunes, tales como linfocitos T CD4+, CD8+ y linfocitos T reguladoras (Treg). En estas interacciones, el estado de maduración de las DC es un factor clave para determinar las funciones efectoras resultantes (Steinman R. M., Hawiger D., Nussenzweig M.C. "Tolerogenic dendritic cells". *Annu Rev Immunol.* 2003; 21:685-711). Para aumentar al máximo el cebado de los linfocitos T CD4+ y CD8+ a la vez que se reduce al máximo la expansión de Treg, las DC necesitan estar completamente maduras, expresando altos niveles de moléculas coestimulantes (como CD40, CD80 y CD86) y citocinas proinflamatorias, como IL-12p70 e IL-6. Igualmente importante, las DC deben ser capaces de migrar eficazmente desde el sitio de vacunación a los ganglios linfáticos drenantes para iniciar las interacciones de linfocitos T (Vieweg J., Jackson A. "Modulation of antitumor responses by dendritic cells". *Springer Semin Immunopathol.* 2005; 26:329-341).

45

50

Para la maduración *ex vivo* de las DC inmaduras derivadas de monocitos, la mayoría de los ensayos basados en DC han usado un cóctel de citocinas (MC) de maduración patrón, compuesto por TNF-alfa, IL-1 beta, IL-6 y PGE<sub>2</sub>. La función principal de la prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) en el cóctel de maduración patrón es sensibilizar el receptor de quimiocinas CC 7 (CCR7) a sus ligandos, el ligando de quimiocina CC 19 (CCL19) y CCL21, y aumentar así la capacidad migratoria de las DC a los ganglios linfáticos drenantes (Scandella E., Men Y., Gillissen S., Forster R., Groettrup M. "Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells". *Blood.* 2002; 100:1354-1361; Luft T., Jefford M., Luetjens P., *et al.* "Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets". *Blood.* 2002; 100:1362-1372). Sin embargo, también se ha informado que la PGE<sub>2</sub> tiene numerosas propiedades potencialmente perjudiciales para la estimulación de una respuesta inmune, incluyendo la supresión de la proliferación de los linfocitos T (Goodwin J. S., Bankhurst A. D., Messner R. P., "Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. Existence of a prostaglandin-producing suppressor cell". *J Exp Med.* 1977; 146:1719-1734; Goodwin J. S. "Immunomodulation by eicosanoids and anti-inflammatory drugs". *Curr Opin Immunol.* 1989; 2:264-268), inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-12p70 y TNF-alfa (Kalinski P., Vieira P. L., Schuitemaker J. H., de Jong E. C., Kapsenberg M. L. "Prostaglandin E(2) is a selective inducer of

55

60

65

interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer". *Blood*. 2001; 97:3466-3469; van der Pouw Kraan T. C., Boeijs L. C., Smeenk R. J., Wijdenes J., Aarden L. A. "Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production". *J Exp Med*. 1995; 181:775-779)) y la regulación negativa de la expresión de superficie del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) II (Snyder D. S., Beller D. L., Unanue E. R. "Prostaglandins modulate macrophage la expression". *Nature* 1982; 299:163-165). Por lo tanto, los protocolos de maduración que pueden evitar la PGE2 al tiempo que potencian la migración probablemente mejorarán la eficacia terapéutica de las vacunas basadas en DC.

Se ha desarrollado un sistema de activación de DC basado en el control temporal dirigido de la vía de señalización de CD40 para extender el estado proestimulante de las DC dentro de tejidos linfoides. La funcionalidad de las DC se mejoró aumentando tanto la amplitud como la duración de la señalización de CD40 (Hanks B. A., Jiang J., Singh R. A., *et al.* "Re-engineered CD40 receptor enables potent pharmacological activation of dendritic-cell cancer vaccines in vivo". *Nat Med*. 2005; 11:130-137). Para lograr esto, el receptor de CD40 se volvió a diseñar de manera que el dominio citoplasmático de CD40 se fusionara a dominios sintéticos de unión a ligandos junto con una secuencia dirigida a la membrana. La administración de un fármaco dimerizante permeable a los lípidos, AP20187 (AP), denominado inductor químico de la dimerización (CID) (Spencer D. M., Wandless T. J., Schreiber S. L., Crabtree G. R. "Controlling signal transduction with synthetic ligands". *Science*. 1993; 262:1019- 1024), condujo a la inducción *in vivo* de cascadas de señalización dependientes de CD40 en DC murinas. Esta estrategia de inducción aumentó significativamente la inmunogenicidad frente a antígenos definidos y tumores *in vivo* más allá de lo conseguido con otras modalidades de activación (Hanks B. A., *et al.*, *Nat Med*. 2005; 11:130-137). La gran potencia de este CD40 inducible por el ligando quimérico (denominado iCD40) en ratones sugirió que este método también podría potenciar la potencia de las vacunas de DC humanas. Lapteva *et al.* ("Development of Novel CD4-independent iCD40-Dendritic Cell Vaccin for HIV-1 Immunotherapy", *Molecular Therapy*, vol. 17, suplemento n.º 1, 1 de mayo de 2009) analiza un receptor de CD40 inducible por fármaco dimerizante diseñado (iCD40) que permite la activación específica de DC controlada temporalmente incluyendo la combinación de iCD40 con una molécula MyD88 inducible por fármacos dimerizantes.

La señalización de receptor de reconocimiento de patrones (PRR), un ejemplo del cual es la señalización del receptor de tipo Toll (TLR) también desempeña un papel fundamental en la inducción de la maduración y la activación de las DC; las DC humanas expresan múltiples TLR distintos (Kadowaki N., Ho S., Antonenko S., *et al.*, "Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens". *J Exp Med*. 2001; 194:863-869). Los once TLR de mamífero responden a diversas macromoléculas derivadas de patógenos, contribuyendo a la activación de respuestas inmunes innatas junto con el inicio de la inmunidad adaptativa. El Lipopolisacárido (LPS) y un derivado clínicamente relevante, el monofosforil lípido A (MPL), se unen a los complejos TLR-4 de la superficie celular (Kadowaki N, HoS, Antonenko S, *et al.*, "Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens". *J Exp Med*. 2001;194:863-869), Conduciendo a diversas vías de señalización que culminan en la inducción de factores de transcripción tales como NF-kappaB e IRF3, junto con proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK) p38 y la quinasa c-Jun (JNK) (Ardehsna K. M., Pizzey A. R., Devereux S., Khwaja A. "The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte derived dendritic cells". *Blood*. 2000; 96:1039-1046; Ismaili J., Rennesson J., Aksoy E., *et al.* "Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells". *J Immunol*. 2002; 168:926-932). Durante este proceso, las DC maduran y regulan parcialmente positiva las citocinas proinflamatorias, como los interferones IL-6, IL-12 y de tipo I (Rescigno M., Martino M., Sutherland C. L., Gold M. R., Ricciardi-Castagnoli P. "Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways". *J Exp Med*. 1998; 188:2175-2180).. Se ha demostrado que la maduración inducida por LPS aumenta la capacidad de las DC para estimular respuestas de linfocitos T específicas de antígenos *in vitro* e *in vivo* (Lapointe R., Toso J. F., Butts C., Young H. A., Hwu P. "Human dendritic cells require multiple activation signals for the efficient generation of tumor antigen-specific T lymphocytes". *Eur J Immunol*. 2000; 30:3291-3298). Los procedimientos de activación de una célula presentadora de antígeno, que comprenden la transducción de la célula con un ácido nucleico que codifica un péptido CD40, se han descrito en la patente de EE.UU. n.º 7.404.950, y los métodos de activación de una célula presentadora de antígeno, que comprende transfectar la célula con un ácido nucleico codificante de una proteína quimérica que incluye un péptido CD40 inducible y un receptor de reconocimiento de patrones u otras proteínas cadena abajo en la vía se han descrito en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US2007/081963, presentada el 19 de octubre de 2007, publicada como WO 2008/049113.

## Sumario

La invención se refiere a las realizaciones como se caracterizan en las reivindicaciones.

Se ha aplicado un sistema CD40 (iCD40) inducible a las células dendríticas humanas (DC), y se ha demostrado que la combinación de la señalización iCD40 con la ligadura del adaptador de reconocimiento de patrones (PRR) provoca una activación persistente y potente de las DC humanas. Estas características forman la base de las inmunoterapias contra el cáncer para tratar cánceres tales como, por ejemplo, cáncer de próstata hormono-refractario avanzado. Por consiguiente, se ha descubierto que la combinación de inducir CD40 y un adaptador de PRR inducible activa sinérgicamente las células presentadoras de antígenos e induce una respuesta inmune contra

un antígeno. Los adaptadores de PRR inducibles incluyen, por ejemplo, MyD88 y TRIF; receptores de reconocimiento de patrones inducibles tales como, por ejemplo, receptores de tipo NOD, por ejemplo, NOD1 o NOD2, y helicasas de tipo RIG, por ejemplo, RIG-I o Mda-5, también pueden usarse en combinación con CD40 inducible. En el presente documento, se analizan métodos de activación de células presentadoras de antígenos, que comprenden transducir una célula presentadora de antígeno con un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, en los que la proteína quimérica comprende (i) una región dirigida a la membrana, (ii) una región de unión al ligando; (iii) una región de polipéptido CD40 citoplasmático; y (iv) un péptido seleccionado del grupo que consiste en un péptido MyD88 truncado que carece del dominio TIR y un péptido TRIF; y poner en contacto la célula presentadora de antígeno con un ligando multimérico no proteico que se une a la región de unión al ligando; mediante lo que se activa la célula presentadora de antígeno.

Por lo tanto, se proporcionan en el presente documento métodos de activación de una célula presentadora de antígeno, que comprenden transfectar o transducir una célula presentadora de antígeno con un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, en la que la proteína quimérica comprende una región dirigida a la membrana, una región de unión al ligando, una región de polipéptido CD40 citoplasmático y un péptido seleccionado del grupo que consiste en un péptido MyD88, un péptido MyD88 truncado que carece del dominio TIR, un péptido NOD2, un péptido RIG-1 y un péptido TRIF; y poner en contacto la célula presentadora de antígeno con un ligando multimérico no proteico que se une a la región de unión al ligando; mediante lo que se activa la célula presentadora de antígeno. La región del polipéptido CD40 citoplasmático de los métodos y de las composiciones puede tener, por ejemplo, una secuencia peptídica de la región citoplasmática de SEQ ID NO: 2, y puede estar codificada, por ejemplo, por una secuencia polinucleotídica que codifica una región polipeptídica citoplasmática en la SEQ ID NO: 1.

También se proporcionan métodos de activación de una célula presentadora de antígeno, que comprenden transfectar o transducir una célula presentadora de antígeno con un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, en los que la proteína quimérica comprende una región dirigida a la membrana, una región de unión al ligando, un péptido MyD88 truncado carente del dominio TIR; y poner en contacto la célula presentadora de antígeno con un ligando multimérico no proteico que se une a la región de unión al ligando; mediante lo que se activa la célula presentadora de antígeno, según lo definido en las reivindicaciones. La proteína quimérica puede comprender además una región de polipéptido CD40.

También se proporcionan composiciones que comprenden un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, en las que la proteína quimérica comprende una región dirigida a la membrana, una región de unión al ligando, una región de polipéptido CD40 citoplasmático y un péptido MyD88 truncado carente de dominio TIR según lo definido en las reivindicaciones.

Una célula presentadora de antígeno es "activada" cuando una o más actividades asociadas con células presentadoras de antígeno activadas pueden ser observadas y/o medidas por un experto en la materia. Por ejemplo, una célula presentadora de antígeno se activa cuando, tras el contacto con un vector de expresión presentado en el presente documento, se puede medir una actividad asociada con la activación en la célula en contacto con el vector de expresión en comparación con una célula presentadora de antígeno que no se ha puesto en contacto con el vector de expresión ni se ha puesto en contacto con un vector de control negativo. En un ejemplo, la actividad aumentada puede estar a un nivel de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez veces, o más, que la de la célula sin contacto, o la célula en contacto con el control negativo. Por ejemplo, se puede mejorar una de las siguientes actividades en una célula presentadora de antígeno que ha sido puesta en contacto con el vector de expresión: la expresión de moléculas coestimulantes en la célula presentadora de antígeno, la translocación nuclear de NF-kappaB en células presentadoras de antígeno, la expresión del marcador de maduración de DC tal como, por ejemplo, la expresión del receptor de tipo Toll o la expresión de CCR7, respuestas de linfocitos T citotóxicos específicos tales como, por ejemplo, actividad lítica específica dirigida contra células tumorales o la expresión de citocinas (por ejemplo IL-2) de quimiocinas. Los métodos de ensayo de la activación de las células presentadoras de antígeno se presentan en el presente documento, por ejemplo, en los Ejemplos 11-17.

Una cantidad de una composición que activa las células presentadoras de antígeno que "potencia" una respuesta inmune se refiere a una cantidad en la que se observa una respuesta inmune que es mayor o está intensificada o desviada de cualquier manera con la adición de la composición cuando se compara con la misma respuesta inmune medida sin la adición de la composición. Por ejemplo, la actividad lítica de los linfocitos T citotóxicos se puede medir, por ejemplo, usando un ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr, con y sin la composición. La cantidad de la sustancia a la que se potencia la actividad lítica de CTL en comparación con la actividad lítica de CTL sin la composición se dice que es una cantidad suficiente para potenciar la respuesta inmune del animal al antígeno. Por ejemplo, la respuesta inmune se puede potenciar en un factor de al menos aproximadamente 2 o, por ejemplo, en un factor de aproximadamente 3 o más. La cantidad de citocinas secretadas también se puede modificar.

La respuesta inmune potenciada puede ser una respuesta inmune activa o pasiva. Como alternativa, la respuesta puede ser parte de un enfoque de inmunoterapia adaptativa en el que las células presentadoras de antígeno se obtienen de un sujeto (por ejemplo, un paciente), luego se transducen o se transfectan con una composición que comprende el vector de expresión o la construcción presentados en el presente documento. Las células

presentadoras del antígeno se pueden obtener, por ejemplo, de la sangre del sujeto o de la médula ósea del sujeto. Las células presentadoras del antígeno se pueden administrar entonces al mismo animal o a un animal diferente, o al mismo sujeto o a un sujeto diferente (por ejemplo, donantes iguales o diferentes). En ciertas realizaciones, el sujeto (por ejemplo, un paciente) tiene o se sospecha que tiene un cáncer tal como, por ejemplo, cáncer de próstata, o tiene o se sospecha que tiene una enfermedad infecciosa. En otras realizaciones, el método de potenciación de la respuesta inmune se pone en práctica junto con una terapia del cáncer conocida o cualquier terapia conocida para tratar la enfermedad infecciosa.

Las etapas de los métodos proporcionados se pueden realizar usando cualquier método adecuado conocido y seleccionado por el experto habitual en la materia. Estos métodos incluyen, sin limitación, métodos de transducción, transformación o suministro de otro tipo de ácido nucleico a la célula presentadora de antígeno, presentados en el presente documento. En algunas realizaciones, el péptido MyD88 truncado está codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 (con o sin enlaces de ADN). También se describe que el péptido es un péptido TRIF. A menudo, el péptido está codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9 (con o sin enlaces de ADN). La región del polipéptido citoplasmático CD40 puede estar codificada por una secuencia polinucleotídica en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones de los métodos o de las composiciones, el péptido tiene una secuencia peptídica de SEQ ID NO: 6 o en la que el péptido está codificado por una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9. En ciertas realizaciones, el MyD88 truncado tiene la secuencia peptídica de SEQ ID NO: 6 y puede, por ejemplo, estar codificado por la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 5. A menudo, el ácido nucleico comprende una secuencia promotora unida operativamente a la secuencia polinucleotídica. En general, la expresión "unida operativamente" pretende indicar que la secuencia promotora está funcionalmente unida a una segunda secuencia, de manera que la secuencia promotora inicia y media la transcripción del ADN correspondiente a la segunda secuencia. Los expertos en la materia pueden seleccionar una secuencia promotora apropiada, incluyendo, sin limitación, una secuencia promotora descrita en el presente documento.

Los expertos en la materia pueden seleccionar cualquier región dirigida a la membrana conocida apropiada, incluyendo, sin limitación, una región dirigida a la miristoilación, región dirigida a la palmitoilación, región dirigida a la prenilación o región transmembrana del receptor. A menudo, la región dirigida a la membrana es una región dirigida a la miristoilación.

La región de unión al ligando es una región de unión al ligando FKBP. A menudo, la región de unión al ligando comprende una secuencia de Fv'Fvls. A veces, la secuencia de Fv'Fvls comprende además una secuencia Fv' adicional.

En algunas realizaciones, el ligando es una molécula pequeña. Los expertos en la materia pueden seleccionar el ligando apropiado para la región de unión al ligando seleccionada. A menudo, el ligando es dimérico, a veces, el ligando es un FK506 dimérico o un análogo dimérico de FK506. En ciertas realizaciones, el ligando es AP1903. En ciertas realizaciones, el ligando es AP20187.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico está contenido dentro de un vector vírico. Los expertos en la materia pueden seleccionar el vector vírico apropiado. En ciertas realizaciones, el vector vírico es un vector adenovírico. Se entiende que, en algunas realizaciones, la célula presentadora de antígeno se pone en contacto con el vector vírico *ex vivo* y, en algunas realizaciones, la célula presentadora de antígeno se pone en contacto con el vector vírico *in vivo*.

En algunas realizaciones, la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica, por ejemplo, una célula dendrítica de mamífero. A menudo, la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica humana.

En ciertas realizaciones, la célula presentadora de antígeno también se pone en contacto con un antígeno. A menudo, la célula presentadora de antígeno se pone en contacto con el antígeno *ex vivo*. A veces, la célula presentadora de antígeno se pone en contacto con el antígeno *in vivo*. En algunas realizaciones, la célula presentadora de antígeno está en un sujeto, y se genera una respuesta inmune contra el antígeno. A veces, la respuesta inmune es una respuesta inmune de linfocitos T citotóxicos (CTL). A veces, la respuesta inmune se genera contra un antígeno tumoral. En ciertas realizaciones, la célula presentadora de antígeno se activa sin la adición de un adyuvante.

En algunas realizaciones, la célula presentadora de antígeno se transduce con el ácido nucleico *ex vivo* y se administra al sujeto mediante administración intradérmica. En algunas realizaciones, la célula presentadora de antígeno se transduce con el ácido nucleico *ex vivo* y se administra al sujeto mediante administración subcutánea. A veces, la célula presentadora de antígeno se transduce con el ácido nucleico *ex vivo*. A veces, la célula presentadora de antígeno se transduce con el ácido nucleico *in vivo*.

También se proporciona un método de inducción de una respuesta inmune de linfocitos T citotóxicos (CTL) contra un antígeno, que comprende: poner en contacto una célula presentadora de antígeno humana sensibilizada con un antígeno con: (a) una molécula multimérica que tiene dos o más regiones que se unen a y multimerizan CD40 nativo; y (b) un adaptador de PRR inducible, por ejemplo, MyD88, MyD88 truncado o TRIF; mediante lo que se

induce una respuesta inmune de los CTL contra el antígeno. MyD88 pretende significar el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88, por ejemplo, pero sin limitación, la versión humana, citada como gen ncbi ID 4615. TRIF pretende significar el interferón beta inductor del adaptador que contiene el dominio TIR. El término "truncado" pretende significar que la proteína no es de longitud completa y que puede carecer, por ejemplo, de un dominio. Por ejemplo, un MyD88 truncado no es de longitud completa, pudiendo faltar, por ejemplo, el dominio TIR. Un ejemplo de MyD88 truncado se indica como MyD88L en el presente documento, y también se presenta como SEQ ID NO: 5 (secuencia de ácido nucleico) y 6 (secuencia peptídica). La SEQ ID NO: 5 incluye los enlaces añadidos durante la subclonación. Los expertos habituales en la materia reconocen que, una secuencia de ácido nucleico que codifica un "MyD88 truncado" pretende significar la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido MyD88 truncado. El término también puede referirse a la secuencia de ácido nucleico que incluye la parte que codifica cualquier aminoácido añadido como un artefacto de clonación, incluyendo cualquier aminoácido codificado por los enlaces. En dichos métodos, la molécula multimérica puede ser un anticuerpo que se une a un epítipo en el dominio extracelular de CD40 (por ejemplo, anticuerpo anti-CD40 humanizado, Tai *et al.*, *Cancer Research* 64, 2846-2852 (2004)), puede ser un ligando de CD40 (por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.497.876 (Maraskovsky *et al.*)) o puede ser otra molécula coestimulante (por ejemplo, B7/CD28). Los expertos en la materia entenderán que las variaciones conservativas en la secuencia, que no afectan a la función, según lo ensayado en el presente documento, pertenecen al alcance de las presentes reivindicaciones.

También se describen en el presente documento composiciones que comprenden un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, en las que la proteína quimérica comprende (i) una región dirigida a la membrana, (ii) una región de unión al ligando, (iii) una región de polipéptido CD40 citoplasmático y (iv) un péptido seleccionado del grupo que consiste en un MyD88 truncado carente de dominio TIR y un péptido TRIF. En algunos aspectos analizados en el presente documento, el péptido MyD88 truncado está codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5. En otras realizaciones, el péptido es un péptido TRIF. A menudo, el péptido está codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9. En algunos aspectos descritos en el presente documento, la región del polipéptido citoplasmático CD40 está codificada por una secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 1. A menudo, el ácido nucleico comprende una secuencia promotora unida operativamente a la secuencia polinucleotídica. Los expertos habituales en la materia pueden seleccionar una secuencia promotora apropiada, incluyendo, sin limitación, una secuencia promotora descrita en el presente documento.

Los expertos en la materia pueden seleccionar cualquier región dirigida a la membrana conocida apropiada, incluyendo, sin limitación, una región dirigida a la miristoilación, región dirigida a la palmitoilación, región dirigida a la prenilación o región transmembrana del receptor. A menudo, la región dirigida a la membrana es una región dirigida a la miristoilación.

En ciertos aspectos tratados en el presente documento, la región de unión al ligando se selecciona del grupo que consiste en región de unión al ligando FKBP, región de unión al ligando del receptor de ciclofilina, región de unión al ligando del receptor de esteroide, región de unión al ligando de los receptores de ciclofilina y región de unión al ligando del receptor de tetraciclina. A menudo, la región de unión al ligando comprende una secuencia de Fv'Fvls. A veces, la secuencia de Fv'Fvls comprende además una secuencia Fv' adicional.

En algunos aspectos tratados en el presente documento, el ácido nucleico está contenido dentro de un vector vírico. Los expertos habituales en la materia pueden seleccionar el vector vírico apropiado. En ciertas realizaciones, el vector vírico es un vector adenovírico. Se entiende que, en algunos aspectos tratados en el presente documento, la célula presentadora de antígeno se pone en contacto con el vector vírico *ex vivo* y, en algunas realizaciones, la célula presentadora de antígeno se pone en contacto con el vector vírico *in vivo*.

En algunos aspectos de la memoria descriptiva, se proporcionan métodos de activación de una célula presentadora de antígeno, que comprenden transducir una célula presentadora de antígeno con un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, en los que la proteína quimérica comprende (i) una región dirigida a la membrana, (ii) una región de unión al ligando e (iii) un péptido MyD88 o un péptido MyD88 truncado carente del dominio TIR; y poner en contacto la célula presentadora de antígeno con un ligando multimérico no proteico que se une a la región de unión al ligando; mediante lo que se activa la célula presentadora de antígeno. A menudo, el péptido MyD88 está truncado, incluyendo, sin limitación, un péptido MyD88 truncado que es codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5. Las etapas de los métodos proporcionados se pueden realizar usando cualquier método adecuado conocido y seleccionado por el experto habitual en la materia. Estos métodos incluyen, sin limitación, métodos de transducción, transformación o suministro de otro tipo de ácido nucleico a la célula presentadora de antígeno, presentados en el presente documento. A menudo, el ácido nucleico comprende una secuencia promotora ligada operativamente a la secuencia de polinucleótido. Los expertos en la materia pueden seleccionar una secuencia promotora apropiada, incluyendo, sin limitación, una secuencia promotora descrita en el presente documento.

Los expertos en la materia pueden seleccionar cualquier región dirigida a la membrana conocida apropiada, incluyendo, sin limitación, una región dirigida a la miristoilación, región dirigida a la palmitoilación, región dirigida a la prenilación o región transmembrana del receptor. A menudo, la región dirigida a la membrana es una región dirigida

a la miristoilación.

La región de unión al ligando se puede seleccionar del grupo que consiste en región de unión al ligando FKBP, región de unión al ligando del receptor de ciclofilina, región de unión al ligando del receptor de esteroide, región de unión al ligando de los receptores de ciclofilina y región de unión al ligando del receptor de tetraciclina. A menudo, la región de unión al ligando comprende una secuencia de Fv'Fvls. A veces, la secuencia de Fv'Fvls comprende además una secuencia Fv' adicional.

El ligando puede ser una molécula pequeña. Los expertos en la materia pueden seleccionar el ligando apropiado para la región de unión al ligando seleccionada. A menudo, el ligando es dimérico, a veces, el ligando es un FK506 dimérico o un análogo dimérico de FK506. El ligando puede ser AP1903 o AP20187.

El ácido nucleico puede estar contenido en un vector vírico. Los expertos habituales en la materia pueden seleccionar el vector vírico apropiado. En ciertas realizaciones, el vector vírico es un vector adenovírico. Se entiende que, en algunos aspectos tratados en el presente documento, la célula presentadora de antígeno se pone en contacto con el vector vírico *ex vivo* y, en algunos aspectos descritos en el presente documento, la célula presentadora de antígeno se pone en contacto con el vector vírico *in vivo*.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica, por ejemplo, una célula dendrítica de mamífero. A menudo, la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica humana.

En ciertos aspectos descritos en el presente documento, la célula presentadora de antígeno también se pone en contacto con un antígeno. A menudo, la célula presentadora de antígeno se pone en contacto con el antígeno *ex vivo*. A veces, la célula presentadora de antígeno se pone en contacto con el antígeno *in vivo*. En algunos aspectos descritos en el presente documento, la célula presentadora de antígeno está en un sujeto, y se genera una respuesta inmune contra el antígeno. A veces, la respuesta inmune es una respuesta inmune de linfocitos T citotóxicos (CTL). A veces, la respuesta inmune se genera contra un antígeno tumoral. En ciertos aspectos tratados en el presente documento, la célula presentadora de antígeno se activa sin la adición de un adyuvante.

En algunos aspectos tratados en el presente documento, la célula presentadora de antígeno se transduce con el ácido nucleico *ex vivo* y se administra al sujeto mediante administración intradérmica. En algunos aspectos tratados en el presente documento, la célula presentadora de antígeno se transduce con el ácido nucleico *ex vivo* y se administra al sujeto mediante administración subcutánea. A veces, la célula presentadora de antígeno se transduce con el ácido nucleico *ex vivo*. A veces, la célula presentadora de antígeno se transduce con el ácido nucleico *in vivo*.

También se proporcionan en el presente documento composiciones que se pueden usar, por ejemplo, en los métodos de la presente invención. Así pues, se proporcionan composiciones que comprenden un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, en las que la proteína quimérica comprende (i) una región dirigida a la membrana, (ii) una región de unión al ligando, (iii) una región de polipéptido CD40 citoplasmático y (iv) un péptido MyD88 truncado carente de dominio TIR según lo definido en las reivindicaciones. A veces, el péptido MyD88 truncado está codificado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5. A menudo, el ácido nucleico comprende una secuencia promotora unida operativamente a la secuencia polinucleotídica. Los expertos en la materia pueden seleccionar una secuencia promotora apropiada, incluyendo, sin limitación, una secuencia promotora descrita en el presente documento.

Los expertos en la materia pueden seleccionar cualquier región dirigida a la membrana conocida apropiada, incluyendo, sin limitación, una región dirigida a la miristoilación, región dirigida a la palmitoilación, región dirigida a la prenilación o región transmembrana del receptor. A menudo, la región dirigida a la membrana es una región dirigida a la miristoilación.

La región de unión al ligando es una región de unión al ligando FKBP. A menudo, la región de unión al ligando comprende una secuencia de Fv'Fvls. A veces, la secuencia de Fv'Fvls comprende además una secuencia Fv' adicional.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico está contenido dentro de un vector vírico. Los expertos en la materia pueden seleccionar el vector vírico apropiado. En ciertas realizaciones, el vector vírico es un vector adenovírico. Se entiende que, en algunas realizaciones, la célula presentadora de antígeno se pone en contacto con el vector vírico *ex vivo* y, en algunas realizaciones, la célula presentadora de antígeno se pone en contacto con el vector vírico *in vivo*.

También se proporcionan composiciones que comprenden una célula transducida con una composición de ácido nucleico de cualquiera de las realizaciones presentadas en el presente documento. En algunas realizaciones, la célula es una célula presentadora de antígeno. A menudo, la célula es una célula dendrítica, incluyendo, sin limitación, una célula de mamífero, por ejemplo, pero sin limitación, una célula dendrítica humana.

También se proporciona el uso de una composición que comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, en la que la proteína quimérica comprende (i) una región dirigida a la membrana, (ii) una región de unión al ligando, (iii) una región de polipéptido CD40 citoplasmático y (iv) un péptido MyD88 truncado carente de dominio TIR en la fabricación de un medicamento para la terapia de una afección mediante la activación de una respuesta inmune según lo definido en las reivindicaciones. En otra realización, se proporciona el uso de una composición que comprende una célula transducida o transfectada con un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, en la que la proteína quimérica comprende (i) una región dirigida a la membrana, (ii) una región de unión al ligando, (iii) una región de polipéptido CD40 citoplasmático y (iv) un péptido MyD88 truncado carente de dominio TIR en la fabricación de un medicamento para la terapia de una afección mediante la activación de una respuesta inmune según lo definido en las reivindicaciones. La composición se puede usar, por ejemplo, para transfectar o transducir una célula presentadora de antígeno.

En los métodos de inducción de una respuesta inmune presentada en el presente documento, la célula presentadora de antígeno puede ser transducida *ex vivo* o *in vivo* con un ácido nucleico que codifique la proteína quimérica. La célula presentadora de antígeno puede ser sensibilizada al antígeno al mismo tiempo que la célula presentadora de antígeno se pone en contacto con el ligando multimérico o la célula presentadora de antígeno puede ser previamente sensibilizada al antígeno antes de que la célula presentadora de antígeno esté en contacto con el ligando de multimerización. La célula presentadora de antígeno se puede poner en contacto con el antígeno *ex vivo*. La célula presentadora de antígeno se puede transducir con el ácido nucleico *ex vivo* y administrarse al sujeto mediante administración intradérmica y, a veces, la célula presentadora de antígeno se transduce con el ácido nucleico *ex vivo* y se administra al sujeto mediante administración subcutánea. El antígeno puede ser un antígeno tumoral, y la respuesta inmune de los CTL se puede inducir mediante la migración de la célula presentadora de antígeno a un ganglio linfático drenante.

En los métodos del presente documento, la parte de CD40 inducible del péptido puede estar situada cadena arriba o cadena abajo de la parte de proteína adaptadora del PRR inducible. Además, la parte de CD40 inducible y las partes de proteína adaptadora del PRR inducibles pueden transfectarse o transducirse en las células o en el mismo vector, en *cis*, o en vectores separados, en *trans*.

También se describe en el presente documento un método de evaluación de la migración de una célula presentadora de antígeno a un ganglio linfático, que comprende: (a) inyectar en un sujeto una célula presentadora de antígeno que produce una proteína detectable; y (b) determinar la cantidad de proteína detectable en el ganglio linfático del animal, mediante lo que la migración de la célula presentadora de antígeno al ganglio linfático se evalúa a partir de la cantidad de proteína detectable en el ganglio linfático. En dichos métodos, el animal puede ser un roedor, tal como una rata o un ratón (por ejemplo, un ratón irradiado). En algunos aspectos tratados en el presente documento, la proteína detectable es una proteína luciferasa, tal como una proteína luciferasa desplazada al rojo de escarabajo click (por ejemplo, *Pyrophorus plagiophthalmus*). En ciertos aspectos tratados en el presente documento, la célula presentadora de antígeno se ha transducido con un ácido nucleico que tiene una secuencia polinucleotídica que codifica la proteína detectable. En ciertos aspectos tratados en el presente documento, el ganglio linfático es el ganglio linfático poplíteo o ganglio linfático inguinal. La célula presentadora de antígeno puede ser una célula dendrítica, tal como una célula dendrítica humana. En ciertos aspectos tratados en el presente documento, el ganglio linfático se retira del animal antes de que se determine la cantidad de proteína detectable, y a veces la D-luciferina se administra al ganglio linfático retirado. La cantidad de la proteína detectable puede ser cualitativa (por ejemplo, cantidades relativas comparadas entre diferentes muestras) y puede ser cuantitativa (por ejemplo, una concentración). La cantidad de la proteína detectable puede determinarse detectando directamente la proteína. Por ejemplo, la proteína puede ser fluorescente (por ejemplo, una proteína fluorescente verde o una versión desplazada al rojo o al azul) o puede unirse a un marcador fluorescente (por ejemplo, un anticuerpo unido a un fluoróforo). Como alternativa, la cantidad de la proteína detectable se puede determinar indirectamente mediante la administración de un sustrato al animal que es convertido a un producto detectable por la proteína y la detección del producto detectable. Por ejemplo, la cantidad de una proteína luciferasa se puede determinar administrando D-Luciferina al animal y detectando el producto de D-luciferina generado por la luciferasa producida en la célula presentadora de antígeno.

En ciertos aspectos tratados en el presente documento, la región dirigida a la membrana es una región dirigida a la miristoilación, aunque la región dirigida a la membrana se puede seleccionar de otros tipos de regiones dirigidas a la transmembrana, tales como las regiones descritas más adelante. En algunos aspectos tratados en el presente documento, el ligando es una molécula pequeña y, a veces, la molécula es dimérica. Los ejemplos de moléculas diméricas son FK506 diméricos y análogos diméricos de FK506. En ciertos aspectos tratados en el presente documento, el ligando es AP1903 o AP20187. En algunos aspectos tratados en el presente documento, la proteína quimérica incluye una o más regiones de unión al ligando, tales como dos o tres regiones de unión al ligando, por ejemplo. Las regiones de unión al ligando suelen estar en tándem.

El ácido nucleico, en ciertos aspectos tratados en el presente documento, está contenido dentro de un vector vírico, tal como un vector adenovírico por ejemplo. La célula presentadora de antígeno, en algunos aspectos tratados en el presente documento, se pone en contacto con un antígeno, a veces *ex vivo*. En ciertos aspectos tratados en el

presente documento, la célula presentadora de antígeno está en un sujeto y se genera una respuesta inmune contra el antígeno, tal como una respuesta inmune de linfocitos T citotóxicos (CTL). En ciertos aspectos tratados en el presente documento, se genera una respuesta inmune contra un antígeno tumoral (por ejemplo, PSMA). En algunos aspectos tratados en el presente documento, el ácido nucleico se prepara *ex vivo* y se administra al sujeto mediante la administración intradérmica o mediante la administración subcutánea, por ejemplo. A veces la célula presentadora de antígeno se transduce o se transfecta con el ácido nucleico *ex vivo* o *in vivo*. En algunos aspectos tratados en el presente documento, el ácido nucleico comprende una secuencia promotora unida operativamente a la secuencia polinucleotídica. Como alternativa, el ácido nucleico comprende un ARN transcrito *ex vivo* que contiene la región codificante de la proteína quimérica.

## Breve descripción de las figuras

Figura 1. Diagrama esquemático de iCD40 y expresión en DC humanas. A. El dominio citoplasmático de CD40 humano puede subclonarse cadena abajo de un dominio dirigido a la miristoilación (M) y dos dominios en tándem (Fv) (Clackson T., Yang W., Rozamus L. W., *et al.* "Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 1998; 95:10437-10442). La expresión de la proteína quimérica M-Fv-Fv-CD40, denominada en el presente documento CD40 inducible (iCD40) puede estar bajo control del promotor de citomegalovirus (CMV). B. La expresión de las formas endógena (eCD40) y recombinante inducible (iCD40) de CD40 evaluadas mediante transferencia Western. Carril 1, DC de tipo silvestre (control de CD40 endógeno); Carril 2, DC estimuladas con 1 microgramo/ml de LPS; Carriles 3 y 4, DC transducidas con 10.000 VP/célula (MOI ~ 160) de Ad5/f35-iCD40 (iCD40-DC) con y sin fármaco dimerizante AP20187, respectivamente; Carril 5, iCD40-DC estimulados con LPS y AP20187; Carril 6, DC estimuladas con CD40L (ligando de CD40, una proteína miembro de la familia TNF a) y LPS; Carril 7, DC transducidas con Ad5/f35-GFP (GFP-DC) a una MOI de 160 y estimuladas con AP20187 y LPS; Carril 8, GFP-DC estimuladas con AP20187; Carril 9, linfocitos T 293 transducidos con Ad5/f35-iCD40 (control positivo para la forma inducible de CD40). Los niveles de expresión de alfa-tubulina sirvieron como control interno.

Figura 2. Esquema de iCD40. La administración del fármaco dimerizante permeable a lípidos, AP20187/AP1903<sup>1</sup> conduce a la oligomerización del dominio citoplasmático de CD40, modificado para contener dominios de unión a AP20187 y una secuencia dirigida a la miristoilación.

La Figura 3 es un esquema de la TLR inducibles por CID.

La Figura 4 es un esquema de los receptores de tipo Toll de material compuesto inducibles por CID (icTLR).

La Figura 5 es un esquema de las TLR de material compuesto inducibles por CID (icTLR)/CD40.

Figura 6: Las principales relaciones entre los receptores de tipo Toll (TLR), sus adaptadores, proteínas quinasa que están unidas a los mismos, y efectos de señalización cadena abajo. *Nature* 430, 257- 263 (8 de Julio de 2004).

Figura 7. iNod2 e iCD40 en células 293. Se transfectaron células 293 de forma transitoria a una velocidad de 1 millón de células/pocillo (de una placa de 6 pocillos) junto con plásmidos de expresión de 3 microgramos para el iNod-2 quimérico y 1 microgramo de plásmido indicador SEAP dependiente de NF-kappaB (indicado como R en la Figura). Se usó iCD40 como control positivo.

Figura 8. iRIG-1 e iMyD88 en células RAW264.7. Se transfectaron células RAW 264.7 transitoriamente junto con plásmidos de expresión de 3 microgramos para iRIG-1 y 1 microgramo de plásmido indicador SEAP dependiente de IFN-gamma; y 3 microgramos de iMyD88 con 1 microgramo de plásmido indicador SEAP dependiente de NF-kappaB.

Figura 9. Esquema de los receptores de reconocimiento de patrones.

Figura 10A. Esquema de un ejemplo de plásmido de iPRR.

Figura 10B. Esquema de un ejemplo de plásmido de iPRR.

Figura 10C. Esquema de un ejemplo de plásmido de iPRR.

La Figura 11 es una gráfica de inducción del indicador de SEAP de NF-kappa B en iRIG, iNOD2 y células 293 transfectadas con iCD40.

La Figura 12 es una gráfica de inducción del indicador de SEAP de NF-kappa B en iRIG-I y células 293 transfectadas con iCD40.

La Figura 13 es una gráfica de inducción del indicador SEAP de NF-kappa B en iRIG, Icd40 y células 293 transfectadas con iRIG+CD40.

La Figura 14 es una gráfica de inducción del indicador SEAP de NF-kappa B en iRIG-I y células Jurkat Tag transfectadas con iCD40.

Las Figuras 15A y 15B proporcionan mapas de plásmidos para pSH1-Sn-RIGI-Fv'-Fvls-E y pSH1-Sn-Fv'-Fvls-RIGI-E, respectivamente. El término "Sn" representa "S" con un sitio Ncol, añadido con fines de clonación. El término "S" representa el término no-diana.

La Figura 16 es un esquema de los receptores CD40 y MyD88 inducibles y la inducción de la actividad NF-kappa B.

La Figura 17 es un esquema de los receptores CD40/MyD88 quiméricos inducibles y la inducción de la actividad NF-kappa B.

La Figura 18 es un gráfico de la activación de NF-kappa B en células 293 mediante MyD88 inducible y receptores de MyD88-CD40 quiméricos. CD40T indica CD40 "turbo", en el que el receptor incluye 3 copias del dominio FKBP12<sub>v36</sub> (Fv').

La Figura 19 es un gráfico de la actividad de NF-kappa B mediante MyD88 (MyD88L) truncado inducible y

- MyD88/CD40 truncado inducible quimérico después de 3 horas de incubación con sustrato.
- La Figura 20 es un gráfico de la actividad de NF-kappa B mediante MyD88 (MyD88L) truncado inducible y MyD88/CD40 truncado inducible quimérico después de 22 horas de incubación con sustrato. En este ensayo está presente una cierta saturación del ensayo.
- 5 La Figura 21 es una transferencia Western de la proteína HA, tras la transducción de adenovirus-MyD88L de células 293T.
- La Figura 22 es una transferencia Western de la proteína HA, tras la transducción de adenovirus-MyD88L-CD40 de células 293T.
- 10 La Figura 23 es un gráfico de un ensayo ELISA después de la infección por adenovirus de DC derivadas de la médula ósea con las construcciones de CD40 y MyD88 inducibles indicadas.
- La Figura 24 es un gráfico de los resultados de un ensayo ELISA similar al de la Figura 23.
- La Figura 25 es un gráfico de los resultados de un ensayo ELISA similar al de las Figuras 23 y 24, tras la infección con una cantidad superior de adenovirus.
- 15 La Figura 26 es un gráfico de los resultados de un ensayo con indicador SEAP de NF-kappaB en células transfectadas con iRIG-1 e iCD40.
- La Figura 27 es un gráfico de los resultados de un ensayo de IFN-beta-indicador SEAP en células transfectadas con iRIG-1 e iTRIF.
- La Figura 28 es un gráfico que compara la activación de iTRIF de los indicadores de NF-kappa B e IFN-beta en células transfectadas.
- 20 La Figura 29 es un gráfico de la activación de iNOD2 de un indicador de NF-kappaB en células transfectadas.
- La Figura 30 es un mapa de construcción de pShuttleX-iMyD88.
- La Figura 31 es un mapa de construcción de pShuttleX-CD4-TLR4L3-E.
- La Figura 32 es un mapa de construcción de pShuttleX-iMyD88E-CD40.
- 25 La Figura 33 es un gráfico de barras que representa los resultados de una inducción dependiente de la dosis de la expresión de IL-12p70 en células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDC) transducidas con diferentes multiplicidades de infecciones de adenovirus que expresan una construcción compuesta de MyD88. CD40 inducible.
- La Figura 34 es un gráfico de barras que representa los resultados de una inducción dependiente del fármaco de la expresión de IL-12p70 en células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDC) transducidas con adenovirus que expresan diferentes construcciones inducibles.
- 30 La Figura 35 es un gráfico de barras que representa los niveles de IL-12p70 en células dendríticas transducidas antes de la vacunación.
- La Figura 36(a) es un gráfico de la inhibición del crecimiento tumoral de EG.7-OVA en ratones vacunados con células dendríticas transducidas; La Figura 36(b) presenta fotos de ratones vacunados representativos; la Figura 36(c) es la gráfica de 36(a) incluyendo las barras de error.
- 35 La Figura 37(a) es un diagrama de dispersión, y 37(b) es un gráfico de barras, que muestran la mayor frecuencia de linfocitos T CD8+ específicos de Ag inducidos por células dendríticas transducidas.
- La Figura 38 es un gráfico de barras que muestra la mayor frecuencia de linfocitos T CD8+ y linfocitos T<sub>H</sub>1 CD4+ IFNgamma+ específicos de Ag inducidos por células dendríticas transducidas.
- 40 La Figura 39 presenta un esquema y los resultados de un ensayo de linfocitos citotóxicos *in vivo*.
- La Figura 40 es un gráfico de barras que resume los datos de una actividad de los CTL *in vivo* mejorada inducida por células dendríticas.
- La Figura 41 presenta los resultados representativos de un ensayo de CTL en ratones inducidos por células dendríticas transducidas.
- 45 La Figura 42 presenta los resultados de tinción intracelular para los linfocitos T<sub>H</sub>2 productores de IL-4 en ratones inoculados con células dendríticas transducidas.
- La Figura 43 presenta los resultados de un ensayo de inhibición del crecimiento tumoral en ratones tratados con células transducidas con Ad5-iCD40.MyD88.
- 50 La Figura 44 presenta un ensayo de linfocitos T específicos de un tumor en ratones tratados con células transducidas cib Ad5-iCD40.MyD88.
- La Figura 45 presenta los resultados de un ensayo de linfocitos citolíticos naturales usando esplenocitos de los ratones tratados como efectores.
- La Figura 46 presenta los resultados de un ensayo de linfocitos citotóxicos usando esplenocitos de los ratones tratados como efectores.
- 55 La Figura 47 presenta los resultados de un ensayo ELISPot de IFN-gamma usando linfocitos T cultivados junto con células dendríticas transducidas con el vector indicado.
- La Figura 48 presenta los resultados de un ensayo de regulación positiva de CCR7 usando células dendríticas transformadas con el vector indicado, con o sin LPS como adyuvante.
- 60 La Figura 49 presenta los resultados del ensayo de regulación positiva de CCR7 presentado en la Figura 48, con los datos de múltiples animales incluidos en un gráfico.

### Descripción detallada

- 65 Como se usa en el presente documento, el uso de la palabra "un" o "una" cuando se usan junto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva, puede significar también "uno", pero también se refiere al significado de "uno/a o más", "al menos uno/a" y "uno/a o más de uno/a". Además, las expresiones "que

tiene/n", "que incluye/n", "que contiene/n" y "que comprende/n" son intercambiables, y un experto en la materia reconoce que dichas expresiones son expresiones abiertas.

5 El término "allogénico", como se usa en el presente documento, se refiere locus de HLA o MHC que son antigénicamente distintos. Por lo tanto, las células o los tejidos que se transfieren de las mismas especies pueden ser antigénicamente distintos. Los ratones singénicos pueden diferir en uno o más locus (congénicos), y los ratones allogénicos pueden tener los mismos antecedentes.

10 El término "antígeno", como se usa en el presente documento, se define como una molécula que provoca una respuesta inmune. Dicha respuesta inmune puede implicar bien la producción de anticuerpos o la activación de células competentes inmunológicamente específicas, o ambas. Un antígeno puede derivarse de organismos, subunidades de proteínas/antígenos, células completas o lisados celulares muertos o inactivados. Los organismos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, *Helicobacter*, *Campylobacter*, *Clostridia*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, virus de la gripe, virus de la paragrape, virus sincitial respiratorio, *Borrelia burgdorferi*, *Plasmodium*, virus del herpes simple, virus de la inmunodeficiencia humana, papilomavirus, *Vibrio cholera*, *E. coli*, virus del sarampión, rotavirus, *shigella*, *Salmonella typhi*, *Neisseria gonorrhoea*. Por lo tanto, un experto prevé que cualquier macromolécula, incluyendo casi todas las proteínas o péptidos, pueda servir como antígeno. Además, se pueden derivar antígenos de ADN recombinante o genómico. Un experto prevé que cualquier ADN que contenga secuencias de nucleótidos o secuencias de nucleótidos parciales de un genoma o gen patógeno, o de un fragmento de un gen de una proteína, que genere una respuesta inmune produce la síntesis de un antígeno. Es más, un experto en la materia prevé que la presente invención no se limita al uso de la secuencia de ácido nucleico completa de un gen o genoma. Es fácilmente inherente que la presente invención incluye, pero sin limitación, el uso de secuencias de ácido nucleico parciales de más de un gen o genoma y que estas secuencias de ácidos nucleicos se disponen en diversas combinaciones para generar la respuesta inmune deseada.

25 La expresión "célula presentadora de antígeno" es cualquiera de una variedad de células capaces de expresar, adquirir o presentar al menos un antígeno o un fragmento antigénico sobre (o en) su superficie celular. En general, la expresión "célula presentadora de antígeno" puede ser cualquier célula que alcance el objetivo de la invención ayudando a la potenciación de una respuesta inmune (es decir, procedente de los grupos de linfocitos T o linfocitos B del sistema inmune) contra un antígeno o una composición antigénica. Dichas células pueden ser definidas por los expertos en la materia, usando los métodos desvelados en el presente documento y en la técnica. Como el experto habitual en la materia entiende (véase, por ejemplo, Kuby, 2000, "Immunology", 4ª edición, W. H. Freeman and company), y se usa en el presente documento, en determinadas realizaciones, una célula que muestra o presenta un antígeno normal o preferentemente con una molécula o complejo mayor de histocompatibilidad de clase II a una célula inmune es una "célula presentadora de antígeno". En determinados aspectos, una célula (por ejemplo, una célula APC) puede fusionarse con otra célula, tal como una célula recombinante o una célula tumoral que exprese el antígeno deseado. Se conocen en la técnica métodos de preparación de una fusión de dos o más células tales como, por ejemplo, los métodos desvelados en Goding, J. W., "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", pág. 65-66, 71-74 (Academic Press, 1986); Campbell, en: "Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Vol. 13, Burden y Von Knippenberg, Ámsterdam, Elsevier, pág. 75-83, 1984; Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975; Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976, Gefferetal., *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977. En algunos casos, la célula inmune a la que una célula presentadora de antígeno muestra o presenta un antígeno es una célula CD4+TH. Las moléculas adicionales expresadas en las APC u otras células inmunes pueden ayudar o mejorar la potenciación de una respuesta inmune. Las moléculas secretadas o solubles, tales como, por ejemplo, las citocinas y los adyuvantes, también pueden ayudar o potenciar la respuesta inmune contra un antígeno. Dichas moléculas son bien conocidas por los expertos en la materia, y se describen diversos ejemplos en el presente documento.

50 El término "cáncer", como se usa en el presente documento, se define como una hiperproliferación de células cuyo único rasgo -la pérdida de los controles normales- produce un crecimiento no regulado, ausencia de diferenciación, invasión del tejido local y metástasis tumoral. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, de pulmón, hepatocarcinoma, leucemia, retinoblastoma, astrocitoma, glioblastoma, de encía, de lengua, neuroblastoma, de cabeza, de cuello, de mama, pancreático, de próstata, renal, óseo, testicular, de ovario, mesotelioma, de cuello uterino, gastrointestinal, linfoma, cerebral, de colon, sarcoma o de vejiga.

60 El término "célula", y las expresiones "línea celular" y "cultivo celular", como se usan en el presente documento, pueden usarse indistintamente. Todas estas expresiones incluyen también su progenie, que son todas y cada una de las generaciones posteriores. Se ha de entender que puede que toda la progenie no sea idéntica debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de iCD40" se define como un CD40 inducible. Dicha iCD40 puede sortear mecanismos que extinguen la señalización de CD40 endógena. El término "iCD40" engloba "ácidos nucleicos de iCD40", "polipéptidos de iCD40" y/o vectores de expresión de iCD40. Además, se entiende que la actividad de iCD40 como se usa en el presente documento está dirigida por CID.

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

La expresión "célula dendrítica" (DC) es una célula presentadora de antígeno existente *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo*, o en un hospedador o sujeto, o que se puede derivar de una célula madre hematopoyética o de un monocito. Las células dendríticas y sus precursores se pueden aislar a partir de una variedad de órganos linfáticos, por ejemplo, del bazo, de los ganglios linfáticos, así como de la médula ósea y de la sangre periférica. La DC tiene una morfología característica con vainas delgadas (lamelipodia) que se extienden en múltiples direcciones lejos del cuerpo de la célula dendrítica. Por lo general, las células dendríticas expresan elevados niveles de MHC y moléculas coestimulantes (por ejemplo, B7-1 y B7-2). Las células dendríticas pueden inducir *in vitro* la diferenciación de linfocitos T específica del antígeno, y pueden iniciar las respuestas primarias de los linfocitos T *in vitro* e *in vivo*.

Como se usa en el presente documento, la expresión "construcción de expresión" o el término "transgén" se definen como cualquier tipo de construcción genética que contiene un ácido nucleico que codifica productos génicos los que se puede transcribir todo o parte del ácido nucleico que codifica la secuencia y que se puede insertar en el vector. La transcripción se traduce en una proteína, pero no es necesario. En determinadas realizaciones, la expresión incluye tanto la transcripción de un gen como la traducción del ARNm en un producto génico. En otras realizaciones, la expresión incluye solo la transcripción del ácido nucleico que codifica los genes de interés. La expresión "construcción terapéutica" también se puede usar para referirse a la construcción de expresión o al transgén. El experto en la materia prevé que la construcción de expresión o el transgén se pueden usar, por ejemplo, como tratamiento para tratar enfermedades o trastornos hiperproliferativos, tales como el cáncer, de esta manera, la construcción terapéutica o el transgén es una construcción terapéutica o una construcción profiláctica.

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

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

Como se usa en el presente documento, la expresión "funcionalmente equivalente", como se usa en el presente documento, como se refiere, por ejemplo, a un fragmento, variante o análogo de ácido nucleico CD40, se refiere a un ácido nucleico que codifica un polipéptido CD40 o a un polipéptido CD40 que estimula una respuesta inmune para destruir tumores o enfermedades hiperproliferativas. "Funcionalmente equivalente" se refiere, por ejemplo, a un polipéptido CD40 que carece de dominio extracelular, pero que es capaz de amplificar la respuesta de destrucción tumoral mediada por linfocitos T regulando en exceso la expresión de las células dendríticas de las moléculas de presentación de antígeno.

La expresión "enfermedad hiperproliferativa" se define como una enfermedad que se debe a una hiperproliferación de células. Las enfermedades hiperproliferativas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, cáncer o enfermedades autoinmunes. Otras enfermedades hiperproliferativas pueden incluir oclusión vascular, reestenosis, aterosclerosis o enfermedad inflamatoria del intestino.

Como se usa en el presente documento, el término "gen" se define como una proteína, un polipéptido o una unidad codificante de péptido funcional. Como apreciarán los expertos en la materia, este término funcional incluye secuencias genómicas, secuencias de ADNc y segmentos génicos más pequeños diseñados mediante ingeniería genética que expresan o que están adaptados para expresar proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión y mutantes.

La expresión "composición inmunogénica" o el término "inmunógeno" se refieren a una sustancia que puede provocar una respuesta inmune. Los ejemplos de inmunógenos incluyen, por ejemplo, antígenos, autoantígenos que desempeñan un papel en la inducción de enfermedades autoinmunes y antígenos asociados a tumores expresados en células cancerosas.

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

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

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los vectores o células presentados en el presente documento, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar principios activos suplementarios a las composiciones.

Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" se define como una cadena de nucleótidos. Además, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Así pues, los ácidos nucleicos y polinucleótidos que se usan en el presente documento son indistintos. Un experto en la materia tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos que se pueden hidrolizar a "nucleótidos" monoméricos. Los nucleótidos monoméricos se pueden hidrolizar a nucleósidos. Como se usan en el presente documento, los polinucleótidos incluyen, pero sin limitación, todas las secuencias de ácidos nucleicos que se obtienen por cualquier medio disponible en la técnica, incluyendo, sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de las secuencias de ácidos nucleicos de una biblioteca recombinante o de un genoma celular, usando la tecnología de clonación habitual y PCR™, y similares, y por medios sintéticos. Además, un experto en la materia reconoce que los polinucleótidos incluyen mutaciones de los polinucleótidos, que incluyen pero sin limitación, mutaciones de los nucleótidos o nucleósidos mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se define como una cadena de restos de aminoácidos que normalmente tienen una secuencia definida. Como se usa en el presente documento, el término polipéptido se usa indistintamente con los términos "péptidos" y "proteínas".

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

Como se usa en el presente documento, la expresión "regular una respuesta inmune " o "modular una respuesta inmune" se refieren a la capacidad de modificar la respuesta inmune. Por ejemplo, la composición es capaz de potenciar y/o activar la respuesta inmune. Además, la composición también es capaz de inhibir la respuesta inmune. La forma de regulación se determina por el ligando que se usa con la composición. Por ejemplo, un análogo dimérico del agente químico produce la dimerización del polipéptido coestimulante que conduce a la activación de las DC, sin embargo, un análogo monomérico del agente químico no produce la dimerización del polipéptido coestimulante, que no activaría las DC.

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

Como se usa en el presente documento, el término "singénico" se refiere a células, tejidos o animales que tienen genotipos que son idénticos o están estrechamente relacionados lo suficiente para permitir el trasplante de tejidos, o que son inmunológicamente compatibles. Por ejemplo, gemelos o animales idénticos de la misma cepa endogámica. Singénico e isogénico se pueden usar indistintamente.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, incluye, pero sin limitación, un organismo o un animal; un mamífero, incluyendo, por ejemplo, un ser humano, un primate no humano (por ejemplo, mono), ratón, cerdo, vaca, cabra, conejo, rata, cobaya, hámster, caballo, mono, oveja u otro mamífero no humano; un no mamífero, incluyendo, por ejemplo, un vertebrado no mamífero, tal como un pájaro (por ejemplo, un pollo o un pato) o un pez, y

un invertebrado no mamífero.

Como se usa en el presente documento, la expresión "bajo control de la transcripción" o "unido operativamente" se define como el promotor que está en la ubicación y en la orientación correctas en relación con el ácido nucleico que controla el inicio de la ARN polimerasa y la expresión del gen.

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

Como se usa en el presente documento, el término "vacuna" se refiere a una formulación que contiene una composición presentada en el presente documento y que está en una forma que es capaz de administrarse a un animal. Por lo general, la vacuna comprende una solución salina convencional o un medio de solución acuosa tamponada en el que la composición está suspendida o disuelta. En esta forma, la composición se puede usar convenientemente para evitar, mejorar o tratar de otra forma una afección. Tras la introducción en un sujeto, la vacuna puede provocar una respuesta inmune que incluye, pero sin limitación, la producción de anticuerpos, citocinas y/u otras respuestas celulares.

#### *Células dendríticas*

El sistema inmune innato usa un conjunto de receptores codificados por líneas germinales para el reconocimiento de patrones moleculares conservados presentes en microorganismos. Estos patrones moleculares se producen en ciertos constituyentes de microorganismos que incluyen: lipopolisacáridos, peptidoglicanos, ácidos lipoteicoicos, fosfatidilcolinas, proteínas específicas de bacterias, incluyendo lipoproteínas, ADN bacterianos, ARN monocatenarios y bicatenarios víricos, ADN de CpG sin metilar, mananos y una variedad de diferentes componentes de la pared celular bacteriana y fúngica. Dichos patrones moleculares se pueden producir también en otras moléculas tales como alcaloides vegetales. Estas dianas de reconocimiento inmune innato se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) debido a que son producidos por microorganismos y no por el organismo hospedador infectado (Janeway *et al.* (1989) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 54: 1-13; Medzhitov *et al.*, *Nature*, 388:394-397, 1997).

Los receptores del sistema inmune innato que reconocen los PAMP se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Janeway *et al.*, 1989; Medzhitov *et al.*, 1997). Estos receptores varían en estructura y pertenecen a varias familias de proteínas diferentes. Algunos de estos receptores reconocen los PAMP directamente (por ejemplo, CD14, DEC205, colectinas), mientras que otros (por ejemplo, los receptores del complemento) reconocen los productos generados por el reconocimiento de PAMP. Los miembros de estas familias de receptores pueden, en general, dividirse en tres tipos: 1) receptores humoral circulantes en el plasma; 2) receptores endocíticos expresados en superficies de células inmunes; y 3) receptores de señalización que se pueden expresar bien sobre la superficie celular o intracelularmente (Medzhitov *et al.*, 1997; Fearon *et al.* (1996) *Science* 272: 50-3).

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

La función primaria de las células dendríticas (DC) es adquirir antígenos en los tejidos periféricos, desplazarse al tejido linfático secundario y presentar los antígenos a linfocitos T efectoras del sistema inmune (Banchereau, J., *et al.*, *Annu Rev Immunol*, 2000, 18: pág. 767-811; Banchereau, J., y Steinman, R. M. "Dendritic cells and the control of immunity". *Nature*, 392, 245-252 (1998)). Como las DC llevan a cabo su papel crucial en la respuesta inmune, sufren cambios de maduración que les permiten realizar la función adecuada para cada entorno (Termeer, C. C., *et al.*, *J Immunol*, 15 de agosto de 2000, 165: pág. 1863-70). Durante la maduración de las DC, se pierde la captación potencial del antígeno, la densidad superficial de las moléculas de clase I y clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) aumenta en 10-100 veces, y CD40, aumenta también mucho la expresión de la molécula coestimulante y de adhesión (Lanzavecchia, A. y F. Sallusto, *Science*, 2000. 290: pág. 92-96). Además, otras alteraciones genéticas permiten a las DC alojarse en la paracorteza rica en linfocitos T de los ganglios linfáticos drenantes y expresar quimiocinas de linfocitos T que atraigan a los linfocitos T sin tratamiento previo y linfocitos T de memoria, y cebar linfocitos TH0 sin tratamiento previo específicos de antígeno (Adema, G. J., *et al.*, *Nature*, 12 de junio de 1997, 387: pág. 713-7). Durante esta etapa, las DC maduras presentan antígeno mediante sus moléculas MHC II a los linfocitos T auxiliares CD4+, induciendo la regulación en exceso del ligando CD40 de los linfocitos T (CD40L) que, a su vez, se une al receptor CD40 de las DC. Esta interacción DC:linfocitos T induce una expresión

rápida de moléculas DC adicionales que son cruciales para el inicio de una potente respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+, incluyendo la regulación en exceso adicional de moléculas MHC I y II, moléculas de adhesión, moléculas coestimulantes (por ejemplo, B7.1, B7.2), citocina (por ejemplo, IL-12) y proteínas antiapoptóticas (por ejemplo, Bcl-2) (Anderson, D. M., *et al.*, *Nature*, 13 de noviembre de 1997. 390: pág. 175-9; Ohshima, Y., *et al.*, *J Immunol*, 15 de octubre de 1997. 159: pág. 3838-48; Sallusto, F., *et al.*, *Eur J Immunol*, 28 de septiembre de 1998: pág. 2760-9; Caux, C. *Adv Exp Med Biol*. 1997, 417:21-5). Los linfocitos T CD8+ salen de los ganglios linfáticos, vuelven a penetrar en la circulación y se alojan en el sitio original de la inflamación para destruir los patógenos o las células malignas.

Un parámetro clave que influye en la función de las DC es el receptor CD40, que sirve como "interruptor de encendido" de las DC (Bennett, S. R., *et al.*, *Nature*, 4 de junio de 1998, 393: pág. 478-80; Clarke, S. R., *J Leukoc Biol*, 2000, mayo. 67: pág. 607-14; Fernandez, N. C., *et al.*, *Nat Med*, 5 de abril de 1999, pág. 405-11; Ridge, J. P., D. R. F, y P. *Nature*, 4 de junio de 1998. 393: pág. 474-8; Schoenberger, S. P., *et al.*, *Nature*, 4 de junio de 1998, 393: pág. 480-3). CD40 es un miembro transmembrana de 48 kDa de la superfamilia de receptores TNF (McWhirter, S. M., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci, EE.UU.*, 20 de julio de 1999. 96: pág. 8408-13). La interacción CD40-CD40L induce la trimerización de CD40, necesaria para iniciar las cascadas de señalización que implican los factores asociados al receptor TNF (TRAF) (Ni, C., *et al.*, *PNAS*, 2000, 97(19): 10395-10399; Pullen, S. S., *et al.*, *J Biol Chem*, 14 de mayo de 1999. 274: pág. 14246-54). CD40 usa estas moléculas de señalización para activar varios factores de transcripción en las DC, incluyendo NF-kappaB, AP-1, STAT3 y p38MAPK (McWhirter, S. M., *et al.*, 1999).

Se proporciona un nuevo sistema de activación de las DC basado en reclutar moléculas de señalización o polipéptidos coestimulantes a la membrana del plásmido de las DC, produciendo la activación prolongada/aumentada y/o la supervivencia de las DC. Los polipéptidos coestimulantes incluyen cualquier molécula o polipéptido que activa la vía NF-kappaB, la vía Akt y/o la vía p38. El sistema de activación de las DC se basa en la utilización de una molécula de señalización recombinante fusionada a dominios de unión al ligando (es decir, un dominio de unión a una molécula pequeña) en los que el polipéptido coestimulante se activa y/o regula con un ligando, produciendo la oligomerización (es decir, un fármaco permeable a lípidos orgánico dimerizante). Otros sistemas que se pueden usar para reticular u oligomerizar polipéptidos coestimulantes incluyen anticuerpos, ligandos naturales y/o ligandos reticulantes o sintéticos artificiales. Además, otros sistemas de dimerización contemplados incluyen el sistema cumermina/ADN girasa B.

Los polipéptidos coestimulantes que se pueden usar incluyen aquellos que activan NF-kappaB y otras cascadas de señalización variables, por ejemplo, la vía p38 y/o la vía Akt. Dichos polipéptidos coestimulantes incluyen, pero sin limitación, receptores de reconocimiento de patrones, receptores de proteínas C reactivas (es decir, Nod1, Nod2, PtX3-R), receptores TNF (es decir, CD40, RANK/TRANSE-R, OX40, 4-1BB), y receptores HSP (Lox-1 y DC-91). Los receptores de reconocimiento de patrones incluyen, pero sin limitación, receptores de reconocimiento de modelos endocíticos (es decir, receptores de manosa, receptores secuestrantes (es decir, Mac-1, LRP, peptidoglicano, ácidos teicoicos, toxinas, CD11c/CR4)); receptores de reconocimiento de patrones de señalización externa (receptores de tipo Toll (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10), proteína de reconocimiento del peptidoglicano, (las PGRP se unen al peptidoglicano bacteriano y CD14); y receptores de reconocimiento de patrones de señalización interna (es decir, los receptores NOD 1 y 2), RIG1 y los PRR mostrados en la Figura 8. Los expertos habituales en la materia también conocen otros receptores de reconocimiento de patrones adecuados para los presentes métodos y la composición, incluyendo los que se analizan, por ejemplo, en Werts C., *et al.*, "Cell Death and Differentiation" (2006) 13:798-815; Meylan, E., *et al.*, *Nature* (2006) 442:39-44; y Strober, W., *et al.*, *Nature Reviews* (2006) 6:9-20.

#### *Construcciones de expresión diseñadas mediante ingeniería genética*

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

#### A. Polipéptidos coestimulantes

Las moléculas polipeptídicas coestimulantes son capaces de amplificar la respuesta mediada por los linfocitos T regulando en exceso la expresión de las células dendríticas de las moléculas de presentación de antígeno. Las proteínas coestimulantes que se contemplan incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, los miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) (es decir, CD40, RANK/TRANSE-R, OX40, 4-1B), receptores de tipo Toll, receptores de proteínas C reactivas, receptores de reconocimiento de patrones y receptores HSP. Por lo general, se usan los dominios citoplasmáticos de estos polipéptidos coestimulantes en el vector de expresión. El dominio citoplasmático de uno de los diversos polipéptidos coestimulantes, incluyendo sus mutantes, donde se conoce la secuencia de reconocimiento implicada en el inicio de la transcripción asociada con el dominio citoplasmático o se conoce un gen sensible a dicha secuencia.

De acuerdo con las reivindicaciones, la molécula polipeptídica coestimulante es CD40. La molécula CD40 comprende una molécula de ácido nucleico que: (1) se hibrida en condiciones rigurosas con un ácido nucleico que tiene la secuencia de un gen CD40 conocido; y (2) codifica un polipéptido CD40. El polipéptido CD40 carece de dominio extracelular. Las secuencias de polinucleótidos ilustrativas que codifican los polipéptidos CD40 incluyen, pero sin limitación, la SEQ ID NO: 1 y a las isoformas CD40 de otras especies. Se contempla que se pueden usar otras variantes normales o mutantes de CD40 en los presentes métodos y composiciones. Por lo tanto, una región CD40 puede tener una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia nativa en una o más sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos. Por ejemplo, se puede eliminar o eliminar eficazmente una o más regiones de unión al factor asociado al receptor de TNF (TRAF) (por ejemplo, se elimina o se altera una secuencia de aminoácidos de CD40 de modo que una proteína TRAF no se une o se une con afinidad inferior a la que se une a la secuencia de CD40 nativa). Se puede eliminar o alterar una región de unión a TRAF3 de manera que se elimine o se elimine eficazmente (por ejemplo, se pueden alterar o eliminar los aminoácidos 250-254, Hauer *et al.*, *PNAS* 102 (8): 2874-2879 2005)).

Los presentes métodos pueden implicar la manipulación de material genético para producir construcciones de expresión que codifican una forma inducible de CD40 (iCD40). Dichos métodos implican la generación de construcciones de expresión que contienen, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica el dominio citoplasmático de CD40 y un medio para su expresión. El vector puede replicarse en una célula auxiliar apropiada, se pueden producir partículas víricas a partir de la misma y células infectadas con las partículas víricas recombinantes.

Por lo tanto, la molécula CD40 presentada en el presente documento puede carecer del dominio extracelular. El dominio extracelular puede estar truncado o eliminado. También se contempla que el dominio extracelular se puede mutar usando mutagénesis convencional, inserciones, eliminaciones o sustituciones para producir una molécula CD40 que no tiene un dominio extracelular funcional. Un ácido nucleico de CD40 puede tener la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1. Los ácidos nucleicos de CD40 también incluyen homólogos y alelos de un ácido nucleico que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1, así como, fragmentos funcionalmente equivalentes, variantes y análogos de los ácidos nucleicos anteriores. Los métodos de construcción de un vector de CD40 inducible se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 7.404.950, expedida el 29 de julio de 2008.

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

#### B. Regiones de unión al ligando

El dominio de unión al ligando ("dimerización") de la construcción de expresión puede ser cualquier dominio conveniente que permita la inducción usando un ligando natural y no natural, por ejemplo, un ligando sintético no natural. El dominio de unión al ligando puede ser interno o externo a la membrana celular, dependiendo de la naturaleza de la construcción y de la elección del ligando. Se conoce una amplia variedad de proteínas de unión al ligando, incluyendo los receptores, que incluyen proteínas de unión al ligando asociadas con las regiones citoplasmáticas indicadas anteriormente. Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio de unión al ligando" se puede usar indistintamente con el término "receptor". Son de particular interés las proteínas de unión al ligando para las que se conocen ligandos (por ejemplo, ligandos orgánicos pequeños) o se pueden producir fácilmente. Estos dominios o receptores de unión al ligando incluyen los receptores de FKBP, según las reivindicaciones, y de la ciclofilina, los receptores esteroides, los receptores de la tetraciclina, los otros receptores indicados anteriormente, y similares, así como receptores "no naturales", que se pueden obtener a partir de anticuerpo, en particular, la subunidad de la cadena pesada o ligera, sus secuencias mutadas, las secuencias de aminoácidos aleatorias obtenidas mediante procedimientos estocásticos, las síntesis combinatorias, y similares. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, los descritos en Kopytek, S. J., *et al.*, *Chemistry & Biology* 7:313-321 (2000) y en Gestwicki, J. E., *et al.*, *Combinatorial Chem. & High Throughput Screening* 10:667-675 (2007); Clackson T (2006) *Chem Biol Drug Des* 67:440-2; Clackson, T. "Controlling Protein-Protein Interactions Using Chemical Inducers and Disrupters of Dimerization," en *Chemical Biology: From Small Molecules to Systems Biology and Drug Design* (Schreiber, s., *et al.*, eds., Wiley, 2007)).

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

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

La parte de la construcción de expresión que codifica el receptor puede estar sometida a mutagénesis por una variedad de motivos. La proteína mutagenizada puede proporcionar una afinidad de unión superior, permitir la diferenciación por parte del ligando entre el receptor natural y el receptor mutagenizado, proporcionar oportunidades para diseñar una pareja receptor-ligando, o similares. El cambio en el receptor puede implicar cambios en los aminoácidos conocidos por encontrarse en el sitio de unión, mutagénesis aleatoria usando técnicas combinatorias, en las que los codones de los aminoácidos asociados con el sitio de unión u otros aminoácidos asociados con cambios conformacionales pueden someterse a mutagénesis cambiando el uno o varios codones del aminoácido en particular, tanto con cambios conocidos como aleatoriamente, expresando las proteínas resultantes en un hospedador procarionota adecuado y, a continuación, seleccionando las proteínas resultantes para establecer la unión.

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

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

### C. Oligomerización

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

Para multimerizar el receptor, el ligando para los dominios de unión a ligando/dominios receptores de las proteínas quiméricas de la membrana superficial normalmente será multimérico en el sentido de que tendrá al menos dos sitios de unión, siendo cada uno de los sitios de unión capaz de unirse al dominio receptor del ligando. Lo deseable es que los ligandos en cuestión sean un dímero o un oligómero de orden superior, normalmente no mayor de aproximadamente tetramérico, de moléculas orgánicas sintéticas pequeñas, las moléculas individuales normalmente tienen al menos aproximadamente 150 Da y menos de aproximadamente 5 kDa, normalmente menos de aproximadamente 3 kDa. Se puede emplear una variedad de pares de ligandos y receptores sintéticos. Por ejemplo, en aspectos tratados en el presente documento que implican receptores naturales, se puede usar FK506 dimérico con un receptor FKBP12, se puede usar ciclosporina A dimerizada con el receptor de ciclofilina, estrógeno dimerizado con un receptor de estrógenos, glucocorticoides dimerizados con un receptor de glucocorticoides, tetraciclina dimerizada con el receptor de la tetraciclina, vitamina D dimerizada con el receptor de la vitamina D, y similares. Como alternativa, se pueden usar órdenes superiores de los ligandos, por ejemplo, se puede usar el trimérico. Para los aspectos tratados en el presente documento que implican receptores no naturales, por ejemplo, subunidades de anticuerpos, subunidades de anticuerpos modificados o receptores modificados y similares, se puede usar cualquiera de una gran variedad de compuestos. Una característica significativa de estas unidades de ligandos es que cada sitio de unión puede unirse al receptor con alta afinidad y pueden dimerizarse químicamente. Además, los expertos en la materia conocen métodos para equilibrar la hidrofobicidad/hidrofilidad de los ligandos de manera que pueden disolverse en suero a niveles funcionales, incluso difundirse a través de las membranas plasmáticas para la mayoría de las aplicaciones.

Los presentes métodos pueden utilizar la técnica de la dimerización inducida químicamente (CID) para producir una proteína o un polipéptido controlado condicionalmente. Además de que esta técnica es inducible, también es reversible, debido a la degradación del agente de dimerización lábil o a la administración de un inhibidor competitivo monomérico.

El sistema CID usa ligandos bivalentes sintéticos para reticular rápidamente las moléculas de señalización que se fusionan a los dominios de unión al ligando. Este sistema se ha usado para generar la oligomerización y la activación de la superficie celular (Spencer, D. M., *et al.*, *Science*, 1993. 262: pág. 1019-1024; Spencer D. M. *et al.*, *Curr Biol* 1996, 6:839-847; Blau, C. A. *et al.*, *Proc Natl Acad. Sci. EE.UU.* 1997, 94:3076-3081) o proteínas citosólicas (Luo, Z. *et al.*, *Nature* 1996, 383:181-185; MacCorkle, R. A. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci, EE.UU.*, 1998, 95:3655-3660) o el reclutamiento de factores de transcripción a elementos de ADN para modular la transcripción (Ho, S. N. *et al.*, *Nature* 1996, 382: 822-826, Rivera, V. M. *et al.*, *Nat. Med.* 1996, 2: 1028-1032) o el reclutamiento de moléculas de señalización a la membrana plasmática para estimular la señalización (Spencer D. M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 1995, 92:9805-9809; Holsinger, L. J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 1995, 95:9810-9814).

El sistema CID se basa en la noción de que la agregación de receptores de superficie activa de manera eficaz las cascadas de señalización cadena abajo. En la realización más sencilla, el sistema CID usa un análogo dimérico del fármaco inmunosupresor permeable a los lípidos, FK506, que pierde su bioactividad normal, al tiempo que gana la capacidad de reticular moléculas fusionadas genéticamente a la proteína de unión a FK506, FKBP12. Mediante la fusión de una o más FKBP y una secuencia de miristoilación al dominio de señalización citoplasmático de un receptor diana, se puede estimular la señalización de una manera dependiente del fármaco dimerizante, pero independiente del ligando y del ectodominio. Esto proporciona al sistema control temporal, reversibilidad usando análogos de fármaco monoméricos y especificidad potenciada. La alta afinidad los CID AP20187/AP1903 de tercera generación para su dominio de unión, FKBP12 permite la activación específica del receptor recombinante *in vivo* sin la inducción de efectos secundarios no específicos a través de FKBP12 endógeno. Además, los ligandos sintéticos son resistentes a la degradación de la proteasa, haciéndolos más eficaces en la activación de los receptores *in vivo* que la mayoría de los agentes proteicos suministrados.

Los ligandos usados pueden unirse a dos o más de los dominios de unión al ligando. Un experto en la materia prevé que las proteínas quiméricas pueden unirse a más de un ligando cuando contienen más de un dominio de unión al ligando. Por lo general, el ligando es una no proteína o un compuesto químico. Los ligandos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, FK506 dimérico (por ejemplo., FK1012).

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

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

#### D. Dirección a la membrana

Una secuencia dirigida a la membrana proporciona el transporte de la proteína quimérica a la membrana de la superficie celular, donde la misma u otras secuencias pueden codificar la unión de la proteína quimérica a la membrana de la superficie celular. Las moléculas en asociación con las membranas celulares contienen ciertas regiones que facilitan la asociación de la membrana, y dichas regiones se puede incorporar a una molécula de proteína quimérica para generar moléculas dirigidas a la membrana. Por ejemplo, algunas proteínas contienen secuencias en el extremo N o en el extremo C que están aciladas, y estas fracciones acilo facilitan la asociación de la membrana. Dichas secuencias son reconocidas por aciltransferasas y se suelen adaptar a un motivo de secuencia en particular. Algunos motivos de acilación son capaces de ser modificados con una sola fracción acilo (a menudo seguido por varios restos cargados positivamente (por ejemplo, c-Src: M-G-S-N-K-S-K-P-K-D-A-S-Q-R-R-R) para mejorar la asociación con grupos de cabeza lipídica aniónicos) y otros son capaces de ser modificados con múltiples fracciones acilo. Por ejemplo, la secuencia N-terminal de la proteína tirosina quinasa Src puede comprender una sola fracción miristoílo. Las regiones de acilación doble están situadas dentro de las regiones N-terminales de ciertas proteínas quinasas, tales como un subconjunto de miembros de la familia Src (por ejemplo, Yes, Fyn, Lck) y subunidades alfa de la proteína G. Dichas regiones de acilación doble se suelen encontrar dentro de los primeros dieciocho aminoácidos de dichas proteínas y se adaptan al motivo de secuencia Met-Gly-Cys-Xaa-Cys, donde Met está escindido, Gly está N-acilado y uno de los Cys está S-acilado. El Gly suele estar miristoilado y un Cys puede estar palmitoilado. Las regiones de acilación que conforman al motivo de secuencia Cys-Ala-Ala-Xaa (denominadas "cajas CAAX"), que pueden modificarse con fracciones isoprenilo C15 o C10, del extremo C de las subunidades gamma de la proteína G y otras proteínas (por ejemplo, dirección de la World Wide Web [ebi.ac.uk/interpro/DisplayproEntry?ac=IPR001230](http://ebi.ac.uk/interpro/DisplayproEntry?ac=IPR001230)) también se pueden utilizar. Estos y otros motivos de acilación son conocidos por el experto habitual en la materia (por ejemplo, Gauthier-Campbell *et al.*, *Molecular Biology of the Cell* 15: 2205-2217 (2004); Glabati *et al.*, *Biochem. J.* 303: 697- 700 (1994) y Zlakine *et al.*, *J. Cell Science* 110: 673-

679 (1997)), y pueden incorporarse en moléculas quiméricas para inducir la localización de la membrana. Una secuencia nativa de una proteína que contiene un motivo de acilación se puede incorporar a una proteína quimérica. Por ejemplo, se puede incorporar una parte N-terminal de Lck, Fyn o Yes o una subunidad alfa de proteína G, tal como los primeros veinticinco aminoácidos N-terminales o menos de dichas proteínas (por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 19 aminoácidos o de aproximadamente 15 a aproximadamente 19 aminoácidos de la secuencia nativa con mutaciones opcionales), dentro del extremo N de una proteína quimérica. Se puede unir una secuencia C-terminal de aproximadamente 25 aminoácidos o menos de una subunidad gamma de la proteína G que contenga una secuencia de motivo de caja CAAX (por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 aminoácidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 18 aminoácidos o de aproximadamente 15 a aproximadamente 18 aminoácidos de la secuencia nativa con mutaciones opcionales) se al extremo C-terminal de una proteína quimérica.

Una fracción acilo tiene un valor de log p de +1 a +6, y a veces tiene un valor de log p de +3 a +4,5. Los valores de log p son una medida de la hidrofobicidad, y suelen derivar de los estudios de partición en octanol/agua, en los que las moléculas con mayor hidrofobicidad se dividen en octanol con mayor frecuencia y se caracterizan por tener un mayor valor de log p. Se han publicado los valores de log p para una serie de moléculas lipófilas y los valores de log p se pueden calcular usando procesos de partición conocidos (por ejemplo, *Chemical Reviews*, Vol. 71, número 6, página 599, donde la entrada 4.493 muestra ácido láurico que tiene un valor de log p de 4,2). Cualquier fracción acilo puede estar unida a una composición peptídica descrita anteriormente y ensayarse para determinar la actividad antimicrobiana usando métodos conocidos y los descritos más adelante en el presente documento. La fracción acilo a veces es un alquilo C1-C20, alqueno C2-C20, alquino C2-C20, cicloalquilo C3-C6, haloalquilo C1-C4, cicloalquilalquilo C4-C12, arilo, arilo sustituido o aril(C1-C4)-alquilo, por ejemplo. Cualquier fracción que contiene acilo, a veces, es un ácido graso, y los ejemplos de fracciones de ácido graso son propilo (C3), butilo (C4), pentilo (C5), hexilo (C6), heptilo (C7), octilo (C8), nonilo (C9), decilo (C10), undecilo (C11), laurilo (C12), miristilo (C14), palmitilo (C16), estearilo (C18), araquidilo (C20), behenilo (C22) y fracciones lignocerilo (C24), y cada fracción puede contener 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 insaturaciones (es decir, dobles enlaces). A veces, una fracción acilo es una molécula lipídica, tal como un lípido de fosfatidilo (por ejemplo, fosfatidil serina, fosfatidil inositol, fosfatidil etanolamina, fosfatidil colina), esfingolípido (por ejemplo, esfingomielina, esfingosina, ceramida, gangliósido, cerebrósido) o versiones modificadas de los mismos. Una, dos, tres, cuatro o cinco o más fracciones acilo se pueden unir a una región de asociación de membrana.

Una proteína quimérica del presente documento también puede incluir una secuencia transmembrana de un solo paso o de múltiples pasos (por ejemplo, en el extremo N o en el extremo C de la proteína quimérica). Las regiones transmembrana de un solo paso se encuentran en ciertas moléculas de DC, receptores de tirosina quinasa, receptores de serina/treonina quinasa, TGFbeta, BMP, activina y fosfatasa. Las regiones transmembrana de un solo paso suelen incluir una región de péptido señal y una región transmembrana de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 aminoácidos, muchos de los cuales son aminoácidos hidrófobos y pueden formar una hélice alfa. Un rastreo corto de aminoácidos cargados positivamente a menudo sigue al intervalo transmembrana para anclar la proteína en la membrana. Las proteínas de múltiples pasos incluyen bombas de iones, canales iónicos y transportadores, e incluyen dos o más hélices que abarcan la membrana varias veces. Toda o sustancialmente toda una proteína de múltiples pasos a veces se incorpora en una proteína quimérica. Las secuencias para las regiones transmembrana de uno o múltiples pasos son conocidas, y pueden ser seleccionadas para su incorporación a una molécula de proteína quimérica por el experto habitual en la materia.

Se puede emplear cualquier secuencia dirigida a la membrana que sea funcional en el hospedador y que pueda estar asociada o no a uno de los otros dominios de la proteína quimérica. En algunas realizaciones, dichas secuencias incluyen, pero sin limitación, la secuencia dirigida a la miristoilación, la secuencia dirigida a la palmitoilación, secuencias de prenilación (es decir, farnesilación, geranil-geranilación, caja CAAX), motivos de interacción proteína-proteína o secuencias transmembranales (utilizando péptidos señal) de los receptores. Los ejemplos incluyen los descritos en, por ejemplo, ten Klooster J. P. *et al*, *Biology of the Cell* (2007) 99, 1-12, Vincent, S., *et al.*, *Nature Biotechnology* 21:936-40, 1098 (2003).

Existen dominios proteicos adicionales que pueden aumentar la retención de proteínas en diversas membranas. Por ejemplo, un dominio de homología de pleckstrina de ~ 120 aminoácidos (PH) se encuentra en más de 200 proteínas humanas que normalmente participan en la señalización intracelular. Los dominios PH pueden unirse a diversos lípidos de fosfatidilinositol (PI) dentro de membranas (p. PI (3,4,5)-P<sub>3</sub>, PI (3,4)-P<sub>2</sub>, PI (4,5)-P<sub>2</sub>) y, por tanto, desempeñan un papel clave en el reclutamiento de proteínas a diferentes compartimentos de membrana o celulares. A menudo, el estado de fosforilación de los lípidos PI se regula, tal como mediante la PI-3 quinasa o PTEN y, por lo tanto, la interacción de membranas con los dominios PH no es tan estable como mediante lípidos de acilo.

#### E. Marcadores seleccionables

Las construcciones de expresión pueden contener construcciones de ácidos nucleicos cuya expresión se identifica *in vitro* o *in vivo* incluyendo un marcador en la construcción de expresión. Dichos marcadores conferirían un cambio identificable a la célula permitiendo una fácil identificación de las células que contienen la construcción de expresión. Normalmente, la inclusión de un marcador de selección del fármaco ayuda en la clonación y en la selección de

transformantes. Por ejemplo, los genes que confieren resistencia a la neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores seleccionables útiles. Como alternativa, se emplean enzimas tales como la timidina quinasa (tk) del virus del herpes simple. También se pueden emplear marcadores de superficie inmunológicos que contienen los dominios extracelulares, sin señalización o diversas proteínas (por ejemplo, CD34, CD19, LNGFR), lo que permite un método directo para la clasificación por medio de un anticuerpo magnético o de fluorescencia. No se cree que el marcador seleccionable empleado sea importante, siempre que sea capaz de ser expresado simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Otros ejemplos de marcadores seleccionables son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen indicadores tales como EGFP, beta-gal o cloranfenicol acetiltransferasa (CAT).

## F. Regiones de control

### 1. Promotores

No se cree que sea importante el promotor concreto empleado para controlar la expresión de una secuencia de polinucleótidos de interés, siempre que pueda dirigir la expresión del polinucleótido en la célula diana. Así pues, cuando la célula humana es la diana, es preferible situar la región de codificación de la secuencia del polinucleótido adyacente y bajo el control de un promotor que pueda expresarse en una célula humana. En términos generales, dicho promotor podría incluir un promotor bien humano o vírico.

Se pueden usar el promotor del gen temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV), el promotor temprano del SV40, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous,  $\beta$ -actina, el promotor de la insulina de rata y de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa para obtener un alto nivel de expresión de la secuencia de codificación de interés. También se contempla el uso de otros promotores víricos o de células de mamíferos o de fagos bacterianos, que son conocidos en la técnica, para conseguir la expresión de una secuencia de codificación de interés, siempre que los niveles de expresión sean suficientes para un fin dado. Mediante el empleo de un promotor con propiedades bien conocidas, se puede optimizar el nivel y el patrón de expresión de la proteína de interés tras la transfección o la transformación.

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

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

Otro sistema inducible que podría ser útil es el sistema Tet-Off™ o Tet-On™ (Clontech, Palo Alto, CA) originalmente desarrollado por Gossen y Bujard (Gossen y Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 89:5547-5551, 1992; Gossen *et al.*, *Science*, 268:1766-1769, 1995). Este sistema también permite la regulación de altos niveles de expresión génica en respuesta a la tetraciclina o a derivados de tetraciclina tales como doxiciclina. En el sistema Tet-On™, la expresión génica se activa en presencia de doxiciclina, mientras que, en el sistema Tet-Off™, la expresión génica se activa en ausencia de la doxiciclina. Estos sistemas se basan en dos elementos reguladores derivados del operón de resistencia a la tetraciclina de *E. coli*. La secuencia operadora de tetraciclina a la que se une el represor de la tetraciclina, y la proteína represora de tetraciclina. El gen de interés se clonó en un plásmido por detrás de un promotor que tiene elementos sensibles a la tetraciclina en el mismo. Un segundo plásmido contiene un elemento regulador denominado transactivador controlado por tetraciclina, que está compuesto, en el sistema Tet-Off™, por el dominio VP16 del virus del herpes simple y el represor de la tetraciclina de tipo silvestre. Por lo tanto, en ausencia de doxiciclina, la transcripción se activa constitutivamente. En el sistema Tet-On™, el represor de la tetraciclina no es de tipo silvestre y, en presencia de doxiciclina, activa la transcripción. Para la producción del vector de terapia génica, se puede usar el sistema Tet-Off™ de manera que las células productoras podrían crecer en presencia de tetraciclina o doxiciclina y evitar la expresión de un transgén potencialmente tóxico, pero cuando se introduce el

vector en el paciente, la expresión génica se activaría constitutivamente.

En algunas circunstancias, es deseable regular la expresión de un transgén en un vector de terapia génica. Por ejemplo, se utilizan promotores víricos diferentes con resistencias variables a la actividad dependiendo del nivel de expresión deseado. En células de mamífero, se suele usar el promotor temprano inmediato del CMV para proporcionar una fuerte activación de la transcripción. El promotor CMV se revisa en Donnelly, J. J., *et al.*, 1997. *Annu. Rev. Immunol.* 15:617-48. También se han usado versiones modificadas del promotor del CMV que son menos potentes cuando se desean niveles de expresión reducidos del transgén. Cuando se desea la expresión de un transgén en células hematopoyéticas, se suelen usar promotores retrovíricos tales como los LTR del VLM o del MMTV. Otros promotores víricos que se usan dependiendo del efecto deseado incluyen SV40, LTR del VSR, LTR del VIH-1 y VIH-2, los promotores adenovíricos tales como de la región E1A, E2A, o de la región MLP, LTR del AAV, VSH-TK y virus del sarcoma aviar.

De forma similar, se usan promotores específicos del tejido para efectuar la transcripción en tejidos o células específicas de manera que reduzcan la toxicidad potencial o los efectos no deseados a los tejidos no diana. Estos promotores pueden producir la expresión reducida en comparación con un promotor más potente tal como el promotor del CMV, pero también pueden dar lugar a una expresión más limitada y a inmunogenicidad. (Bojak, A., *et al.*, 2002. *Vaccine*. 20:1975-79; Cazeaux, N., *et al.*, 2002. *Vaccine* 20:3322-31). Por ejemplo, promotores específicos del tejido tales como el promotor asociado a PSA o calicreína glandular específica de la próstata o el gen de creatina quinasa muscular, cuando sea apropiado.

En determinadas indicaciones, se desea activar la transcripción en momentos específicos tras la administración del vector de terapia génica. Esto se realiza con promotores tales como los que son regulables por hormonas o citocinas. Los promotores sensibles a las citocinas y proteínas inflamatorias que se pueden usar incluyen quinínogeno K y T (Kageyama *et al.*, (1987) *J. Biol. Chem.*, 262, 2345-2351), c-fos, TNF-alfa, proteína C reactiva (Arcone, *et al.*, (1988) *Nucl. Acids Res.*, 16(8), 3195-3207), haptoglobina (Oliviero *et al.*, (1987) *EMBO J.*, 6, 1905-1912), amiloide A2 sérico, C/EBP alfa, IL-1, IL-6 (Poll y Cortese, (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.*, 86, 8202-8206), Complemento C3 (Wilson *et al.*, (1990) *Mol. Cell. Biol.*, 6181-6191), IL-8, glicoproteína ácida alfa-1 (Prowse y Baumann, (1988) *Mol Cell Biol*, 8,42-51), alfa-1-antitripsina, lipoproteína lipasa (Zechner *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 2394-2401, 1988), angiotensinógeno (Ron, *et al.*, (1991) *Mol. Cell. Biol.*, 2887-2895), fibrinógeno, c-jun (inducible por ésteres de forbol, TNF-alfa, radiación UV, ácido retinoico y peróxido de hidrógeno), colagenasa (inducida por ésteres de forbol y ácido retinoico), metalotioneína (metales pesados y glucocorticoides inducibles), estromelisina (inducible por ésteres de forbol, interleucina-1 y EGF), macroglobulina alfa-2 y anti-quimotripsina alfa-1. Otros promotores incluyen, por ejemplo, SV40, MMTV, virus de inmunodeficiencia humana (MV), virus de Moloney, ALV, virus de Epstein Barr, virus de sarcoma de Rous, actina humana, miosina, hemoglobina y creatina.

Se prevé que cualquiera de los promotores anteriores solos o en combinación con otro puede ser útil dependiendo de la acción deseada. Los promotores y otros elementos reguladores son seleccionados por los expertos en la materia de manera que sean funcionales en las células o en los tejidos deseados. Además, esta lista de promotores no debe interpretarse como exhaustiva ni limitante, los expertos en la materia conocerán otros promotores que se usan junto con los promotores y los métodos desvelados en el presente documento.

## 2. Potenciadores

Los potenciadores son elementos genéticos que aumentan la transcripción de un promotor situado en una posición distante en la misma molécula de ADN. Los primeros ejemplos incluyen los potenciadores asociados con la inmunoglobulina y los receptores de linfocitos T que flanquean la secuencia codificante y se producen dentro de varios intrones. Muchos promotores víricos, tales como CMV, SV40 y LTR retrovíricos están estrechamente asociados con la actividad potenciadora, y se suelen tratar como elementos individuales. Los potenciadores se organizan en gran parte como promotores. Es decir, se componen de muchos elementos individuales, cada uno de los cuales se une a una o más proteínas de transcripción. La distinción básica entre potenciadores y promotores es operacional. Una región potenciadora, en su conjunto, debe poder estimular la transcripción a distancia y suele ser independiente de la orientación; esto no es necesariamente cierto con respecto a una región promotora o sus elementos componentes. Por otra parte, un promotor debe tener uno o más elementos que dirigen el inicio de la síntesis del ARN en un determinado sitio y en una orientación concreta, mientras que los potenciadores carecen de estas especificidades. Los promotores y potenciadores suelen ser solapantes y contiguos, pareciendo tener a menudo una organización modular muy similar. Un subconjunto de potenciadores son regiones de control de locus (LCR) que no solo pueden aumentar la actividad de la transcripción, sino que (junto con elementos aislantes) también pueden ayudar a aislar el elemento transcripcional de secuencias adyacentes cuando se integran en el genoma.

Se puede usar cualquier combinación promotor/potenciador (según la base de datos de promotores eucariotas, EPDB) para dirigir la expresión del gen, aunque muchos restringirán la expresión a un determinado tipo de tejido o subconjunto de tejidos, (revisado en, por ejemplo, Kutzler, M. A. y Weiner, D. B., 2008. *Nature Reviews Genetics* 9:776-88). Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, potenciadores de la actina humana, miosina, hemoglobina, creatina quinasa muscular, secuencias, y de virus CMV, RSV y EBV. Los expertos en la materia podrán seleccionar

potenciadores apropiados para aplicaciones particulares. Las células eucariotas pueden soportar la transcripción citoplasmática de ciertos promotores bacterianos si se proporciona la polimerasa bacteriana apropiada, ya sea como parte del complejo de administración o como una construcción de expresión genética adicional.

### 5 3. Señales de poliadenilación

10 Cuando se emplea una inserción de ADNc, se deseará incluir normalmente una señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación adecuada de la transcripción génica. No se cree que sea crucial la naturaleza de la señal de poliadenilación para la práctica satisfactoria de los presentes métodos, y se emplea cualquiera de dichas secuencias tales como una hormona del crecimiento humana o bovina y las señales de poliadenilación de SV40 y las señales de poliadenilación de LTR. Un ejemplo no limitante es la señal de poliadenilación de SV40 presente en el plásmido pCEP3 (Invitrogen, Carlsbad, California). También se contempla como elemento del casete de expresión un terminador. Estos elementos pueden servir para potenciar los niveles de mensajes y para reducir al mínimo la lectura del casete en otras secuencias. Las secuencias de señal de terminación o poli(A) pueden estar, por ejemplo, situadas en torno a 11-30 nucleótidos cadena abajo de una secuencia conservada (AAUAAA) en el extremo 3' del ARNm. (Montgomery, D. L., *et al.*, 1993, *DNA Cell Biol.* 12:777-83; Kutzler, M. A., y Weiner, D. B., 2008. *Nature Rev. Gen.* 9:776-88).

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

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

30 Se pueden usar elementos de sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) para crear multigenes o mensajes policistrónicos. Los elementos IRES pueden evitar el modelo de rastreo del ribosoma de la traducción dependiente de la protección terminal metilada en 5' y comenzar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, *Nature*, 334:320-325, 1988). Se han descrito elementos IRES procedentes de dos miembros de la familia picornavirus (polio y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como un IRES de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991). Los elementos IRES se pueden unir a marcos de lectura abiertos heterólogos. Se pueden transcribir juntos múltiples marcos de lectura abiertos, separado cada uno de ellos por un IRES, creando mensajes policistrónicos. En virtud del elemento IRES, cada marco de lectura abierto es accesible a los ribosomas para una traducción eficaz. Se pueden expresar eficazmente múltiples genes usando un solo promotor/potenciador para transcribir un único mensaje (véanse las patentes de EE.UU. n.º 5.925.565 y 5.935.819).

### 40 G. Optimización de secuencias

La producción de proteínas también puede aumentarse optimizando los codones en el transgén. Los cambios de codones específicos de la especie, conocidos por los expertos en la materia, se pueden usar para aumentar la producción de proteínas. Además, los codones pueden optimizarse para producir un ARN optimizado, lo que puede dar lugar a una traducción más eficaz. Mediante la optimización de los codones que se incorporarán a ARN, se pueden eliminar elementos tales como los que producen una estructura secundaria que causa inestabilidad, estructuras de ARNm secundarias que pueden, por ejemplo, inhibir la unión ribosómica o secuencias crípticas que pueden inhibir la exportación nuclear de ARNm. (Kutzler, M. A., y Weiner, D. B., 2008. *Nature Rev. Gen.* 9:776-88; Yan J. *et al.*, 2007. *Mol. Ther.* 15:411-21; Cheung, Y. K., *et al.*, 2004. *Vaccine* 23:629-38; Narum., D. L., *et al.*, 2001. 69:7250-55; Yadava, A., y Ockenhouse, C. F., 2003. *Infect. Immun.* 71:4962-69; Smith., J. M., *et al.*, 2004. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20:1335-47; Zhou, W., *et al.*, 2002. *Vet. Microbiol.* 88:127-51; Wu, X., *et al.*, 2004. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313:89-96; Zhang, W., *et al.*, 2006. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349:69-78; Demi, L. A., *et al.*, 2001. *J. Virol.* 75:1099-11001; Schneider, R. M., *et al.*, 1997. *J. Virol.* 71:4892-4903; Wang, S. D., *et al.*, 2006. *Vaccine* 24:4531-40; zur Megede, J., *et al.*, 2000. *J. Virol.* 74:2628-2635).

### H. Secuencias líder

60 Se pueden añadir secuencias líder, como es conocido por los expertos en la materia, para potenciar la estabilidad del ARNm y producir una traducción más eficaz. La secuencia líder suele estar implicada en dirigir el ARNm al retículo endoplasmático. Los ejemplos incluyen la secuencia señal para la glicoproteína de la envoltura del VIH-1 (Env), que retrasa su propia escisión, y la secuencia líder del gen de IgE (Kutzler, M. A. y Weiner, D. B., 2008. *Nature Rev. Gen.* 9:776-88; Li, V., *et al.*, 2000. *Virology* 272:417-28; Xu, Z. L., *et al.* 2001. *Gene* 272:149-56; Malin, A. S., *et al.*, 2000. *Microbes Infect.* 2:1677-85; Kutzler, M. A., *et al.*, 2005. *J. Immunol.* 175:112-125; Yang., J. S., *et al.*, 2002. *Emerg. Infect. Dis.* 8:1379-84; Kumar, S., *et al.*, 2006. *DNA Cell Biol.* 25:383-92; Wang, S., *et al.*, 2006. *Vaccine* 24:4531-40). La secuencia líder de IgE se puede usar para potenciar la inserción en el retículo

endoplasmático (Tepler, I, *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5912).

La expresión de los transgenes puede optimizarse y/o controlarse mediante la selección de métodos apropiados para optimizar la expresión, conocidos por los expertos en la materia. Estos métodos incluyen, por ejemplo, la optimización de promotores, métodos de administración y secuencias de genes (por ejemplo, como se presenta en Laddy, D. J., *et al.*, 2008. *PLoS.ONE* 3 e2517; Kutzler, M. A., y Weiner, D. B., 2008. *Nature Rev. Gen.* 9:776-88).

#### Métodos de transferencia génica

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

Se generó una célula transformada que comprendía un vector de expresión introduciendo en la célula el vector de expresión. Los métodos adecuados para la administración de polinucleótidos para la transformación de un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo para su uso con los presentes métodos incluyen casi cualquier método mediante el que se puede introducir un polinucleótido (por ejemplo, ADN) en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en el presente documento o conocería el experto habitual en la materia.

Una célula hospedadora puede usarse, y se ha usado, como receptora de vectores. Las células hospedadoras pueden derivarse de procariotas o eucariotas, dependiendo de si el resultado deseado es la replicación del vector o de la expresión de parte o de todas las secuencias de polinucleótidos codificadas por el vector. Hay disponibles numerosas líneas y cultivos celulares para su uso como una célula hospedadora, y se pueden obtener a través de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), que es una organización que sirve como archivo de cultivos vivos y materiales genéticos. En realizaciones específicas, la célula hospedadora es una célula dendrítica, que es una célula presentadora de antígeno.

También pertenece al conocimiento de un experto en la materia determinar un hospedador adecuado. En general, esto se basa en la estructura principal del vector y en el resultado deseado. Se puede introducir un plásmido o un cósmido, por ejemplo, en una célula hospedadora procariota para la replicación de muchos vectores. Las células bacterianas usadas como células hospedadoras para la replicación y/o la expresión del vector incluyen DH5alfa, JM109, y KC8, así como una serie de hospedadores bacterianos disponibles en el mercado tales como SURE® Competent Cells y SOLOPACK™ Gold Cells (STRATAGENE®, La Jolla, CA). Como alternativa, se podrían usar células bacterianas tales como LE392 de *E. coli* como células hospedadoras para los virus de fagos. Las células eucariotas que se pueden usar como células hospedadoras incluyen, pero sin limitación, levaduras, insectos y mamíferos. Los ejemplos de células hospedadoras eucariotas de mamíferos para la replicación y/o la expresión de un vector incluyen, pero sin limitación, HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, COS, CHO, Saos, y PC12. Los ejemplos de cepas de levaduras incluyen, pero sin limitación, YPH499, YPH500 y YPH501.

Las vacunas de ácido nucleico son conocidas por los expertos en la materia, e incluyen, por ejemplo, vectores de ADN no vírico, ADN y ARN "desnudos" y vectores víricos. Los métodos de transformación de células con estas vacunas, y para la optimización de la expresión de genes incluidos en estas vacunas son conocidos y también se analizan en el presente documento.

#### A. Ejemplos de métodos de transferencia de vectores de ácido nucleico y víricos

##### 1. Transformación *ex vivo*

Los métodos de transfección de células y tejidos vasculares extraídos de un organismo en un escenario *ex vivo* son conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se han alterado genéticamente células endoteliales caninas mediante transferencia génica retroviral *in vitro* y se han trasplantado en un perro (Wilson *et al.*, *Science*, 244:1344-1346, 1989). En otro ejemplo, se transfectaron células endoteliales de minicerdo de Yucatán mediante retrovirus *in vitro* y se trasplantaron en una arteria usando un catéter de doble globo (Nabel *et al.*, *Science*, 244(4910):1342-1344, 1989). Así pues, se contempla que las células o los tejidos se puedan retirar y transfectar *ex vivo* usando los polinucleótidos presentados en el presente documento. En aspectos concretos, las células o los tejidos trasplantados pueden introducirse en un organismo. De esta manera, está comprendido en el conocimiento de un experto en la materia el aislamiento de células dendríticas procedentes de un animal, la transfección de las células con el vector de expresión y, a continuación, la administración de las células transfectadas o transformadas al animal.

##### 2. Inyección

Se puede administrar un polinucleótido a un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo mediante una o más inyecciones (es decir, una inyección con aguja), tal como, por ejemplo, por vía subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, *etc.* Los métodos de inyección de vacunas son bien conocidos por los expertos habituales en la materia (por ejemplo, la inyección de una composición que comprende una solución

salina). Otras posibilidades incluyen la introducción de un polinucleótido mediante microinyección directa. La cantidad del vector de expresión usado puede variar dependiendo de la naturaleza del antígeno, así como del órgano, de la célula, del tejido o del organismo usado.

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

### 3. Electroporación

15 Se puede introducir un polinucleótido en un órgano, una célula, un tejido o un organismo mediante electroporación. La electroporación implica la exposición de una suspensión de células y ADN a una descarga eléctrica de alto tensión. En algunas variantes de este método, se emplean determinadas enzimas degradadoras de la pared celular, tales como las enzimas degradadoras de pectina, para volver las células receptoras diana más susceptibles a la transformación mediante electroporación que las células sin tratar (patente de EE.UU. n.º 5.384.253).

20 La transfección de células eucariotas usando electroporación ha sido bastante satisfactoria. Se han transfectado prelinfocitos B de ratones con genes de la inmunoglobulina kappa humana (Potter *et al.*, (1984) *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.*, 81,7161-7165), y se han transfectado hepatocitos de rata con el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (Tur-Kaspa *et al.*, (1986) *Mol. Cell Biol.*, 6,716-718) de esta manera.

25

### 4. Fosfato de calcio

Se puede introducir un polinucleótido en las células usando la precipitación con fosfato de calcio. Se han transfectado células KB humanas con ADN de adenovirus 5 (Graham y van der Eb, (1973) *Virology*, 52,456-467) usando esta técnica. También, de esta manera, se han transfectado células L(A9) de ratón, C127 de ratón, CHO, CV-1, BHK, NIH3T3 y HeLa con un gen marcador de la neomicina (Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987), y se han transfectado hepatocitos de rata con una variedad de genes marcadores Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990).

### 5. DEAE-Dextrano

Se puede administrar un polinucleótido en una célula usando DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol. De esta manera, se introdujeron plásmidos indicadores en células de mieloma y eritroleucemia de ratón (Gopal, T. V., *Mol Cell Biol.* Mayo de 1985; 5(5):1188-90.

### 6. Carga por sonicación

Las posibilidades adicionales incluyen la introducción de un polinucleótido mediante una carga sónica. Se han transfectado fibroblastos LTK con el gen de la timidina quinasa mediante carga por sonicación (Fechheimer *et al.*, (1987) *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.*, 84,8463-8467).

### 7. Transfección mediada por liposomas

Se puede atrapar un polinucleótido en un complejo lipídico tal como, por ejemplo, un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana con una bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas de lípidos separadas por un medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando se suspenden los fosfolípidos en una solución acuosa en exceso. Los componentes lipídicos experimentan una autorredistribución antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas de lípidos (Ghosh y Bachhawat, (1991) en: "Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands", pág. 87-104). También se contempla un polinucleótido complejo con Lipofectamina (Gibco BRL) o Superfect (Qiagen).

### 8. Transfección mediada por receptor

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

65 Determinados vehículos dirigidos a genes mediados por receptores comprenden un ligando específico del receptor celular y un agente de unión a polinucleótido. Otros comprenden un ligando específico del receptor celular al que se

va a administrar el polinucleótido que se ha unido operativamente. Se han usado algunos ligandos para la transferencia génica mediada por el receptor (Wu y Wu, (1987) *J. Biol. Chem.*, 262, 4429-4432; Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 87(9):3410-3414, 1990; Perales *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 91:4086-4090, 1994; Myers, EPO 0273085), que establece la operabilidad de la técnica. Se ha descrito la administración específica en el contexto de otro tipo de célula de mamífero (Wu y Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993). En ciertos aspectos, se selecciona un ligando para corresponder a un receptor expresado específicamente en la población de células diana.

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

El componente del vehículo de administración de polinucleótidos de un vehículo de administración dirigida puede ser el propio liposoma, que comprenderá preferentemente uno o más lípidos o glicoproteínas que dirigen la unión específica de células. Por ejemplo, se ha incorporado lactosil ceramida, un asiogangliósido terminado en galactosa, a liposomas, y se ha observado un aumento en la captación del gen de la insulina por parte de los hepatocitos (Nicolau *et al.*, (1987) *Methods Enzymol.*, 149,157-176). Se contempla que las construcciones transformantes específicas de los tejidos pueden administrarse específicamente a una célula diana de una manera similar.

## 9. Bombardeo de microproyectiles

Se pueden usar técnicas de bombardeo de microproyectiles para introducir un polinucleótido en al menos un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo (patente de EE.UU. n.º 5.550.318; patente de EE.UU. n.º 5.538.880; patente de EE.UU. n.º 5.610.042; y solicitud PCT n.º WO 94/09699). Este método depende de la capacidad de acelerar los microproyectiles recubiertos de ADN a una alta velocidad, lo que les permite perforar membranas celulares y penetrar en las células sin destruirlas (Klein *et al.*, (1987) *Nature*, 327,70-73). Existe una amplia variedad de técnicas de bombardeo con microproyectiles conocidas en la materia, muchas de las cuales son aplicables a los presentes métodos.

En este bombardeo de microproyectiles, se pueden recubrir una o más partículas con al menos un polinucleótido y administrarse a células mediante una fuerza propulsora. Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar partículas pequeñas. Uno de dichos dispositivos se basa en una descarga de alto tensión para generar una corriente eléctrica que, a su vez, proporcione la fuerza motora (Yang *et al.*, (1990) *Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU.*, 87, 9568-9572). Los microproyectiles usados han consistido en sustancias biológicamente inertes tales como partículas o perlas de tungsteno u oro. Las partículas ilustrativas incluyen las comprendidas por tungsteno, platino y, preferentemente, oro. Se contempla que, en algunos casos, la precipitación de ADN sobre partículas metálicas no sería necesaria para la administración del ADN a una célula receptora usando el bombardeo de microproyectiles. Sin embargo, se contempla que las partículas puedan contener ADN en lugar de estar recubiertas con ADN. Las partículas recubiertas con ADN pueden aumentar el nivel de administración del ADN mediante el bombardeo de partículas pero no son, en ni por sí mismas, necesarias.

## B. Ejemplos de métodos de transferencia mediada por vectores víricos

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

### 1. Adenovirus

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

La región E1 (E1A y E1B) codifica las proteínas responsables de la regulación de la transcripción del genoma vírico y unos cuantos genes celulares. La expresión de la región E2 (E2A y E2B) da lugar a la síntesis de las proteínas para la replicación del ADN vírico. Estas proteínas participan en la replicación del ADN, la expresión final del gen y la desactivación de la célula hospedadora (Renan, M. J. (1990) *RadiotherOncol.*, 19, 197-218). Los productos de los

genes posteriores (L1, L2, L3, L4 y L5), incluyendo la mayoría de las proteínas de cápsidas víricas, solo se expresan después de un procesamiento significativo de una sola transcripción primaria caracterizada por el promotor posterior mayor (MLP). El MLP (situado a 16,8 unidades cartográficas) es particularmente eficaz durante la fase final de la infección, y todos los ARNm caracterizados a partir de este promotor poseen una secuencia líder 5' tripartita (TL), que les convierte en ARNm preferidos para la traducción.

Para optimizar el adenovirus para la terapia génica, es necesario aumentar al máximo la capacidad de transporte de manera que se puedan incluir grandes segmentos de ADN. Es también muy deseable reducir la toxicidad y la reacción inmunológica asociadas con determinados productos adenovíricos. Las dos metas son, de manera amplia, colindantes en tanto en cuanto dicha eliminación de genes adenovíricos sirve para ambos fines. Poniendo en práctica los presentes métodos, es posible conseguir ambas metas reteniendo a la vez la capacidad de manipular las construcciones terapéuticas con relativa facilidad.

El gran desplazamiento del ADN es posible gracias a que los elementos *cis* requeridos para la replicación del ADN vírico están situados en las repeticiones terminales invertidas (ITR) (100-200 pb) en cualquier extremo del genoma vírico lineal. Los plásmidos que contienen las ITR pueden replicarse en presencia de un adenovirus no defectuoso (Hay, R. T., *et al.*, *J Mol Biol.* 5 de junio de 1984;175(4):493-510). Por lo tanto, la inclusión de estos elementos en un vector adenovírico debería permitir la replicación.

Además, la señal de empaquetamiento para la encapsulación vírica se localiza entre los pb 194-385 (0,5-1,1 unidades cartográficas) en el extremo izquierdo del genoma vírico (Hearing *et al.*, *J. (1987) Virol.*, 67,2555-2558). Esta señal imita el sitio de reconocimiento de la proteína en el ADN del bacteriófago lambda donde una secuencia específica cierra el extremo izquierdo, pero lejos de la secuencia del extremo cohesivo, media la unión a las proteínas que se requieren para la inserción del ADN en la estructura de cabeza. Los vectores de sustitución E1 de Ad han demostrado que un fragmento de 450 pb (0-1,25 unidades cartográficas) en el extremo izquierdo del genoma vírico podría dirigir el empaquetamiento en células 293 (Levrero *et al.*, *Gene*, 101:195-202, 1991).

Anteriormente, se ha demostrado que se pueden incorporar ciertas regiones del genoma adenovírico al genoma de células de mamífero, mediante lo que se pueden expresar los genes codificados. Estas líneas celulares son capaces de soportar la replicación de un vector adenovírico que sea deficiente en la función adenovírica codificada por la línea celular. También se han publicado informes sobre la complementación de vectores adenovíricos deficientes en la replicación por vectores "auxiliares", por ejemplo, el virus de tipo silvestre o mutantes condicionalmente defectuosos.

Se pueden complementar vectores adenovíricos deficientes en la replicación, en *trans*, por el virus auxiliar. Esta observación sola no permite el aislamiento de los vectores deficientes en la replicación; sin embargo, debido a la presencia del virus auxiliar, necesaria para proporcionar funciones replicativas, podría contaminarse cualquier preparado. Así pues, era necesario un elemento adicional que pudiera añadir especificidad a la replicación y/o al empaquetamiento del vector deficiente en la replicación. Este elemento se deriva de la función de empaquetamiento del adenovirus.

Se ha mostrado que existe una señal de empaquetamiento para el adenovirus en el extremo izquierdo de la cartografía convencional del adenovirus (Tibbetts *et al.* (1977) *Cell*, 12,243-249). Estudios posteriores han mostrado que un mutante con una eliminación en la región E1A (194-358 pb) del genoma creció mal incluso en una línea celular complementaba la función inicial (E1A) (Hearing y Shenk, (1983) *J. Mol. Biol.* 167,809-822). Cuando se recombinó un ADN adenovírico de compensación (0-353 pb) en el extremo derecho del mutante, el virus se empaquetó con normalidad. El análisis adicional de la mutación identificó un elemento corto, repetido, dependiente de la posición en el extremo izquierdo del genoma de Ad5. Se ha encontrado que una copia de la repetición bastaba para un empaquetado eficaz si estuviera presente en cualquier extremo del genoma, pero no cuando se mueve hacia el interior de la molécula de ADN de Ad5 (Hearing *et al.*, *J. (1987) Virol.*, 67,2555-2558).

Usando versiones mutadas de la señal de empaquetamiento, es posible crear virus auxiliares que se empaqueten con eficacias variables. Por lo general, las mutaciones son mutaciones o eliminaciones puntuales. Cuando se desarrollan virus auxiliares con una baja eficacia de empaquetamiento en células auxiliares, el virus se empaqueta, aunque a tasas reducidas en comparación con el virus de tipo silvestre, permitiendo, por tanto, la propagación del auxiliar. Cuando, sin embargo, estos virus auxiliares se desarrollan en células junto con el virus que contiene las señales de empaquetamiento de tipo silvestre, las señales de empaquetamiento de tipo silvestre se reconocen preferentemente sobre las versiones mutadas. Dada una cantidad limitante de factor de empaquetamiento, el virus que contiene las señales de tipo silvestre se empaqueta selectivamente en comparación con los auxiliares. Si la preferencia es suficientemente elevada, deben conseguirse soluciones madre que se acerquen a la homogeneidad.

Para mejorar el tropismo de las construcciones de ADV para tejidos o especies particulares, las secuencias de fibras de unión a receptores se suelen poder sustituir entre aislamientos adenovíricos. Por ejemplo, el ligando de receptor del adenovirus Coxsackie (CAR) encontrado en el adenovirus 5 puede sustituirse con la secuencia de fibra de unión a CD46 del adenovirus 35, fabricando un virus con afinidad de unión enormemente mejorada para células hematopoyéticas humanas. El virus "pseudotipificado" resultante, Ad5f35, ha sido la base de varios aislados víricos

desarrollados en el entorno clínico. Además, existen diversos métodos bioquímicos para modificar la fibra con el fin de permitir la redirección del virus a células diana, tales como células dendríticas. Los métodos incluyen el uso de anticuerpos bifuncionales (con un extremo unido al ligando CAR y un extremo unido a la secuencia diana) y biotilación metabólica de la fibra para permitir la asociación con ligandos químicos basados en avidina modificados. Como alternativa, se podrían unir ligandos (por ejemplo, anti-CD205 mediante enlazadores heterobifuncionales (por ejemplo, que contengan PEG), a la partícula de adenovirus.

## 2. Retrovirus

Los retrovirus son un grupo de virus de ARN monocatenarios caracterizados por la capacidad de convertir su ARN en ADN bicatenario en células infectadas mediante un proceso de transcripción inversa (Coffin, (1990) en: "Virology", ed., Nueva York: Raven Press, pág. 1437-1500). Este ADN resultante se integra a continuación de forma estable en cromosomas celulares como un provirus y dirige la síntesis de las proteínas víricas. La integración da lugar a la retención de las secuencias génicas víricas en la célula receptora y sus descendientes. El genoma retrovítico contiene tres genes - gag, pol y env - que codifican las proteínas de la cápsida, la enzima polimerasa y componentes de la envoltura, respectivamente. Una secuencia que se encuentra cadena arriba del gen gag, denominada psi, funciona como una señal para el empaquetamiento del genoma en viriones. Hay dos secuencias de repetición terminal larga (LTR) en los extremos 5' y 3' del genoma vírico. Estas contienen secuencias de un promotor y un potenciador potentes, y se requieren también para la integración en el genoma de la célula hospedadora (Coffin, 1990).

Para construir un vector retrovítico, se inserta un ácido nucleico que codifica un promotor en el genoma vírico en lugar de determinadas secuencias víricas para producir un virus que es defectuoso en la replicación. Para producir viriones, se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes gag, pol y env, pero sin los componentes de LTR y psi (Mann *et al.*, (1983) *Cell*, 33,153-159). Cuando un plásmido recombinante que contiene un ADNc humano, junto con las secuencias de LTR y psi retrovíticas se introduce en esta línea celular (mediante precipitación con fosfato de calcio, por ejemplo), la secuencia psi permite a la transcripción de ARN del plásmido recombinante empaquetarse en partículas víricas, que se secretan a continuación en el medio de cultivo (Nicolas, J. F., y Rubenstein, J. L. R., (1988) en: "Vectors: a Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses", Rodriguez Y Denhardt, Eds.). Nicolas y Rubenstein; Temin *et al.*, (1986) en: "Gene Transfer", Kucherlapati (ed.), Nueva York: Plenum Press, pág. 149-188; Mann *et al.*, 1983). Se recoge el medio que contiene los retrovirus recombinantes, se concentra opcionalmente, y se usa para la transferencia génica. Los vectores retrovíticos infectan una amplia variedad de tipos de células. Sin embargo, la integración y la expresión estable de muchos tipos de retrovirus requieren la división de las células hospedadoras (Paskind *et al.*, (1975) *Virology*, 67,242-248).

Se ha desarrollado recientemente una metodología diseñada para la dirección específica de los vectores retrovíticos basada en la modificación química de un retrovirus mediante la adición química de restos de galactosa a la envoltura vírica. Dicha modificación podría permitir la infección específica de células tales como hepatocitos mediante los receptores de asialoglicoproteínas, si esto se desea.

Se ha diseñado una metodología diferente para la dirección de retrovirus recombinantes, en la que se han usado anticuerpos biotilados contra una proteína de la envoltura retrovítica y contra un receptor específico de la célula. Los anticuerpos se acoplaron mediante los componentes de biotina usando estreptavidina (Roux *et al.*, (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.*, 86, 9079-9083). Usando anticuerpos contra los antígenos de clase I y clase II del complejo de histocompatibilidad mayor se ha demostrado la infección de una variedad de células humanas que perforan aquellos antígenos superficiales con un virus ecotrópico *in vitro* (Roux *et al.*, 1989).

## 3. Virus adeno-asociado

Los AAV utilizan un ADN monocatenario lineal, de aproximadamente 4.700 pares de bases. Las repeticiones terminales invertidas flanquean el genoma. Hay dos genes presentes en el genoma que dan lugar a una serie de productos génicos distintos. El primero, el gen cap, produce tres proteínas de viriones diferentes (VP), designadas VP-1, VP-2 y VP-3. El segundo, el gen rep, codifica cuatro proteínas no estructurales (NS). Uno o más de estos productos del gen rep son responsables de transactivar la transcripción de AAV.

Los tres promotores en AAV se designan por su ubicación, en unidades cartográficas, en el genoma. Existen, de izquierda a derecha, p5, p19 y p40. La transcripción da lugar a seis transcripciones, dos iniciadas en cada uno de los tres promotores, cortándose y empalmándose uno de cada pareja. El sitio de corte y empalme, derivado de las unidades cartográficas 42-46, es el mismo para cada transcripción. Las cuatro proteínas no estructurales se derivan aparentemente de la más larga de las transcripciones, y surgen tres proteínas de viriones de la transcripción más pequeña.

No se ha asociado AAV con ningún estado patológico en seres humanos. Curiosamente, para una replicación eficaz, AAV requiere funciones "auxiliares" de los virus tales como el virus del herpes simple I y II, citomegalovirus, el virus de la pseudorabia y, por supuesto, adenovirus. El mejor caracterizado de los auxiliares es el adenovirus, y se ha mostrado que muchas funciones "iniciales" de este virus ayudan en la replicación del AAV. Se cree que la expresión

de bajo nivel de las proteínas rep de AAV mantiene la expresión estructural de AAV en estado de verificación, y se cree que la infección del virus auxiliar elimina este bloque.

Se pueden obtener repeticiones terminales del vector de AAV mediante digestión de la endonucleasa de restricción de AAV o un plásmido tal como p201, que contiene un genoma de AAV modificado (Samulski *et al.*, *J. Virol.*, 61:3096-3101 (1987)) o mediante otros métodos conocidos por el experto en la materia, que incluyen, pero sin limitación, la síntesis química o enzimática de las repeticiones terminales basadas en la secuencia publicada de AAV. El experto habitual en la materia puede determinar, mediante métodos bien conocidos tales como el análisis de eliminación, la secuencia mínima o parte de los ITR de AAV que se requieren para permitir su función, es decir, la integración estable y específica del sitio. El técnico habitual en la materia puede determinar también qué modificaciones menores de la secuencia pueden tolerarse manteniendo a la vez la capacidad de las repeticiones terminales de dirigir la integración estable, específica de sitio.

Los vectores basados en AAV han demostrado ser vehículos seguros y eficaces para la administración de genes *in vitro*, y estos vectores se desarrollan y ensayan en etapas preclínicas y clínicas para una amplia selección de aplicaciones en una potencial terapia génica, tanto *ex vivo* como *in vivo* (Carter y Flotte, (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 770, 79-90; Chattejee, *et al.*, (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 770,79-90; Ferrari *et al.*, (1996) *J. Virol.*, 70,3227-3234; Fisher *et al.*, (1996) *J. Virol.*, 70,520-532; Flotte *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.*, 90,10613-10617, (1993); Goodman *et al.* (1994), *Blood*, 84,1492-1500; Kaplitt *et al.*, (1994) *Nat'l Genet.*, 8,148-153; Kaplitt, M. G., *et al.*, *Ann Thorac Surg.*, diciembre de 1996; 62(6): 1669-76; Kessler *et al.*, (1996) *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.*, 93,14082-14087; Koeberl *et al.*, (1997) *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.*, 94,1426-1431; Mizukami *et al.*, (1996) *Virology*, 217,124-130).

La transferencia y la expresión génica eficaces mediadas por AAV en el pulmón ha conducido a ensayos clínicos para el tratamiento de la fibrosis quística (Carter y Flotte, 1995; Flotte *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.*, 90,10613-10617, (1993)). De manera similar, parecen prometedoras las perspectivas para el tratamiento de la distrofia muscular mediante la administración génica mediada por AAV de la distrofina al músculo esquelético, de la enfermedad de Parkinson mediante la administración del gen de la tirosina hidroxilasa al cerebro, de la hemofilia B mediante la administración del gen del Factor IX al hígado y, potencialmente, del infarto de miocardio mediante la administración del gen del factor de crecimiento endotelial vascular al corazón, debido a que la expresión del transgén mediada por AAV en estos órganos ha mostrado recientemente ser muy eficaz (Fisher *et al.*, (1996) *J. Virol.*, 70,520-532; Flotte *et al.*, 1993; Kaplitt *et al.*, 1994; 1996; Koeberl *et al.*, 1997; McCown *et al.*, (1996) *Brain Res.*, 713,99-107; Ping *et al.*, (1996) *Microcirculation*, 3,225-228; Xiao *et al.*, (1996) *J. Virol.*, 70,8098-8108).

#### 4. Otros vectores víricos

En los presentes métodos y composiciones, se emplean otros vectores víricos como construcciones de expresión. Se emplean vectores derivados de virus tales como de virus vaccinia (Ridgeway, (1988) en: "Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses", pág. 467-492; Baichwal y Sugden, (1986) en, "Gene Transfer", pág. 117-148; Couparetal., *Gene*, 68:1-10, 1988), el virus de la viruela del canario, y virus del herpes. Estos virus ofrecen algunas características para el uso en la transferencia génica en diversas células de mamífero.

Una vez que la construcción se ha administrado a la célula, el ácido nucleico que codifica el transgén se sitúa y expresa en diferentes sitios. El ácido nucleico que codifica el transgén se integra de manera estable en el genoma de la célula. Esta integración está en la localización y orientación análogas mediante recombinación homóloga (sustitución del gen) o se integra en una ubicación aleatoria, no específica (aumento del gen). En otras realizaciones adicionales, el ácido nucleico se mantiene de manera estable en la célula como un segmento episómico, separado de ADN. Dichos segmentos de ácido nucleico o "episomas" codifican secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y la replicación independiente de o en sincronización con el ciclo de la célula hospedadora. Cómo se administra la construcción de expresión a una célula y cuándo el ácido nucleico que permanece en la célula es dependiente del tipo de construcción de expresión empleada.

#### Potenciación de una respuesta inmune

En ciertas realizaciones, se contempla una nueva estrategia de activación de DC que incorpora la manipulación de los polipéptidos coestimulantes de la señalización que activan las vías NF-kappaB, las vías Akt y/o las vías p38. Este sistema de activación de las DC se puede usar junto con o sin vacunas convencionales para potenciar la respuesta inmune debido a que sustituye la necesidad de ayuda de los linfocitos T CD4+ durante la activación (Bennett, S. R., *et al.*, *Nature*, 4 de junio de 1998, 393: pág. 478-80; Ridge, J. P., D. R. F, y P. *Nature*, 4 de junio de 1998, 393: pág. 474-8; Schoenberger, S. P., *et al.*, *Nature*, 4 de junio de 1998, 393: pág. 480-3). De esta manera, el sistema de activación de las DC presentado en el presente documento potencia las respuestas inmunes evitando la necesidad de la generación de péptidos MHC específicos de clase II.

Según las reivindicaciones, la activación de las DC es mediante la activación de CD40. Por lo tanto, la activación de las DC mediante interacciones CD40/CD40L endógenas puede estar sujeta a la regulación negativa debida a la retroalimentación negativa, conduciendo con rapidez al "efecto de desgaste de IL-12". En el transcurso de 7 a 10

horas después de la activación de CD40, se produce una isoforma cortada y empalmada de forma alternativa de CD40 (tipo II) como un factor secretable (Tone, M., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 2001. 98(4): pág. 1751-1756). CD40 de tipo II puede actuar como receptor negativo dominante, regulando negativamente la señalización a través de CD40L y limitando posiblemente la potencia de la respuesta inmune generada. Por lo tanto, los presentes procedimientos invitan a la regulación natural de CD40 creando una forma inducible de CD40 (iCD40), careciendo de dominio extracelular y activado en cambio por ligandos dimerizantes sintéticos (Spencer, D. M., *et al.*, *Science*, 1993. 262: pág. 1019-1024) mediante una tecnología denominada dimerización inducida químicamente (CID).

Los presentes métodos comprenden métodos de potenciación de la respuesta inmune en un sujeto que comprenden la etapa de administrar cualquiera de entre el vector de expresión, la construcción de expresión o las células presentadoras de antígeno transducidas al sujeto. El vector de expresión codifica un polipéptido coestimulante, tal como iCD40.

En ciertos aspectos analizados en el presente documento, las células presentadoras de antígeno están comprometidas en un animal, tal como un ser humano, primate no humano, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o roedor. El sujeto puede ser, por ejemplo, un ser humano, por ejemplo, un paciente que padezca una enfermedad infecciosa y/o un sujeto que esté inmunocomprometido, o que padezca una enfermedad hiperproliferativa según lo definido en las reivindicaciones.

La construcción de expresión y/o el vector de expresión se pueden utilizar como una composición o sustancia que active las células presentadoras de antígeno. Dicha composición que "activa las células presentadoras de antígeno" o "potencia la actividad de las células presentadoras de antígeno" se refiere a la capacidad de estimular una o más actividades asociadas con las células presentadoras de antígeno. Dichas actividades son bien conocidas de los expertos en la materia. Por ejemplo, una composición, tal como una construcción o un vector de expresión de los presentes métodos, puede estimular la regulación de forma positiva de moléculas coestimulantes en células presentadoras de antígeno, inducir la translocación nuclear de NF-kappaB en células presentadoras de antígeno, activar los receptores de tipo Toll en las células presentadoras de antígeno u otras actividades que implican citocinas o quimiocinas.

La construcción de expresión, el vector de expresión y/o las células presentadoras de antígeno transducidas pueden potenciar o contribuir a la eficacia de la vacuna, por ejemplo, potenciando la inmunogenicidad de antígenos más débiles tales como antígenos muy purificados o recombinantes, reduciendo la cantidad de antígeno requerida para una respuesta inmune, reduciendo la frecuencia de inmunización requerida para proporcionar inmunidad protectora, mejorando la eficacia de las vacunas en sujetos con respuestas inmunes reducidas o debilitadas, tales como en recién nacidos, ancianos e individuos inmunocomprometidos, y potenciar la inmunidad en un tejido diana, tal como la inmunidad mucosal, o promover la inmunidad mediada por células o humoral generando un perfil de citocinas concreto.

Además, un individuo o sujeto comprometido es un sujeto que tiene una respuesta inmune reducida o debilitada. Dichos individuos pueden incluir también un sujeto que haya sido sometido a quimioterapia o cualquier otra terapia que debilite el sistema inmune, un receptor de trasplante, un sujeto que tome actualmente inmunosupresores, un anciano o cualquier individuo que tenga células auxiliares T CD4 reducidas y/o dañadas. Se contempla que los presentes métodos se pueden utilizar para potenciar la cantidad y/o la actividad de los linfocitos auxiliares T CD4 en un sujeto inmunocomprometido.

En aspectos específicos analizados en el presente documento, antes de administrar la célula presentadora de antígeno transducida, las células se estimulan con antígenos (también denominados en el presente documento "antígenos diana"). Tras el estímulo, las células presentadoras de antígeno transducidas cargadas se administran al sujeto por vía parenteral, intradérmica, intranodal o intralinfática. Las vías parenterales adicionales incluyen, pero sin limitación, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intramiocárdica, transendocárdica, transepicárdica, intratecal, y técnicas de infusión.

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

El antígeno diana puede obtenerse o aislarse de, por ejemplo, un microorganismo patógeno tal como virus que incluyen el VIH (Korber *et al.*, eds "HIV Molecular Immunology Database", Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N. Mex. 1977), la gripe, el herpes simple, el virus del papiloma humano (patente de EE.UU. n.º 5.719.054), hepatitis B (patente de EE.UU. n.º 5.780.036), la hepatitis C (patente de EE.UU. n.º 5.709.995), el VEB, el citomegalovirus (CMV) y similares. El antígeno diana puede obtenerse o aislarse de bacterias patógenas tales como, por ejemplo, *Chlamydia* (patente de EE.UU. n.º 5.869.608), *Mycobacteria*, *Legionella*, *Meningococcus*, *Streptococcus de grupo A*, *Salmonella*, *Listeria*, *Hemophilus influenzae* (patente de EE.UU. n.º 5.955.596) y similares.

El antígeno diana se puede derivar o aislar de, por ejemplo, levaduras patógenas incluyendo *Aspergillus*, *Candida invasiva* (patente de EE.UU. n.º 5.645.992), *Nocardia*, *Histoplasmosis*, *Cryptosporidia* y similares.

5 El antígeno diana puede obtenerse o aislarse, por ejemplo, de protozoos patógenos y parásitos patógenos incluyendo, pero sin limitación, *Pneumocystis carinii*, *Tripanosoma*, *Leishmania* (patente de EE.UU. n.º 5.965.242), *Plasmodium* (patente de EE.UU. n.º 5.589.343) y *Toxoplasma gondii*.

10 El antígeno diana incluye un antígeno asociado con un estado preneoplásico o hiperplásico. El antígeno diana puede asociarse también con o ser causante de cáncer. Dicho antígeno diana puede ser, por ejemplo, un antígeno específico de tumor, antígeno asociado a tumores (TAA) o antígeno específico de tejidos, sus epítomos, y los agonistas de epítomos de los mismos. Dichos antígenos diana incluyen, pero sin limitación, antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus epítomos tales como CAP-1, CAP-1-6D (46) y similares (n.º de acceso del GenBank M29540), MART-1 (Kawakami *et al.*, *J. Exp. Med.* 180:347-352, 1994), MAGE-1 (patente de EE.UU. n.º 5.750.395), MAGE-3, GAGE (patente de EE.UU. n.º 5.648.226), GP-100 (Kawakami *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* EE.UU. 91:6458-6462, 1992), MUC-1, MUC-2, oncogén ras mutado puntualmente, oncogenes p53 mutados normal y puntualmente (Hollstein *et al Nucleic Acids Res.* 22:3551-3555, 1994), PSMA (Israeli *et al.*, *Cancer Res.* 53:227-230, 1993), tirosinasa (Kwon *et al.*, *PNAS* 84:7473-7477, 1987) TRP-1 (gp75) (Cohen *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 18:2807-2808, 1990; patente de EE.UU. n.º 5.840.839), NY-ESO-1 (Chen *et al.*, *PNAS* 94: 1914-1918, 1997), TRP-2 (Jackson *et al.*, *EMBOJ*, 11:527-535, 1992), TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erbB2, (patente de EE.UU. n.º 5.550.214), BRC-I, BRC-II, bcr-abl, pax3-fkhr, ews-fli-1, modificaciones de los TAA y del antígeno específico de tejido, variantes de corte y empalme de los TAA, agonistas de epítomos, y similares. Se pueden identificar otros TAA, aislarse y clonarse mediante métodos conocidos en la técnica tales como los desvelados en la patente de EE.UU. n.º 4.514.506. El antígeno diana también puede incluir uno o más factores de crecimiento y variantes de corte y empalme de cada uno.

25 Un antígeno puede expresarse más frecuentemente en células cancerosas que en células no cancerosas. El antígeno proceder de la puesta en contacto la célula dendrítica modificada con el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) o un fragmento del mismo. En ciertas realizaciones, la célula dendrítica modificada se pone en contacto con un fragmento de PSMA que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3).

30 Para los organismos que contienen un genoma de ADN, un gen que codifica un antígeno diana o un epítopo inmunológico del mismo de interés se aísla del ADN genómico. Para organismos con genomas de ARN, el gen deseado puede aislarse de copias de ADNc del genoma. Si se dispone de mapas de restricción del genoma, el fragmento de ADN que contiene el gen de interés se escinde por digestión con la endonucleasa de restricción mediante métodos rutinarios en la técnica. En casos en los que el gen deseado se ha clonado previamente, los genes pueden obtenerse fácilmente de los clones disponibles. Como alternativa, si se conoce la secuencia de ADN del gen, el gen se puede sintetizar mediante cualquiera de las técnicas convencionales para la síntesis de ácidos desoxirribonucleicos.

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

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

50 Se puede lograr la carga antigénica de células dendríticas con antígenos, por ejemplo, incubando células dendríticas o células progenitoras con el polipéptido, ADN (desnudo o en un vector plasmídico) o ARN; o con bacterias o virus recombinantes que expresan el antígeno (por ejemplo, vaccinia, virus de la viruela aviar, adenovirus o vectores lentivíricos). Antes de la carga, el polipéptido puede conjugarse covalentemente con una pareja inmunológica que proporcione linfocitos T auxiliares (por ejemplo, una molécula transportadora). Como alternativa, se puede pulsar una célula dendrítica con una pareja inmunológica no conjugada, por separado o en presencia del polipéptido. Los antígenos procedentes de células o moléculas MHC se pueden obtener mediante elución ácida u otros métodos conocidos en la técnica (véase Zitvogel L. *et al.*, *J Exp Med* 1996. 183:87-97).

60 En aspectos adicionales analizados en el presente documento, la célula presentadora de antígeno transducida es transfectada con ARNm de células tumorales. La célula presentadora de antígeno transfectada transducida se administra a un animal para efectuar una repuesta inmune de linfocitos T citotóxicos y de antígeno antitumoral de linfocitos citolíticos naturales, y se regula usando FK506 dimérico y análogos de FK506 dimérico. El ARNm de las

65

células tumorales puede ser, por ejemplo, ARNm de una célula tumoral de próstata.

Además, la célula presentadora de antígeno transducida es pulsada con lisados de células tumorales. Las células presentadoras de antígeno transducidas pulsadas se administran a un animal para efectuar una repuesta inmune de linfocitos T citotóxicos y de antígeno antitumoral de linfocitos citolíticos naturales, y se regula usando FK506 dimérico y análogos de FK506 dimérico. El lisado de las células tumorales puede ser, por ejemplo, lisado de una célula tumoral de próstata.

El experto en la materia es total conocedor de que la activación de la molécula coestimulante del presente documento se basa en la oligomerización de los dominios de unión al ligando, por ejemplo, CID, para inducir su actividad. En realizaciones específicas, el ligando no es una proteína. Por ejemplo, el ligando puede ser FK506 dimérico o los análogos de FK506 dimérico, que producen la potenciación o la regulación positiva de la respuesta inmune. El uso de FK506 monomérico o de los análogos de FK506 monomérico produce la inhibición o reducción de la respuesta inmune negativamente.

Los linfocitos T se pueden activar mediante el contacto con la célula presentadora de antígeno que comprende el vector de expresión analizado en el presente documento, en el que la célula presentadora de antígeno se ha estimulado, transfectado, pulsado o electrofusionado con un antígeno.

La electrofusión es un método de generación de células híbridas. Existen algunas ventajas en la producción de híbridos celulares mediante electrofusión. Por ejemplo, se pueden controlar electrónicamente de manera fácil y precisa los parámetros de fusión para las condiciones dependientes de las células que se vayan a fusionar. Además, la electrofusión de células ha mostrado la capacidad de aumentar la eficacia de fusión sobre esta de la fusión por medios químicos o mediante fusógenos biológicos. La electrofusión se realiza aplicando pulsos eléctricos a las células en suspensión. Al exponer las células a un campo eléctrico alterno, las células se acercan entre sí formando cadenas de perlas en un método denominado alineación mediante dielectroforesis. Los pulsos posteriores con una tensión mayor hacen que las células entren en un contacto más íntimo, se formen electroporos reversibles en la descomposición reversible permeabilizante y mecánica de las membranas celulares, produciendo la fusión.

Los linfocitos T expresan un único receptor de unión al antígeno en su membrana (receptor de linfocitos T), que puede reconocer el antígeno solo con moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) sobre la superficie de otras células. Existen varias poblaciones de linfocitos T, tales como los linfocitos T auxiliares y los linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T auxiliares y los linfocitos T citotóxicos se distinguen principalmente por su expresión de las glicoproteínas CD4 y CD8 de unión a la membrana, respectivamente. Los linfocitos T auxiliares secretan diversas linfocinas, que son cruciales para la activación de los linfocitos B, linfocitos T citotóxicos, macrófagos y otras células del sistema inmune. Por el contrario, un linfocito T CD8 sin tratamiento previo reconoce un complejo de antígeno-MHC que prolifera y se diferencia en una célula efectora denominada linfocito T CD8 (CTL). Los CTL eliminan células del cuerpo que expresan el antígeno, tales como células infectadas por virus y células tumorales, produciendo sustancias que produce la lisis celular.

Se puede evaluar la actividad de los CTL mediante métodos descritos en el presente documento o como conocería el experto en la materia. Por ejemplo, pueden evaluarse los CTL en células mononucleares aisladas recientemente de sangre periférica (PBMC), en una línea de células expandida mediante IL-2 estimulada por fitohemaglutinina a partir de PBMC (Bernard *et al.*, *AIDS*, 12(16):2125-2139, 1998) o por linfocitos T aislados de un sujeto previamente inmunizado y vuelto a estimular durante 6 días con DC infectadas con un vector de adenovirus que contiene antígeno usando ensayos convencionales de microtoxicidad de liberación de <sup>51</sup>Cr durante 4 h. Un tipo de ensayo usa linfocitos T clonados. Se han ensayado linfocitos T clonados para determinar su capacidad de mediar tanto la perforina como la destrucción dependiente del ligando Fas en los ensayos de citotoxicidad redirigida (Simpson *et al.*, *Gastroenterology*, 115(4):849-855, 1998). Los linfocitos T citotóxicos clonados presentaron destrucción dependiente tanto de Fas como de perforina. Recientemente, se ha desarrollado el ensayo de liberación de la deshidrogenasa *in vitro* que aprovecha un nuevo sistema de amplificación fluorescente (Page, B., *et al.*, *Anticancer Res.*, julio-agosto de 1998; 18(4A):2313-6). Dicha metodología es sensible, rápida y reproducible, y se puede usar ventajosamente para la reacción mixta de los linfocitos (MLR). Puede automatizarse además fácilmente para ensayos de citotoxicidad a gran escala usando la integridad de la membrana celular y así se considera. En otro ensayo fluorométrico desarrollado para detectar la citotoxicidad mediada por una célula, el fluoróforo usado es la molécula no tóxica AlamarBlue (Nodari *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 213(2): 157-167, 1998). Se inactiva el AlamarBlue fluorescentemente (es decir, bajo rendimiento cuántico) hasta que se produce la reducción mitocondrial que, a continuación, produce un drástico aumento de la intensidad de la fluorescencia del AlamarBlue (es decir, un aumento en el rendimiento cuántico). Se ha informado que este ensayo es extremadamente sensible, específico y requiere un número significativamente menor de células efectoras que el ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr convencional.

Otras células inmunes que son inducidas por los presentes métodos incluyen linfocitos citolíticos naturales (NK). Los NK son células linfoides que carecen de receptores específicos del antígeno, y forman parte del sistema inmune innato. Por lo general, las células infectadas suelen ser destruidas por los linfocitos T alertados por partículas foráneas unidas al MHC de la superficie celular. Sin embargo, las células infectadas por virus señalizan la infección expresando proteínas víricas que son reconocidas por los anticuerpos. Estas células pueden ser destruidas por los

NK. En las células tumorales, si las células tumorales pierden la expresión de las moléculas MHC I, entonces, pueden ser susceptibles a los NK.

#### Formulaciones y vías de administración a pacientes

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

10 En general, se desea emplear sales y tampones adecuados para volver los vectores de administración estables y permitir la captación por células diana. También, se emplearán tampones cuando se introduzcan células recombinantes en un paciente. Las composiciones acuosas comprenden una cantidad eficaz del vector para las células, disuelta o dispersada en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones también se denominan inóculos. La expresión "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras reacciones no deseadas cuando se administran a un animal o a un ser humano. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los vectores o las células, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar principios activos suplementarios a las composiciones.

15 20 25 Las composiciones activas pueden incluir preparados farmacéuticos clásicos. La administración de estas composiciones será mediante cualquier vía común, siempre que el tejido diana esté disponible por dicha vía. Esto incluye la administración oral, nasal, bucal, rectal, vaginal o tópica. Como alternativa, la administración puede ser ortotópica, mediante inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa. Dichas composiciones normalmente se administrarían como composiciones farmacéuticamente aceptables, descritas en el presente documento.

30 35 40 45 Las formas farmacéuticas adecuadas para un uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil aplicación a través de una jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse por medio de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En ciertos ejemplos, se prefieren incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares y cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir mediante el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

50 55 Para la administración oral, se pueden incorporar a las composiciones excipientes y usarse en forma de enjuagues bucales y dentífricos no ingeribles. Se puede preparar un enjuague bucal incorporando el principio activo en la cantidad necesaria a un disolvente adecuado, tal como una solución de borato de sodio (Solución Dobell). Como alternativa, el principio activo puede incorporarse a un enjuague antiséptico que contenga borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio. El principio activo también puede dispersarse en dentífricos, incluyendo: geles, pastas, polvos y suspensiones. El principio activo puede añadirse en una cantidad terapéuticamente eficaz a una pasta dentífrica que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes, agentes espumantes y humectantes.

60 65 Las composiciones se pueden formular en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, hierro, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

Tras la formulación, se administrarán soluciones de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos y similares. Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente si es

necesario y el diluyente líquido volverse primero isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas concretas son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, se podría disolver una dosis en 1 ml de solución de NaCl isotónica y añadirse bien a 1.000 ml de fluido de hipodermocclisis o inyectarse en el sitio propuesto de la infusión, (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Se producirá necesariamente alguna variación en la dosis dependiendo de la afección del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para cada sujeto. Además, para la administración a seres humanos, los preparados deben cumplir las normas de esterilidad, de pirogenicidad, y de seguridad y pureza generales exigidas por la FDA Office of Biologics standards.

#### *Métodos de tratamiento de una enfermedad*

Los presentes métodos también engloban métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad producida por microorganismos patógenos y/o una enfermedad hiperproliferativa.

Las enfermedades que pueden tratarse o prevenirse incluyen enfermedades producidas por virus, bacterias, levaduras, parásitos, protozoos, células cancerosas y similares. La composición farmacéutica (DC transducidas, vectores de expresión, construcciones de expresión, etc.) pueden usarse como potenciadores inmunes generalizados (composición o sistema activador de las DC) y, como tales, tienen utilidad en el tratamiento de enfermedades. Las enfermedades ilustrativas que se pueden tratar y/o prevenir incluyen, pero sin limitación, infecciones de etiología vírica tales como VIH, gripe, herpes, hepatitis vírica, Epstein Bar, polio, encefalitis vírica, sarampión, varicela, virus del papiloma etc.; o infecciones de etiología bacteriana tales como neumonía, tuberculosis, sífilis, etc.; o infecciones de etiología parasitaria tales como malaria, tripanosomiasis, leishmaniosis, trichomoniasis, amebiasis, etc.

Los estados preneoplásicos o hiperplásicos que se pueden tratar o prevenir usando la composición farmacéutica DC transducidas, vectores de expresión, construcciones de expresión, etc.) incluyen, pero sin limitación, estados preneoplásicos o hiperplásicos tales como pólipos en el colon, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lesiones de mama y similares.

Los cánceres que se pueden tratar usando la composición farmacéutica incluyen, pero sin limitación, melanoma primario o metastásico, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células adenoescamosas, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de colon, mieloma múltiple, neuroblastoma, NPC, cáncer de vejiga, cáncer de cuello de útero y similares.

Otras enfermedades hiperproliferativas que se pueden tratar usando el sistema de activación de las DC presentado en el presente documento invención incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, osteoartritis, leiomiomas, adenomas, lipomas, hemangiomas, fibromas, oclusión vascular, reestenosis, aterosclerosis, lesiones preneoplásicas (tales como hiperplasia adenomatosa y neoplasia intraepitelial prostática), carcinoma *in situ*, leucoplaquia pilosa oral o soriasis.

En el método de tratamiento, la administración de la composición farmacéutica (construcción de expresión, vectores de expresión, proteínas fusionadas, células transducidas, DC activadas, DC transducidas y cargadas) puede ser para cualquier fin "profiláctico" o "terapéutico". Cuando se proporciona profilácticamente, la composición farmacéutica se proporciona antes de cualquier síntoma. La administración profiláctica de la composición farmacéutica sirve para prevenir o mejorar cualquier infección o enfermedad posterior. Cuando se proporciona terapéuticamente, la composición farmacéutica se proporciona en o después del inicio de un síntoma de la infección o enfermedad. Así pues, las composiciones presentadas en el presente documento se pueden proporcionar bien antes de la exposición anticipada a un agente causante de enfermedad o estado patológico o tras el inicio de la infección o enfermedad.

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

Una cantidad eficaz de la composición farmacéutica sería la cantidad que consigue este resultado seleccionado de potenciación de la respuesta inmune, y dicha cantidad podría determinarse como materia rutinaria por el experto en la materia. Por ejemplo, una cantidad eficaz para tratar una deficiencia en el sistema inmune podría ser la cantidad necesaria para producir la activación del sistema inmune, produciendo el desarrollo de una respuesta inmune específica de antígeno tras la exposición al antígeno. La expresión es también sinónimo de "cantidad suficiente".



organismo con una sola composición o formulación farmacéutica que incluye tanto la composición farmacéutica como uno o más de los agentes, o poniendo en contacto la célula con dos o más composiciones o formulaciones, de manera que una composición incluya la composición farmacéutica y la otra incluya uno o más agentes.

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

15 La administración de la composición farmacéutica puede preceder, ser concurrente con y/o seguir al/a los otro/s agente/s mediante intervalos que varían de minutos a semanas. En realizaciones en las que la composición farmacéutica y el/los otro/s agente/s se aplican por separado a una célula, a un tejido o a un organismo, en general, se garantizaría que no expire un período de tiempo significativo entre los momentos de cada administración, de forma que la composición farmacéutica y el/los agente/s siguieran pudiendo ejercer un efecto ventajosamente combinado en la célula, en el tejido o el organismo. Por ejemplo, en dichos casos, se contempla que se puede poner en contacto la célula, el tejido o el organismo con dos, tres, cuatro o más modalidades de manera esencialmente simultánea (es decir, en menos de aproximadamente un minuto) con la composición farmacéutica. En otros aspectos, se pueden administrar uno o más agentes de manera esencialmente simultánea o en de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 24 horas a aproximadamente 7 días a aproximadamente 1 a aproximadamente 8 semanas o más, y cualquier intervalo derivable de los mismos, antes de y/o después de la administración del vector de expresión. Además, se pueden emplear varias pautas de combinación de la composición farmacéutica y uno o más agentes.

### Ejemplos

Los ejemplos expuestos a continuación ilustran, pero no limitan la invención.

#### *Ejemplo 1: materiales y métodos*

A continuación, en el presente documento, se describen los materiales y métodos utilizados en los estudios descritos en los siguientes ejemplos.

#### *Líneas de células tumorales y péptidos*

Las líneas celulares NA-6-Mel, T2, SK-Mel-37 y LNCaP se adquirieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (Manassas, VA). Se usaron los péptidos restringidos a HLA-A2 MAGE-3 p271-279 (FLWGPRLV), matriz de influenza (IM) p58-66 (GILGFVFTL) y HIV-1 gag p77-85 (SLYNTVATL) para analizar las respuestas de los linfocitos T CD8+. En los experimentos de polarización de linfocitos T auxiliares, se usó el péptido toxoide tetánico TTP30 FNNFTVSFVLRVLPKVSASHLE. Todos los péptidos fueron sintetizados por Genemed Synthesis Inc (San Francisco, CA), con una pureza determinada mediante HPLC > 95 %.

#### *Adenovirus recombinante que codifica el CD40 inducible humano*

El dominio citoplasmático de CD40 humano fue la polimerasa de Pfu I (Stratagene, La Jolla, California), amplificado a partir de ADNc de DC derivadas de monocitos humanos usando un cebador 5' flanqueado por Xho I (CDC40X), (5hCD40X), 5'-atatactcgagaaaaggtggccaagaagccaacc-3' y un cebador 3' flanqueado por Sal I (3hCD40S), 5'-atatatgcgactcactgtctctctgcactgagatg-3'. El fragmento de PCR se subclonó en pSH1/M-FvFvls-E15 digerido con Sal I y se secuenció para crear pSH1/M-FvFvls-CD40-E. El CD40 inducible se subclonó posteriormente en un vector no replicante basado en Ad5/f35 con E1, E3 suprimido que expresaba el transgén bajo un promotor temprano/inmediato del citomegalovirus. La secuencia que codifica iCD40 se confirmó mediante digestión de restricción y secuenciación. La amplificación, purificación y titulación de todos los adenovirus se llevaron a cabo en las instalaciones Viral Vector Core Facility del Baylor College of Medicine.

#### *Transferencia Western*

Se prepararon extractos celulares totales con tampón RIPA que contenía un cóctel inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se cuantificaron usando un ensayo de concentración de proteínas compatible con detergentes (Bio-Rad, Hercules, CA). Se separaron de la manera habitual de 10 a 15 microgramos de proteína total en geles SDS-PAGE al 12 %, y se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Las transferencias se hibridaron con anticuerpos anti-CD40 de cabra (T-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y anti-alfa-tubulina de ratón (Santa Cruz Biotechnology), seguidos de anticuerpos anti-IgG-HRP de cabra de burro y anti-IgG-HRP de ratón de cabra (Santa Cruz Biotechnology), respectivamente. Las transferencias se desarrollaron usando el sistema de sustrato SuperSignal West Dura Stable (Pierce, Rockford, Illinois).

*Generación y estimulación de DC humanas*

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos por centrifugación de densidad de sangre heparinizada en Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Noruega). Se lavaron las PBMC con PBS, se volvieron a suspender en medio CellGenix DC (Freiburg, Alemania) y se dejaron adherir en placas de cultivo durante 2 h a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Se retiraron las células no adherentes mediante lavados extensivos, y se cultivaron los monocitos adherentes durante 5 días en presencia de 500 U/ml de hIL-4 y 800 U/ml de hGM-CSF (R & D Systems, Minneapolis, MN). Según lo evaluado mediante ensayos de morfología y FACS, las DC inmaduras resultantes (imDC) fueron MHC de clase I, II<sub>i</sub>, y expresaron CD40lo, CD80lo, CD83lo, CD86lo. Las imDC eran CD14neg y contenían < 3 % de linfocitos T CD3+, B CD19+ y NK CD16+ contaminantes.

Se cultivaron aproximadamente 2 x 10<sup>6</sup> células/ml en una placa de 24 pocillos y se transdujeron con adenovirus a 10.000 partículas víricas (vp)/célula (MOI de ~160) durante 90 minutos a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Inmediatamente después de la transducción, se estimularon las DC con MPL, FSL-1, Pam3CSK4 (InvivoGen, San Diego, CA), LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), AP20187 (donado amablemente por ARIAD Pharmaceuticals, Cambridge, MA) o cóctel de maduración (MC) que contenía 10 ng/ml de TNF-alfa, 10 ng/ml de IL-1 beta, 150 ng/ml de IL-6 (R & D Systems, Minneapolis, MN) y 1 microgramo/ml de PGE2 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI). En ensayos con linfocitos T, se pulsaron las DC con 50 microgramos/ml de péptido PSMA o MAGE 3 24 horas antes y después de la transducción adenovírica.

*Marcadores de superficie y producción de citocinas*

La tinción de la superficie celular se realizó con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo (BD Biosciences, San Diego, CA). Se analizaron las células en un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA). Se midieron las citocinas en sobrenadantes de cultivo usando kits de ensayo de inmunoabsorción enzimática para IL-6 humana e IL-12p70 humanas (BD Biosciences).

*Ensayo de Q-PCR en tiempo real para SOCS1 humano*

Se purificó el ARN total y se transcribió inversamente con hexámeros aleatorios usando Superscript II RTase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se cuantificaron los niveles de ARNm en las DC sometiendo ADNc a análisis de PCR TaqMan usando el sistema de detección de secuencias GeneAmp 5700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los reactivos de detección de secuencias preconformados (Applied Biosystems) específicos de SOCS1 y ARNr 18S humanos, incluyendo cebadores directos e inversos, así como una sonda de hibridación fluorogénica marcada con FAM de TaqMan, se suministraron como mezclas y se usaron a 1 microlitro/20 microlitros de PCR. Las muestras se procesaron en duplicados. Se normalizó el nivel de expresión de SOCS1 de cada muestra con respecto al nivel de ARNr 18S de la misma muestra usando el método 2-delta delta CT comparativo (Livak K. J., Schmittgen T. D. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method". *Methods*. 2001; 25:402-408).

*Ensayo de migración de DC*

Se midió la quimiotaxis de las DC por migración a través de un filtro de policarbonato con un tamaño de poro de 8 micrómetros en placas de Multiwell HTS Fluoroblok de 96 pocillos (BD Biosciences). Se cargaron en la cámara inferior el medio de ensayo (250 microlitros) que contenía 100 ng/ml de CCL19 (R & D Systems) o medio de ensayo solo (como control para la migración espontánea). Se marcaron las DC (50.000) con un rastreador de células Green-CMFDA (Invitrogen), no se estimularon o se estimularon durante 48 horas con los reactivos indicados, y se añadieron a la cámara superior en un volumen total de 50 microlitros durante 1 hora a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Se midió la fluorescencia de las células, que habían migrado a través de la membrana microporosa, usando el lector FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech Inc., Durham, NC). Se restó la fluorescencia media de las células migradas espontáneamente del número total de células migradas para cada condición.

*Ensayo ELISPOT de IFN-gamma*

Se pulsaron DC de voluntarios sanos positivos en HLA-A2 con péptido MAGE-3 A2.1 (restos 271-279; FLWGPRALV) el día 4 del cultivo, seguido de la transducción con Ad-iCD40 y la estimulación con diversos estímulos el día 5. Se purificaron los linfocitos T autólogos a partir de PBMC mediante selección negativa (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) y se mezclaron con DC a razón de DC:T de 1:3. Las células se incubaron en RPMI completo con 20 U/ml de hIL-2 (R & D Systems) y 25 microgramos/ml de péptido MAGE 3 A2.1. Se volvieron a estimular los linfocitos T el día 7 y se ensayaron el día 14 del cultivo.

*Cuantificación de ELISPOT*

Se recubrieron placas de nitrocelulosa de 96 pocillos de fondo plano (MultiScreen-HA, Millipore, Bedford, MA) con anticuerpo monoclonal IFN-gamma (2 µg/ml, 1-D1K, Mabtech, Estocolmo, Suecia) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Tras lavar con PBS que contenía TWEEN 20 al 0,05 %, se bloquearon las placas con RPMI completo durante

2 h a 37 °C. Se añadió un total de  $1 \times 10^5$  linfocitos T efectores CD8+ previamente sensibilizados a cada pocillo y se incubaron durante 20 h con 25 microgramos/ml de péptidos. Se lavaron las placas a fondo con PBS que contenía TWEEN 20 al 0,05 %, y se añadió anticuerpo monoclonal anti-IFN (0,2 µg/ml, 7-B6-1-biotina, Mabtech) a cada pocillo. Después de la incubación durante 2 horas a 37 °C, se lavaron las placas y se desarrollaron con estreptavidina-fosfatasa alcalina (1 µg/ml, Mabtech) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el lavado, se añadió sustrato (3-amino-9-etil-carbazol, Sigma-Aldrich) y se incubó durante 5 min. Las membranas de placas mostraron puntos de color rosa oscuro que fueron escaneados y analizados por ZellNet Consulting Inc. (Fort Lee, NJ).

#### 10 *Ensayo de liberación de cromo*

Se evaluó el reconocimiento del antígeno usando células diana marcadas con Cromo-51 (Amersham) durante 1 hora a 37 °C y se lavó tres veces. A continuación, se añadieron células diana marcadas (5000 células en 50 microlitros) a células efectoras (100 microlitros) en las proporciones indicadas de las células efectoras:diana en placas de micropocillos de fondo en V a las concentraciones indicadas. Se recogieron los sobrenadantes después de 6 h de incubación a 37 °C y se midió la liberación de cromo usando un contador MicroBeta Trilux (Perkin-Elmer Inc, Torrance CA). Los ensayos que implican células LNCaP se realizaron durante 18 horas. El porcentaje de lisis específica se calculó como:  $100 \times [(liberación\ experimental - espontánea)/(liberación\ espontánea\ máxima)]$ .

#### 20 *Tinción de tetrámeros*

Se obtuvieron los tetrámeros HLA-A2 ensamblados con MAGE-3.A2 (FLWGPRLV) en el Baylor College of Medicine Tetramer Core Facility (Houston, TX). Se tiñeron linfocitos T CD8+ sensibilizados previamente en 50 µl de PBS que contenía FCS al 0,5 % con tetrámero marcado con PE durante 15 minutos en hielo antes de la adición de anticuerpo monoclonal FITC-CD8 (BD Biosciences). Después del lavado, se analizaron los resultados por citometría de flujo.

#### *Polarización de linfocitos T auxiliares sin tratamiento previo*

30 Se aislaron linfocitos T CD4+CD45RA+ sin tratamiento previo de donantes positivos en HLA-DR11.5 (genotipados usando el kit de tipificación FASTYPE HLA-DNA SSP, Biosynthesis, Lewisville, TX) mediante selección negativa usando el kit de aislamiento de linfocitos T CD4+ sin tratamiento previo (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Se estimularon los linfocitos T con DC autólogas pulsadas con toxoide tetánico (5 UF/ml) y se estimularon con diversos estímulos en una proporción de estimulante con respecto al respondedor de 1:10. Tras 7 días, se volvieron a estimular los linfocitos T con DC autólogas pulsadas con el péptido auxiliar restringido a HLA-DR11.5 TTP30 y se transdujeron con el adenovector Ad-iCD40. Se tiñeron las células con anticuerpo PE-anti-CD4 (BD Biosciences), se fijaron y se permeabilizaron usando el kit BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences), luego se tiñeron con anticuerpo monoclonal hIFN-gamma (eBioscience, San Diego, CA) y se analizaron por citometría de flujo. Los sobrenadantes se analizaron usando un conjunto de flexión de matrices de perlas citométricas de BD para TH1/TH2 humanos en el bioanalizador FACSArray de BD (BD Biosciences).

#### *Purificación de proteínas PSMA*

45 El vector de transferencia de baculovirus, pAcGP67A (BD Biosciences) que contenía el cDNA de la parte extracelular de PSMA (restos 44-750) fue amablemente proporcionado por el Dr. Pamela J. Bjorkman (Howard Hughes Medical Institute, California Institute of Technology, Pasadena, CA). Se fusionó el PSMA con una señal de secreción hidrófoba, un sitio de escisión del Factor Xa y un marcador de afinidad 6x-His N-terminal. El baculovirus de alto título fue producido por las instalaciones Baculovirus/Monoclonal antibody core facility of Baylor College of Medicine. Se produjo la proteína PSMA en células High 5 infectadas con virus recombinante, y se purificó la proteína a partir de sobrenadantes celulares usando columnas de afinidad Ni-NTA (Qiagen, Chatsworth, CA) como se ha descrito anteriormente (Cisco R. M., Abdel-Wahab Z., Dannull J. *et al.* "Induction of human dendritic cell maturation using transfection with RNA encoding a dominant positive toll-like receptor 4". *J Immunol.* 2004;172:7162-7168). Después de la purificación, se detectó la banda solitaria de ~100 kDa de proteína PSMA mediante tinción con plata de geles de acrilamida.

#### 55 *Migración de DC humanas en ratón hospedador*

60 Para evaluar la migración de las DC humanas *in vivo*, se desarrolló el adenovector Ad5-CBR, que expresa la luciferasa desplazada al rojo (pico de emisión = 613 nm) de escarabajos click de *Pyrophorus plagiophalamus* (Promega, Madison, WI). Se transdujeron las DC humanas con una MOI de ~50 de Ad5-CBR, y una MOI de 160 de Ad5f35-iCD40. A continuación, se maduraron las DC con MC o 1 microgramo/ml de LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Las DC derivadas de médula ósea de ratón se obtuvieron como se ha descrito anteriormente y se maduraron con 1 microgramo/ml de LPS. Se inyectaron aproximadamente  $2 \times 10^6$  DC en las patas traseras izquierda y derecha de ratones Balb/c irradiados (250 Rad) (ambas patas traseras de tres ratones por grupo, n = 6). Se inyectó a los ratones i.p. D-Luciferina (~ 1 mg/25 g de animal) y se formaron imágenes durante varios días usando un sistema de formación de imágenes IVIS™ 100 (Xenogen Corp., Alameda, CA). Se midió la señal luminiscente en 3 ratones por

grupo, y se extirparon los ganglios linfáticos poplíteos e inguinales (LN) el día 2 después de la inoculación de las DC. Se midió la señal de los LN y se restó el fondo para cada grupo (n = 6).

#### Análisis de datos

5 Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error típico. El tamaño de la muestra se determinó con una potencia de 0,8, con un nivel alfa unilateral de 0,05. Las diferencias entre los grupos experimentales se determinaron mediante la prueba t de Student.

#### 10 Ejemplo 2: Expresión de iCD40 e inducción de la maduración de DC

Para investigar si la señalización de iCD40 puede potenciar las funciones inmunogénicas de las DC humanas, se generó el adenovirus Ad5/f35-ihCD40 (simplificado a Ad-iCD40), que expresa el receptor de CD40 humano inducible, basado en el vector iCD40 de ratón 13 previamente descrito (Figura 1). Los expertos en la materia  
15 reconocerán que se trata de un ejemplo de un ensayo que puede usarse para examinar la maduración de las DC después de la transducción de una proteína iCD40 quimérica, tal como, por ejemplo, iCD40-MyD88 u otros ejemplos quiméricos del presente documento. Se clonó el dominio de señalización citoplasmático de CD40 humano cadena abajo de un dominio dirigido a la miristoilación y dos dominios en tándem (de FKBP12 humano (V36), designados "Fv"), que unen el fármaco dimerizante AP20187 (Clackson T., Yang W., Rozamus L. W., et al. "Redesigning an FKBP- ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 1998; 95:10437-10442). Las DC inmaduras expresaron CD40 endógeno, que fue inducido por LPS y CD40L. La transducción de Ad-iCD40 condujo a la expresión del iCD40 de tamaño distintivo, que no interfirió con la expresión endógena de CD40. Curiosamente, la expresión de iCD40 también fue significativamente potenciada por la estimulación de LPS, probablemente debido a la inducibilidad de los factores de transcripción omnipresentes que se  
20 unieron al promotor de CMV "constitutivo".

Una de las cuestiones para el diseño de vacunas basadas en DC es obtener DC completamente maduras y activadas, ya que el estado de maduración está ligado a la transición de un estado inmunogénico tolerogénico a activante (Steinman R. M., et al., *Annu Rev Immunol.* 2003; 21:685-711; Hanks B. A., et al., *Nat Med.* 2005; 11:130-137; Banchereau J., Steinman R. M. "Dendritic cells and the control of immunity". *Nature.* 1998; 392: 245-252). Se ha demostrado que la expresión de la variante de ratón Ad-iCD40 puede inducir la maduración de DC derivadas de la médula ósea murina (Hanks B. A., et al., *Nat Med.* 2005; 11:130-137). Para determinar si el iCD40 humanizado afecta a la expresión de los marcadores de maduración en las DC, se transdujeron las DC con Ad-iCD40 y se evaluó la expresión de los marcadores de maduración CD40, CD80, CD83 y CD86. La señalización de TLR-4 mediada por LPS o su MPL derivado es un potente inductor de la maduración de DC (Ismaili J., et al., *J Immunol.* 2002; 168:926-932; Cisco R. M., et al., *J Immunol.* 2004; 172:7162-7168; De Becker G., Moulin V., Pajak B., et al. "The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigen-presenting cells". *Int Immunol.* 2000;12:807-815; Granucci F., Ferrero E., Foti M., Aggujaro D., Vettoretto K., Ricciardi-Castagnoli P. "Early events in dendritic cell maturation induced by LPS". *Microbes Infect.* 1999; 1:1079-1084). También se informó previamente que la señalización de CD40 endógena regula específicamente positivamente la expresión de CD83 en DC humanas (Megjovanni A. M., Sanchez F., Gluckman J. C., Rosenzweig M. "Double-stranded RNA stimulation or CD40 ligation of monocyte-derived dendritic cells as models to study their activation and maturation process". *Eur Cytokine Netw.* 2004; 15: 126-134). En consonancia con estos informes anteriores, los niveles de expresión de CD83 se regularon positivamente tras la transducción de Ad-iCD40, y la expresión de CD83 se reguló positivamente posteriormente tras la adición de LPS o MPL.  
45

#### Ejemplo 3 Ensayo de sinergia de la señalización de iCD40 y de la ligadura de la proteína adaptadora a PRR inducible

50 Los expertos habituales en la materia son capaces de modificar los ensayos presentados en el presente ejemplo para observar la sinergia entre la señalización de iCD40 y la ligación de la proteína adaptadora de PRR inducible. La interleucina-12 (IL-12) activa las respuestas de los linfocitos T y NK, e induce la producción de IFN-gamma.

La interleucina 12 (IL-12) activa las respuestas de los linfocitos T y NK, e induce la producción de IFN-gamma. También favorece la diferenciación de los linfocitos TH1 y es un eslabón vital entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Banchereau J., et al., *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 987:180-187; Puccetti P., Belladonna M. L., Grohmann U. "Effects of IL-12 and IL-23 on antigen-presenting cells at the interface between innate and adaptive immunity". *Crit Rev Immunol.* 2002; 22:373-390). Por lo tanto, la inducción del heterodímero IL-12p70 biológicamente activo es probablemente fundamental para las vacunas óptimas basadas en DC. No obstante, los actuales protocolos de vacunación de DC que incluyen PGE2 producen solo IL-12 limitada (Lee A. W., Truong T., Bickham K., et al. "A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy". *Vaccine*, 2002; 20 Supl 4:A8-A22). IL-12 es una citocina heterodimérica que consiste en cadenas de p40 y p35. Anteriormente, se informó que la señalización de CD40 inducible potenciaba la expresión de la subunidad p35 de IL-12p70 en DC derivadas de médula ósea de ratón (Hanks B. A., et al., *Nat Med.* 2005; 11:130-137). También se informó que la ligación de TLR-4 puede potenciar la expresión de p40 (Liu J., Cao S., Herman L. M., Ma X. "Differential regulation of interleukin (IL)-12 p35 and p40 gene  
65

expression and interferon (IFN)-gamma-primed IL-12 production by IFN regulatory factor 1". *J Exp Med.* 2003; 198:1265-1276). Por lo tanto, se cultivaron iCD40-DC en presencia de LPS o MPL, y se ensayaron los sobrenadantes mediante ELISA para determinar la producción de IL-12p70.

5 Predicablemente, de manera similar a las DC tratadas con MC convencional, los iCD40-DC no produjeron heterodímero IL-12p70 detectable. Si PGE2 fue retenido de la MC, las DC produjeron niveles detectables, pero bajos de IL-12p70, en consonancia con un papel potencialmente perjudicial para PGE2. Además, las DC cultivadas durante 12 h en presencia de LPS o MPL por sí solas tampoco produjeron IL-12 (<30 pg/ml). Sin embargo, cuando las DC transducidas con Ad-iCD40 se cultivaron en presencia de MPL o LPS, produjeron niveles muy altos de IL-12p70 (16,4 ± 7,8 ng/ml para MPL). Este nivel de IL-12 fue aproximadamente 25 veces superior a los niveles inducidos por MC convencional carente de PGE2. Curiosamente, este sinergismo de iCD40 y TLR4 fue parcialmente independiente de la adición de AP20187, lo que implica que la señalización de iCD40 basal también puede sinergizarse con la ligadura de TLR4. La producción de IL-12p70 en iCD40-DC también fue dependiente de la dosis a medida que los niveles de IL-12 se correlacionaron con la dosis de las partículas víricas.

15 Dado que la señalización de CD40 normalmente se restringe estrechamente a un período de tiempo relativamente corto (Contin C., Pitard V., Itai T., Nagata S., Moreau J. F., Dechanet-Merville J. "Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling" *J Biol Chem.* 2003; 278:32801-32809; Tone M., Tone Y., Fairchild P. J., Wykes M., Waldmann H. "Regulation of CD40 function by its isoforms generated through alternative splicing". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2001;98: 1751-1756), limitando potencialmente la inmunidad adaptativa, se determinó si iCD40 podría inducir no solo una expresión mejorada, sino también prolongada, de IL-12p70 en DC estimuladas con TLR-4. Para evaluar la cinética de la expresión de IL-12 expresión, se compararon iCD40-DC tratados con LPS y DC estimuladas con CD40L. Se observó que los iCD40-DC fueron capaces de producir IL-12p70 durante más de 72 horas después de la estimulación en comparación con CD40L o DC transducidas con vector de control en las que la expresión de IL-12p70 cesó al eliminarse la estimulación de LPS. Estos resultados indican que la señalización de CD40 inducible permite a las DC producir niveles mayores de IL-12p70 de manera continua en respuesta a la estimulación con TLR-4.

30 Finalmente, se evaluó la inducción del supresor de la señalización de citocinas (SOCS1). El SOCS1 es un inhibidor de retroalimentación negativa de la activación de DC que puede atenuar (Wesemann D. R., Dong Y., O'Keefe G. M., Nguyen V. T., Benveniste E. N. "Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits cytokine induction of CD40 expression in macrophages". *J Immunol.* 2002; 169:2354-2360) la respuesta a la estimulación de LPS y citocinas (Evel-Kabler K., Song X. T., Aldrich M., Huang X. F., Chen S. Y. "SOCS1 restricts dendritic cells' ability to break self tolerance and induce antitumor immunity by regulating IL-12 production and signaling". *J Clin Invest.* 2006; 116:90-100). La estimulación de LPS reguló positivamente la expresión de SOCS1 en las DC, como se había informado anteriormente (Wesemann D. R., *et al.*, *J Immunol.* 2002; 169:2354-2360). Sorprendentemente, sin embargo, en presencia de LPS, los iCD40-DC expresaron niveles de SOCS1 3 veces más bajos que las DC estimuladas con CD40L. Además, iCD40 no indujo SOCS1 por sí mismo, a diferencia de CD40L. Estos datos indican que iCD40 puede sortear parcialmente la inducción de SOCS1 en las DC humanas y puede explicar parcialmente la elevación sostenida observada de los niveles de IL-12 y los marcadores de maduración de DC.

45 Además de IL-12, IL-6 desempeña un papel importante en la supervivencia celular y en la resistencia a los linfocitos T reguladores (Rescigno M., *et al.*, *J Exp Med.* 1998; 188:2175-2180; Pasare C., Medzhitov R. "Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells". *Science.* 2003; 299:1033-1036). Se observó que, tras la transfección con Ad-iCD40, la expresión de IL-6 se mejoró significativamente y se reguló positivamente de forma adicional cuando se estimularon los iCD40-DC con el fármaco dimerizante y los ligandos de TLR-4. Por lo tanto, la señalización iCD40 es suficiente para la producción de algunas citocinas proinflamatorias, pero requiere la señalización de TLR adicional para la producción de la citocina TH1 clave, IL-12.

#### 50 *Ejemplo 4: Polimerización de TH1 específica del antígeno*

En el presente documento, se presentan ensayos de polarización de TH1 específicos del antígeno. Los expertos en la materia son capaces de modificar los ejemplos presentados con el fin de ensayar la polarización en el contexto de PRR inducible y proteínas adaptadoras de PRR inducible.

55 Para investigar más a fondo si los iCD40-DC madurados con ligandos de TLR-4 pueden cebar eficazmente linfocitos T auxiliares CD4+ (TH), se determinó si pueden aumentar las respuestas de los linfocitos T específicas del epítipo CD4+ *in vitro*. Se estimularon linfocitos T CD4+CD45RA+ sin tratamiento previo durante 7 días en presencia de DC autólogas Ad-iCD40 pulsadas con el antígeno modelo, el toxoide tetánico. Al séptimo día, se estimularon los linfocitos T con el epítipo del toxoide tetánico restringido al MHC de clase II, TTp30. La producción de IFN-gamma se aumentó significativamente en los linfocitos T CD4+ cultivados junto con iCD40-DC y iCD40-DC estimulados con MPL o MC. La producción de IFN-gamma fue específica de iCD40, ya que no fue inducida por DC transducidas con el virus de control Ad-GFP ni por la estimulación MPL o MC sola. Además, la polarización de los linfocitos T se analizó mediante la evaluación de los niveles de citocinas TH1/TH2 en los sobrenadantes de los linfocitos T usando una matriz de perlas citométricas. Los niveles de citocinas secretadas por IFN-gamma, TNF-alfa, IL-4 e IL-5 se aumentaron en los linfocitos T auxiliares estimulados por iCD40-DC, indicando la expansión de los linfocitos T TH1 y

TH2 polarizados. Sin embargo, los niveles de citocinas TH1 fueron significativamente mayores que las citocinas asociadas a TH2, lo que indica una expansión predominante de los linfocitos TH1. Por el contrario, la inducción de los linfocitos T auxiliares CD4+ específicos de TT de células CD4+CD45RA+ sin tratamiento previo, usando DC maduras con MC, condujo a solo un modesto sesgo en la diferenciación de TH1 específica del epítipo TT. Estos resultados sugieren que la señalización de iCD40 en las DC les permite inducir eficazmente la diferenciación de TH1 específica del antígeno, posiblemente debido a una mayor producción de IL-12.

*Ejemplo 5: Ensayo de respuesta de CTL específico del antígeno tumoral*

En el presente documento, se presentan ensayos de polarización de TH1 específicos del antígeno. Los expertos en la materia son capaces de modificar los ejemplos presentados con el fin de ensayar la polarización en el contexto de PRR inducible y proteínas adaptadoras de PRR inducible.

Se determinó si iCD40 y MPL podrían mejorar las respuestas de los linfocitos T citotóxicos (CTL) a un auto-antígeno MAGE-3 de melanoma poco inmunogénico. Se pulsaron iCD40-DC de donantes positivos en HLA-A2- con péptido inmunodominante derivado de MAGE3 de restringido a HLA-A2.1 de clase I, FLWGPRALV, y se cultivaron junto con linfocitos T autólogos. Tras una serie de estimulaciones, se evaluó la frecuencia de los linfocitos T específicos del antígeno mediante el ensayo ELISPOT específico de IFN-gamma. Los iCD40-DC estimulados con MPL condujeron a un aumento del 50 % de los linfocitos T específicos de MAGE-3 en relación con las iCD40-DC estimuladas con MC y aproximadamente un aumento de cinco veces en los linfocitos T específicos del antígeno en comparación con DC de control no transducidas (WT).

También se determinó si iCD40-DC eran capaces de potenciar la muerte mediada por los CTL de células tumorales de una manera específica del antígeno. Se transfectaron DC inmaduras de voluntarios positivos en HLA-A2 con Ad-iCD40, se pulsaron con proteína MAGE-3, y se usaron como estimulantes para generar CTL *in vitro*. Se utilizaron células SK-MEL-37 (HLA-A2+, MAGE-3+) y linfocitos T2 pulsados con péptido MAGE-3 A2.1 (HLA-A2+, MAGE-3+) como dianas. Las células NA-6-MEL (HLA A2-, MAGE-3+) y los linfocitos T2 (HLA-A2+) pulsados con un péptido de matriz de la gripe restringido a A2.1 irrelevante sirvieron como controles negativos. Los CTL inducidos por iCD40-DC fueron capaces de reconocer y lisar eficientemente sus dianas afines (SK-MEL-37), y también los linfocitos T2 pulsados con péptido MAGE-3 A2.1, lo que indica la presencia de CTL específicos de MAGE-3. Por el contrario, las dianas de control se lisaron a niveles significativamente más bajos. Se observó sistemáticamente una actividad lítica mejorada cuando se usaron iCD40-DC tratados con MPL o MC como estimulantes en comparación con las DC no transducidas tratadas con MPL o MC solas. Además, se observó una expansión significativa de los CTL CD8+ positivos para tetrámeros específicos de MAGE-3/HLA-A2 por iCD40-DC que fueron tratados con MPL.

De forma similar, para comprobar si las DC estimuladas con LPS y con iCD40 podrían mejorar la actividad lítica de CTL, se examinó su capacidad para romper la tolerancia al antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). Se pulsaron las DC generadas a partir de voluntarios HLA-A2+ sanos con proteína PSMA (Davis M. I., Bennett M. J., Thomas L. M., Bjorkman P. J. "Crystal structure of prostate-specific membrane antigen, a tumor marker and peptidase", *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2005; 102:5981-5986) o MAGE-3, se transdujeron con Ad-iCD40 o Ad-Luc, y se cultivaron junto con linfocitos T autólogos. Tras tres rondas de estimulación, se midió la actividad de los CTL específica del antígeno mediante el ensayo de liberación de cromo usando células LNCaP (HLA-A2+PSMA+) como dianas y SK-Mel-37 (HLA-A2+PSMA-) como células de control para DC pulsadas con PSMA. Se usaron células SK-Mel-37 (MAGE-3+) como dianas cuando se pulsaron células DC del mismo donante con MAGE-3, y se usaron células LNCaP (MAGE-3-) como controles negativos. En conjunto, estos datos indican que las DC transducidas con iCD40 son capaces de inducir respuestas de CTL específicas del antígeno significativamente más potentes *in vitro* que las DC tratadas con MC. Los expertos habituales en la materia pueden modificar este ensayo para examinar las respuestas de los CTL específicas del antígeno tumoral usando proteínas adaptadoras de PRR inducibles con iCD40 quimérico.

*Ejemplo 6: CD40 inducible mejora la expresión de CCR7 y las capacidades migratorias de las DC sin PGE2*

En el presente documento, se presentan ensayos de polarización de TH1 específicos del antígeno. Los expertos en la materia son capaces de modificar los ejemplos presentados con el fin de ensayar la polarización en el contexto de PRR inducible y proteínas adaptadoras de PRR inducible.

Además de otros marcadores de maduración, el CCR7 es regulado positivamente en las DC durante la maduración y es responsable de dirigir su migración a los ganglios linfáticos drenantes (Cyster J. G. "Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs". *Science.* 1999;286:2098- 2102). Recientemente, varios informes han indicado que, aparte de la quimiotaxis, el CCR7 también afecta a la "citoarquitectura", tasa de endocitosis, supervivencia, velocidad migratoria y maduración de las DC (Sanchez-Sanchez N., Riol-Blanco L., Rodriguez-Fernandez J. L. "The Multiple Personalities of the Chemokine Receptor CCR7 in Dendritic Cells". *J Immunol.* 2006; 176:5153- 5159). Junto con las moléculas coestimulantes y las citocinas TH1, el iCD40 regula positivamente de forma específica la expresión de CCR7 en las DC humanas. Además, la expresión de CCR7 se correlacionó con el aumento a escala de la dosis vírica de Ad-iCD40.

Debido a que los niveles de expresión de CCR7 se correlacionan con una mayor migración hacia MIP-3 beta (CCL19), se determinó si los iCD40-DC humanos podrían migrar *in vitro* hacia MIP-3 beta en ensayos Transwell. Los iCD40-DC tratados con el dimerizante AP20187 tienen niveles de migración comparables a los inducidos por MC. Además, la migración de iCD40-DC se aumentó adicionalmente mediante la estimulación de MPL o MC, incluso cuando no estaba presente PGE2. Estos datos fueron altamente reproducibles e indican que iCD40 es suficiente para inducir la expresión de CCR7 y la migración de DC *in vitro* en contraste con la creencia generalizada de que PGE2 es esencial para la emigración de forma selectiva a los ganglios linfáticos de las DC humanas.

Las quimiocinas y los receptores de quimiocinas comparten un alto grado de identidad de secuencia dentro de una especie y entre especies (De Vries I. J., Krooshoop D. J., Scharenborg N. M., *et al.* "Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state". *Cancer Res.* 2003; 63:12-17). Basándose en este conocimiento, se desarrolló un nuevo modelo de xenoinjerto para controlar la migración de las DC humanas *in vivo*. Las DC humanas se transdujeron con iCD40 y se maduraron con LPS o MC, y las DC de ratón se maduraron con LPS. Dado que las DC se transdujeron junto con Ad5-CBR, la bioluminiscencia fue inmediatamente visible. Como era de esperar, las DC inmaduras no emigraron a los ganglios linfáticos poplíteos drenantes. Sin embargo, los iCD40-DC madurados con LPS o MC fueron detectables en los ganglios linfáticos poplíteos xenogénicos en los 2 días después de la inoculación. La migración de iCD40-DC estimulados con LPS fue significativamente superior ( $p = 0,036$ ) que las DC no estimuladas y fue comparable a la migración de las DC de ratón. Por otra parte, al segundo día, se detectaron los iCD40-DC en los LN inguinales, mientras que las DC estimuladas con MC no fueron detectables, lo que sugiere mayores capacidades migratorias de iCD40-DC que la estimulación con MC. En conjunto, estos resultados indican que la señalización de iCD40 en las DC desempeña un papel fundamental en el control de la expresión de CCR7 y es suficiente para la migración de las DC a los ganglios linfáticos. La migración de iCD40-DC se mejora aún más cuando las células se estimulan con LPS, correlacionando con la expresión de CCR7 mejorada. Los expertos en la materia pueden modificar este ensayo para ensayar las proteínas adaptadoras de PRR inducibles con iCD40 quimérico.

#### *Ejemplo 7: Resumen de observaciones de los ensayos presentados del Ejemplo 2 al Ejemplo 6 con iCD40 y PRR*

La eficacia de las células dendríticas depende de muchas variables, especialmente del estado de maduración y de la migración eficiente a los ganglios linfáticos. Varios ensayos clínicos en pacientes con cáncer mostraron la potencia de las DC para inducir inmunidad adaptativa a los antígenos específicos del tumor (Nestle F. O., Banchereau J., Hart D. "Dendritic cells: On the move from bench to bedside". *Nat Med.* 2001; 7:761-765; Schuler G., Schuler-Thurner B., Steinman R. M. "The use of dendritic cells in cancer immunotherapy". *Curr Opin Immunol.* 2003; 15:138-147; Cranmer L. D. Trevor K. T., Hersh E. M. "Clinical applications of dendritic cell vaccination in the treatment of cancer". *Cancer Immunol Immunother.* 2004; 53:275-306). Sin embargo, las respuestas clínicas fueron transitorias, y merecen una mejora adicional en el diseño de la vacuna de DC (Ridgway D. "The first 1000 dendritic cell vaccines". *Cancer Invest.* 2003;21:873-886; Dallal R. M., Lotze M. T. "The dendritic cell and human cancer vaccines". *Curr Opin Immunol.* 2000; 12:583-588). La limitación de las vacunas actuales basadas en DC son el estado de activación transitoria dentro de los tejidos linfoides, la baja inducción de la inmunidad de los linfocitos T CD4+ y la disminución de la capacidad de migración a los ganglios linfáticos drenantes. (Adema G. J., de Vries I. J., Punt C. J., Figdor C. G. "Migration of dendritic cell based cancer vaccines: *in vivo* veritas?" *Curr Opin Immunol.* 2005; 17:170-174). Menos de 24 horas después de la exposición a LPS, las DC terminan la síntesis de la citocina polarizante de TH1, IL-12 y se vuelven refractarias a estímulos adicionales (Langenkamp A., Messi M., Lanzavecchia A., Sallusto F. "Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells". *Nat Immunol.* 2000; 1:311-316), limitando su capacidad para activar los linfocitos T auxiliares y los CTL. Otros estudios indican que menos del 5 % de las DC maduras administradas por vía intradérmica alcanzan los ganglios linfáticos, mostrando una emigración específica a los ganglios linfáticos poco eficaz. Estos hallazgos subrayan la necesidad de prolongar el estado de activación y las capacidades migratorias de las DC y/o coordinar temporalmente la "ventana" de activación de DC con el acoplamiento de los linfocitos T afines dentro de los ganglios linfáticos.

Se desarrolló un método de potenciación de la función de las DC de ratón *in vivo* mediante la manipulación de un receptor de CD40 inducible quimérico (Hanks B. A., *et al.*, *Nat Med.* 2005; 11:130-137). Se ha observado que el enfoque de CD40 inducible es también eficaz para potenciar la función inmunoestimulante de las DC humanas. De acuerdo con los informes anteriores de la actividad sinérgica de la combinación de la señalización de TLR y CD40 para la secreción de IL-12p70, la señalización de iCD40 más TLR4 indujo la secreción de IL-12 de alto nivel, la maduración de las DC, las funciones estimulantes de los linfocitos T y las extensas capacidades migratorias (Lapointe R., *et al.*, *Eur J Immunol.* 2000;30: 3291-3298; Napolitani G., Rinaldi A., Bertoni F., Sallusto F., Lanzavecchia A. "Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells". *Nat Immunol.* 2005;6:769-776).

También se demostró que una secreción aumentada y prolongada de IL-12p70 en las DC podría romper la autotolerancia, lo que es probablemente atribuible en parte a la producción de SOCS1, que inhibe la señalización de IL-12 (Evel-Kabler K., *et al.*, *J Clin Invest.* 2006; 116:90-100). Se ha determinado que, aunque la señalización CD40 endógena estimulada por CD40L soluble conduce a una regulación positiva de SOCS1, iCD40 activa las DC sin inducción significativa de SOCS1. Además, la señalización de iCD40 desencadena una expresión alta y prolongada de IL-12p70 en las DC, que presentan una potencia aumentada en la estimulación de linfocitos T CD4+ y los CTL.

La IL-6 está implicada en la supervivencia de muchos tipos de células diferentes mediante la activación de vías antiapoptóticas, tales como MAPK, ERK1, 247 y PI3 quinasa (Bisping G., Kropff M., Wenning D. *et al.* "Targeting receptor kinases by a novel indolinone derivative in multiple myeloma: abrogation of stroma-derived interleukin-6 secretion and induction of apoptosis in cytogenetically defined subgroups". *Blood*. 2006; 107:2079-2089). También se identificó la inducción de la expresión de IL-6 mediante la señalización de iCD40 y TLR-4 en las DC. Este hallazgo podría explicar en parte la prolongada supervivencia de las DC descrita anteriormente (Hanks B. A., *et al.*, *Nat Med*. 2005; 11:130-137). Además, la expresión de IL-6 es fundamental en la capacidad de las DC para inhibir la generación de linfocitos reguladores T CD4+ CD25+ (Pasare C. y Medzhitov R., *Science*. 2003; 299:1033-1036). En este contexto, una vacuna basada en iCD40-DC podría potencialmente suprimir los reguladores negativos *in vivo*, inhibiendo la tolerancia periférica a los antígenos dirigidos.

Uno de los principales objetivos de la inmunoterapia del cáncer ha sido el diseño de vacunas para potenciar potentes respuestas de los CTL específicas del antígeno tumoral en pacientes con (Rosenberg S. A., *Immunity*. 1999; 10:281-287). Sin embargo, la evidencia acumulada sugiere que los linfocitos T CD4+ también desempeñan un papel fundamental en la inmunidad antitumoral, ya que contribuyen a la inducción, persistencia y expansión de los linfocitos T CD8+ (Kalams S. A., Walker B. D.. "The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses". *J Exp Med*. 1998; 188:2199-2204). El presente estudio demostró que los iCD40-DC podrían cebar eficazmente los linfocitos T sin tratamiento previo y expandir eficazmente las células específicas del antígeno que representan ambos grupos de la respuesta inmune (es decir, CTL específicos de MAGE-3 y PSMA, y linfocitos T CD4+ específicos de TT). Se demostró que las citocinas TH1 (IFN-gamma y TNF-alfa) se produjeron predominantemente en el medio de linfocitos T CD4+ estimulados con iCD40-DC, indicando la expansión de los linfocitos TH1. Como era de esperar, estas citocinas no se detectaron cuando los linfocitos T se estimularon con DC tratadas con MC, porque PGE2 (un componente clave de MC) es un poderoso supresor de las respuestas de TH1 (Kalinski P., Hilkens C. M., Srijders A., Srijdewint F. G., Kapsenberg M. L. "Dendritic cells, obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE2, promote Th2 responses". *Adv Exp Med Biol*. 1997;417:363-367; McIlroy A. Caron G, Blanchard S, *et al.* Histamine and prostaglandin E up-regulate the production of Th2-attracting chemokines (CCL17 and CCL22) y disminuyen la producción de CXCL10 inducida por IFN-gamma por células dendríticas humanas inmaduras. *Inmunología*. 2006; 1 17: 507 - 516; Meyer F, Ramanujam KS, Gobert AP, James SP, Wilson KT. Línea de corte: la activación de la ciclooxigenasa-2 suprime la polarización Th1 en respuesta a *Helicobacter pylori*. *J Immunol*. 2003; 171: 3913 - 3917).

Recientes estudios con ratones han demostrado que la migración de DC se correlaciona directamente con la proliferación de los linfocitos T (Martín-Fontecha A., Sebastiani S., Hopken U. E., *et al.* "Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming". *J Exp Med*. 2003; 198:615-621). Por lo tanto, el aumento de la migración debería aumentar la eficacia de las vacunas basadas en DC<sup>45</sup>. Los protocolos actuales de la vacuna de DC incluyen acondicionar previamente el sitio de inyección de la vacuna con citocinas inflamatorias o la estimulación *ex vivo* de DC con ligandos TLR y citocinas proinflamatorias, que consisten principalmente en constituyentes MC (Martín-Fontecha A., *et al.*, *J Exp Med*. 2003; 198: 615-621; Prins R. M., Craft N, Bruhn K. W., *et al.* "The TLR-7 agonist, imiquimod, enhances dendritic cell survival and promotes tumor antigen-specific T cell priming: relation to central nervous system antitumor immunity". *J. Immunol*. 2006; 176: 157-164). A pesar de sus numerosas funciones inmunosupresoras<sup>8-12</sup>, la PGE2 se ha usado en los últimos años como un componente indispensable del cóctel de maduración de DC, porque estimula la capacidad migratoria de las DC mediante la regulación positiva de CCR7 y la sensibilización a sus ligandos. Los enfoques alternativos que potencian la migración de las DC sin PGE2, deberían ser beneficiosos para la mejora de las vacunas basadas en DC.

Los resultados de estos estudios muestran que la señalización de iCD40 no solo regula positivamente la expresión de CCR7 en DC, sino que también estimula su quimiotaxis hacia CCL19 *in vitro*. Además, las DC inmaduras transducidas con iCD40 fueron capaces de migrar tan eficientemente como las DC estimuladas por MC tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, la migración de iCD40-DC se indujo más cuando las células fueron estimuladas con ligandos TLR-4. Recientemente, se ha demostrado que la estimulación de CCR7 aumenta la tasa migratoria de las DC, lo que indica que este receptor puede regular la locomoción y la motilidad de las DC (Riol-Blanco L., Sanchez-Sanchez N., Torres A., *et al.* "The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate Chemotaxis and migratory speed". *J Immunol*. 2005; 174: 4070-4080; Palecek S. P., Loftus J. C., Ginsberg M. H., Lauffenburger D. A., Horwitz A. F., "Integrin-ligand-binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness". *Nature*. 1997; 385:537-540; Yanagawa Y., Onoe K. "CCL19 induces rapid dendritic extension of murine dendritic cells". *Blood*. 2002; 100:1948-1956). Se ha demostrado que la estimulación de CCR7 potencia el fenotipo maduro de DCs<sup>58</sup>. Por lo tanto, mediante la transducción de DC con iCD40, se han mejorado la expresión de CCR7, la migración de DC y el estado de maduración, evitando la necesidad de PGE2.

Finalmente, la estimulación con iCD40 de las DC fue capaz de inducir una potente respuesta de los linfocitos T citotóxicos al antígeno prostático específico, PSMA, que era capaz de aumentar significativamente la destrucción de las células LNCaP diana. (Dudley M. E., Wunderlich J. R., Yang J. C., *et al.* "Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma". *J Clin Oncol*. 2005; 23:2346-2357; Morgan R. A., Dudley M. E., Wunderlich J. R., *et al.* "Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes". *Science*. 2006). Otros documentos citados en el presente documento se mencionan en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 10/781.384, presentada el

18 de febrero de 2004, titulada "Induced Activation In Dendritic Cells," y en la que se nombra a Spencer *et al.* como inventores, actualmente emitida como la patente de EE.UU. n.º 7.404.950.

#### Ejemplo 8: CD40 inducible

5 El sistema inmune innato usa varias familias de receptores de reconocimiento de patrones PRR para detectar infecciones patológicas o lesiones. Una familia de PRR son los receptores de tipo Toll (TLR) que actualmente incluyen aproximadamente 11 miembros en mamíferos. Estos normalmente se unen a ligandos multivalentes a través de un motivo rico en leucina (LRM). Los ligandos pueden proceder de bacterias, virus, hongos o células hospedadoras, y se pueden unir a TLR, ya sea en la superficie celular o dentro de vesículas endocíticas (especialmente TLR 3, 7, 8 y 9). Dentro de sus dominios de señalización citoplasmáticos, comparten un dominio TIR (Toll/IL-1R) conservado que se une a moléculas adaptadoras que contienen TIR cadena abajo, tales como MyD88 y TRIF/TICAM-1, y los adaptadores TIRAM/TICAM-2 y MAL/TIRAP. Otros PRR adicionales incluyen los receptores de tipo NOD (por ejemplo, NOD1 y NOD2) y las helicasas de tipo RIG, RIG-I y Mda-5. Muchos PRR se unen a ligandos a través de LRM flexibles y se acoplan a moléculas de señalización cadena abajo a través de motivos de unión proteína-proteína, tales como dominios TIR o CARD (dominio de reclutamiento de caspasas).

La estimulación a través de TLR-4 junto con la señalización a través de la molécula coestimulante CD40 pueden potenciar la maduración de alto nivel y las propiedades migratorias en células dendríticas derivadas de monocitos humanos (MoDC). Basándose en datos tanto publicados como no publicados<sup>2-7</sup>, este estado de activación prolongado y potenciado de los MoDC humanos *in vitro* y/o *in vivo* puede tanto promover la activación como la expansión de los linfocitos T autólogos tumorales específicos de la inmunoterapia adoptiva y superar los problemas de autolimitación de las DC maduras *ex vivo* para la vacunación.

Existen diversos enfoques para evaluar el uso de diferentes PRR en combinación con CD40 inducible. Estos enfoques y los métodos experimentales usados para realizar estas evaluaciones también pueden usarse para estudiar CD40 inducible en combinación con proteínas adaptadoras de PRR inducibles tales como, por ejemplo, MyD88 y TRIF.

Para reemplazar cócteles de maduración de MoDC complejos, mal conocidos, o combinaciones de adyuvantes y señalización de CD40, se desarrollan versiones inducibles por CID del receptor de tipo Toll 4 (denominado iTLR4) y otros iTLR (es decir, TLR3, 7, 8 y 9), y se ensayan iTLR para la sinergia con iCD40 ya sea en *trans* o en *cis* dentro de la misma cadena polipeptídica. La eficacia se basa en la inducción de los factores de transcripción NF-kappaB e IRF3/7s, y la fosforilación de p38 y JNK en la línea de DC, D2SC/1. El receptor inducible más potente se subclona en un adenovector para la transducción eficiente de MoDC.

Las células dendríticas (DC) desempeñan un papel fundamental en la iniciación y regulación de la inmunidad adaptativa<sup>7,8</sup>. Tras la detección de "señales de peligro", las DC se adaptan fisiológicamente a su microambiente sometándose a un programa de maduración genética<sup>6</sup>. Usando un amplio repertorio de moléculas coestimulantes y de presentación de antígenos, las DC son capaces de activar potentemente los linfocitos T específicos de antígenos sin tratamiento previo y regular su posterior fenotipo y función<sup>9</sup>. En la mayoría de los casos, el desarrollo de una inmunidad robusta de los linfocitos T citotóxicos (CTL) por las DC requiere una señal "auxiliar" procedente de los linfocitos T CD4<sup>+</sup><sup>10</sup>. Esta señal está compuesta de ambas citocinas solubles, tales como IL-2, así como la estimulación mediada por CD40L del receptor de CD40 de superficie en las DC<sup>11-13</sup>. Un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), el CD40, desencadena diversas vías dentro de la DC, produciendo la regulación positiva de varios genes de presentación de antígenos, coestimulantes, citocinas y pro-supervivencia, que permiten colectivamente que la DC induzca la activación de CTL<sup>14,15</sup>.

Dado el papel preeminente de las DC como células presentadoras de antígeno (APC), se pueden aprovechar como coadyuvantes naturales en los protocolos de vacunación para el tratamiento de diversas neoplasias malignas<sup>16,17</sup>. Las aplicaciones típicas incluyen la recolección de monocitos de sangre periférica a través de leucaféresis, diferenciación en cultivo en GM-CSF e IL-4 y la carga de DC derivados de monocitos inmaduros (MoDC) (o células precursoras CD34<sup>+</sup>) con antígenos tumorales mediante uno de varios métodos, tales como el pulsado de DC inmaduras con lisados tumorales no fraccionados, péptidos eluidos con MHC, proteínas de choque térmico derivadas de tumores (HSP), antígenos asociados a tumores (TAA (péptidos o proteínas)) o la transfección de DC con ARNm de tumor en masa o ARNm codificante de TAA (Revisado en 18,19). A continuación, por lo general, las DC cargadas con antígeno son maduras *ex vivo* con citocinas inflamatorias (por ejemplo, TNFalfa, IL1 beta, IL6 y PGE<sub>2</sub>) u otros coadyuvantes (por ejemplo, LPS, oligonucleótidos CpG) e inyectadas en pacientes. En cada caso, las propiedades inmunoestimulantes de las DC dependen de muchas variables, en especial, de la capacidad de migrar a los ganglios linfáticos y el estado de maduración completa. Sin embargo, el éxito limitado en ensayos clínicos recientes con inmunoterapia de DC ha sugerido que los protocolos actuales necesitan ser perfeccionados si se ha de incluir la inmunoterapia basada en DC en el arsenal de tratamiento junto con las modalidades más convencionales de terapia anticancerígena<sup>20,21</sup>.

Dos limitaciones clave de las vacunas basadas en DC son la corta vida útil de las DC maduras y su estado de activación transitoria dentro de los tejidos linfoides. Menos de 24 horas después de la exposición al lipopolisacárido

- (LPS), las DC terminan la síntesis de la citocina polarizante con T<sub>H</sub>1, IL-12, y se vuelven refractarias a estímulos adicionales<sup>22</sup>, limitando su capacidad para activar los linfocitos T citotóxicos (CTL). Otros estudios indican que la supervivencia de las DC pulsadas con antígeno dentro del ganglio linfático drenante (LN) se limita a solo 48 horas después de su administración, debido principalmente a la eliminación por los CTL específicos de antígeno<sup>23</sup>. Estos hallazgos subrayan la necesidad de mejores métodos, bien de prolongación del estado de activación y la duración de vida de las DC y/o de coordinación temporal de la "ventana" de activación de DC con el acoplamiento de linfocitos T afines dentro de los LN. Por lo tanto, el aumento de la activación y la supervivencia de las DC puede ser fundamental para potenciar la inmunidad contra los tumores.
- La supervivencia de las DC está regulada, al menos en parte, por moléculas derivadas de patógenos que actúan a través de uno o más receptores de tipo Toll (TLR) conservados y moléculas coestimulantes expresadas en linfocitos T (por ejemplo, CD40L y TRANCE), que son parcialmente dependientes de Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> para la actividad anti-apoptótica<sup>3,24-27</sup>. Aunque la importancia de la longevidad de las DC mediadas por TLR, CD40 o Bcl-2 ha sido bien documentada, los mecanismos de retroalimentación homeostática también pueden limitar la utilidad de los ligandos de TLR o miembros de la familia Bcl-2 para prolongar la longevidad de las DC en protocolos de vacunación de tumores. Estos incluyen la desensibilización del receptor o la regulación negativa<sup>4,28,29</sup>, la expresión de reguladores negativos para los TLR/IL-1R, como IRAK-M<sup>30</sup> y SOCS-1<sup>5</sup>, y la inducción de moléculas proapoptóticas, como Bim<sup>31</sup>, resultando en la neutralización de las moléculas anti-apoptóticas por las señales de TLR.
- Una diana atractiva para la manipulación es el receptor de la familia de TNF, CD40. A diferencia de las citocinas proinflamatorias o moléculas asociadas con patógenos que las DC encuentran en toda la periferia, el receptor CD40 expresado por las DC es unido por los linfocitos T auxiliares T CD4<sup>+</sup> dentro de la paracorteza de los LN a través de su ligando afín, CD40L<sup>12,13,37</sup>. Estudios recientes han demostrado además que la estimulación con CD40 permite a las DC "presentar de forma cruzada" el antígeno<sup>38</sup> y superar la tolerancia de los linfocitos T periféricos<sup>39</sup>, lo que genera estudios terapéuticos basados en la estimulación de CD40. Las estrategias incluyeron la administración sistémica de anticuerpos monoclonales específicos de CD40 (mAb) o de CD40L trimerizado<sup>40</sup>, la utilización de vacunas basadas en DC cargadas con el antígeno, estimuladas con CD40, y la administración de DC que expresan el ligando CD40 modificado genéticamente (CD40L)<sup>42</sup>. A pesar del gran potencial, varias propiedades de CD40 limitan su desarrollo terapéutico, incluyendo la expresión omnipresente de CD40 por una variedad de otros tipos de células, incluyendo los linfocitos B, macrófagos y células endoteliales<sup>14</sup>, aumentando la probabilidad de efectos secundarios debidos a la administración sistémica de estímulos de CD40. Además, varios mecanismos regulan la expresión superficial de CD40 mediante la dirección a su dominio extracelular, incluyendo la escisión inducida por CD40L mediante enzimas metaloproteinasas de matriz<sup>29</sup>, la degradación de retroalimentación negativa por una isoforma CD40 cortada y empalmada de forma alternativa<sup>28</sup>, y la endocitosis mediada por CD40L de CD40.
- Por lo tanto, se ha desarrollado un sistema de activación de DC basado en la vía de señalización de CD40 para prolongar el estado proestimulante de las DC dentro de los tejidos linfoides proporcionando funcionalidad dirigida a las DC, control temporal y resistencia a los mecanismos reguladores de CD40. Este receptor recombinante diseñado es compoñía del dominio citoplasmático de CD40 fusionado a dominios de unión al ligando y una secuencia dirigida a la membrana (**Fig. 2**). La administración de un fármaco dimerizante permeable a los lípidos condujo por vía intraperitoneal a la inducción potente de cascadas de señalización dependientes de CD40 y mejoró significativamente la inmunogenicidad frente a antígenos definidos y a tumores *in vivo* en relación con otras modalidades de activación<sup>4</sup>. Por lo tanto, el CD40 quimérico se denominó CD40 inducible (iCD40). La alta utilidad de las DC activadas con iCD40 en ratones sugirió que los métodos para estabilizar la señalización endógena de CD40 también podrían aumentar la potencia de las vacunas de DC.
- Los TLR se unen a una variedad de moléculas víricas y derivadas de bacterias que desencadenan la activación de células diana, tales como linfocitos T, macrófagos y células dendríticas. Aunque la mayoría de los 10 o más TLR de mamíferos utilizan una vía de señalización iniciada por la proteína adaptadora de PRR inducible, MyD88, que conduce a la activación NF-kappaB, TLR3 se basa en cambio en el adaptador de PRR inducible TRIF, conduciendo a la inducción del interferón de tipo I y de IRF3. En conjunto, estas vías de señalización pueden sinergizarse para producir altos niveles de la citocina Th1, IL-12<sup>43</sup>. Curiosamente, TLR-4 puede utilizar ambas vías después de la unión del mitógeno potente, LPS, o derivados. La estimulación a través de TLR-4 en combinación con la señalización a través de la molécula coestimulante CD40 puede potenciar la maduración de alto nivel y las propiedades migratorias en MoDC humanos.
- Al igual que muchos receptores de la superficie celular que hacen un solo paso a través de la membrana plasmática, es probable que todos los TLR se activen por homo- o heterodimerización u oligomerización. Ha habido informes de activación mediada por homodimerización de TLR-4 y activación mediada por heterodimerización de TLR2 con TLR1 y TLR6<sup>44-48</sup>. Además, en un artículo reciente, Ian Wilson y colaboradores cristalizaron TLR-3 e identificaron regiones de dimerización dentro del dominio extracelular, sugiriendo que señala como un homodímero tras la unión a dsRNA<sup>49</sup>. Por lo tanto, es probable que la dimerización inducida químicamente de TLR, especialmente TLR-4, conduzca a su inducción.
- Consideraciones para el desarrollo de DC humanas "mejoradas" derivadas de monocitos, maduras ex vivo.* Estudios publicados<sup>4</sup> y no publicados han sugerido dos métodos potentes para mejorar la función de las DC *in vivo*,

la expresión ectópica de un Akt optimizado, constitutivo (Myr<sub>F</sub>-ΔAkt) y la manipulación de un CD40 inducible quimérico *in vivo*. Complementando este trabajo, Si-Yi Chen (Baylor College of Medicine, Houston, Texas) ha demostrado que la reducción de los niveles de SOCS-1 en las DC también puede aumentar la eficacia<sup>5</sup>. Aunque se han acumulado datos significativos de apoyo en ratones para los enfoques de iCD40, Myr<sub>F</sub>-ΔAkt y SOCS-1, los MoDC humanos no son idénticos a las DC murinas derivadas de la médula ósea. En particular, el protocolo de vacuna de DC humana más comúnmente usado implica la diferenciación de los MoDC de los monocitos, antes del tratamiento con el cóctel de maduración proinflamatoria “de referencia”, que contiene TNF-alfa, IL-1-beta, IL-6 y PGE<sub>2</sub>. Aunque PGE<sub>2</sub> se considera necesario para regular positivamente CCR7 y aumentar la reactividad quimiotáctica a las quimiocinas derivadas de los ganglios linfáticos, CCL19 y CCL21<sup>50,51</sup>, PGE<sub>2</sub> también puede perjudicar a la señalización de las DC mediante la supresión de la producción de IL12p70 bioactiva<sup>52</sup>. Aunque es improbable que la supresión de la IL12 sea permanente *in vivo*, dada la tasa de éxito de construcción lenta de las vacunas de DC<sup>7</sup>, será importante determinar antes de las aplicaciones clínicas cuáles de los métodos descritos anteriormente pueden superar mejor la supresión de la IL12 mediada por PGE<sub>2</sub> en MoDC humanos sin interferir con la capacidad migratoria.

Aunque el éxito clínico en las vacunas de DC ha sido modesto<sup>7,20</sup>, los efectos secundarios sumamente bajos, y la especificidad y sensibilidad potencialmente exquisitas hacen que esta modalidad sea atractiva. Debido a que es probable que se prolongue la interacción con los linfocitos T específicos del antígeno, estas DC mejoradas tienden a mejorar el resultado clínico de las vacunas de DC. El desarrollo de DC mejoradas que expresan el antígeno no solo tiene una posible aplicabilidad en el tratamiento de la malignidad, sino que también se deben aplicar al tratamiento de numerosos patógenos. Además, este enfoque de alto impacto debería complementar los esfuerzos previos de numerosos laboratorios, que han identificado antígenos tumorales.

*Caracterización de la funcionalidad de iCD40 en DC primarias y desarrollo de una vacuna para el cáncer de próstata basada en DC con expresión de iCD40.* Tras demostrar la funcionalidad de iCD40 en células D2SC/1 murinas (<sup>4</sup> y no mostradas), que poseen muchas características de las DC recién aisladas, se examinó la funcionalidad de iCD40 en DC derivadas de médula ósea primaria (BMDC) utilizando un adenovirus que expresa iCD40. Se diseñó un vector adenovirico de tipo 5, dependiente de un auxiliar, ΔE1, ΔE3, denominado Ad-iCD40-GFP, para expresar tanto iCD40 como EGFP bajo el control del promotor/potenciador temprano/inmediato del CMV. Ad-iCD40-GFP transdujo y expresó satisfactoriamente el transgén de iCD40, así como el marcador de EGFP, en las BMDC purificadas. La titulación de Ad-iCD40-GFP, midiendo la regulación positiva inducida por iCD40 de B7.2(CD86), mostró que la activación máxima de iCD40 mediada por fármacos se producía a una MOI de aproximadamente 100, y procedió asintóticamente hasta la meseta con títulos víricos más altos (datos no mostrados). Aunque los efectos fueron modestos, AP20187 indujo la expresión superficial de MHC de clase I K<sup>b</sup>, B7.2, así como CD40 endógeno en BMDC que expresaban iCD40 a una MOI de 100, no en DC no transducidas. A continuación, se investigaron los efectos de Ad-iCD40-GFP en las BMDC usando tinción con citocina intracelular para evaluar la expresión de las DC de la citocina polarizante de T<sub>H</sub>1, IL-12. Estos hallazgos confirmaron numerosos informes previos de que un vector adenovirico vacío puede contribuir a las lecturas de fluorescencia de fondo mediante la estimulación de la producción de niveles bajos de esta citocina<sup>53</sup>. Estos experimentos también revelaron que el transgén de iCD40 podría generar un nivel significativo de señalización basal a estos títulos incluso en ausencia de CID.

Sin embargo, la exposición a AP20187 de estas DC que expresan iCD40 logró superar reproduciblemente estos efectos acumulativos para aumentar aún más el porcentaje de DC IL-12<sup>+</sup>. Curiosamente, la estimulación de la síntesis de IL-12p70/p40 con LPS y CD40L alcanzó su máximo a las 8 h y disminuyó a partir de entonces, mientras que el porcentaje de las DC IL-12<sup>+</sup> siguió aumentando hasta al menos 24 horas después de la transducción de Ad-iCD40-GFP. Trabajos anteriores de Langenkamp *et al.* han demostrado que el tratamiento prolongado de las DC con LPS agota su capacidad de producción de citocinas<sup>54</sup>. Estos resultados implican que el vector Ad-iCD40-GFP, en oposición a la señal de peligro de LPS, es capaz de potenciar y mantener una respuesta de IL-12 más duradera por las BMDC.

Además del estado de activación de DC, la longevidad de las DC es otra variable crítica que influye en la generación de inmunidad dependiente de los linfocitos T. De hecho, la muerte mediada por CTL de las DC se considera un mecanismo significativo para modular las respuestas inmunes mientras que protege al hospedador de patologías autoinmunes<sup>55,56</sup>. Otro trabajo ha establecido que la estimulación mediante CD40 de las DC prolonga su supervivencia mediante una variedad de mecanismos, incluyendo la regulación positiva de la proteína anti-apoptótica bcl-X<sub>L</sub> y el inhibidor de la granzima B, Spi-6<sup>57,58</sup>. Se compararon los efectos de iCD40 relativos a CD40L sobre la supervivencia de DC en un ensayo de cultivo privado de suero *in vitro*. Mediante el análisis, la población de células positivas en yoduro de propidio (PI) vital por citometría de flujo, las BMDC que expresaban iCD40 resultaron demostrar una mayor longevidad en estas condiciones en relación con las DC no transducidas transformadas con CD40L. Este efecto era dependiente de iCD40, ya que las DC transducidas con Ad-GFP no reflejaban una supervivencia mejorada en estas condiciones. Este trabajo también mostró que la exposición de BMDC iCD40 al fármaco dimerizante AP20187 incluso mejoró aún más este efecto de supervivencia en relación con las BMDC no tratadas. Además, cuando las DC transducidas con Ad-iCD40 fueron teñidas con CFSE y se inyectaron en la almohadilla plantar, se encontró un número significativamente mayor de DC en los ganglios linfáticos poplíteos después de las inyecciones i.p. de AP20187 frente a las DC iCD40 estimuladas *in vitro* o las DC tratadas con LPS/CD40L.

A pesar de las conocidas señales de maduración dependientes de Ad y de los efectos de la señalización basal de iCD40 en las BMDC primarias, se detectó un aumento de la activación de las DC en presencia de AP20187. En general, estos datos sugieren que un receptor de CD40 inducible diseñado para responder a un agente farmacológico es capaz de mantener las DC primarias en un estado sostenido de activación en comparación con los efectos más transitorios de la estimulación de CD40L y los efectos potencialmente más complejos de los anticuerpos anti-CD40. Estos datos coinciden con los hallazgos anteriores que describen la modulación de las DC solo a corto plazo para los estímulos que se dirigen al CD40 endógeno.

*El interruptor de activación de iCD40 funciona como un potente adyuvante para las vacunas de ADN antitumorales*

Estudios previos han demostrado que las DC desempeñan un papel fundamental en el procesamiento y en la presentación de las vacunas de ADN a los linfocitos T que responden<sup>59</sup>. A continuación, se estudió la eficacia antitumoral *in vivo* de las vacunas basadas en DC iCD40, así como el papel *in situ* de las DC que expresan iCD40 en la inmunovigilancia tumoral. Para establecer un modelo tumoral terapéutico, se inocularon los ratones C57BL/6 por vía subcutánea con la línea de tumor de timoma de EG.7-OVA, y se dejó que avanzara hasta que los volúmenes del tumor alcanzaron aproximadamente 0,5 cm<sup>3</sup>. Se vacunaron estos ratones portadores de tumores con cualquiera de las BMDC iCD40 o de tipo silvestre pulsadas con SIINFEKL. La vacunación con las BMDC de tipo silvestre, no tratadas o estimuladas en cultivo con LPS y CD40L o *in vivo* con anticuerpo monoclonal anti-CD40, no retardaron la velocidad de crecimiento tumoral global. Sin embargo, la activación de iCD40 mediada por fármacos *in vivo* de las vacunas de BMDC produjo reducciones sostenidas del tamaño del tumor. Además, la tasa de respuesta a las vacunas de BMDC que expresan iCD40 activadas *in vivo* fue significativamente mayor que las tasas de respuesta a las BMDC de tipo silvestre en todas las demás condiciones de vacunación (70 % frente al 30 %). Para confirmar la generación de respuestas de linfocitos T específicos del antígeno tumoral en ratones portadores de tumores, se realizó el análisis del tetrámero H-2K<sup>b</sup> OVA<sub>257-264</sub> en linfocitos T CD8<sup>+</sup> de la sangre periférica. Este análisis verificó la presencia de una población expandida de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de K<sup>b</sup>OVA<sub>257-264</sub> exclusivamente en los ratones vacunados con BMDC iCD40 activadas *in vivo*.

Aunque los modelos de tumor subcutáneo proporcionan una herramienta conveniente para aproximar el tamaño del tumor, su utilidad normalmente se limita a tumores no ortotópicos que son razonablemente simétricos. Además, la cuantificación de la metástasis requiere la eutanasia y se limita a una sola medición. Como una mejora en este enfoque fundamental, se desarrollaron células tumorales que expresan de forma estable una luciferasa desplazada al rojo de los escarabajos del Caribe (*Pyrophorus plagiophthalmus*). La formación de imágenes en ratones después de la administración del sustrato D-Luciferina, confirma la detección fácil mediante bien una cámara CCD enfriada (MS<sup>TM</sup> Imaging System, Xenogen Corp.) o calibradores convencionales. Además, el indicador de luciferasa de desplazamiento al rojo (emisión a ~613 nm) debería permitir una cuantificación más lineal de la metástasis superficial distante.

*Desarrollo de TLR inducibles por CID (iTLR)*: Existen varios subgrupos de TLR basados en la sublocalización y las vías de señalización utilizadas. Independientemente de la localización subcelular normal de los dominios extracelulares de unión al ligando, los dominios de señalización son citoplasmáticos y deberían señalar adecuadamente en todos los casos si la homodimerización es el mecanismo de señalización normal. De forma análoga a iCD40, se amplificaron los dominios de señalización citoplasmática de TLR por PCR con los sitios de restricción *Xho*I y *Sa*I flanqueantes para LA subclonación en el lado 5' o 3' de dos inductores químicos de dominios de unión a la dimerización (CID), KBP12<sub>v36</sub><sup>1</sup>. Los CBD-TLR quiméricos se localizaron en la membrana plasmática usando motivos dirigidos a la miristoilación (Fig. 3).

Los ensayos iniciales de los TLR implicaron la transfección conjunta de vectores de expresión en células Jurkat-TAg o 293 junto con un plásmido indicador de SEAP (fosfatasa alcalina secretada) sensible a NF-kappaB<sup>66</sup>. Curiosamente, los datos preliminares sugerían que solo iTLR7 e iTLR8 funcionaron en las células Jurkat-TAg, pero no iTLR3, 4, y 9, independientemente de la posición relativa de los CBD y TLR. Se requerirán transfecciones adicionales en un panel de células para determinar si esto refleja diferencias fisiológicas de señalización específica de tejidos u otras idiosincrasias de estas construcciones quiméricas.

Los expertos en la materia reconocerán las modificaciones que se pueden realizar para el uso de proteínas adaptadoras en lugar de TLR en los siguientes métodos.

*Desarrollo de los TLR inducibles*: se pueden desarrollar TLR quiméricos inducibles para evitar la necesidad de adyuvante derivado de un patógeno (o sintético) en la activación de las DC. Inicialmente, los iTLR 3, 4, 7, 8 y 9 quiméricos se desarrollaron clonando los dominios de señalización citoplasmática de los TLR 5' (cadena arriba) o 3' (cadena abajo) de los dominios de unión a CID (Fig. 3). El rastreo inicial en células Jurkat-TAG reveló que iTLR8 (y en menor medida iTLR7) desencadenó la mayor inducción de NF-kappaB. Sin embargo, la fuerza relativa de varios TLR puede ser un parámetro específico del tejido. Para abordar esto, estas construcciones pueden ensayarse en la línea celular DC D2SC/1 inicialmente con respecto a la activación NF-kappaB usando un sistema indicador de SEAP NF-kappaB basado en la transfección transitoria de múltiples plásmidos de expresión en células diana. Las células 2DSC/1 representan un subconjunto raro de líneas DC inmortalizadas que conservan tanto el fenotipo de DC de inmadurez como la capacidad de madurar después de las señales de activación<sup>67</sup>. Puesto que la inducción de NF-

kappaB no es la única función de los TLR, la inducción de IRF3/7 también se puede examinar usando un plásmido indicador de SEAP de elemento de respuesta estimulado por interferón (IFN) (ISRE) que se une a los IRF e induce actividad indicadora. Para desarrollar ISRE-SEAP, el promotor que contiene ISRE de ISRE-luc (Stratagene) puede sustituir al promotor SRalfa en el plásmido indicador constitutivo pSH1/kSEAP. Como inducción secundaria de la señalización de TLR, se controla la fosforilación de JNK y p38 mediante transferencia Western usando anticuerpos específicos de la fosforilación.

Dado que varios TLR distintos pueden inducir diferencialmente IRF y NF-kappaB, y pueden sinergizarse en la activación de DC y la producción de IL-12<sup>43</sup>, se pueden seguir los ensayos iniciales de TLR inducibles mediante pruebas combinatorias por cotransfección de iTLR, de dos en dos. Aunque se pueden producir tanto la homodimerización normal como la heterodimerización más impredecible, este enfoque debe revelar sinergismo entre diferentes clases de TLR. La activación de los pares de TLR sinérgicos debería conferir capacidades de inmunoestimulación mejoradas a las DC. Si se puede detectar un sinergismo, se ensaya una nueva serie de construcciones que están compuestas por dos TLR distintos (o idénticos) en tándem, denominados TLR compuestos inductivos (icTLR) (Fig. 4). En este caso, los dominios de señalización de TLR flanqueados por *XhoI-SaI* citoplasmáticos anteriores se combinan en diversas disposiciones cadena arriba y cadena abajo de los CBD. Finalmente, las dos construcciones más potentes se modifican para contener el dominio citoplasmático de CD40, demostrado previamente que se activó mediante CID (Fig. 5).

Aunque la transfección de DC puede ser problemática, recientemente, se ha descrito un método mejorado de electroporación por Vieweg y colaboradores<sup>68</sup>. En su enfoque, se refuerza la supervivencia después de la electroporación (300 V, 150 mF (Gene Pulser II: Bio-Rad)) volviendo a suspender las DC (4 x 10<sup>7</sup>/ml) en tampón ViaSpan de ion potásico alto (Barr Laboratories). Además, si la eficacia de transfección sigue siendo demasiado baja, se cotransfectará el vector de expresión pRSV-TAg, que contiene antígeno T grande de SV40 para amplificar nuestros vectores de expresión de la serie pSH1, que contienen el origen de replicación del SV40.

*Desarrollo de un adenovector que expresa el gen de activación unificado icTLR/CD40:* aunque D2SC/1 es un modelo de células útil para estudios preclínicos, a continuación, se ensayarán los genes inmunorreguladores en DC primarias de ratón y humanas antes de las aplicaciones clínicas. Para facilitar la transferencia genética eficiente a las células primarias, se subclonan la una o varias construcciones más potentes en el vector lanzadera de adenovirus, pShuttle-X o pDNR-CMV, y se transfieren después al vector Ad5, pAdeno-X (BD) o AdXLP (BD), respectivamente. Se lleva a cabo la preparación del virus de alto título. Como se ha logrado con Ad5/f35-iCD40 previamente desarrollado, este vector se ensaya tanto en DC humanas como de ratones. Aunque los adenovectores pseudotipados Ad5/f35 mejoran un poco la eficiencia de transducción un poco en las DC humanas, se pueden usar adenovectores envueltos en Ad5 "puros" para permitir la transducción adicional de las DC murinas.

Para estudios en seres humanos, se preparan las MoDC mediante incubación convencional de precursores de DC de sangre periférica adherida en GM-CSF e IL-4. Las DC inmaduras se transducen con el vector icTLR/CD40 desarrollado y los vectores de control (por ejemplo, Ad5/f35-iCD40 y Ad5/f35-EGFP). Los ensayos convencionales de MoDC para la maduración y actividad se describen en el presente documento y también incluyen, por ejemplo, análisis de citometría de flujo de marcadores de maduración (por ejemplo, CD40, CD80, CD86, HLA de clase I y II, CCR7), producción de IL-12, migración y activación de linfocitos T específicos del antígeno.

En el caso de que la colocación de dominios de señalización de CD40 y TLR en tándem pueda interferir con las vías de señalización activadas por los dominios aislados, las construcciones pueden coexpresarse en vectores víricos usando estrategias alternativas, tales como el uso de casetes de expresión bicistrónicos o clonación en la región E3 de adenovectores deltaE1deltaE3. Además, los receptores quiméricos pueden no señalar de forma idéntica a las proteínas endógenas. Aunque se puede creer que algunos PRR o adaptadores de PRR sean los TLR más potentes para la activación de DC mieloides, otras alternativas pueden funcionar mejor cuando se convierten en un receptor activado por CID. Además, se puede encontrar que el sinergismo entre los diversos PRR inducibles y adaptadores de PRR y Akt constitutivo, M<sub>F</sub>-deltaAkt o SOCS-1 de ARNip es más potente. En estos casos, se pueden combinar diversas combinaciones de genes reguladores inmunes en adenovectores multicistrónicos.

#### *Métodos adicionales de ensayo de adaptadores inducibles por CID*

Los expertos en la materia reconocerán las modificaciones que se pueden realizar para el uso de proteínas adaptadoras en lugar de TLR en los siguientes métodos.

Debido al papel central que desempeñan las DC en la regulación de la inmunidad adaptativa, existen muchos mecanismos homeostáticos que reducen la actividad de las DC. Sin embargo, se puede requerir una activación elevada para superar los mecanismos tolerógenos derivados de tumores o virus. En el presente documento, se analizan diversos métodos para eludir estos mecanismos homeostáticos. El CD40 inducible puede activarse *in vivo* en el contexto de una sinapsis inmunológica, y carece de su dominio extracelular, evitando varios mecanismos de retroalimentación negativa que se dirigen a este dominio. El Akt constitutivamente activo, optimizado, M<sub>F</sub>-deltaAkt, se basa en la dirección mediante balsa lipídica de un alelo de Akt1 truncado. La reducción del inhibidor SOCS-1 con tecnología de ARNip aumenta la señalización del receptor de tipo Toll y la producción de interferón de tipo I. Por lo

tanto, los tres métodos tienen la capacidad de aumentar los MoDC.

*Preparación de los MoDC:* para la mayoría de los experimentos basados en la optimización de las DC aumentadas (eDC), las DC derivadas de monocitos se diferencian y se enriquecen a partir de células mononucleares de sangre periférica obtenidas del Banco de Sangre o voluntarios sanos. En resumen, los precursores de DC se aíslan mediante técnicas de densidad flotante (Histopaque: Sigma-Aldrich) y después se cultivan células adherentes (y semiadherentes) durante 5 días en medio de DC X-VIVO 15 exento de suero (Cambrex Bio Science) en presencia de citocinas GM-CSF (800 U/ml) e IL-4 (500 U/ml) (R&D Systems, Mineápolis, MN). Después de 5 días en cultivo, se incuban las DC inmaduras durante 24 horas más en presencia de adenovectores que expresan iCD40 (es decir, Ad5/f35-iCD40), Akt constitutivo (Ad5/f35-MF-deltaAkt), SOCS1 de ARNhc (Ad5-shSOCS1) o Ad5-iTLR/CD40 a 10.000 partículas víricas (vp) por célula. (Nota: Los vectores Ad5 pueden añadirse a 20.000 vp para compensar parcialmente una eficiencia de transducción algo reducida). En un subconjunto de muestras, se añadirá más ligando TLR4, monofosforil lípido A (MPL: 1 mg/ml) o AP20817 dimerizante (100 nM; iCD40-DC solamente) para la maduración completa.

*Determinación del estado de maduración de los MoDC:* se induce una serie de proteínas de superficie ("marcadores") durante la activación de los MoDC, incluyendo CD25, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA de clase I y clase II, CCR7 y otros. Estudios preliminares demostraron que la señalización de iCD40 solo es suficiente para aumentar la expresión de CD83 y CCR7 en los MoDC (no mostrado). La señalización de TLR4 adicional (a través de MPL) conduce a la activación aditiva (o sinérgica) de todos los marcadores de maduración. Por lo tanto, a un número fijo de vp, se evalúa la inducción de los marcadores de maduración (determinada por citometría de flujo) mediante los cuatro vectores víricos, solos o en combinación con MPL. La maduración mediante el cóctel de maduración (MC) "de referencia" anterior, compuesto por IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF $\alpha$  y PGE $_2$ , actúa como control positivo y las DC inmaduras no tratadas (simuladas) sirven como controles negativos en estos y en siguientes experimentos. Además del análisis fenotípico de los marcadores de superficie celular, la producción de IL-12 y otras citocinas polarizantes de T $_H$ 1 (por ejemplo, IL-23, TNF $\alpha$ ), también son importantes para una inmunidad antitumoral óptima. Aunque iCD40 no es suficiente para la producción de IL-12, las combinaciones de MPL e iCD40 conducen a una potente producción sinérgica de IL-12. Por lo tanto, los sobrenadantes de cultivo de DC, estimulados como se ha explicado anteriormente, se cosechan 24 y 48 horas después de la transducción y de la maduración. Los niveles de p70 de IL-12, los dímeros p40 de IL-12/IL-23 y las concentraciones de TNF $\alpha$  se determinan mediante ensayos colorimétricos en ensayos de ELISA de tipo sándwich (BD Biosciences). Como alternativa, se pueden usar perlas multiplexadas desarrolladas por BD para ensayar simultáneamente múltiples citocinas adicionales (por ejemplo, IL-1, IL-6, IFN $\alpha$ , etc.).

*Determinación de la capacidad de migración:* a diferencia de las DC murinas derivados de médula ósea (BMDC), que son competentes para la migración a los LN, los MoDC inmaduros son deficientes en esta función crucial. Mientras que la PGE $_2$  normalmente se usa para regular de manera positiva CCR7 y la capacidad migratoria, la utilidad de la PGE $_2$  se ve perjudicada por posibles efectos deletéreos, que incluyen la regulación negativa de la señalización de CD40 y la producción de IL-12 y la regulación positiva de IL-10<sup>50,52,69</sup>. Además, incluso en presencia de PGE $_2$ , la migración a los LN es modesta y aproximadamente del 1-2 % de las células inyectadas<sup>70</sup>. Aunque la expresión de CCR7 es probablemente un requisito previo para la migración a los ganglios linfáticos, la respuesta quimiotáctica a las quimiocinas CCR7 derivadas de LN, CCL19 y CCL21, es una medida más directa de la probable migración a los nódulos linfáticos. Por lo tanto, la migración a CCL19/MIP3b se puede comparar en un ensayo modificado de 2 cámaras.

Los experimentos preliminares demuestran el sorprendente resultado de que la señalización de iCD40 es suficiente para la capacidad migratoria, incluso en ausencia de PGE $_2$ . En este ensayo, se transdujeron los MoDC con Ad5/f35-ihCD40 y se marcaron con colorante fluorescente, Green-CMFD (Molecular Probes). Se dispusieron las células en la cámara superior de una placa de ensayo de 2 cámaras de 8 mm, y se cuantificó la fluorescencia total en la cámara inferior y se comparó con la estimulación mediada por PGE $_2$ . De forma similar, se puede comparar la capacidad migratoria *in vitro* de los MoDC con iCD40-TLR, iCD40 y Akt-MoDC, y los MoDC deficientes en SOCS1 individualmente y en combinación con y sin los ligandos de TLR4.

Como un segundo ensayo más directo para determinar la capacidad de migración, se puede comparar la migración *in vivo* mediante la inyección de eDC en la parte inferior de la pata de ratones SCID inmunodeficientes no irradiados mieloablativamente. Se necesita una radiación mínima (~250 rad) para suprimir la actividad de los linfocitos citotóxicos naturales (NK) contra las células xenogénicas. A pesar de las diferencias entre especies, los MoDC humanos pueden responder a las quimiocinas murinas y migrar a los LN drenantes<sup>71</sup>. Para visualizar los MoDC migrados con éxito, se marcan las células con el colorante fluorescente rastreador celular Green-CMFD, que se cuantifica por citometría de flujo. En segundo lugar, además de la "mejora" mediada por el adenovector, los MoDC se transducen con adenovector, Ad5/f35-CBR, que expresa la luciferasa (Promega) del escarabajo (*Pyrophorus plagiophthalmus*) de desplazamiento al rojo (pico de excitación de 510 nm). El uso del alelo de la luciferasa CBR debería permitir detectar más fácilmente las DC bioluminiscentes (usando el presente sistema de formación de imágenes IVIS® (Xenogen Corp, Alameda, CA)) tanto en el LN poplíteo drenante como en sitios distantes y distales de la membrana.

*Activación y polarización de linfocitos T autólogos:* además de la maduración y la migración, la capacidad para activar una respuesta inmune específica del antígeno sesgada por T<sub>H</sub>1 *in vivo* es la condición sine qua non de la vacunación de DC contra los tumores sólidos. Por lo tanto, se puede evaluar la capacidad de las eDC para estimular la función tanto auxiliar como citotóxica de los linfocitos T. Inicialmente, se puede ensayar la estimulación de la proliferación de los linfocitos T alogénicos CD4<sup>+</sup>. Las DC mejoradas se maduran y se activan usando las condiciones descritas anteriormente, se irradian (3000 rad) y se cultivan 1:10 con linfocitos T CD4<sup>+</sup> purificados con perlas magnéticas alogénicas (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Se evalúa la proliferación 4 días más tarde tras 16 horas de incubación con [<sup>3</sup>H]-timidina. Para complementar estos estudios, se puede determinar la capacidad de polarización de T<sub>H</sub>1 (determinada mediante ensayos de ELISpot a IL-4 e IFN-gamma) mediante diversos patrones o eDC. Para determinar más específicamente el estado de maduración de las DC, se determina la capacidad para estimular la función de los CTL sin tratamiento previo, usando el análisis de tetrámero restringido a HLA-A2 y ensayos de CTL. (Nota: varios vehículos de HLA-A2 han sido recientemente genotipados). Se compara la activación de los linfocitos T autólogos en donantes sanos mediante diversas DC que presentan 2 cócteles distintos de antígenos restringidos a HLA-A2, uno fuerte y otro débil. Los ensayos de CTL se basarán en la actividad lítica específica del antígeno de los linfocitos T estimulados con patrón o eDC como se ha explicado anteriormente. Estos 4 ensayos de linfocitos T deberían proporcionar un análisis preclínico equilibrado de las DC mejoradas, junto con un análisis funcional de los diversos enfoques.

*Citas a las que se hace referencia en el presente ejemplo y/o que proporcionan más información técnica*

1. Clackson, T. *et al.* "Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity". *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU. **95**, 10437-10442 (1998).
2. Labeur, M. S. *et al.* "Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage". *J Immunol* **162**, 168-75 (1999).
3. Nopora, A. y Brocker, T. "Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo". *J Immunol* **169**, 3006-14(2002).
4. Hanks, B. A. *et al.* "Re-engineered CD40 receptor enables potent pharmacological activation of dendritic-cell cancer vaccines in vivo". *Nat Med* **11**,130-7 (2005).
5. Shen, L., Evel-Kabler, K., Strube, R. y Chen, S. Y. "Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity". *Nat Biotechnol* **22**, 1546-53 (2004).
6. Reis e Sousa, C. "Dendritic cells as sensors of infection". *Immunity* **14**, 495-8 (2001).
7. Banchereau, J. y Palucka, A. K. "Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer". *Nat Rev Immunol* **5**, 296-306 (2005).
8. Banchereau, J. *et al.* "Immunobiology of dendritic cells". *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811 (2000).
9. Lanzavecchia, A. y Sallusto, F. "Regulation of T cell immunity by dendritic cells". *Cell* **106**, 263-6 (2001).
10. Smith, C.M. *et al.* "Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity". *Nat Immunol* **5**, 1143-8 (2004).
11. Schoenberger, S. P., Toes, R. E., El, v.d.V., Offringa, R. y Melief, C. J. "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions [see comments]". *Nature* **393**, 480-3 (1998).
12. Bennett, S. R. *et al.* "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signaling". *Nature* **393**, 478-80 (1998).
13. Ridge, J. P., Di Rosa, F. y Matzinger, P. "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell". *Nature* **393**, 474-8 (1998).
14. Grewal, I. S. y Flavell, R. A. "CD40 and CD154 in cell-mediated immunity". *Annu Rev Immunol* **16**, 111-35(1998).
15. O'Sullivan, B. y Thomas, R. "CD40 and dendritic cell function". *Crit Rev Immunol* **23**, 83-107 (2003).
16. Nestle, F. O., Banchereau, J. y Hart, D. "Dendritic cells: On the move from bench to bedside". *Nat Med* **7**, 761-5 (2001).
17. Schuler, G., Schuler-Thurner, B. y Steinman, R. M. "The use of dendritic cells in cancer immunotherapy". *Curr Opin Immunol* **15**, 138-47 (2003).
18. Gilboa, E. y Vieweg, J. "Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells". *Immunol Rev* **199**, 251-63 (2004).
19. Gilboa, E. "The promise of cancer vaccines". *Nat Rev Cancer* **4**, 401-11 (2004).
20. Ridgway, D. "The first 1000 dendritic cell vaccines". *Cancer Invest* **21**, 873-86 (2003).
21. Dallal, R. M. y Lotze, M. T. "The dendritic cell and human cancer vaccines". *Curr Opin Immunol* **12**, 583-8 (2000).
22. Langenkamp, A., Messi M., Lanzavecchia, A. y Sallusto, F. "Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells". *Nat Immunol* **1**, 311-6 (2000).
23. Hermans, I. F., Ritchie, D. S., Yang, J., Roberts, J. M. y Ronchese, F. "CD8+ T cell-dependent elimination of dendritic cells in vivo limits the induction of antitumor immunity". *J Immunol* **164**, 3095-101 (2000).
24. Park, Y., Lee, S. W. y Sung, Y. C. Cutting Edge: "CpG DNA inhibits dendritic cell apoptosis by up-regulating cellular inhibitor of apoptosis proteins through the phosphatidylinositol-3'-OH kinase pathway". *J Immunol* **168**, 5-8 (2002).
25. Josien, R. *et al.* "TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo". *J Exp Med* **191**, 495-502 (2000).
26. Miga, A. J. *et al.* "Dendritic cell longevity and T cell persistence is controlled by CD154- CD40 interactions". *Eur J Immunol* **31**, 959-65 (2001).

27. Cremer, I. *et al.* "Long-lived immature dendritic cells mediated by TRANCE-RANK interaction". *Blood* **100**, 3646-55 (2002).
28. Tone, M., Tone, Y., Fairchild, P. J., Wykes, M. y Waldmann, H. "Regulation of CD40 function by its isoforms generated through alternative splicing". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* **98**, 1751-1756. (2001).
- 5 29. Contin C. *et al.* "Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme. Implications for CD40 signaling". *J Biol Chem* **278**, 32801-9, (2003).
30. Kobayashi K. *et al.* "IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling". *Cell* **110**,191-202(2002).
31. Hou W. S. y Van Parijs L. "A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells". *Nat Immunol* **5**, 583-9 (2004).
- 10 32. Kandel, E. S. y Hay N. "The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB". *Exp Cell Res* **253**, 210-29 (1999).
33. Vassiliou E., Sharma V., Jing H., Sheibanie F. y Ganea D. "Prostaglandin E2 promotes the survival of bone marrow-derived dendritic cells". *J Immunol* **173**, 6955-64 (2004).
34. Ardeshtna K. M., Pizzey A. R., Devereux S. y Khwaja A. "The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells". *Blood* **96**, 1039-46(2000).
- 15 35. Kanto T., Kalinski P., Hunter, O. C., Lotze M. T. y Amoscato A. A. "Ceramide mediates tumor-induced dendritic cell apoptosis". *J Immunol* **167**, 3773-84 (2001).
36. Mochizuki T. *et al.* "Akt protein kinase inhibits non-apoptotic programmed cell death induced by ceramide". *J Biol Chem* **277**, 2790-7 (2002).
- 20 37. Bennett, M. R., Evan G. I. y Schwartz, S. M. "Apoptosis of rat vascular smooth muscle cells is regulated by p53-dependent and -independent pathways". *Circ.Res.* **77**, 266- 273 (1995).
38. Albert, M. L., Jegathesan M. y Darnell, R. B. "Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells". *Nat Immunol* **2**, 1010-7 (2001).
- 25 39. Diehl, L. *et al.* "CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy". *Nat Med* **5**, 774-9 (1999).
40. Vonderheide R. H. *et al.* "CD40 activation of carcinoma cells increases expression of adhesion and major histocompatibility molecules but fails to induce either CD80/CD86 expression or T cell alloreactivity". *Int J Oncol* **19**, 791-8 (2001).
- 30 41. Mazouz N. *et al.* "CD40 triggering increases the efficiency of dendritic cells for antitumoral immunization". *Cancer Immun* **2**, 2 (2002).
42. Kikuchi T, Worgall S., Singh, R., Moore, M. A. y Crystal, R. G. "Dendritic cells genetically modified to express CD40 ligand and pulsed with antigen can initiate antigen-specific humoral immunity independent of CD4+ T cells". *Nat Med* **6**, 1154-9 (2000).
- 35 43. Napolitani G., Rinaldi, A., Bertoni F., Sallusto F. y Lanzavecchia A. "Selected Tolllike receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells". *Nat Immunol* **6**, 769-76 (2005).
44. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P. y Janeway C. A., Jr. "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity". *Nature* **388**, 394-7 (1997).
- 40 45. Hoshino K. *et al.* "Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product". *J Immunol* **162**, 3749-52 (1999).
46. Ozinsky A. *et al.* "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* **97**, 13766-71 (2000).
47. Zhang, H., Tay P. N., Cao W., Li, W. y Lu, J. "Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signaling". *FEBS Lett* **532**, 171-6 (2002).
- 45 48. Lee, H. K., Dunzendorfer S. y Tobias, P. S. "Cytoplasmic domain-mediated dimerizations of toll-like receptor 4 observed by beta-lactamase enzyme fragment complementation." *J Biol Chem* **279**, 10564-74 (2004).
49. Choe J., Kelker M. S. y Wilson, L. A. "Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain". *Science* **309**, 581-5 (2005).
- 50 50. Luft T. *et al.* "Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets". *Blood* **100**, 1362-72 (2002).
51. Scandella E. *et al.* "CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2". *Blood* **103**, 1595-601 (2004).
- 55 52. Kalinski P., Vieira, P. L., Schuitemaker J. H., de Jong E. C. y Kapsenberg M. L. "Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer". *Blood* **97**, 3466-9 (2001).
53. Korst R., Mahtabifard A., Yamada R. y Crystal, R. "Effect of Adenovirus Gene Transfer Vectors on the Immunologic Functions of Mouse Dendritic Cells". *Molecular Therapy* **5**, 307-315 (2002).
- 60 54. Langenkamp, A., Messi M., Lanzavecchia A. y Sallusto F. "Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2, and nonpolarized T cells". *Nature Immunology* **1**, 311-316 (2000).
55. Hermans, I., Ritchie, D., Yang, J., Roberts, J., and Ronchese F. "CD8 T cell-dependent elimination of dendritic cells in vivo limits the induction of antitumor immunity". *Journal of Immunology* **164**, 3095-3101 (2000).
56. Wong, P.a.P., E. "Feed-back Regulation of Pathogen-Specific T Cell Priming". *Immunity* **188**, 499-511 (2003).
- 65 57. Miga<sub>1</sub> A., Masters, S., Durell, B., Gonzalez, M., Jenkins, M., Maliszewski, C., Kikutani, H., Wade, W. y Noelle, R. "Dendritic cell longevity and T cell persistence is controlled by CD154-CD40 interactions". *European*

- Journal of Immunology* **31**, 959-965 (2001).
58. Medema, J., Schuurhuis, D., Rea, D., van Tongeren, J., de Jong, J., Bres, S., Laban, S., Toes, R., Toebes, M., Schumacher, T., Bladergroen, B., Ossendorp, F., Kummer, J., Melief, C. y Ofringa, R. "Expression of the serpin serine protease inhibitor 6 protects dendritic cells from cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis: differential modulation by T helper type 1 and type 2 cells". *Journal of Experimental Medicine* **194**, 657-667(2001).
59. Steinman, R. a. P., M. "Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy". *Journal of Clinical Investigation* **109**, 1519-1526 (2002).
60. Woltman, A. M. *et al.* "Rapamycin specifically interferes with GM-CSF signaling in human dendritic cells, leading to apoptosis via increased p27KIP1 expression". *Blood* **101**, 1439-45 (2003).
61. Granucci, F. *et al.* "Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis". *Nat Immunol* **2**, 882-8 (2001).
62. Fujio, Y. y Walsh, K. "Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner". *J Biol Chem* **274**, 16349-54(1999).
63. Mukherjee, A., Arnaud, L. y Cooper, J. A. "Lipid-dependent recruitment of neuronal Src to lipid rafts in the brain". *J Biol Chem* **278**, 40806-14 (2003).
64. Li, B., Desai, S. A., MacCorkle-Chosnek, R. A., Fan, L. y Spencer, D. M. "A novel conditional Akt 'survival switch' reversibly protects cells from apoptosis". *Gene Ther* **9**, 233-44. (2002).
65. Sporri, R. y Reis e Sousa, C. "Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function". *Nat Immunol* **6**, 163-70 (2005).
66. Spencer, D. M., Wandless, T. J., Schreiber, S. L. y Crabtree, G. R. "Controlling signal transduction with synthetic ligands". *Science* **262**, 1019-1024 (1993).
67. Granucci, F. *et al.* "Modulation of cytokine expression in mouse dendritic cell clones". *Eur J Immunol* **24**, 2522-6 (1994).
68. Su, Z. *et al.* "Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer." *J Immunol* **174**, 3798-807 (2005).
69. Scandella, E., Men, Y., Gillissen, S., Forster, R. y Groettrup, M. "Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells". *Blood* **100**, 1354-61 (2002).
70. Morse, M. A. *et al.* "Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies". *Cancer Res* **59**, 56-8 (1999).
71. Hammad, H. *et al.* "Monocyte-derived dendritic cells induce a house dust mite-specific Th2 allergic inflammation in the lung of humanized SCID mice: involvement of CCR7". *J Immunol* **169**, 1524-34 (2002).

#### Ejemplo 9: Construcciones de expresión y ensayo

35 Inicialmente, se seleccionaron los TLR 3, 4, 7, 8 y 9 para construir proteínas quiméricas inducibles, ya que representan TLR de las diferentes subfamilias que se sabe que desencadenan la citocina Th1, IL-12, en DC derivadas de monocitos. Además, se ha demostrado que TLR4 desencadena la señalización después de la reticulación de los alelos de TLR4 quiméricos a través de dominios extracelulares heterólogos. Se amplificaron los dominios citoplasmáticos de cada uno (incluidos los TIR) por PCR y se colocaron adyacentes (5' y 3') a dos (2) genes FKBP12(V36) (genes (tambaleantes) F<sub>v</sub> and F<sub>v</sub>, que se unieron a la membrana plasmática usando una secuencia dirigida a la miristoilación de c-Src. Se han desarrollado proteínas quiméricas que tienen un tercer gen FKBP para mejorar la oligomerización.

45 Además, se han generado versiones quiméricas de adaptadores de PRR inducibles MyD88 y TRIF fusionando estas proteínas citoplasmáticas a dos (2) FKBP. Finalmente, los dominios CARD en tándem de los PRR citoplasmáticos, NOD2 y RIG-I, se han fusionado a los FKBP en tándem.

50 Estas construcciones y ensayos de indicadores se describen a continuación.

#### Construcciones

(i) *iTLR inducibles*: Se amplificaron los TLR3, 4, 7, 8 y 9 por PCR a partir de ADNc derivado de MoDC. Los cebadores de PCR estaban flanqueados por los sitios de restricción *Xho*I y *Sa*I para permitir la clonación en 5' y 3' de FKBP en tándem en los sitios *Xho*I y *Sa*I, respectivamente, de pSH1/M-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-E<sup>1,2</sup>. Los cebadores usados fueron (a) 5TLR3cX (5'-cgatcactcgaggctggaggatattttttattgg-3') y 3TLR3cS (5'-tgatcggctgcagatgtacagagttttggatccaagtg-3'), dando pSH1/M-TLR3-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-E y pSH1/M-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-TLR3-E; (b) 5TLR4cX (5'-cgatcactcgagtataagttctattttcacctgatgcttc-3') y 3TLR4cS (5'-tgatcggctgcagatagatgttcttctccaattg-3') dando pSH1/M-TLR4-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-E y pSH1/M-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-TLR4-E; (c) 5TLR7cS (5'-cgatcagctgcagcatgtgtgtatatttaccatttctg-3') y 3TLR7cS (5'-tgatcggctgcagcaccgtttcctgaacacctgac-3'), dando pSH1/M-TLR7-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-E y pSH1/M-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-TLR7-E; (d) 5TLR8cX (5'-cgatcactcgaggatgtttgtttatataatgtgtg-3') y 3TLR8cS (5'-tcggctgcagctattgcttaatggaatgcacatac-3'), dando pSH1/M-TLR8-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-E y pSH1/M-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-TLR8-E; (e) 5TLR9cX (5'-cgatcactcgaggacctgtgactgctccacc-3') y 3TLR9cS (5'-tgatctgtcagctcggcctgggtccctggc-3'), dando pSH1/M-TLR9-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-E and pSH1/M-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-TLR9-E. Se confirmaron todas las inserciones por secuenciación y para el tamaño apropiado mediante transferencia Western al epítipo de hemaglutinina (HA) de 3' (E). M, secuencia dirigida a la miristoilación de c-Src (restos 1-14). pSH1, vector de expresión. Además, se añadió un tercer dominio F<sub>v</sub> unido a *Xho*I/*Sa*I a los sitios *Xho*I de pSH1/M-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-

TLR4-E y pSH1/M-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-TLR8-E para obtenerse pSH1/M-F<sub>v</sub>2-F<sub>vis</sub>-TLR4-E y pSH1/M-F<sub>v</sub>2-F<sub>vis</sub>-TLR8-E, respectivamente, para mejorar la oligomerización.

Para reflejar fielmente la señalización fisiológica de TLR4, se amplificó el TLR4 de 2,5 kb de longitud completa mediante PCR a partir de ADNc de TLR4 (del laboratorio de Medzhitov) usando los cebadores unidos a *SacI* y *XhoI* 5hTLR4 (5'-aatctaccgcgccaccatgatgtctgcctcgcgcctg-3') y 3hTLR4 (5'-tcagttctcgaggatagatgttgcctcctgccaattg-3'), respectivamente. Se subclonó el producto de PCR de 2.546 pb en pCR-Blunt-TOPO y se secuenció. Se digirió con *SacI*/*XhoI* la inserción verificada secuencialmente y se subclonó en pSH1/M-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-E digerido con *SacI*/*XhoI* (y "CIPped"), dando **pSH1/hTLR4-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-E**. Se añadió un Fv adicional al sitio de *XhoI*, dando **pSH1/hTLR4-F<sub>v</sub>2-F<sub>vis</sub>-E**.

(ii) *iTLR4-CD40 compuesto inducible*: Se amplificó por PCR el dominio citoplasmático de CD40 humano unido a *XhoI*-*SaI* de 191 pb con los cebadores hCD405X (5'-atatactcgagaaaaagggtggccaagaagccaacc-3') y hCD403Sns (5'-acatagtcgacctgtctcctgcactgagatg-3') y se subclonó en el sitio *SaI* de pSH1/hTLR4-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-E y pSH1/hTLR4-F<sub>v</sub>2-F<sub>vis</sub>-E, obteniéndose **pSH1/hTLR4-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-CD40-E** y **pSH1/hTLR4-F<sub>v</sub>2-F<sub>vis</sub>-CD40-E**.

(iii) *iNOD2 inducible*: se amplificó por PCR el extremo amino de ~ 800 pb del NOD2 de PRR (que contenía los dominios CARD en tándem) con los cebadores unidos a *XhoI*/*SaI* 5NOD2X (5'-atagcactcgagatgggggaagagggtggtcag-3') y 3NOD2Sb (5'-cttcatgtcgcgacctccaggacattctctgtg-3'), y se subclonó en los sitios *XhoI* y *SaI* de pSH1/M-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-E, dando **pSH1/M-NOD2-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-E** y **pSH1/M-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-NOD2-E=Fv NOD2**.

(iv) *iRIG-I inducible*: se amplificó por PCR el extremo amino de ~ 650 pb de RIG-I de la ARN helicasa (que contenía los dominios CARD en tándem) con los cebadores unidos a *XhoI*/*SaI* 5RIGX (5'-atagcactcgagaccaccgagcagcgcagcag-3') y 3RIGS (5'-cttcatgtcgcacaatctgtatgacagaagttccatc-3'), y se subclonó en los sitios *XhoI* y *SaI* de pSH1/M-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-E, dando **pSH1/M-RIGI-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-E** y **pSH1/M-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-RIGI-E=Fv RIG-I**.

(v) *iMyD88 inducible*: se amplificó por PCR el adaptador de PRR inducible que contiene TIR humano MyD88 (~ 900 pb) a partir de ADNc de 293 usando los cebadores unidos a *XhoI*/*SaI* 5MyD88S (5'-acatcaactcgagatggctgcaggaggtcccg-3') y 3MyD88S (5'-actcatagtcgaccaggacaaggccttggaag-3'), y se subclonó en los sitios *XhoI* y *SaI* de pSH1/M-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-E, dando **pSH1/M-MyD88-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-E** y **pSH1/M-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-MyD88-E**, respectivamente.

(vi) *iTRIP inducible*. se amplificó por PCR el adaptador de PRR inducible que contiene TIR humano TRIF2 (~ 2.150 pb) a partir de ADNc de 293 usando los cebadores unidos a *XhoI*/*SaI* 5TRIFX (5'-acatcaactcgagatggcctgcacaggcccatcac-3') y 3TRIFS (5'-actcatagtcgactctgcctcctgcgtcttctg-3'), y se subclonó en pSH1/M-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-E digerido con *SaI*, dando **pSH1/M-F<sub>v</sub>-F<sub>vis</sub>-TRIF-E**.

(vii) *IFN $\beta$ -SEAP*: se amplificó por PCR el promotor de IFN $\beta$  mínimo a partir de ADN genómico, usando los cebadores 5IFN $\beta$ MI (5'-aactagacgcgtactactaaatgtaaagacataggaaaac-3') y 3IFN $\beta$ H (5'-gactgaagcctaacacgaacagtgcctactac-3'). Se subclonó el fragmento digerido con *MluI*-*HindIII* en un plásmido de indicador de SEAP menos el promotor.

Se dirigieron ciertas construcciones específicamente a las balsas de lípidos de la membrana plasmática usando secuencias de miristoilación de Fyn, así como el dominio dirigido a la membrana PIP2 de TIRAP.(5).

Ensayos de fosfatasa alcalina secretada (SEAP): los ensayos de indicadores se realizaron en células Jurkat-TAG humanas (linfocitos T) o 293 (células epiteliales embrionarias de riñón) o células RAW264.7 (macrófagos) murinas. Se sometieron las células Jurkat-TAG (10<sup>7</sup>) en crecimiento en fase logarítmica a electroporación (950 mF, 250 V) con 2 mg de plásmido de expresión y 2 mg del plásmido indicador NF-kB-SEAP<sup>3</sup> o IFN $\beta$ -TA-SEAP (véase anteriormente). Se transfectaron células 293 o RAW264.7 (~ 2 x 10<sup>5</sup> células por placa de 35 mm) en la fase logarítmica con 6 ml de FuGENE-6 en medio de crecimiento. Tras 24 h, las células transformadas se estimularon con CID. Después de 20 horas más, se ensayaron los sobrenadantes para determinar la actividad de SEAP como se ha descrito anteriormente<sup>3</sup>.

Cultivo de tejidos: se cultivaron células Jurkat-TAG y RAW264.7 en medio RPMI 1640, suero bovino fetal al 10 % (FBS), HEPES 10 mM (pH 7,4), penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 mg/ml). Se cultivaron células 293 en medio de Eagle modificado por Dulbecco, FBS al 10 % y pen-estrep.

Análisis de transferencia Western Se determinó la expresión proteica mediante transferencia Western usando anticuerpos contra el marcador común de epítipo de hemaglutinina (HA).

## Resultados

El iTLR4 quimérico con el motivo dirigido a la membrana PIP2 se activa 2 veces. La construcción codificó dos dominios de unión al ligando. Sin embargo, el resto de los iTLR no son inducidos a niveles robustos por CID en las células 293, RAW o D2SC1, como se observa en ensayos con indicadores. Esto podría atribuirse a los diversos

requisitos de dirección a la membrana de los iTLR. Por lo tanto, los presentes inventores desarrollaron Nod2 inducible y RIG-1, que son PRR citoplasmáticos que no necesitan dirigirse a la membrana plasmática. Mientras que iNod2 se activó 2 veces por el fármaco dimerizante en las células 293, no se observa dicho en las células RAW 264.7 células. Con la adición de concentraciones crecientes de CID, la actividad de iNod2 disminuye en las células RAW. También el efecto de iNod2 e iCD40 untos, sobre la activación de NF-kappaB, es aditivo en las células 293 (Figura 7). iRIG-1 se activa 2,5 veces (Figura 8). Las versiones inducibles de las moléculas de adaptador PRR inducible de longitud completa MyD88 y TRIF, que son los mediadores primarios de la señalización cadena abajo de los TLR están en el proceso de selección.

10 *Citas a las que se hace referencia en el ejemplo y que proporcionan información técnica adicional*

1. Xie X. et al. "Adenovirus-mediated tissue-targeted expression of a caspase-9-based artificial death switch for the treatment of prostate cancer". *Cancer Res* 61, 6795-804. (2001).
2. Fan, L., Freeman, K. W., Khan, T., Pham, E. y Spencer, D. M. en *Human Gene Therapy* 2273-2285 (1999).
- 15 3. Spencer, D. M., Wandless, T. J., Schreiber, S. L. y Crabtree, G. R. "Controlling signal transduction with synthetic ligands". *Science* 262, 1019-1024 (1993).
4. Thompson, B. S., P. M. Chilton, J. R. Ward, J. T. Evans y T. C. Mitchell. 2005. "The Low-Toxicity Versions Of Lps, Mpl Adjuvant And Rc529, Are Efficient Adjuvants For Cd4+ T Cells". *J Leukoc Biol* 78:1273-1280.
5. Salkowski, C. A., G. R. Detore y S. N. Vogel. 1997. "Lipopolysaccharide And Monophosphoryl Lipid A Differentially Regulate Interleukin-12, Gamma Interferon, And Interleukin-10 Mrna Production In Murine Macrophages". *Infect Immun* 65:3239-3247.
- 20 6. Beutler, B. 2004. "Inferences, Questions And Possibilities In Toll-Like Receptor Signalling". *Nature* 430:257-263.
7. Werts, C., S. E. Girardin y D. J. Philpott. 2006. Tir, Card y Pypin: "Three Domains For An Antimicrobial Triad". *Cell Death Differ* 13:798-815.
- 25 8. Kagan, J. C. y R. Medzhitov. 2006. "Phosphoinositide-Mediated Adapter Recruitment Controls Toll-Like Receptor Signaling". *Cell* 125:943-955.

30 *Ejemplo 10: Inducción dependiente del fármaco de la actividad de NF-Kappa B en células transfectadas con iRIG-I, iCD40 e iNOD2*

Se transfectaron células 293 con 1 microgramo de construcción de indicador NF-KappaB-SEAP + 1 microgramo de construcción de PRR inducible usando el reactivo de transfección Fugene 6. Las transfecciones se realizaron en una placa de 6 pocillos a  $1 \times 10^6$  células/pocillo o transfección.

Se transfectaron células Jurkat TAg con 2 microgramo de construcción de indicador NF-KappaB-SEAP + 3 microgramos de construcción de PRR inducible usando electroporación a 950 microF y 0,25 kV. Las células se transfectaron a  $10 \times 10^6$  células/transfección.

24 horas más tarde, se sembraron las células en una placa de 96 pocillos con 2 concentraciones diferentes de AP20187 (100 nM y 1.000 nM). Después de 24 horas más de incubación a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, se recogieron los sobrenadantes y se analizaron para determinar la actividad de SEAP mediante incubación con sustrato de SEAP, fosfato de 4-metilumbiliferilo (MUP). Se determinó la fluorescencia a una excitación de 355 nm y emisión de 460 nm usando un lector de placas FLUOstar Optima (BMG Labtech).

Para los experimentos con iNOD2 y de combinación, las transfecciones se normalizaron para el ADN total usando un vector de expresión "vacío", pSH1/S-Fv'-Fvls-E.

Las Figuras 11-14 son gráficos que muestran la inducción dependiente del fármaco de la actividad de NF-kappaB y los recuentos de indicador de SEAP. Cada gráfico es representativo de un experimento individual separado.

Con el fin de aclarar los gráficos, algunos de los vectores fueron renombrados para las figuras.

Fv'RIG-I = pSH1-Fv'Fvls-RIG-I = pSH1/M-Fv'-Fvls-RIG-I  
 Fv'NOD2 = pSH1-Fv'Fvls-NOD2 = pSH1/M-Fv'-Fvls-NOD2-E  
 Fv'2NOD2 = pSH1-Fv'2Fvls-NOD2  
 Fv'NOD2+ = pSH1-Fv'Fvls-NOD2 (igual que la secuencia de NOD2 de Nunez)  
 Fv'CD40 = pSH1-Fv'Fvls-CD40.

60 *Ejemplo 11: MyD88 inducible y MyD88-CD40 compuesto activan NF-kappaB en células 293*

Se diseñó un conjunto de construcciones para expresar receptores inducibles, incluyendo una versión truncada de MyD88, que carecía del dominio TIR. Se transfectaron células 293 junto con un indicador de NF-kappaB, y se realizó un ensayo de indicador de SEAP esencialmente como se ha descrito en Spencer, D. M., Wandless, T. J., Schreiber, S. L. y Crabtree, G. R. "Controlling signal transduction with synthetic ligands". *Science* 262, 1019-1024 (1993). El vector originalmente diseñado fue pBJ5-M-MyD88L-Fv'Fvls-E. PShuttleX-M-MyD88L-Fv'Fvls se usó para fabricar el

adenovirus. Ambos vectores se ensayaron en ensayos de SEAP. Después de 24 horas, se añadió AP20187, y después de 20 horas más, se ensayó el sobrenadante celular para determinar la actividad SEAP. Los gráficos relativos a estas construcciones químéricas y a la activación se proporcionan en las Figuras 16 y 17. Los resultados se muestran en la Figura 18.

- 5 Construcciones
- Control: Transfectado solo con indicador de NF-kappaB
- 10 TLR4on: pShuttleX-CD4/TLR4-L3-E: CD4/TLR4L3-E es una versión constitutiva de TLR4 que contiene el dominio extracelular de CD4 de ratón en tándem con los dominios transmembrana y citoplasmático de TLR4 humano (como se ha descrito en Medzhitov R. Preston-Hurlburt P., Janeway C. A. Jr. "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity". Nature. 24 de Julio de 1997:388(6640):394-7.) seguido de tres enlazadores de 6 aminoácidos y un epítipo HA.
- 15 iMyD88: contiene M-MyD88L-Fv'Fvls-E  
iCD40: contiene M-Fv'-Fvls-CD40-E  
iCD40T: contiene M-Fv'-Fv'-Fvls-CD40-E - iCD40T contiene un Fv' extra (FKBP con tambaleo en la valina)  
iMyD88:CD40: contiene M-MyD88L-CD40-Fv'Fvls-E  
iMyD88:CD40T: contiene M-MyD88LCD40-Fv'Fv'Fvls-E - contiene un Fv' extra en comparación con iMyD88:CD40.

20 *Ejemplo 12: CD40-MyD88, CD40-RIG-1 y CD40.NOD2 inducibles*

Se diseñaron las siguientes construcciones y se ensayaron en el sistema indicador de NF-kappaB. Se transfectaron células 293 células junto con un indicador de NFkappaB y una de las construcciones. Tras 24 horas, se añadió AP20187, y después de 3 horas más (Figura 19) o 22 horas (Figura 20), se ensayó el sobrenadante celular para determinar la actividad de SEAP. Aproximadamente 20-24 horas después de la transfección, las células se trataron con el fármaco dimérico AP20187. Aproximadamente 20-24 horas después del tratamiento con el fármaco dimérico, las células se trataron con el sustrato SEAP 4-metilumbeliferil fosfato (MUP). Después de una incubación durante la noche (de 16 a 22 horas), se registraron los recuentos de SEAP en una máquina FLUOStar OPTIMA.

- 30 MyD88LFv'FvlsCD40: se fabricó en la estructura principal de pBJ5 con la secuencia miristoilación cadena arriba de MyD88L  
Fv'FvlsCD40MyD88L: se fabricó en la estructura principal de pBJ5 con la secuencia miristoilación cadena arriba de Fv'.
- 35 MyD88LCD40Fv'Fvls: se fabricó en la estructura principal de 2 vectores (pBJ5) con la secuencia miristoilación cadena arriba de MyD88L  
CD40Fv'FvlsMyD88L: se fabricó en la estructura principal de pBJ5 con la secuencia miristoilación cadena arriba de CD40.  
Fv'2FvlsCD40stMyD88L: es una construcción en la que una secuencia de parada detrás de CD40 evitó la traducción de MyD88L. También se denominó iCD40T.  
Fv'2Fvls incluye 2 copias de Fv', separadas por una secuencia gtcgag.  
MyD88LFv'Fvls
- 40 Fv'FvlsMyD88L: se fabricó en la estructura principal de pBJ5 con la secuencia miristoilación cadena arriba de Fv'.  
Fv'FvlsCD40: está disponible en pBJ5 y pShuttleX
- 45 CD40Fv'Fvls: está disponible en la estructura principal de pBJ5 con la secuencia miristoilación cadena arriba de CD40.  
MFv'Fvls: : está disponible en la estructura principal de pBJ5 con la secuencia miristoilación inducida con la M.  
Fv'FvlsNOD2: pBJ5-Sn-Fv'Fvls-NOD2-E en la estructura principal de pBJ5 sin secuencia de miristoilación, contiene 2 FKBP seguidos de 2 dominios CARD de NOD2 y el epítipo HA.
- 50 Fv'FvlsRIG-1: pBJ5-Sn-Fv'Fvls-RIG-I-E en la estructura principal de pBJ5 sin secuencia de miristoilación, contiene 2 FKBP seguidos de 2 dominios CARD de RIG-I y el epítipo HA.

En las Figuras 30, 31 y 32, se presentan ejemplos de mapas de construcción para las versiones de pShuttleX usadas para la producción de adenovirus. Los expertos en la materia conocen los métodos de modificación de estas construcciones para producir otras construcciones usadas en los métodos y en las composiciones que se describen en el presente documento.

*Ejemplo 13: La transfección adenovírica de MyD88L de células 293T produce la expresión de proteínas*

60 Se construyeron las siguientes construcciones pShuttleX para la producción de adenovirus:

pShuttleX-MyD88L-Fv'Fvls-E  
pShuttleX-MyD88LCD40-Fv'Fvls-E  
pShuttleX-CD4/TLR4-L3-E

65

L3 indica tres enlazadores de 6 aminoácidos que tienen la secuencia de ADN:  
 GGAGGCGGAGGCAGCGGAGGTGGCGGTTCCGGAGGCGGAGGTTCT  
 Secuencia de proteína: GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer  
 E es un epítipo HA.

El adenovirus recombinante se obtuvo usando métodos conocidos por los expertos en la materia, y esencialmente como se describe en He, T. C., S. Zhou, *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95(5):2509-14.

Para cada uno de los ensayos de adenovirus, se ensayaron lisados en bruto de varias placas de virus para determinar la expresión de proteínas mediante transferencia Western. Las partículas víricas fueron liberadas de los sedimentos celulares suministrados por el Vector Core en el Baylor College of Medicine (dirección mundial de <http://vector.bcm.tmc.edu/>) mediante congelación-descongelación de los sedimentos tres veces. Se sembraron células 293 a  $1 \times 10^6$  células por pocillo de una placa de 6 pocillos. 24 horas después del cultivo, se lavaron las células dos veces con medio DMEM libre de suero con antibiótico, seguido de la adición de 25 microlitros o 100 microlitros de lisado del virus a la monocapa celular en 500 microlitros de medio libre de suero. 2 horas más tarde, se añadieron 2,5 ml de DMEM suplementado con suero a cada pocillo de la placa de 6 pocillos.

De 24 a 48 horas más tarde, se recogieron las células, se lavaron dos veces con  $1 \times$  PBS y se volvieron a suspender en tampón de lisis RIPA (que contenía PMSF 100 micromolar) (disponible, por ejemplo, en Millipore o Thermo Scientific). Se incubaron las células sobre hielo durante 30 minutos con agitación cada 10 minutos, seguido de una centrifugación a 10.000 g durante 15 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se mezclaron con tampón SDS Laemmli más beta-mercaptoetanol en una proporción de 1:2, se incubaron a 100 °C durante 10 minutos, se cargaron en un gel SDS y se sonicaron sobre una membrana de nitrocelulosa usando un anticuerpo para el epítipo HA. Los resultados se muestran en las Figuras 21 y 22. Los lisados celulares restantes se almacenaron a -80 °C para su futuro uso. Las células se transdujeron por separado con cada uno de los virus, en concreto, Ad5-iMyD88 y Ad5-TLRon por separado.

#### *Ejemplo 14: Expresión de IL-12p70 en células transducidas con adenovirus MyD88L*

Se sembraron células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) a  $0,25 \times 10^6$  células por pocillo de una placa de 48 pocillos después de lavar dos veces con medio RPMI libre de suero con antibiótico. Las células se transdujeron con 6 microlitros de lisado de virus en bruto en 125 microlitros de medio libre de suero. 2 horas después, se añadieron 375 microlitros de RPMI suplementado con suero a cada pocillo de la placa de 48 pocillos. 48 horas más tarde, se recogieron los sobrenadantes y se analizaron usando un kit de ELISA de IL-12p70 de ratón (BD OptEIA (BD BioSciences, Nueva Jersey). Se realizaron ensayos por duplicado para cada muestra, con o sin la adición de AP21087 100 nM. CD40-L es un ligando de CD40, un miembro de la familia de los TNF que se une al receptor de CD40. LPS es lipopolisacárido. Los resultados se muestran en la Figura 23. Los resultados de una repetición del ensayo se muestran en la Figura 24, se añadió lisado adenovírico en bruto a 6,2 microlitros por 0,25 millones de células. La Figura 25 muestra los resultados de un ensayo adicional, en el que se usó más lisado vírico, 12,5 microlitros por 0,25 millones de células para infectar las BMDC.

#### *Ejemplo 15: Actividades de iRIG-1, iNOD2 e iTRIF inducibles*

Se transfectó un microgramo de cada uno de pBJ5-Fv'Fvls-RIG-1 y pBJ5-Fv'Fvls-CD40 en células 293 con un microgramo de indicador de NF-kappaB-SEAP, y se analizaron las células para determinar la actividad indicadora en el tratamiento con una dosis creciente de fármaco dimérico AP20187. También se ensayó una construcción pBJ5-RIG-1-Fv'Fvls. Los resultados se muestran en la Figura 26. Los resultados muestran que iRIG-1 pudo funcionar bien con iCD40 como se demuestra por los efectos aditivos observados en el ensayo de indicador de NF-kappaB reportero cuando se transfectaron ambas construcciones de iRIG-1 e iCD40 a células 293.

Se transfectó un microgramo de pBJ5-Fv'Fvls-RIG-1 en células 293 con 1 microgramo de indicador de IFNbeta-SEAP, y se analizaron las células para determinar la actividad indicadora en el tratamiento con diluciones semilogarítmicas de fármaco dimérico AP20187. De manera simultánea, también se ensayó la construcción de iTRIF (pBJ5-Fv'Fvls-TRIF) transfectando cantidades crecientes en células 293. PBJ5-M-Fv'Fvls-TRIF-E - se fabricó en la estructura principal de pBJ5 con una secuencia de miristoilación, 2 FKBP, TRIF de longitud completa y un epítipo HA. Los resultados se muestran en las Figuras 27 y 28. Los resultados demuestran que iTRIF activa constitutivamente NF-kappaB, y, en mayor medida, indicadores IFNbeta en células 293.

Se realizó un ensayo similar usando iNOD2, como se muestra en la Figura 29. Los resultados muestran que el iNOD2 activa NF-kappaB de una manera dependiente del fármaco. Esta activación de NF-kappa B aumenta con la adición de un tercer dominio FKBP a iNOD2 (iNOD2Turbo). PBJ5-Sn-Fv'Fv'Fvls-NOD2-E - se fabricó en la cadena principal de pBJ5, y contiene una secuencia de miristoilación, 3 FKBP, 2 dominios CARD de NOD2 y un epítipo HA.

*Ejemplo 16: Expresión de IL-12p70 en células dendríticas derivadas de monocitos humanos transducidos con Adenovirus MyD88L*

Se sembraron células dendríticas derivadas de monocitos humanos inmaduras (moDC) a  $0,25 \times 10^6$  células por pocillo de una placa de 48 pocillos después de lavar dos veces con medio RPMI libre de suero con antibiótico. Las células se transdujeron con diferentes multiplicidades de infección (MOI) de adenovirus AD5-iMyD88.CD40, y se estimularon con el fármaco dimérico AP20187 100 nM. El virus usado fue una versión optimizada del lisado vírico usado en los Ejemplos 13 y 14. 48 horas más tarde, se cosecharon los sobrenadantes y se ensayaron en un ensayo de IL12p70 ELISA. La Figura 33 representa los resultados de esta titulación.

Se sembraron moDC humanos inmaduros (moDC) a  $0,25 \times 10^6$  células por pocillo de una placa de 48 pocillos después de lavar dos veces con medio RPMI libre de suero con antibiótico. A continuación, se transdujeron las células con cualquiera de Ad5f35-iCD40 (10.000 VP/célula); Ad5-iMyD88.CD40 (MOI de 100); Ad5.iMyD88 (MOI de 100) o Ad5-TLR4on (MOI de 100), y se estimularon con 1 microgramo/mililitro de LPS cuando se indica, y fármaco dimérico AP20187 100 nM, donde se indica en la Figura 34. 48 horas más tarde, los sobrenadantes fueron recogidos y ensayados en un ensayo ELISA de IL12p70.

Se produjo Ad5f35-iCD40 usando pShuttleX-ihCD40 (también conocido como M-Fv'-Fvls-hCD40; pShuttleX-M-Fv'-Fvls-hCD40). MyD88, como se indica en las Figuras 33 y 34, es la misma versión truncada de MyD88 que la versión indicada como MyD88L en el presente documento. El adenovirus indicado como Ad5.iMyD88 se produjo usando pShuttleX-MyD88L-Fv'Fvls-E. El adenovirus indicado como Ad5-iMyD88.Cd40 se produjo usando pShuttleX-MyD88LCD40-Fv'Fvls-E. El adenovirus indicado como Ad5-TLR40n se produjo usando pShuttleX-CD4/TLR4-L3-E.

*Ejemplo 17: Transformación no vírica de células dendríticas*

Se construye un vector plasmídico que comprende la secuencia de iMyD88-CD40 unida operativamente a la secuencia de Fv'Fvls, tal como, por ejemplo, la inserción pShuttleX-MyD88LCD40-Fv'Fvls-E. La construcción plasmídica también incluye los siguientes elementos reguladores unidos operativamente a la secuencia MyD88LCD40-Fv'Fvls-E: promotor, codón de iniciación, codón de parada, señal de poliadenilación. El vector también puede comprender una secuencia potenciadora. Las secuencias MyD88L, CD40 y Fv'Fvls también pueden modificarse usando técnicas sintéticas conocidas en la materia para incluir codones optimizados.

Se sembraron células dendríticas derivadas de monocitos humanos inmaduros (MoDC) a  $0,25 \times 10^6$  células por pocillo de una placa de 48 pocillos después de lavar dos veces con medio RPMI libre de suero con antibiótico. Las células se transducen con el vector plasmídico usando cualquier método apropiado conocido por los expertos en la materia tales como, por ejemplo, nucleofección usando kits AMAXA, electroporación, fosfato cálcico, DEAE-dextrano, carga por sonicación, transfección mediada por liposomas, transfección mediada por receptor o bombardeo de microproyectiles.

Las vacunas de ADN se tratan en, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. n.º 20080274140, publicada el 6 de noviembre de 2008. La secuencia de iMyD88-CD40 unida operativamente a la secuencia de Fv'Fvls se inserta en un vector de vacuna de ADN, que también comprende, por ejemplo, elementos reguladores necesarios para la expresión de la proteína química iMyD88-Cd40 Fv'Fvls en el tejido hospedador. Estos elementos reguladores incluyen, pero sin limitación, promotor, codón de iniciación, codón de parada, señal de poliadenilación y potenciador, y se pueden optimizar los codones que codifican la proteína química.

*Ejemplo 18: Evaluación de células dendríticas transformadas con MyD88CD40 in vivo usando un modelo de tumor de ratón*

Las células dendríticas de médula ósea se transdujeron usando vectores adenovíricos como se presenta en los ejemplos de la presente invención. Se ensayaron estas BMDC transducidas en cuanto a su capacidad para inhibir el crecimiento tumoral en un modelo EG.7-OVA. Se inocularon células EG.7-OVA ( $5 \times 10^5$  células/100 ml) en el lado derecho de ratones hembra C57BL/6. Se pulsaron las BMDC de todos los grupos con 50 microgramos/ml de proteína ovoalbúmina y se activaron como se ha descrito anteriormente. Aproximadamente 7 días después de la inoculación de las células tumorales, se descongelaron y se inyectaron por vía subcutánea las BMDC en las patas traseras de los ratones.

El crecimiento tumoral se monitorizó dos veces por semana en ratones de todos los grupos. La sangre periférica de ratones aleatorios de todos los grupos se analizó mediante tinción con tetrámero y mediante ensayos de CTL *in vivo*. La Tabla 1 presenta el diseño experimental, que incluye células dendríticas no transducidas (grupos 1 y 2), células dendríticas transducidas con un vector de adenovirus de control (grupo 3), células dendríticas transducidas con un vector que codifica la región citoplasmática de CD40 (grupo 4), células dendríticas transducidas con un vector MyD88 truncado (grupos 5 y 6) y células dendríticas transducidas con el vector MyD88 truncado con CD40 quimérico (grupos 7 y 8). Las células se estimularon con AP-1903, LPS o ligando de CD40 como se indica.

Tabla 1

Grupo	Tratamiento	Nivel de dosis	ADV vp/célula	[LPS]	[AP1903] (in vitro)	Otros reactivos (in vitro)	Vía de administración (Vacyba)	Vía de administración (AP1903)	N
1	PBS	NA			N/D		SC	N/D	6
2	DC + CD40L + LPS	1,5 x 10 <sup>6</sup> células <sup>b</sup>		200 ng/ml	N/D	CD40L 2 µg/ml	SC	N/D	6
3	DC + Ad-Luc + LPS + AP1903	1,5 x 10 <sup>6</sup> células 5 mg/kg (AP1903)	20K wGJ	200 ng/ml	100 nM		sc	IP	6
4	DC + Ad-iCD40 + LPS + AP1903	1,5 x 10 <sup>6</sup> Células 5 mg/kg (AP1903)	20K wGJ	200 ng/ml	100 nM		SC	IP	6
5	DC + Ad-iMyD88 + AP1903	1,5 x 10 <sup>6</sup> Células 5 mg/kg (AP1903)	20K wGJ		100 nM		SC	IP	6
6	DC + Ad-iMyD88	1,5 x 10 <sup>6</sup> células	20K wGJ		N/A		SC	N/A	6
7	DC + Ad-iMyD88.CD40 + AP1903	1,5 x 10 <sup>6</sup> Células 5 mg/kg (AP1903)	20K wGJ		100 nM		SC	IP	6
8	DC + Ad-iMyD88.CD40	1,5 x 10 <sup>6</sup> células	20K wGJ		N/D		SC	N/A	6

Antes de la vacunación de los ratones inoculados con el tumor, se midieron los niveles de IL-12p70 de las células dendríticas transducidas *in vitro*. Los niveles de IL-12p70 se presentan en la Figura 35.

5 La Figura 36 muestra un gráfico de la inhibición del crecimiento tumoral observada en los ratones transducidos. La inoculación de las células dendríticas transducidas con MyD88 y tratadas con AP1903 dio como resultado una velocidad de curado de 1/6, mientras que la inoculación de las células dendríticas transducidas con MyD88-CD40 sin AP1903 dio como produjo una tasa de curación de 4/6, indicando un potencial efecto independiente del dimerizante. El asterisco indica una comparación de Luc+LPS+AP y iCD40MyD88+LPS+/-AP1903. La Figura 36 también proporciona fotografías de ratones vacunados representativos.

15 La Figura 37 presenta un análisis de la frecuencia mejorada de la inducción de los linfocitos T CD8+ específicos de Ag en ratones tratados con células dendríticas transducidas con iMyD88-CD40. Se recogieron células periféricas de médula ósea de ratones tratados diez días después de la vacunación el día 7. Se tiñeron las PBMC con anti-mCD8-FITC y H2-K<sup>b</sup>-SIINFEKL-tetrámero-PE y se analizaron por citometría de flujo.

20 La Figura 38 presenta la frecuencia aumentada de linfocitos T CD8+ y linfocitos T<sub>H</sub>1 CD4+ específicos de Ag inducidos en ratones después del tratamiento con células dendríticas transducidas con iMyD88-CD40. Se sacrificaron tres ratones de todos los grupos experimentales 18 días después de la vacunación. Los esplenocitos de tres ratones por grupo se "agruparon" entre sí y se analizaron mediante ensayo ELISPOT de IFN-gamma. Se recubrieron placas MultiScreen-HA de Millipore con 10 microgramos/ml de anticuerpo AN18 anti-IFN-gamma de ratón (Mabtech AB, Inc., Nacka, Suecia). Se añadieron esplenocitos y se cultivaron durante 20 horas a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % en medio ELISpot completo (RPMI, FBS al 10 %, penicilina, estreptomycin). Los esplenocitos se incubaron con 2 microgramos/ml de OT-1 (SIINFEKL), OT-2 (ISQAVHAAHAEINEAGR) o péptido TRP-2 (péptido control no dirigido). Después de los lavados, se aplicó un segundo anticuerpo monoclonal biotinilado al IFN-gamma de ratón (R4-6A2, Mabtech AB) a los pocillos a una concentración de 1 microgramo/ml, seguido de la incubación con complejos de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Vector Laboratories, Ltd. , Burlingame, CA). Después se desarrollaron placas con el sustrato de fosfatasa alcalina, 3-amino-9-etilcarbazol (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO). Se calificó el número de puntos en los pocillos por ZellNet Consulting, Inc. con un sistema lector ELISPOT automatizado (Carl Zeiss, Inc, Thornwood NY).

35 La Figura 39 presenta un esquema y los resultados de un ensayo de linfocitos citotóxicos *in vivo*. Dieciocho días después de las vacunaciones con DC, se realizó un ensayo de CTL *in vivo*. Se usaron esplenocitos sin tratamiento previo singénicos como células diana *in vivo*. Se marcaron por incubación durante 10 minutos a 37 °C bien con células CFSE 6 micromolar (CFSE<sup>hi</sup>) o CFSE 0,6 micromolar en medio de CTL (células CFSE<sup>lo</sup>). Las células CFSE<sup>hi</sup> se pulsaron con péptido OT-1 SIINFEKL y las células FSE<sup>lo</sup> se incubaron con el péptido TRP2 de control. Se inyectó por vía intravenosa una mezcla de 4 x 10<sup>6</sup> de CFSE<sup>hi</sup> más 4 x 10<sup>6</sup> células CFSE<sup>lo</sup> a través de la vena de la cola. Después de 16 horas de incubación *in vivo*, se recogieron esplenocitos y se analizaron las suspensiones monocelulares para la detección y cuantificación de las células marcadas con CFSE. La Figura 40 es un gráfico que presenta la actividad de CTL mejorada inducida por células dendríticas transducidas con iMyD88-CD40 en los ratones inoculados. La Figura 41 muestra los histogramas en bruto de los CTL para muestras seleccionadas, que

indican la actividad de CTL *in vivo* mejorada inducida por las células dendríticas transducidas con iMyD88-CD40.

La Figura 42 presenta los resultados de la tinción intracelular para los linfocitos T<sub>H</sub>2 productores de IL-4 en ratones vacunados con las células transducidas. Se reconstituyeron esplenocitos de ratones (células agrupadas de tres ratones) con 2 microgramos/ml de péptido OT-2. Las células se incubaron durante 6 horas con 10 microgramos/ml de brefeldina A para suprimir la secreción. A continuación, las células se fijaron y se permearon y se analizaron por tinción intracelular con anti-mIL-4-APC y anti-mCD4-FITC.

Se volvió a evaluar el vector adenovirico que comprende la secuencia iCD40-MyD88 para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento tumoral en un modelo de ratón. En el primer experimento, se midió la inhibición del crecimiento tumoral dependiente de fármacos después de la inoculación con células dendríticas modificadas con el vector de MyD88 truncado con CD40 inducible (Ad-iCD40.MyD88). Se pulsaron células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6 con 10 microgramos/ml de ovoalbúmina y se transdujeron con 20.000 partículas víricas/célula (VP/c) de las construcciones adenoviricas Ad5-iCD40.MyD88, Ad5-iMyD88 o Ad5-Luc (control). Las células se activaron con 2 microgramos/ml de CD40L, 200 ng/ml de LPS o 50 nM de fármaco dimerizante AP1903. Se inocularon 5x10<sup>5</sup> células de timoma E.G7-OVA en la espalda de los ratones C57BL/6 (N = 6/grupo). Cuando los tumores alcanzaron ~5 mm de diámetro (día 8 después de la inoculación), se trataron los ratones con inyecciones subcutáneas de 2 x 10<sup>6</sup> BMDC. Al día siguiente, después de las vacunaciones celulares, se trataron los ratones con inyecciones intraperitoneales de 5 mg/kg de AP1903. El crecimiento del tumor se monitorizó dos veces por semana. Los resultados se muestran en la Figura 43A. En otro conjunto de experimentos, se establecieron tumores de E.G7-OVA como se ha descrito anteriormente. Se trataron ratones (N = 6/grupo) con 2 x 10<sup>6</sup> BMDC (ovoalbúmina pulsada) y se transdujeron con 20.000 o 1.250 VP/c de Ad5-iCD40.MyD88. Las BMDC de los grupos de AP1903 fueron tratadas *in vitro* con AP1903 50 nM. Al día siguiente, después de las vacunaciones celulares, los ratones de los grupos de AP1903 se trataron por inyección intraperitoneal con 5 mg/kg de AP1903. Los resultados se muestran en la Figura 43B. La Figura 43C representa los niveles relativos de IL-12p70 producidos después de un cultivo durante una noche de las diversas células de vacuna antes de la crioconservación. Se ensayó IL-12p70 mediante el ensayo ELISA.

Se analizó la sangre de ratones inmunizados con las células dendríticas modificadas de médula ósea para determinar la frecuencia y función de los linfocitos T específicos del tumor usando tinción con tetrámero. La Figura 44A muestra los resultados de un experimento en el que ratones (N = 3-5) fueron inmunizados por vía subcutánea con BMDC pulsadas con ovoalbúmina y activadas como se describe en la Figura 43. Una semana después de la vacunación, se tiñeron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con anti-mCD8-FITC y SIINFEKL-H2-K<sup>b</sup>-PE, y se analizaron por citometría de flujo. La Figura 44B muestra los resultados de un ensayo de CTL *in vivo* que se realizó en ratones vacunados con BMDC como se ha descrito anteriormente. Dos semanas después de la inmunización con BMDC, se pulsaron los esplenocitos de ratones C57BL/6 singénicos con el péptido de control TRP-2, SVYDFFVWL, o con el péptido diana, diana SINFEKL, y se usaron como dianas *in vivo*. La mitad de los esplenocitos se marcó con células CFSE 6 micromolar (células CFSE<sup>hi</sup>) o CFSE 0,6 micromolar (células CFSE<sup>lo</sup>). Se pulsaron células CFSE<sup>hi</sup> con péptido OT-1 (SIINFEKL) y se incubaron células CFSE<sup>lo</sup> con el péptido (SVYDFFVWL) TRP-2 de control. Se inyectó por vía intravenosa una mezcla de 4 x 10<sup>6</sup> células CFSE<sup>hi</sup> más 4 x 10<sup>6</sup> células CFSE<sup>lo</sup> a través de la vena de la cola. Al día siguiente, se recogieron esplenocitos y se analizaron suspensiones monocelulares para la detección y cuantificación de células marcadas con CFSE. Las Figuras 44C y 44D muestran los resultados de un ensayo de IFN-gamma. Se analizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de ratones portadores de E.G7-OVA tratados como se describe en la Figura 43, en ensayos ELISpot de IFN-gamma con 1 microgramo/ml de péptido SIINFEKL (OT-1), ISQAVHAAHAEINEAGR (OT-2) y péptidos TRP-2 (irrelevantes restringidos a H2-K<sup>b</sup>). Se evaluó el número de linfocitos productores de IFN-gamma en pocillos por triplicado. Se agruparon las células de tres ratones por grupo y se analizaron mediante ELISpot de IFN-gamma en pocillos por triplicado. Los ensayos se realizaron dos veces.

La Figura 45 presenta los resultados de un ensayo de linfocitos citolíticos naturales realizado usando esplenocitos de ratones tratados como se ha indicado en el presente ejemplo. Los esplenocitos obtenidos de ratones (3 por grupo) se usaron como efectores (E). Se marcaron células Yac-1 con <sup>51</sup>Cr y se usaron como dianas (T). La línea celular EL-4 se usó como un control irrelevante.

La Figura 46 presenta los resultados de un ensayo para la detección de linfocitos citotóxicos específicos del antígeno. Los esplenocitos obtenidos de ratones (3 por grupo) se usaron como efectores (E). Se marcaron células EG.7-Ova con <sup>51</sup>Cr y se usaron como dianas (T). La línea celular EL-4 se usó como un control irrelevante.

La Figura 47 presenta los resultados de la activación de células humanas transducidas con el vector adenovirico de MyD88 truncado con CD40 inducible (iCD40.MyDD). Se purificaron células dendríticas (día 5 del cultivo) de tres diferentes donantes HLA-A2+ mediante el método de adhesión a plástico, y se transdujeron con 10.000 VP/célula de Ad5-iCD40.MyD88, Ad5-iMyD88 o Ad5-Luc. Las células se activaron con AP1903 100 nM o 0,5 microgramos/ml de CD40L y 250 ng/ml de LPS o cóctel de maduración convencional (MC), que contenía TNF-alfa, IL-1 beta, IL-6 y prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>). Los linfocitos T CD8+ autólogos se purificaron por selección negativa usando microperlas y se cultivaron junto con DC pulsadas con 10 microgramos/ml de péptido FLAGPRALV MAGE-3 restringido a HLA-A2 a proporción de (DC:T) de 1:5 durante 7 días. Cinco días después de la segunda serie de estimulación con DC

(al día 7), los linfocitos T se ensayaron en el ensayo ELISpot de IFN-gamma convencional. Las células se pulsaron con 1 microgramos/ml de MAGE-3 o péptido PSMA irrelevante restringido a HLA-A2 (PSMA-P2). Los experimentos se realizaron por triplicado.

5 Las Figuras 48 y 49 presentan los resultados de un ensayo de migración celular. Se transdujeron mBMDC con 10.000 VP/célula de Ad5.Luciferase o Ad5.iMyD88.CD40 en presencia de Gene Jammer (Stratagene, San Diego, California) y se estimularon con AP1903 100 nM (AP) o LPS (1 microgramo/ml) durante 48 horas. Se analizó la expresión de CCR7 en la superficie de células dendríticas CD11c+ mediante tinción intracelular usando un anticuerpo conjugado con PerCP.Cy5.5.

10 La Figura 48 muestra los resultados del experimento, con cada ensayo presentado por separado; la Figura 49 proporciona los resultados en el mismo gráfico.

*Ejemplo 19: Ejemplos de secuencias de ácido nucleico y aminoácidos particulares*

15 SEQ ID NO: 1 (secuencia de ácido nucleico codificante de CD40 humano; n.º de acceso del Genbank NM\_001250; la región citoplasmática está indiada en negrita)

```

1 gccaaaggctg gggcagggga gtcagcagag gcctcgctcg ggcgccagc ggtcctgccg
 61 cctggtctca cctcgctatg gttcgtctgc ctctgcagtg cgtcctctgg ggctgcttgc
121 tgaccgctgt ccatccagaa ccaccctctg catgcagaga aaaacagtac ctaataaaca
181 gtcagtgcctg ttctttgtgc cagccaggac agaaactggt gagtgactgc acagagttca
241 ctgaaacgga atgccttctt tgggggaaa gogaattcct agacacctgg aacagagaga
301 cacactgcca ccagcacaaa tactgcgacc ccaacctagg gctcggggtc cagcagaagg
361 gcacctcaga aacagacacc atctgcacct gtaagaagg ctggcactgt acgagtgagg
421 cctgtgagag ctgtgtctct caccgctcat gctcgcccgg ctttggggtc aagcagattg
481 ctacaggggt ttctgatacc atctgcgagc cctgcccagt cggctcttc tccaatgtgt
541 catctgcttt cgaaaaatgt cacccttggc caagctgtga gaccaaagac ctggttgcg
601 aacaggcagg cacaacaag actgatgttg tctgtgttcc ccaggatcgg ctgagagccc
661 tgggtggtgat cccatcctc ttggggatcc tgtttgccat cctcttgggt ctggtcttta
721 tcaaaaagggt ggccaagaag ccaaccaata aggcccccca cccaagcag gaaccccagg
781 agatcaattt tcccgacgat cttcctggct ccaactctgc tgctccagtg caggagactt
841 tacatggatg ccaaccggtc acccaggagg atggcaaga gagtcgcatc tcaagtgcagg
901 agagacagtg aggctgcacc caccaggag tgtggccacg tgggcaaca ggcagtggc
961 cagagagcct ggtgctctg ctgctgtggc gtgaggggga ggggctggca ctgactgggc
1021 atagctccc gctctgcct gcacccctgc agtttgagac aggagacctg gcactggatg
1081 cagaaacagt tcacttgaa gaacctctca cttcacctg gagccatcc agtctccaa
1141 cttgtattaa agacagaggc agaagtttg tgggtggtg gttggggtat ggttagtaa
1201 tatccaccag acctccgat ccagcagttt ggtgccaga gaggcatcat ggtggcttcc
1261 ctgcgcccag gaagccatat acacagatgc ccattgcagc attgtttgtg atagtgaaca
1321 actggaagct gcttaactgt ccatcagcag gagactggct aaataaaatt agaatatatt
1381 tatacaacag aatctcaaaa acactgttga gtaaggaaaa aaaggcatgc tgctgaatga
1441 tgggtatgga actttttaa aaagtacatg cttttatgta tgtatatgc ctatggatat
1501 atgtataaat acaatagca tcatatattg atataacaag gttctggaa ggttacacag
1561 aaaaccaca gctcgaagag tgggtacgct tgggtgggg aagaagggtc tggggg
    
```

20 SEQ ID NO: 2 (secuencia de aminoácidos codificante de CD40 humano; la región citoplasmática está indiada en negrita)

```

MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPQGKLVSDCTEFTETECLPC
GESEFLDTWNRETHCHQHKEYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLH
RSCSPGFVQKIATGVSdTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTD
VVCQPQDRLRALVWPIIFGILFAILLVLFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTA
APVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ
    
```

25

SEQ ID NO: 3 (secuencia de nucleótidos codificante de PSMA)

gcgatccgcatcatcatcatcacagctccggaatcgagggacgtgtaaatcctccaatgaagctactaacattactccaaa  
gcataatatgaaagcattttggatgaattgaaagctgagaacatcaagaagttctatataattttacacagataccacatttagcag  
gaacagaacaaaactttcagctgcaaagcaaatccacagtggaagaattggcctggattctgttgagctagcacattatg

atgtcctgtgtcctacccaaataagactcatcccaactacatctcaataattaatgaagatggaatgagattttcaacacatcattatt  
tgaaccacctcctccaggatgaaaatgttcggatattgtaccacctttcagtgcttctcctcaaggaatgccagagggcgatct  
agtgtatgtaactatgacgaactgaagactctttaaattggaacgggacatgaaaatcaattgctctgggaaaatgtaattgcca  
gatatgggaaagtgttcagaggaaataagggttaaaaatgccagctggcaggggcaaaggagtcattctctactccgacctgct  
gactactttgctcctggggtgaagtctatccagatggttgaatctcctggaggtggtgccagctggaataatcctaaatctgaat  
ggtgcaggagacctctcacaccaggttaccagcaaatgaatgcttataggcgtggaattgcagaggctgtgttctccaagt  
attcctgttcatcaattggatactatgatgcacagaagctcctagaaaaaatgggtggctcagcaccaccagatagcagctggag  
aggaagtctcaaagtgccctacaatgttggacctggcttactggaacttttctacacaaaaagcaagatgcacatccactctacc  
aatgaagtgaacaagaattacaatgtgataggtactctcagaggagcagtggaaccagacagatatgctattctgggaggtcacc  
gggactcatgggtgttgggtgattgacctcagagtgagcagctgttgttcatgaaattgtgaggagctttggaactgaaaaa  
ggaaggggtggagacctagaagaacaattttgttcaagctgggatgcagaagaattggtctctgttctactgagtgggcagag  
gagaattcaagactcctcaagagcgtggcgtggcttataatgctgactcatctatagaaggaaactacactctgagagttgatg  
tacaccgctgatgtacagcttggatcacacaacctaaacaaaagagctgaaaagccctgatgaaggctttgaaggcaaatctctttag  
aaagtggactaaaaaagctcctccccagagttcagtggaatgccaggataagcaaatgggatctggaatgattttgaggtgt  
tctccaacgacttgaattgctcaggcagagcacggtatactaaaaatgggaaacaaacaaatcagcggctatccactgtatc  
acagtgctatgaaacatagagttggtgaaaagtttatgatccaatgtttaaatacacctcactgtggccaggttcgaggaggg  
atggtgtttgagctagccaattccaatagtgctccctttgatgtcgagattatgctgtagtttaagaaagtagctgacaaaatctacagt  
attctatgaaacatccacaggaaatgaagacatagctgtatcatttgattcactttttctgcagtaagaattttacagaaattgctt  
caagttcagtgagagactccaggactttgacaaaagcaagcatgtcatctatgctccaagcagccacaacaagatgcagggga  
gtcattcccaggaatttatgatgctgttgaattgaaagcaaatggacctccaaggcctgggggagaagtgaagagacagat  
ttatgttcagccttcacagtgaggcagctgcagagactttgagtgaaagtagcctaagcggccgcatagca

5

SEQ ID NO: 4 (secuencia de aminoácidos de PSMA codificada por SEQ ID NO: 3)

MWNLLHETDSAVATARPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKSSNEATNITPKHNMKAFL  
DELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFLDSVELAHYDVLLSYPNKTHTP  
NYISIINEDGNEIFNTSLFEPPIPGYENVSDIVPPFAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLE  
RDMKINCSGKVIARYGKVFVRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGG  
GVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYDAQKLLKMGSSA  
PPDSSWRGSLKVPYNVGPFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILG  
GHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFLLGSTEWAE  
ENSRLQLERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWT  
KKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYE  
LVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFEANSLVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEM  
KTYSVSFDLSFAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSKHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDIES  
KVDPSKAWGEVQRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA

10

SEQ ID NO: 5 (secuencia de nucleótidos de MyD88L con enlazadores Sall)

**gtcgac**atggctgcaggaggtcccggcgggggtctcggcccccgtctcctccacatcctccctccctgctctcaacat  
gcgagtgccgcccgcctgtctgttctgaacgtgcggacacaggtggcggccgactggaccgctggcggaggagatgg  
actttgagtacttgagatccggcaactggagacacaagcggaccccactggcaggctgctggacgctggcagggagcgcct  
ggcgcctctgtaggcccactgctcagagctgcttaccagctgggcccgcgacgacgtgctgctggagctggaccagcattgag  
gaggattgcaaaaaglatatctgaagcagcagcaggagggtgagaagcctttacaggtggccgctgtagacagcagtg  
cccacggacagcagagctggcgggcatcaccacactgatgaccccctggggcatatgcctgagcgtttgatgcttcatctgct  
attgcccagcagacat**gtcgac**

SEQ ID NO: 6 (secuencia de aminoácidos de MyD88L)

MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEYLEIR  
QLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRLELLTKLGRDDVLELGPSIEEDCQKYILK  
QQQEEAEKPLQVAADVSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMPERFDFAFICYCPSDI

5

SEQ ID NO: 7 (secuencia de Fv'Fvls con enlazadores de XhoI/SalI, (codones tambaleantes en minúscula en Fv'))

**ctcgag**GGcGTcCAaGTcGAaACcATtagtCCcGGcGAtGGcaGaACaTTtCCtAAaaGgGGaCAaA  
CaTGtGTcGTcCAITAtACaGGcATGTgGAgGAcGGcAAaAAGGTgGAcagtagtaGaGAtcGc  
AAaAAaCCtTTcAAaTTcATGtTgGGaAAaCAaGAaGTcATtaGgGGaTGGGAgGAgGGcGT  
gGcCAaATGtccGTcGGcCAacGcGcTAAgCTcACcATcagcCCcGAcTAcGCaTAcGGcGcT  
ACcGGaCAtCCcGGaATtATtCCcCCtCAcGcTACctTgGTgTTtGAcGTcGAaCTgtTgAAgCT  
cGA**agtcgaggg**gagtgaggtggaaccatctccccaggagacggcgacactccccagcgcggccagacctgc  
gtggtgactacaccgggatgctgaagatggaagaaagttgattcctccgggacagaaacaagcccttaagttagtgc  
taggcaagcaggaggtgatccgaggtcgggaagaaggggtgcccagatgagtggtgagagagccaaactgacta  
tatctccagattatgctatggtgccactgggcaccagcatcatcccaccacatgccactctctctgatgtggagcttct  
aaaactggaatctggcggtggatccggag**tcgag**

10 SEQ ID NO: 8 (secuencia de péptido FV'FVLS)

GlyValGlnValGluThrIleSerProGlyAspGlyArgThrPheProLysArgGlyGlnThrCysValValHisTyrThr  
GlyMetLeuGluAspGlyLysLysValAspSerSerArgAspArgAsnLysProPheLysPheMetLeuGlyLysGln  
nGluValIleArgGlyTrpGluGluGlyValAlaGlnMetSerValGlyGlnArgAlaLysLeuThrIleSerProAspTyrA  
laTyrGlyAlaThrGlyHisProGlyIleIleProProHisAlaThrLeuValPheAspValGluLeuLeuLysLeuGlu  
(ValGlu)

GlyValGlnValGluThrIleSerProGlyAspGlyArgThrPheProLysArgGlyGlnThrCysValValHisTyrThr  
GlyMetLeuGluAspGlyLysLysValAspSerSerArgAspArgAsnLysProPheLysPheMetLeuGlyLysGln  
nGluValIleArgGlyTrpGluGluGlyValAlaGlnMetSerValGlyGlnArgAlaLysLeuThrIleSerProAspTyrA  
laTyrGlyAlaThrGlyHisProGlyIleIleProProHisAlaThrLeuValPheAspValGluLeuLeuLysLeuGluSer  
GlyGlyGlySerGly

SEQ ID NO: 9 (secuencia de nucleótidos de TRIF con enlazadores de XhoI/SalI)

15

**ctcgagatggcctgcacaggccatcacttctagcgccttcgacattctaggtgcagcaggccaggacaagctctgtatctgaa**  
gcacaaactgaagaccccaagcggcctgcccagggtgcccaggggagcagcctcctgcatgcatggttctctgaagctgggcccaggaaa  
ctgaggccaggatctctctagaggcattgaaggccgatgcggtggcccggctggtggcccggcagtgggctggcgtggacagca  
ccgaggaccagaggagccccagatgtctctgggctgtggcccgtgtaccacctgctggctgaggagaagctgtgccccg  
cctcgtcgggacgtggcctaccaggaagccgtccgcaccctcagctccagggacgaccaccggctgggggaacttcaggat  
gaggcccgaaccgggtggggtgggacattgctggggtaccagggagcatccggacgctccagccaatctgggctgctccca  
ccatcctcggtcttgcctctgggaccaggagcctcccacgccccattgacgggtttcggactggagccaaggggtgctccctgca  
tccactggcagccctgctcctggccagcaactggaaatcagccagctcccctaccatgcccttctcagcctgcaccgcagccc  
acatgggcccagcaagctctgtgacgacccccaggccagcttggtgcccagcctgtccccgggtggctgcccaggagcctgagga  
gatgagctggcccatcgggggagattgccagcccaccagagctgccaagcagcccacctctgggcttccogaagtgggccc

cagatgcaacctccactggcctccctgataccccgcagctccagaaaccagcaccaactaccagtgaggagtcacccgagggg  
tctgcaggccccagctctctcccttgctattctggagccgggtcaaaaaaccctgtctgtcaaagaccagaogccactccaacttt  
ctgtagaagataccacctctcaataccaagcogtggccacctctccaccaccccagaaacatccccctctctctctctctc  
ctcctcatctactcctgttcagctcacctgacccccctcctcctgttccctctcctcctggaatcatcatcggaacagaaattctataact  
ttgtgatcctccacgcccagggcagacgaacacatcgccctgcgggttcggggagaagctggaggcccttggcgtgcccagcgggg  
ccacctctgcgaggatttccagggtccggggcgcggggagctgagctgcctgcaggacgcatagaccactcagcttcatcatc  
ctactctcacctccaactcgactgtgcctgagcctgcaccagggtgaaccaagccatgatgagcaacctcacgogacaggggtc  
gccagactgtgtcatccccctcctgcccctggagagctccccggcccagctcagctccgacacggccagcctgtctccgggctgg  
tgcggctggacgaacactcccagatcttgcgaggaaggtggccaacacctcaagccccacaggctcaggcccgaaggcc  
atgtggaggaaggaacaggacaccogagccctgcgggaacagagccaacacctggacgggtgagcggatgcaggcggcggc  
actgaacgcagcctactcagcctacctccagagctacttgcctaccaggcacagatggagcagctccagggtggctttgggagcc  
acatgtcatttgggactggggcgccctatggggctcgaatgcccttgggggcccagggtgccctgggagccccgccacctttcca  
ctggccgggggtgcccgcagccgccacccctgcacgcattggcaggctggccccccccaccgcccctccccacagccagcagc  
ctttccacagtcactgccctcccgcagctcccagccttccctacggcctcaccgcacccccctcagagcccagggtgcaaccct  
cattatccaccacgcacagatggtacagctggggctgaacaaccacatgtggaaccagagaggggtcccaggcggccgaggac  
aagacgcaggaggcagaag**gtcgac**

SEQ ID NO: 10 (secuencia de péptido TRIF)

MetAlaCysThrGlyProSerLeuProSerAlaPheAspIleLeuGlyAlaAlaGlyGlnAspLysLeuLeuTyrLeuLy  
sHisLysLeuLysThrProArgProGlyCysGlnGlyGlnAspLeuLeuHisAlaMetValLeuLeuLysLeuGlyGln  
GluThrGluAlaArgIleSerLeuGluAlaLeuLysAlaAspAlaValAlaArgLeuValAlaArgGlnTrpAlaGlyValA  
spSerThrGluAspProGluGluProProAspValSerTrpAlaValAlaArgLeuTyrHisLeuLeuAlaGluGluLys  
LeuCysProAlaSerLeuArgAspValAlaTyrGlnGluAlaValArgThrLeuSerSerArgAspAspHisArgLeuG  
lyGluLeuGlnAspGluAlaArgAsnArgCysGlyTrpAspIleAlaGlyAspProGlySerIleArgThrLeuGlnSerA  
snLeuGlyC

5

SEQ ID NO: 11 (secuencia de nucleótidos de RIG-I (dominios de CARD subrayados) con enlazadores de XhoI/Sall:

**Ctcgagaccaccgagcagcgacgcagcctgcaagcctccaggattatccggaagaccctggaccctacctacatcctgag**  
**ctacatggccccctggttagggaggaagaggtgcagtataatcaggctgagaaaaacaacaagggcccaatggaggctgcca**  
**cacttttctcaagttcctgttggagctccaggaggaaggctggtccgtggccttttggatgccctagaccatgcaggttattctggacttt**  
**atgaagccattgaaagttgggatttcaaaaaaattgaaaagttggaggagtagattacttttaaaacgtttacaaccagaatttaa**  
**aaccagaattatcccaaccgatatacttctgatctgtgaaatgtaataatcaggaatgtgaagaaattctacagatttctctacta**  
**aggggatgatggcagggtgcagagaaattggtggaatgccttctcagatcagacaagggaaaactggcccaaaactttgaaacttg**  
**ctttggagaaagaaaggaacaagttcagtgaaactgtggattgtagagaaaggtataaaagatggtgaaacagaagatcttgagga**  
**taagatggaaacttctgacatacagatt**gtcgac****

10

SEQ ID NO: 12 (secuencia de péptido RIG-1 (dominios de CARD subrayados))

TTEQRRLQAFQDYIRKTLDPTYILSYMAPWFREEEVQYIQAEKNNKGPMEAATLFLKFLLEL  
QEEGWFRGFLDALDHAGYSGLYEAIESWDFKKIEKLEEYRLLKRLQPEFKTRIIPTDIISDLSE  
CLINQECEELQICSTKGMAGAEKLVCELLRSDKENWPKTLKLALEKERNKFSSELWIVEKGIK  
DVETEDLEDKMETSDIQI

15

SEQ ID NO: 13 (secuencia de nucleótidos de NOD2 (dominios de CARD subrayados) con enlazadores de XhoI/Sall:

**Ctcgagatgggggaagaggggtggtcagcctctcacgatgaggaggaaagagcaagtgctcctcggacattctccgggtgtg  
 aaatgtgctcgaggaggctttcaggcacagaggagccagctggtcgagctgctggtctcagggccctggaaggctcgagag  
 tgcctggaactggtgctgctggtggaggctcctcctgggaggactacgagggctccacctctgggcccagcctctcccactg  
 ccaggcgccttctggacaccgctggaataaagggtacttgggctgctcagaagctcatcgcgctgcccagaaggcccaggccg  
 acagccagtcccccaaagctgcatggctgctgggacccccactgctccaccagcccagagcctgacaggtcaccggccagcc  
 attgtcaggaggctccacagccatgtggagaacatgctggacctggcatgggagcggggttctgcaaccagtatgaatgtatga  
 aatcaggttgcgatcttcacaccgctccagagggcaagaaggctgctgatcttccacggtgaaagcgaatggattggctgctt  
 cctctacaacatgttcaggaattaccagctccattggccctgcttggaaagctgccacatgcaagaagtatatggccaagctgag  
 gaccacggtgctgctcagctcgtcctcagtaacctatgatggagcagagacgctcctgctggaggacatatacacagagaatgt  
 cctggaggtcgtcgac**

5 SEQ ID NO: 14 (secuencia de péptido NOD2 (dominios de CARD subrayados))

MetGlyGluGluGlyGlySerAlaSerHisAspGluGluGluArgAlaSerValLeuLeuGlyHisSerProGlyCysGl  
 uMetCysSerGlnGluAlaPheGlnAlaGlnArgSerGlnLeuValGluLeuLeuValSerGlySerLeuGluGlyPhe  
 GluSerValLeuAspTrpLeuLeuSerTrpGluValLeuSerTrpGluAspTyrGluGlyPheHisLeuLeuGlyGlnP  
 roLeuSerHisLeuAlaArgArgLeuLeuAspThrValTrpAsnLysGlyThrTrpAlaCysGlnLysLeulleAlaAlaA  
 laGlnGluAlaGlnAlaAspSerGlnSerProLysLeuHisGlyCysTrpAspProHisSerLeuHisProAlaArgAsp  
 LeuGlnSerHisArgProAlalleValArgArgLeuHisSerHisValGluAsnMetLeuAspLeuAlaTrpGluArgGly  
 PheValSerGlnTyrGluCysAspGluilleArgLeuProllePheThrProSerGlnArgAlaArgArgLeuLeuAspLe  
 uAlaThrValLysAlaAsnGlyLeuAlaAlaPheLeuLeuGlnHisValGlnGluLeuProValProLeuAlaLeuProL  
 euGluAlaAlaThrCysLysLysTyrMetAlaLysLeuArgThrThrValSerAlaGlnSerArgPheLeuSerThrTyr  
 AspGlyAlaGluThrLeuCysLeuGluAspIleTyrThrGluAsnValLeuGluVal

SEQ ID NO: 15 (secuencia de nucleótidos de MyD88)

10 atggctgcaggaggtcccggcgcggggtctgctggcccggtctcctccacatcctccctcccctggctgctctcaacatgcgagtg  
 cggcgccgctgctctgttctgaacgtgctggacacaggtggcgccgactggaccgctggcggaggagatggactttgagt  
 actggagatccggcaactggagacacaagcggacccactggcaggctgctggacgctggcagggagcgcctggcgccct  
 gtaggcgactgctcgagctgcttaccagctgggcccgcgacgctgctgctggagctgggacccagcattgaggaggattgc  
 caaaagtatatctgaagcagcagcaggaggagctgagaagcctttacaggtggccgctgtagacagcagtgcccacggac  
 agcagagctggcgggcatcaccacactgtatgacccctggggcatatgcctgagcgttctgatgcctcatctgctattgcccag  
 cgacatccagttgtgcaggagatgatccggcaactggaacagacaaaactatcgactgaagtgtgtgtctgaccgcatgtcct  
 gcctggcacctgtgtctgttctattgctagtgagctcatcgaagagggtgccgcccgatggtggtggtgtctctgatgattaccgca  
 gagcaaggaatgtgactccagaccaaattgcactcagcctctcctcagggtgccatcagaagcagctgatcccatcaagta  
 aggcaatgaagaagagtcccagcatcctgagggtcatcactgtctgcgactacaccaaccctgcaccaaactctgtgtctgga  
 ctgccttgccaaggcctgtcctgcc

SEQ ID NO: 16 (secuencia de péptido MyD88)

15 M A A G G P G A G S A A P V S S T S S L P L A A L N M R V R R L  
 S L F L N V R T Q V A A D W T A L A E E M D F E Y L E I R Q L E T Q  
 A D P T G R L L D A W Q G R P G A S V G R L L E L L T K L G R D D  
 V L L E L G P S I E E D C Q K Y I L K Q Q Q E E A E K P L Q V A A V  
 D S S V P R T A E L A G I T T L D D P L G H M P E R F D A F I C Y C  
 P S D I Q F V Q E M I R Q L E Q T N Y R L K L C V S D R D V L P G T  
 C V W S I A S E L I E K R C R R M V V V V S D D Y L Q S K E C D F Q  
  
 T K F A L S L S P G A H Q K R L I P I K Y K A M K K E F P S I L R F I  
 T V C D Y T N P C T K S W F W T R L A K A L S L P

20 Las citas de las patentes, solicitudes de patente, publicaciones y documentos anteriores no es una admisión de que cualquiera de los anteriores sea un estado de la técnica pertinente, ni tampoco constituye una admisión en cuanto al contenido o la fecha de estas publicaciones o documentos.

Se pueden realizar modificaciones a lo anterior sin apartarse de los aspectos básicos de la invención. Aunque la invención se ha descrito sustancialmente en detalle con referencia a una o más realizaciones específicas, los expertos habituales en la materia reconocerán que pueden realizarse cambios a las realizaciones desveladas específicamente en la presente solicitud, aunque estas modificaciones y mejoras están dentro del alcance y del espíritu de la invención.

La invención descrita ilustrativamente en el presente documento se puede poner en práctica de manera adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos no específicamente desvelados en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, en cada caso, en el presente documento, cualquiera de las expresiones "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" se puede reemplazar por cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones que se han empleado se usan como términos de descripción y no de limitación, y el uso de dichos términos y expresiones no excluye ningún equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, siendo posibles diversas modificaciones dentro del alcance de La invención reivindicada. El término "un", "uno" o "una" puede referirse a uno/a o a una pluralidad de los elementos que modifica (por ejemplo, "un reactivo" puede significar uno o más reactivos) a menos que sea contextualmente claro que se describe uno cualquiera de los elementos o más de uno de los elementos. El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere a un valor dentro del 10 % del parámetro subyacente (es decir, más o menos el 10 %), y el uso del término "aproximadamente" al principio de una cadena de valores modifica cada uno de los valores (es decir, "aproximadamente 1, 2 y 3" es aproximadamente 1, aproximadamente 2 y aproximadamente 3). Por ejemplo, un peso de "aproximadamente 100 gramos" puede incluir pesos entre 90 gramos y 110 gramos. Por lo tanto, se ha de entender que, aunque la presente invención se haya desvelado específicamente mediante realizaciones representativas y características opcionales, la modificación y la variación de los conceptos desvelados en el presente documento pueden ser usadas por los expertos en la materia, y dichas modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de la presente invención.

Las realizaciones de la invención se exponen en la/s reivindicación/es que se muestra/n a continuación.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES DE GENERACIÓN DE UNA RESPUESTA INMUNE MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE CD40 Y ADAPTADORES DE RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES

<130> BEL-2004-PC

<140> PCT/US2009/057738

<141> 21-09-2009

<150> 61/181.572

<151> 27-05-2009

<150> 61/153.562

<151> 18-02-2009

<150> 61/099.163

<151> 22-09-2008

<160> 53

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1616

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 633 470 T3

gccaaaggctg gggcagggga gtcagcagag gcctcgctcg ggcgcccagt ggtcctgccg 60  
 cctggtctca cctcgctatg gttcgtctgc ctctgcagtg cgtcctctgg ggctgcttgc 120  
 tgaccgctgt ccatccagaa ccaccactg catgcagaga aaaacagtac ctaataaaca 180  
 gtcagtgctg ttctttgtgc cagccaggac agaaactggg gagtgactgc acagagttca 240  
 ctgaaacgga atgccttcct tgcggtgaaa gcgaattcct agacacctgg aacagagaga 300  
 cacactgcca ccagcacaaa tactgcgacc ccaacctagg gcttcgggtc cagcagaagg 360  
 gcacctcaga aacagacacc atctgcacct gtgaagaagg ctggcactgt acgagtgagg 420  
 cctgtgagag ctgtgtcctg caccgctcat gctcgcccgg ctttggggtc aagcagattg 480  
 ctacaggggt ttctgatacc atctgcgagc cctgcccagt eggcttcttcc tccaatgtgt 540  
 catctgcttt cgaaaaatgt cacccttga caagctgtga gaccaaagac ctggttgtgc 600  
 aacaggcagg cacaaacaag actgatgttgc tctgtgggtcc ccaggatcgg ctgagagccc 660  
 tgggtggtgat ccccatcatc ttcgggatcc tgtttgccat cctcttggtg ctggtcttta 720  
 tcaaaaagggt ggccaagaag ccaaccaata agggccccca cccaagcag gaaccccagg 780  
 agatcaattt tcccgaagat cttcctggct ccaacactgc tgctccagtg caggagactt 840  
 tacatggatg ccaaccggtc acccaggagg atggcaaaga gagtcgcatc tcagtgcagg 900  
 agagacagtg aggctgcacc caccaggag tgtggccacg tgggcaaaca ggcagttggc 960  
 cagagagcct ggtgctgctg ctgctgtggc gtgaggggtga ggggctggca ctgactgggc 1020  
 atagctcccc gcttctgctt gcaccctgc agtttgagac aggagacctg gcaactggatg 1080  
 cagaaacagt tcaccttgaa gaacctctca cttcaccctg gagccccatcc agtctcccaa 1140  
 cttgtattaa agacagaggc agaagtttgg tgggtggtggg gttggggat ggtttagtaa 1200  
 tatccaccag accttccgat ccagcagttt ggtgcccaga gaggcacatc ggtggcttcc 1260  
 ctgccccag gaagccatat acacagatgc ccattgcagc attgtttgtg atagtgaaca 1320  
 actggaagct gcttaactgt ccatcagcag gagactggct aaataaaatt agaataatatt 1380  
 tatacaacag aatctcaaaa aactgttga gtaaggaaaa aaaggcatgc tgctgaatga 1440  
 tgggtatgga actttttaa aaagtacatg cttttatgta tgtatattgc ctatggatat 1500  
 atgtataaat acaatatgca tcatatattg atataacaag ggttctggaa gggtagacag 1560  
 aaaaccaca gctcgaagag tggtgacgtc tgggggtggg aagaagggtc tggggg 1616

<210> 2  
 <211> 277  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*:

<400> 2

5

10

ES 2 633 470 T3

Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu  
 20 25 30  
 Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val  
 35 40 45  
 Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu  
 50 55 60  
 Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His  
 65 70 75 80  
 Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr  
 85 90 95  
 Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr  
 100 105 110  
 Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly  
 115 120 125  
 Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu  
 130 135 140

ES 2 633 470 T3

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

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

Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu  
 180 185 190

Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile  
 195 200 205

Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn  
 210 215 220

Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp  
 225 230 235 240

Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His  
 245 250 255

Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser  
 260 265 270

Val Gln Glu Arg Gln  
 275

<210> 3  
 <211> 2096  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

gcggatccgc atcatcatca tcatcacagc tccggaatcg agggacgtgg taaatcctcc 60  
 aatgaagcta ctaacattac tccaagcat aatatgaaag catttttggga tgaattgaaa 120  
 gctgagaaca tcaagaagtt cttatataat ttacacaga taccacattt agcaggaaca 180  
 gaacaaaact ttcagcttgc aaagcaaatt caatcccagt ggaaagaatt tggcctggat 240  
 tctgttgagc tagcacatta tgatgtcctg ttgtcctacc caaataagac tcatccaac 300  
 tacatctcaa taattaatga agatggaaat gagattttca acacatcatt atttgaacca 360  
 cctcctccag gatatgaaaa tgtttcggat attgtaccac ctttcagtgc tttctctcct 420  
 caaggaatgc cagagggcga tctagtgtat gttaactatg cacgaaactga agacttcttt 480  
 aaattggaac gggacatgaa aatcaattgc tctgggaaaa ttgtaattgc cagatatggg 540  
 aaagttttca gaggaataa ggttaaaaat gccagctgg caggggccaaggagtcatt 600

10

ES 2 633 470 T3

ctctactccg accctgctga ctactttgct cctgggggtga agtcctatcc agatggttgg 660  
aatcttcctg gaggtggtgt ccagcgtgga aatatacctaa atctgaatgg tgcaggagac 720  
cctctcacac caggttacc cagcaaatgaa tatgcttata ggcgtggaat tgcagaggct 780  
gttggtcttc caagtattcc tgttcatcca attggatact atgatgcaca gaagctccta 840  
gaaaaaatgg gtggctcagc accaccagat agcagctgga gaggaagtct caaagtgccc 900  
tacaatgttg gacctggctt tactggaaac ttttctacac aaaaagtcaa gatgcacatc 960  
cactctacca atgaagtgac aagaatttac aatgtgatag gtactctcag aggagcagtg 1020  
gaaccagaca gatatgtcat tctgggaggt caccgggact catgggtgtt tgggtgtatt 1080  
gacctcaga gtggagcagc tgttgttcat gaaattgtga ggagctttgg aacactgaaa 1140  
aaggaagggg ggagacctag aagaacaatt ttgtttgcaa gctgggatgc agaagaattt 1200  
ggtcttcttg gttctactga gtgggcagag gagaattcaa gactccttca agagcgtggc 1260  
gtggcttata ttaatgctga ctcatctata gaaggaaact acactctgag agttgattgt 1320  
acaccgctga tgtacagctt ggtacacaac ctaacaaaag agctgaaaag ccctgatgaa 1380  
ggctttgaag gcaaattctt ttatgaaagt tggactaaaa aaagtccttc cccagagttc 1440  
agtggcatgc ccaggataag caaattggga tctggaaatg attttgaggt gttcttccaa 1500  
cgacttggaa ttgcttcagg cagagcacgg tatactaaaa attgggaaac aaacaaattc 1560  
agcggctatc cactgtatca cagtgtctat gaaacatatg agttggtgga aaagttttat 1620  
gatccaatgt ttaaataatca cctcactgtg gcccaggttc gaggagggat ggtgtttgag 1680  
ctagccaatt ccatagtgtc cccttttgat tgtcagagatt atgctgtagt ttaagaaag 1740  
tatgtgaca aaatctacag tatttctatg aaacatccac aggaaatgaa gacatacagt 1800  
gtatcatttg attcactttt ttctgcagta aagaatttta cagaaattgc ttccaagttc 1860  
agtgagagac tccaggactt tgacaaaagc aagcatgtca tctatgctcc aagcagccac 1920  
aacaagtatg caggggagtc attcccagga atttatgatg ctctgtttga tattgaaagc 1980  
aaagtggacc cttccaaggc ctggggagaa gtgaagagac agatttatgt tgcagccttc 2040  
acagtgcagg cagctgcaga gactttgagt gaagtagcct aagcggccgc atagca 2096

<210> 4  
<211> 719  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg  
1 5 10 15

10

Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe



ES 2 633 470 T3

Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val Gly  
 275 280 285

Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys  
 290 295 300

Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg  
 305 310 315 320

Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Thr Gly Asn  
 325 330 335

Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu Val  
 340 345 350

Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Pro  
 355 360 365

Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe Gly  
 370 375 380

Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg  
 385 390 395 400

Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile  
 405 410 415

Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr  
 420 425 430

Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala  
 435 440 445

Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val  
 450 455 460

Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu Thr Lys Glu  
 465 470 475 480

Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu Ser  
 485 490 495

Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg Ile  
 500 505 510

Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu  
 515 520 525

ES 2 633 470 T3

Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn  
 530 535 540

Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu  
 545 550 555 560

Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val  
 565 570 575

Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val  
 580 585 590

Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala  
 595 600 605

Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr  
 610 615 620

Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr  
 625 630 635 640

Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser  
 645 650 655

Lys His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu  
 660 665 670

Ser Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val  
 675 680 685

Asp Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala  
 690 695 700

Ala Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala  
 705 710 715

<210> 5  
 <211> 528  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 5

gtcgacatgg ctgcaggagg tcccggcgcg gggctctgcg ccccggtctc ctccacatcc 60  
 tcccttcccc tggctgctct caacatgcga gtgcggcgcc gcctgtctct gttcttgaac 120

gtgCGGacac aggtggcggc cgactggacc gcgctggcgg aggagatgga ctttgagtac 180  
 ttggagatcc ggcaactgga gacacaagcg gacccccactg gcaggctgct ggacgcctgg 240  
 cagggacgcc ctggcgcctc tgtaggccga ctgctcgagc tgcttaccaa gctgggcccgc 300  
 gacgacgtgc tgctggagct gggaccacgc attgaggagg attgccaaaa gtatatcttg 360  
 aagcagcagc aggaggaggc tgagaagcct ttacaggtgg ccgctgtaga cagcagtgtc 420  
 ccacggacag cagagctggc gggcatcacc acacttgatg accccctggg gcatatgcct 480  
 gagcgtttcg atgccttcat ctgctattgc cccagcgaca tcgtcgac 528

<210> 6  
 <211> 172  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 6

Met Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Ala Ala Pro Val Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Thr Ser Ser Leu Pro Leu Ala Ala Leu Asn Met Arg Val Arg Arg Arg  
 20 25 30  
 Leu Ser Leu Phe Leu Asn Val Arg Thr Gln Val Ala Ala Asp Trp Thr  
 35 40 45  
 Ala Leu Ala Glu Glu Met Asp Phe Glu Tyr Leu Glu Ile Arg Gln Leu  
 50 55 60  
 Glu Thr Gln Ala Asp Pro Thr Gly Arg Leu Leu Asp Ala Trp Gln Gly  
 65 70 75 80  
 Arg Pro Gly Ala Ser Val Gly Arg Leu Leu Glu Leu Leu Thr Lys Leu  
 85 90 95  
 Gly Arg Asp Asp Val Leu Leu Glu Leu Gly Pro Ser Ile Glu Glu Asp  
 100 105 110  
 Cys Gln Lys Tyr Ile Leu Lys Gln Gln Gln Glu Glu Ala Glu Lys Pro  
 115 120 125  
 Leu Gln Val Ala Ala Val Asp Ser Ser Val Pro Arg Thr Ala Glu Leu  
 130 135 140  
 Ala Gly Ile Thr Thr Leu Asp Asp Pro Leu Gly His Met Pro Glu Arg  
 145 150 155 160

ES 2 633 470 T3

Phe Asp Ala Phe Ile Cys Tyr Cys Pro Ser Asp Ile  
 165 170

5 <210> 7  
 <211> 678  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 7  
 ctcgagggcg tccaagtcga aaccattagt cccggcgatg gcagaacatt tcctaaaagg 60  
 ggacaaacat gtgtcgtcca ttatacaggc atgttgagg acggcaaaaa ggtggacagt 120  
 agtagagatc gcaataaacc tttcaaattc atgttgggaa aacaagaagt cattagggga 180  
 tgggaggagg gcgtggctca aatgtccgtc ggccaacgcg ctaagctcac catcagcccc 240  
 gactacgcat acggcgctac cggacatccc ggaattattc cccctcacgc taccttggtg 300  
 tttgacgtcg aactgttgaa gctcgaagtc gagggagtgc aggtggaaac catctcccca 360  
 ggagacgggc gcacctccc caagcgggc cagacctgcg tgggtgacta caccgggatg 420  
 cttgaagatg gaaagaaagt tgattcctcc cgggacagaa acaagccctt taagtttatg 480  
 ctaggcaagc aggaggtgat ccgaggctgg gaagaagggg ttgccagat gagtgtgggt 540  
 cagagagcca aactgactat atctccagat tatgcctatg gtgccactgg gcaccaggc 600  
 atcatccac cacatgccac tctcgtcttc gatgtggagc ttctaaaact ggaatctggc 660  
 ggtggatccg gagtcgag 678

15 <210> 8  
 <211> 222  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 8  
 Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro  
 1 5 10 15  
 Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp  
 20 25 30  
 Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe  
 25 35 40 45

ES 2 633 470 T3

Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala  
 50 55 60

Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr  
 65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr  
 85 90 95

Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Val Glu Gly Val Gln  
 100 105 110

Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly  
 115 120 125

Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys  
 130 135 140

Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly  
 145 150 155 160

Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala Gln Met Ser  
 165 170 175

Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly  
 180 185 190

Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr Leu Val Phe  
 195 200 205

Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 210 215 220

<210> 9  
 <211> 2148  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 9

ctcgagatgg cctgcacagg cccatcactt cctagcgcct tcgacattct aggtgcagca 60  
 ggccaggaca agctcttgta tctgaagcac aaactgaaga cccacgccc aggctgccag 120  
 gggcaggacc tctgcatgc catggttctc ctgaagctgg gccaggaaac tgaggccagg 180  
 atctctctag aggcattgaa ggccgatgcg gtggcccggc tggtgccccg ccagtgggct 240  
 ggcgtaggaca gcaccgagga cccagaggag ccccagatg tgtcctgggc tgtggcccg 300

ttgtaccacc	tgctggctga	ggagaagctg	tgccccgcct	cgctgcggga	cgtaggcctac	360
caggaagccg	tccgcaccct	cagctccagg	gacgaccacc	ggctggggga	acttcaggat	420
gaggccccgaa	accggtgtgg	gtgggacatt	gctggggatc	cagggagcat	ccggacgctc	480
cagtccaatc	tggtctgcct	cccaccatcc	tcggctttgc	cctctggggac	caggagcctc	540
ccacgccccca	ttgacggtgt	ttcggactgg	agccaagggg	gctccctgcg	atccactggc	600
agccctgcct	ccctggccag	caacttggaa	atcagccagt	cccctaccat	gcccttctc	660
agcctgcacc	gcagcccaca	tgggcccagc	aagctctgtg	acgacccccca	ggccagcttg	720
gtgcccgagc	ctgtccccgg	tggtgccag	gagcctgagg	agatgagctg	gccgccatcg	780
ggggagattg	ccagcccacc	agagctgcca	agcagcccac	ctcctgggct	tcccgaagtg	840
gccccagatg	caacctccac	tggcctccct	gatacccccg	cagctccaga	aaccagcacc	900
aactaccag	tggagtgcac	cgaggggtct	gcaggcccc	agtctctccc	cttgccatt	960
ctggagccgg	tcaaaaacc	ctgctctgtc	aaagaccaga	cgccactcca	actttctgta	1020
gaagatacca	cctctccaaa	taccaagccg	tgcccaccta	ctcccaccac	cccagaaaca	1080
tccccctctc	ctctctctcc	tctctcttca	tctactcett	gttcagctca	cctgaccccc	1140
tcctccctgt	tccttctctc	cctggaatca	tcatcggaac	agaaattcta	taactttgtg	1200
atcctccacg	ccagggcaga	cgaacacatc	gcctgcggg	ttcgggagaa	gctggaggcc	1260
cttggcgtgc	ccgacggggc	caccttctgc	gaggatttcc	aggtagccggg	gcgcggggag	1320
ctgagctgcc	tgcaggacgc	catagaccac	tcagctttca	tcatcctact	tctcacctcc	1380
aacttcgact	gtcgccctgag	cctgcaccag	gtgaaccaag	ccatgatgag	caacctcag	1440
cgacaggggt	cgccagactg	tgatcatccc	ttcctgcccc	tggagagctc	cccggccccag	1500
ctcagctccg	acacggccag	cctgctctcc	gggctggtgc	ggctggacga	acactcccag	1560
atcttcgcca	ggaaggtggc	caacaccttc	aagccccaca	ggcttcaggc	ccgaaaggcc	1620
atgtggagga	aggaacagga	cacccgagcc	ctgcgggaac	agagccaaca	cctggacggt	1680
gagcggatgc	aggcggcggc	actgaacgca	gcctactcag	cctacctcca	gagctacttg	1740
tcctaccagg	cacagatgga	gcagctccag	gtggcttttg	ggagccacat	gtcatttggg	1800
actggggcgc	cctatggggc	tcgaatgcc	tttgggggcc	aggtagccct	gggagccccg	1860
ccaccctttc	ccacttggcc	ggggtgcccc	cagccgccac	ccctgcacgc	atggcaggct	1920
ggcaccccc	caccgcctc	cccacagcca	gcagcctttc	cacagtact	gcccttcccc	1980
cagtccccag	ccttccctac	ggcctcacc	gcacccccctc	agagcccagg	gctgcaacct	2040
ctcattatcc	accacgcaca	gatggtacag	ctggggctga	acaaccacat	gtggaaccag	2100
agaggggtccc	aggcggcccga	ggacaagacg	caggaggcag	aagtcgac		2148

ES 2 633 470 T3

<210> 10  
 <211> 164  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 10

10

```

Met Ala Cys Thr Gly Pro Ser Leu Pro Ser Ala Phe Asp Ile Leu Gly
 1           5           10           15

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

Pro Arg Pro Gly Cys Gln Gly Gln Asp Leu Leu His Ala Met Val Leu
           35           40           45

Leu Lys Leu Gly Gln Glu Thr Glu Ala Arg Ile Ser Leu Glu Ala Leu
           50           55           60

Lys Ala Asp Ala Val Ala Arg Leu Val Ala Arg Gln Trp Ala Gly Val
 65           70           75           80

Asp Ser Thr Glu Asp Pro Glu Glu Pro Pro Asp Val Ser Trp Ala Val
           85           90           95

Ala Arg Leu Tyr His Leu Leu Ala Glu Glu Lys Leu Cys Pro Ala Ser
           100          105          110

Leu Arg Asp Val Ala Tyr Gln Glu Ala Val Arg Thr Leu Ser Ser Arg
           115          120          125

Asp Asp His Arg Leu Gly Glu Leu Gln Asp Glu Ala Arg Asn Arg Cys
           130          135          140

Gly Trp Asp Ile Ala Gly Asp Pro Gly Ser Ile Arg Thr Leu Gln Ser
145          150          155          160

Asn Leu Gly Cys
    
```

<210> 11  
 <211> 642  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

20

<400> 11

ES 2 633 470 T3

```

ctcgagacca ccgagcagcg acgcagcctg caagccttcc aggattatat ccggaagacc      60
ctggacccta cctacatcct gagctacatg gccccctggt ttagggagga agaggtgcag      120
tatattcagg ctgagaaaaa caacaagggc ccaatggagg ctgccacact ttttctcaag      180
ttcctgttgg agctccagga ggaaggctgg ttccgtggct ttttggatgc cctagaccat      240
gcaggttatt ctggacttta tgaagccatt gaaagttggg atttcaaaaa aattgaaaag      300
ttggaggagt atagattact tttaaaacgt ttacaaccag aatttaaaac cagaattatc      360
ccaaccgata tcattttctga tctgtctgaa tgtttaatta atcaggaatg tgaagaaatt      420
ctacagattht gctctactaa ggggatgatg gcagggtgcag agaaattggt ggaatgcctt      480
ctcagatcag acaaggaaaa ctggcccaa actttgaaac ttgctttgga gaaagaaagg      540
aacaagttca gtgaactgtg gattgtagag aaaggtataa aagatgttga aacagaagat      600
cttgaggata agatggaaac ttctgacata cagattgtcg ac                          642
    
```

5 <210> 12  
 <211> 210  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 12

```

Thr Thr Glu Gln Arg Arg Ser Leu Gln Ala Phe Gln Asp Tyr Ile Arg
1 5 10 15
Lys Thr Leu Asp Pro Thr Tyr Ile Leu Ser Tyr Met Ala Pro Trp Phe
20 25 30
Arg Glu Glu Glu Val Gln Tyr Ile Gln Ala Glu Lys Asn Asn Lys Gly
35 40 45
Pro Met Glu Ala Ala Thr Leu Phe Leu Lys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
50 55 60
Glu Glu Gly Trp Phe Arg Gly Phe Leu Asp Ala Leu Asp His Ala Gly
65 70 75 80
Tyr Ser Gly Leu Tyr Glu Ala Ile Glu Ser Trp Asp Phe Lys Lys Ile
85 90 95
Glu Lys Leu Glu Glu Tyr Arg Leu Leu Leu Lys Arg Leu Gln Pro Glu
100 105 110
    
```

ES 2 633 470 T3

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

Cys Leu Ile Asn Gln Glu Cys Glu Glu Ile Leu Gln Ile Cys Ser Thr  
 130 135 140

Lys Gly Met Met Ala Gly Ala Glu Lys Leu Val Glu Cys Leu Leu Arg  
 145 150 155 160

Ser Asp Lys Glu Asn Trp Pro Lys Thr Leu Lys Leu Ala Leu Glu Lys  
 165 170 175

Glu Arg Asn Lys Phe Ser Glu Leu Trp Ile Val Glu Lys Gly Ile Lys  
 180 185 190

Asp Val Glu Thr Glu Asp Leu Glu Asp Lys Met Glu Thr Ser Asp Ile  
 195 200 205

Gln Ile  
 210

<210> 13  
 <211> 789  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 13

ctcgagatgg gggaaagaggg tggttcagcc tctcacgatg aggaggaaag agcaagtgtc 60

ctcctcggac attctccggg ttgtgaaatg tgctcgcagg aggcttttca ggcacagagg 120

agccagctgg tcgagctgct ggtctcaggg tccttggaag gcttcgagag tgcctggac 180

tggctgctgt cctgggaggt cctctcctgg gaggactacg agggcttcca cctcctgggc 240

cagcctctct cccacttggc caggcgcctt ctggacaccg tctggaataa gggtaacttg 300

gcctgtcaga agctcatcgc ggctgcccaa gaagcccagg ccgacagcca gtcccccaag 360

ctgcatggct gctgggaccc ccactcgtct caccagccc gagacctgca gagtcaccgg 420

ccagccattg tcaggaggct ccacagccat gtggagaaca tgctggacct ggcattggag 480

cggggtttcg tcagccagta tgaatgtgat gaaatcaggt tgccgatctt cacaccgtcc 540

cagagggcaa gaaggctgct tgatcttgcc acggtgaaag cgaatggatt ggctgccttc 600

cttctacaac atgttcagga attaccagtc ccattggccc tgcttttggga agctgccaca 660

tgcaagaagt atatggccaa gctgaggacc acggtgtctg ctcagtctcg ctctctcagt 720

acctatgatg gagcagagac gctctgcctg gaggacatat acacagagaa tgcctctggag 780

gtcgtcgac

789

5 <210> 14  
 <211> 259  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 14

Met Gly Glu Glu Gly Gly Ser Ala Ser His Asp Glu Glu Glu Arg Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Leu Leu Gly His Ser Pro Gly Cys Glu Met Cys Ser Gln Glu  
 20 25 30  
 Ala Phe Gln Ala Gln Arg Ser Gln Leu Val Glu Leu Leu Val Ser Gly  
 35 40 45  
 Ser Leu Glu Gly Phe Glu Ser Val Leu Asp Trp Leu Leu Ser Trp Glu  
 50 55 60  
 Val Leu Ser Trp Glu Asp Tyr Glu Gly Phe His Leu Leu Gly Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Leu Ser His Leu Ala Arg Arg Leu Leu Asp Thr Val Trp Asn Lys Gly  
 85 90 95  
 Thr Trp Ala Cys Gln Lys Leu Ile Ala Ala Ala Gln Glu Ala Gln Ala  
 100 105 110  
 Asp Ser Gln Ser Pro Lys Leu His Gly Cys Trp Asp Pro His Ser Leu  
 115 120 125  
 His Pro Ala Arg Asp Leu Gln Ser His Arg Pro Ala Ile Val Arg Arg  
 130 135 140  
 Leu His Ser His Val Glu Asn Met Leu Asp Leu Ala Trp Glu Arg Gly  
 145 150 155 160  
 Phe Val Ser Gln Tyr Glu Cys Asp Glu Ile Arg Leu Pro Ile Phe Thr  
 165 170 175  
 Pro Ser Gln Arg Ala Arg Arg Leu Leu Asp Leu Ala Thr Val Lys Ala  
 180 185 190  
 Asn Gly Leu Ala Ala Phe Leu Leu Gln His Val Gln Glu Leu Pro Val

ES 2 633 470 T3

	195		200		205											
	Pro	Leu	Ala	Leu	Pro	Leu	Glu	Ala	Ala	Thr	Cys	Lys	Lys	Tyr	Met	Ala
	210						215					220				
	Lys	Leu	Arg	Thr	Thr	Val	Ser	Ala	Gln	Ser	Arg	Phe	Leu	Ser	Thr	Tyr
	225					230					235					240
	Asp	Gly	Ala	Glu	Thr	Leu	Cys	Leu	Glu	Asp	Ile	Tyr	Thr	Glu	Asn	Val
					245					250					255	
	Leu	Glu	Val													

5 <210> 15  
 <211> 888  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 15

```

atggctgcag gaggtcccgg cgcggggctc gcgccccgg tctcctccac atcctccctt      60
ccccctggctg ctctcaacat gcgagtgcg cgccgcctgt ctctgttctt gaacgtgcgg      120
acacaggtgg cggccgactg gaccgcgctg gcgaggaga tggactttga gtacttggag      180
atccggcaac tggagacaca agcggacccc actggcaggc tgctggacgc ctggcagggg      240
cgccctggcg cctctgtagg ccgactgctc gagctgctta ccaagctggg ccgcgacgac      300
gtgctgctgg agctgggacc cagcattgag gaggattgcc aaaagtatat ctggaagcag      360
cagcaggagg aggctgagaa gcctttacag gtggccgctg tagacagcag tgtcccacgg      420
acagcagagc tggcgggcat caccacactt gatgacccc tggggcatat gcctgagcgt      480
ttcgatgcct tcatctgcta ttgccccagc gacatccagt ttgtgcagga gatgatccgg      540
caactggaac agacaaacta tcgactgaag ttgtgtgtgt ctgaccgca tgtcctgcct      600
ggcacctgtg tctggtctat tgctagttag ctcacgaaa agaggtgccg ccggatggtg      660
gtggttgtct ctgatgatta cctgcagagc aaggaatgtg acttcagac caaatttga      720
ctcagcctct ctccaggtgc ccatcagaag cgactgatcc ccatcaagta caaggcaatg      780
aagaaagagt tccccagcat cctgaggttc atcactgtct gcgactacac caaccctgc      840
accaaatctt ggttctggac tcgccttgcc aaggccttgt cctgccc      888
  
```

15 <210> 16  
 <211> 296  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20

ES 2 633 470 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 16

5

Met Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Ala Ala Pro Val Ser Ser  
 1 5 10 15

Thr Ser Ser Leu Pro Leu Ala Ala Leu Asn Met Arg Val Arg Arg Arg  
 20 25 30

Leu Ser Leu Phe Leu Asn Val Arg Thr Gln Val Ala Ala Asp Trp Thr  
 35 40 45

Ala Leu Ala Glu Glu Met Asp Phe Glu Tyr Leu Glu Ile Arg Gln Leu  
 50 55 60

Glu Thr Gln Ala Asp Pro Thr Gly Arg Leu Leu Asp Ala Trp Gln Gly  
 65 70 75 80

Arg Pro Gly Ala Ser Val Gly Arg Leu Leu Glu Leu Leu Thr Lys Leu  
 85 90 95

Gly Arg Asp Asp Val Leu Leu Glu Leu Gly Pro Ser Ile Glu Glu Asp  
 100 105 110

Cys Gln Lys Tyr Ile Leu Lys Gln Gln Gln Glu Glu Ala Glu Lys Pro  
 115 120 125

Leu Gln Val Ala Ala Val Asp Ser Ser Val Pro Arg Thr Ala Glu Leu  
 130 135 140

Ala Gly Ile Thr Thr Leu Asp Asp Pro Leu Gly His Met Pro Glu Arg  
 145 150 155 160

Phe Asp Ala Phe Ile Cys Tyr Cys Pro Ser Asp Ile Gln Phe Val Gln  
 165 170 175

Glu Met Ile Arg Gln Leu Glu Gln Thr Asn Tyr Arg Leu Lys Leu Cys  
 180 185 190

Val Ser Asp Arg Asp Val Leu Pro Gly Thr Cys Val Trp Ser Ile Ala  
 195 200 205

Ser Glu Leu Ile Glu Lys Arg Cys Arg Arg Met Val Val Val Val Ser  
 210 215 220

Asp Asp Tyr Leu Gln Ser Lys Glu Cys Asp Phe Gln Thr Lys Phe Ala  
 225 230 235 240

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala His Gln Lys Arg Leu Ile Pro Ile Lys  
 245 250 255

Tyr Lys Ala Met Lys Lys Glu Phe Pro Ser Ile Leu Arg Phe Ile Thr  
 260 265 270

Val Cys Asp Tyr Thr Asn Pro Cys Thr Lys Ser Trp Phe Trp Thr Arg  
 275 280 285

Leu Ala Lys Ala Leu Ser Leu Pro  
 290 295

5 <210> 17  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

10 **Met Gly Ser Asn Lys Ser Lys Pro Lys Asp Ala Ser Gln Arg Arg Arg**  
**1 5 10 15**

15 <210> 18  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Cualquier aminoácido

25 <400> 18

**Met Gly Cys Xaa Cys**  
**1 5**

30 <210> 19  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 <400> 19

**Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val**  
**1 5**

40 <210> 20  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 20

5  
**Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu**  
**1 5**

<210> 21  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15  
 <400> 21

**Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu**  
**1 5**

<210> 22  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25  
 <400> 22

**Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser**  
**1 5 10 15**

**Ala Ser His Leu Glu**  
**20**

30  
 <210> 23  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

40  
 <400> 23  
**atatactcga gaaaaagggtg gccaagaagc caacc** 35

<210> 24  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

50  
 <400> 24  
**atatagtcga ctcactgtct ctctgcact gagatg** 36

<210> 25  
 <211> 6  
 <212> PRT

55

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: Marcador His 6x sintético	
	<400> 25	
	<b>His His His His His His</b>	
	<b>1 5</b>	
10	<210> 26	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético	
	<400> 26	
	<b>Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu</b>	
20	<b>1 5</b>	
	<210> 27	
	<211> 36	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 27	
	<b>cgatcactcg agggctggag gatatctttt tattgg</b>	<b>36</b>
	<210> 28	
	<211> 38	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 28	
	<b>tgatcggctcg acatgtacag agtttttggg tccaagtg</b>	<b>38</b>
	<210> 29	
45	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 29	
	<b>cgatcactcg agtataagtt ctattttcac ctgatgcttc</b>	<b>40</b>
55	<210> 30	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	

	<400> 30 <b>tgatcggctcg acgatagatg ttgcttcctg ccaattg</b>	37
5	<210> 31 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 31 <b>cgatcagctcg acgatgtgtg gtatatttac catttctg</b>	38
15	<210> 32 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
25	<400> 32 <b>tgatcggctcg acgaccgttt ccttgaacac ctgac</b>	35
30	<210> 33 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
35	<400> 33 <b>cgatcactcg aggatgtttg gtttatatat aatgtgtg</b>	38
40	<210> 34 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 34 <b>tcggtcgcg tattgcttaa tggaatcgac atac</b>	34
50	<210> 35 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 35 <b>cgatcactcg aggacctctg gtactgcttc cacc</b>	34
60	<210> 36 <211> 32	

	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 36 <b>tgatctgtcg acttcggccg tgggtccctg gc</b>	32
10	<210> 37 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 37 <b>aatctaccgc ggccaccatg atgtctgcct cgcgcctg</b>	38
20	<210> 38 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 38 <b>tcagttctcg aggatagatg ttgtttcctg ccaattg</b>	37
30	<210> 39 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 39 <b>acatagtcca cctgtctctc ctgcactgag atg</b>	33
45	<210> 40 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 40 <b>atagcactcg agatggggga agaggggtggt tcag</b>	34
55	<210> 41 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 41	

	<b>cttcatgtcg acgacctcca ggacattctc tgtg</b>	<b>34</b>
5	<210> 42 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 42 <b>atagcactcg agaccaccga gcagcgacgc ag</b>	<b>32</b>
15	<210> 43 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 43 <b>cttcatgtcg acaatctgta tgtcagaagt ttccatc</b>	<b>37</b>
25	<210> 44 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
35	<400> 44 <b>acatcaactc gagatggctg caggaggctc cgg</b>	<b>33</b>
40	<210> 45 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 45 <b>actcatagtc gaccaggac aaggccttgg caag</b>	<b>34</b>
50	<210> 46 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 46 <b>acatcaactc gagatggcct gcacaggccc atcac</b>	<b>35</b>
60	<210> 47 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético		
	<400> 47		
5	<b>actcatagtc gacttctgcc tcctgcgtct tgtcc</b>		<b>35</b>
	<210> 48		
	<211> 42		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético		
15	<400> 48		
	<b>aactagacgc gtactactaa aatgtaaattg acataggaaa ac</b>		<b>42</b>
	<210> 49		
20	<211> 36		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético		
	<400> 49		
	<b>gacttgaagc ttaacacgaa cagtgtcgcc tactac</b>		<b>36</b>
30	<210> 50		
	<211> 45		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético		
	<400> 50		
	<b>ggagggcggag gcagcggagg tggcggttcc ggagggcggag gttct</b>		<b>45</b>
40	<210> 51		
	<211> 15		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético		
	<400> 51		
	<b>Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser</b>		
	<b>1 5 10 15</b>		
50	<210> 52		
	<211> 17		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético		
	<400> 52		
	<b>Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly</b>		
	<b>1 5 10 15</b>		
60			

**Arg**

5 <210> 53  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 53

Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu  
1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* de activación de una célula presentadora de antígeno, que comprende: transfectar o transducir una célula presentadora de antígeno con un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica, en el que la proteína quimérica comprende (i) una región dirigida a la membrana; (ii) un dominio de unión al ligando FKBP; (iii) una región de polipéptido CD40 citoplasmático carente del dominio extracelular; y (iv) un polipéptido MyD88 truncado carente del dominio TIR; y poner en contacto la célula presentadora de antígeno con FK506 dimérico o un análogo de FK506 dimérico que se une al dominio de unión al ligando; mediante lo que se activa la célula presentadora de antígeno.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el ligando es una molécula pequeña.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el ligando es AP1903 o AP20187.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el MyD88 truncado tiene la secuencia de SEQ ID NO: 6.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la región dirigida a la membrana se selecciona del grupo que consiste en la región dirigida a la miristoilación, región dirigida a la palmitoilación, región de prenilación y región transmembrana del receptor.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la región dirigida a la membrana una región dirigida a la miristoilación.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el dominio de unión al ligando comprende una secuencia de Fv'Fvls.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el dominio de unión al ligando comprende FKBP12(v36).
9. El método de la reivindicación 7, en el que el dominio de unión al ligando comprende además una secuencia de Fv' adicional.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el ácido nucleico está contenido en un vector vírico.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el ácido nucleico está contenido en un vector plasmídico.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la célula presentadora de antígeno está en contacto con un antígeno.
13. El método de la reivindicación 12, en el que la célula presentadora de antígeno es transfectada o transducida con el vector *ex vivo* y se va a administrar a un sujeto.
14. El método de la reivindicación 13, en el que se genera una respuesta inmune contra el antígeno.
15. El método de la reivindicación 14, en el que la respuesta inmune es una respuesta inmune de linfocitos T citotóxicos (CTL).
16. El método de la reivindicación 14 o 15, en el que la respuesta inmune se genera contra un antígeno tumoral.
17. El método de la reivindicación 16, en el que el antígeno tumoral está asociado con el cáncer de próstata.
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica humana.
19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que el ácido nucleico comprende una secuencia promotora unida operativamente a la secuencia polinucleotídica.
20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que la célula presentadora de antígeno se activa sin la adición de un adyuvante.
21. Una composición que comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica o una célula transducida con el ácido nucleico, en la que la proteína quimérica comprende (i) una

región dirigida a la membrana; (ii) un dominio de unión al ligando FKBP; (iii) una región de polipéptido CD40 citoplasmático carente del dominio extracelular; y (iv) un polipéptido MyD88 truncado carente del dominio TIR.

- 5 22. La composición de la reivindicación 21, en la que el ácido nucleico comprende una secuencia promotora unida operativamente a la secuencia polinucleotídica.
23. La composición que comprende una célula de la reivindicación 21 o 22, en la que la célula es una célula presentadora de antígeno.
- 10 24. La composición que comprende una célula de la reivindicación 23, en la que la célula es una célula dendrítica humana.
25. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24 para su uso en el tratamiento de un cáncer en un sujeto mediante la potenciación de una respuesta inmune.
- 15 26. La composición para el uso de la reivindicación 25, en la que el cáncer es cáncer de próstata.
27. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, o la composición para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 25 o 26, en la que la MyD88 truncada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.
- 20 28. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24 y 27, o la composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en la que la región dirigida a la membrana se selecciona del grupo que consiste en la región dirigida a la miristoilación, región dirigida a la palmitoilación, región de prenilación y región transmembrana del receptor.
- 25 29. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, 27 y 28, o la composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, en la que la región dirigida a la membrana es una región dirigida a la miristoilación.
- 30 30. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, y 27 a 29, o la composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29, en la que el dominio de unión al ligando comprende una secuencia de Fv'Fvls.
- 35 31. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, y 27 a 30, o la composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 30, en la que el dominio de unión al ligando comprende FKBP12(v36).
- 40 32. La composición o la composición para el uso de la reivindicación 30 o 31, en la que el dominio de unión al ligando comprende además una secuencia de Fv' adicional.
33. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, y 27 a 32, o la composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32, en la que el ácido nucleico está contenido en un vector vírico.
- 45 34. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, y 27 a 32, o la composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32, en la que el ácido nucleico está contenido en un vector plasmídico.

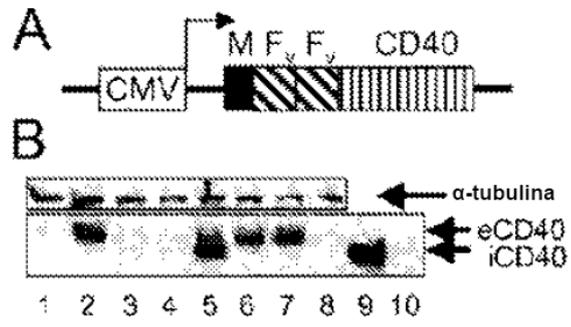


FIG. 1

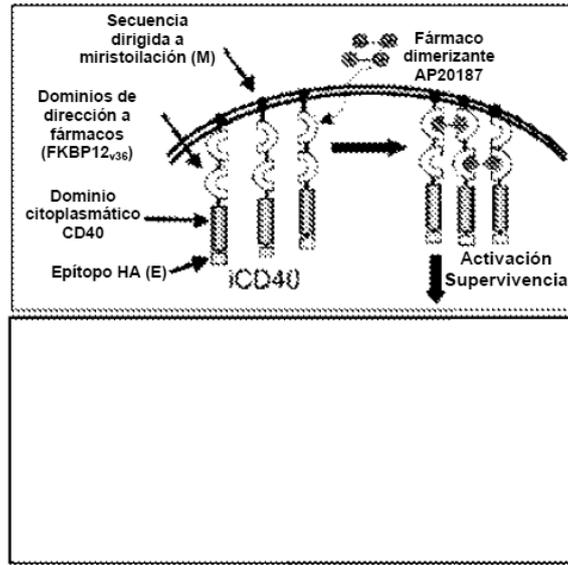


FIG. 2

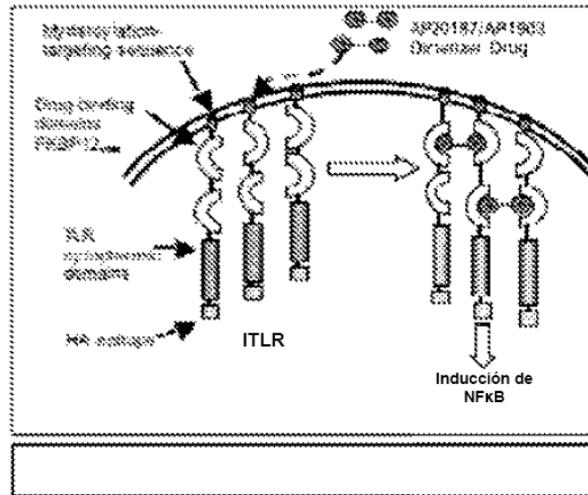


FIG. 3

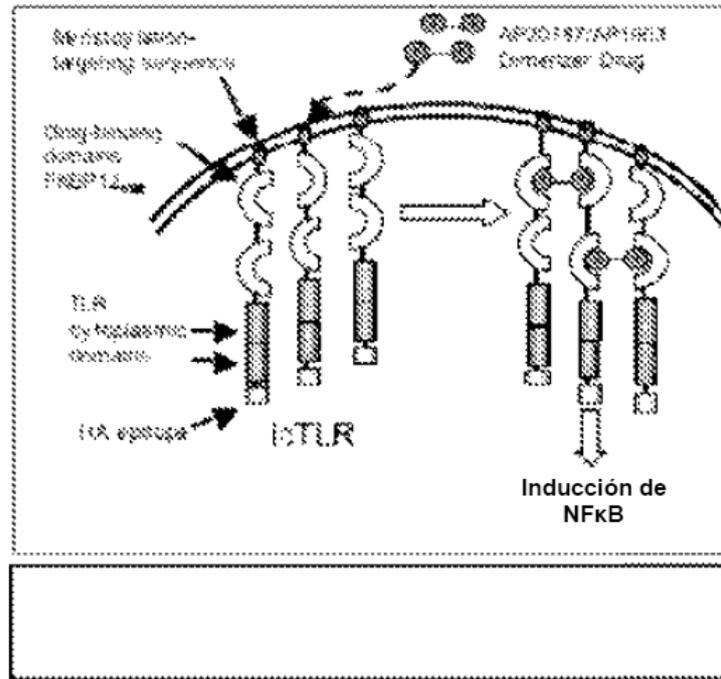


FIG. 4

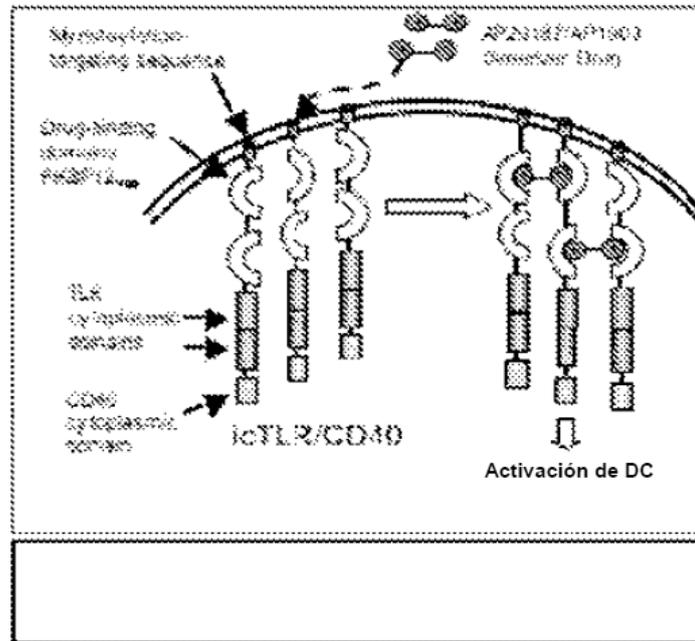


FIG. 5

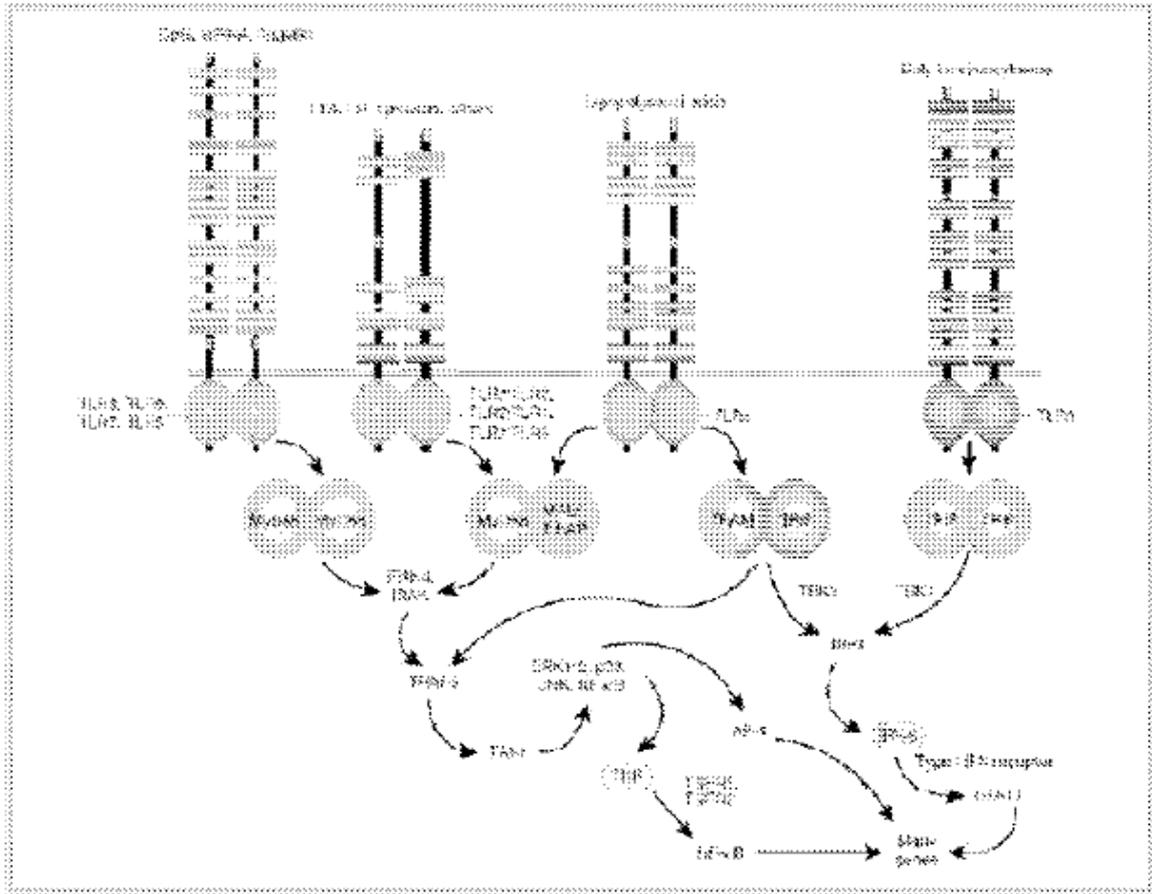
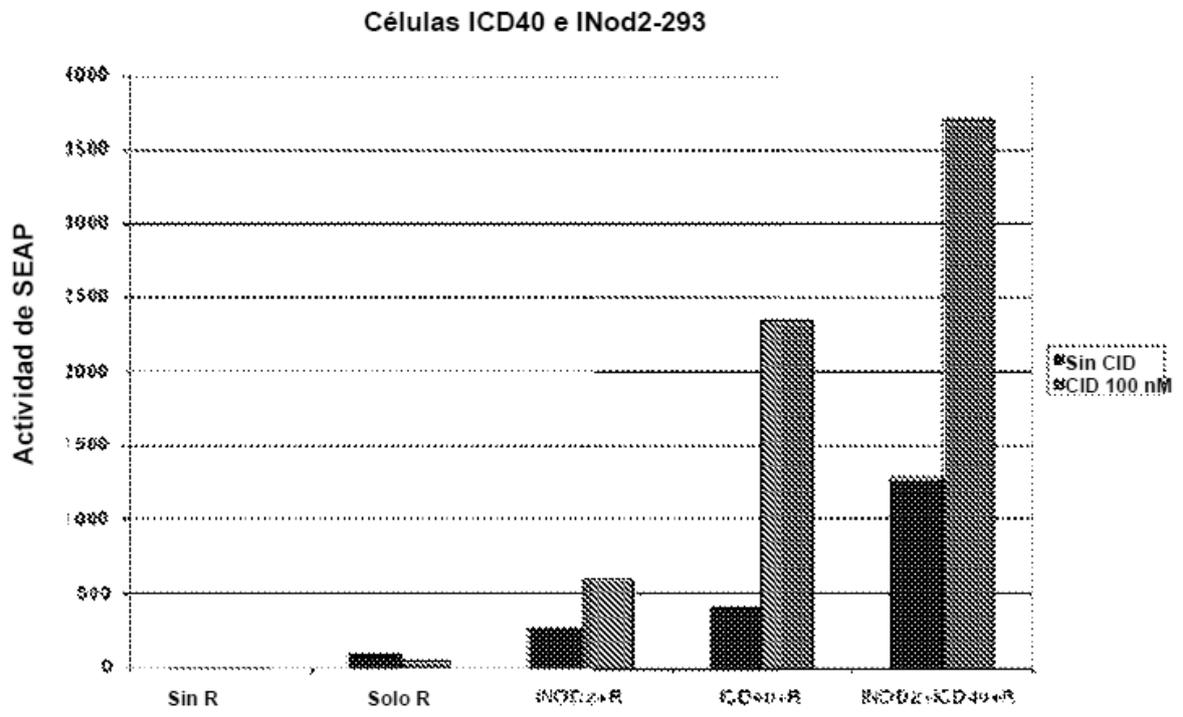


FIG. 6



**FIG. 7**

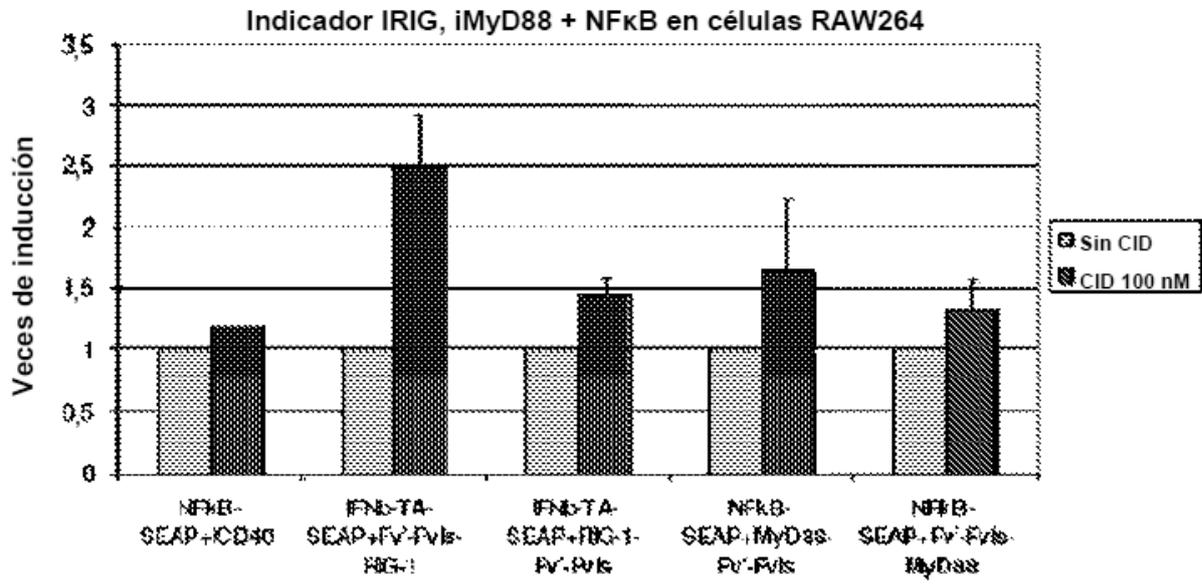


FIG. 8



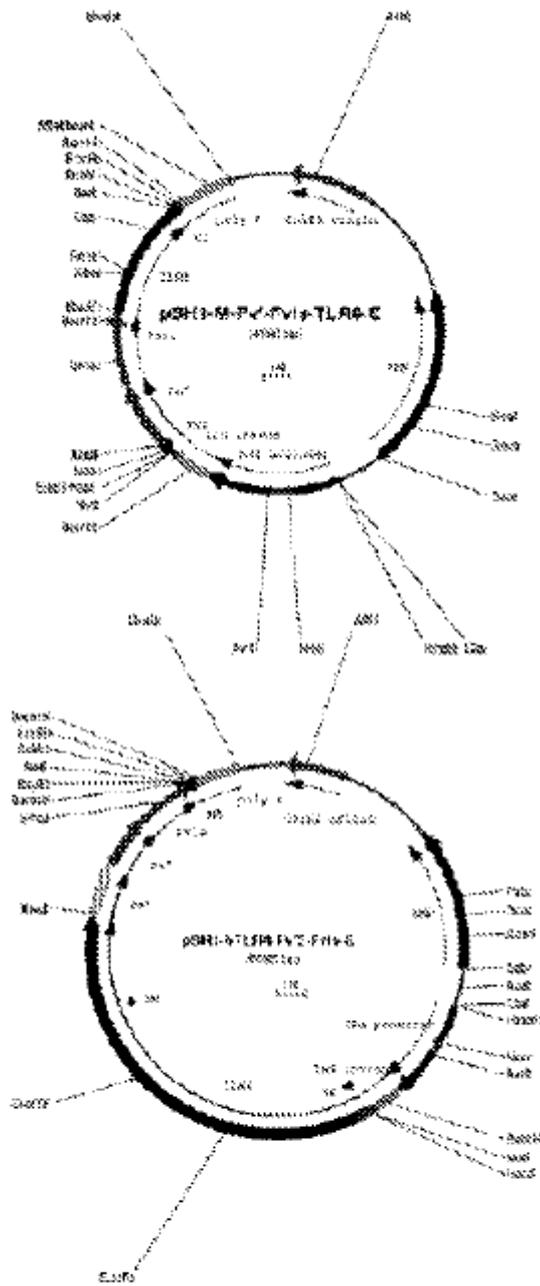


FIG. 10A

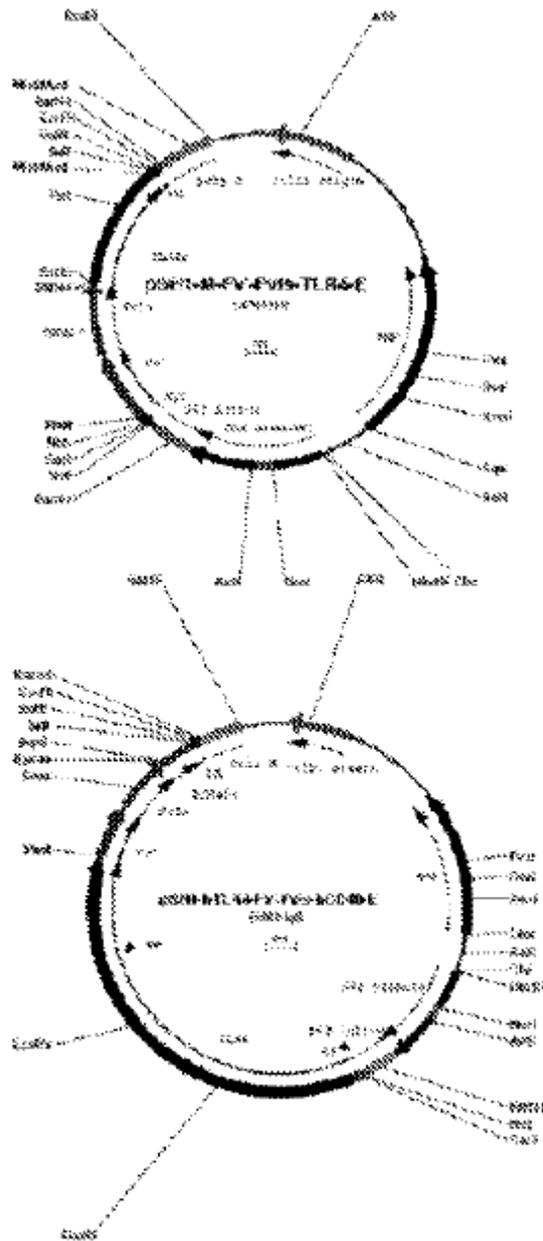


FIG. 10B



### Inducción del indicador de NFκB SEAP

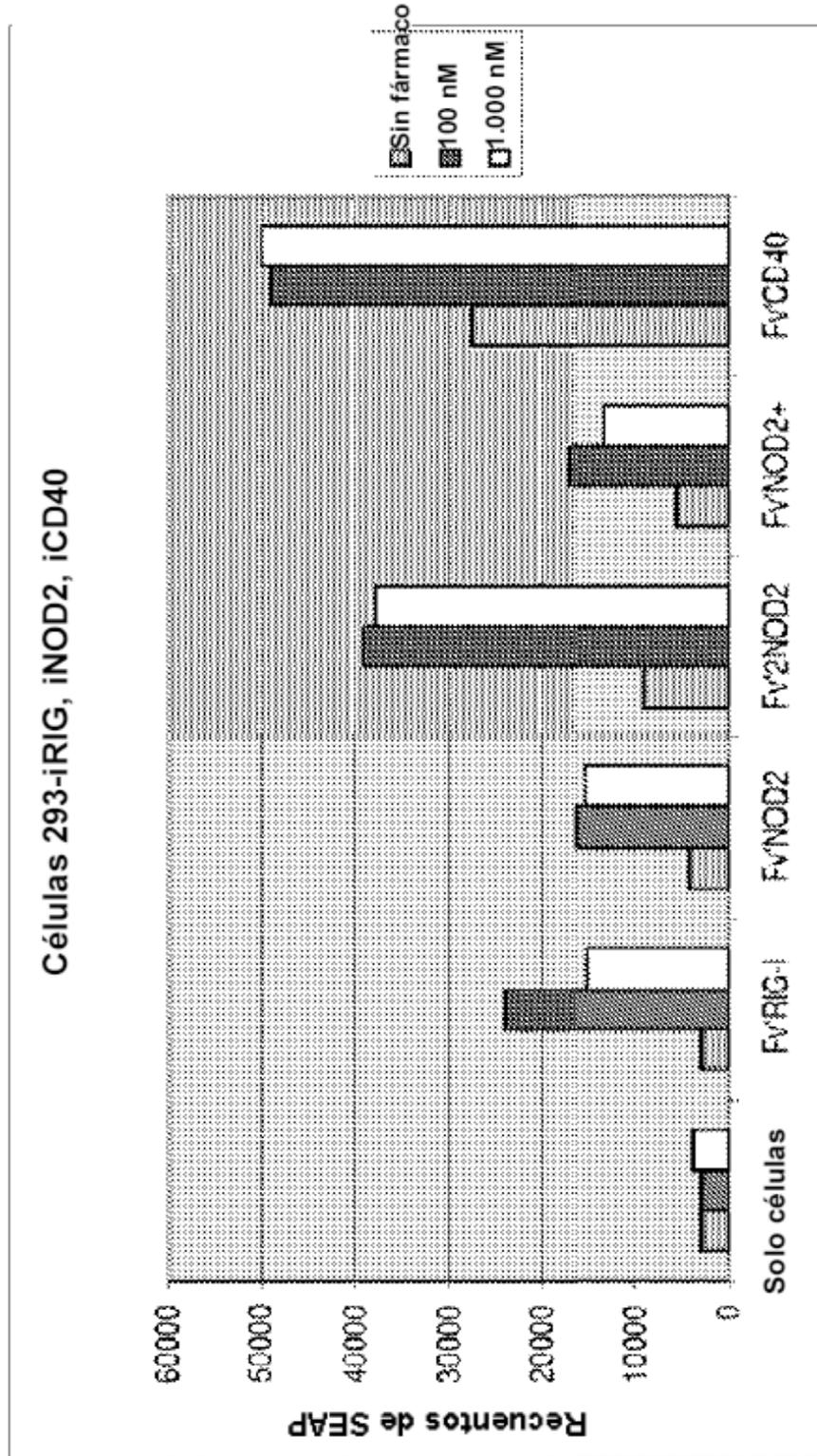


FIG.11

### Inducción del indicador de NFκB SEAP

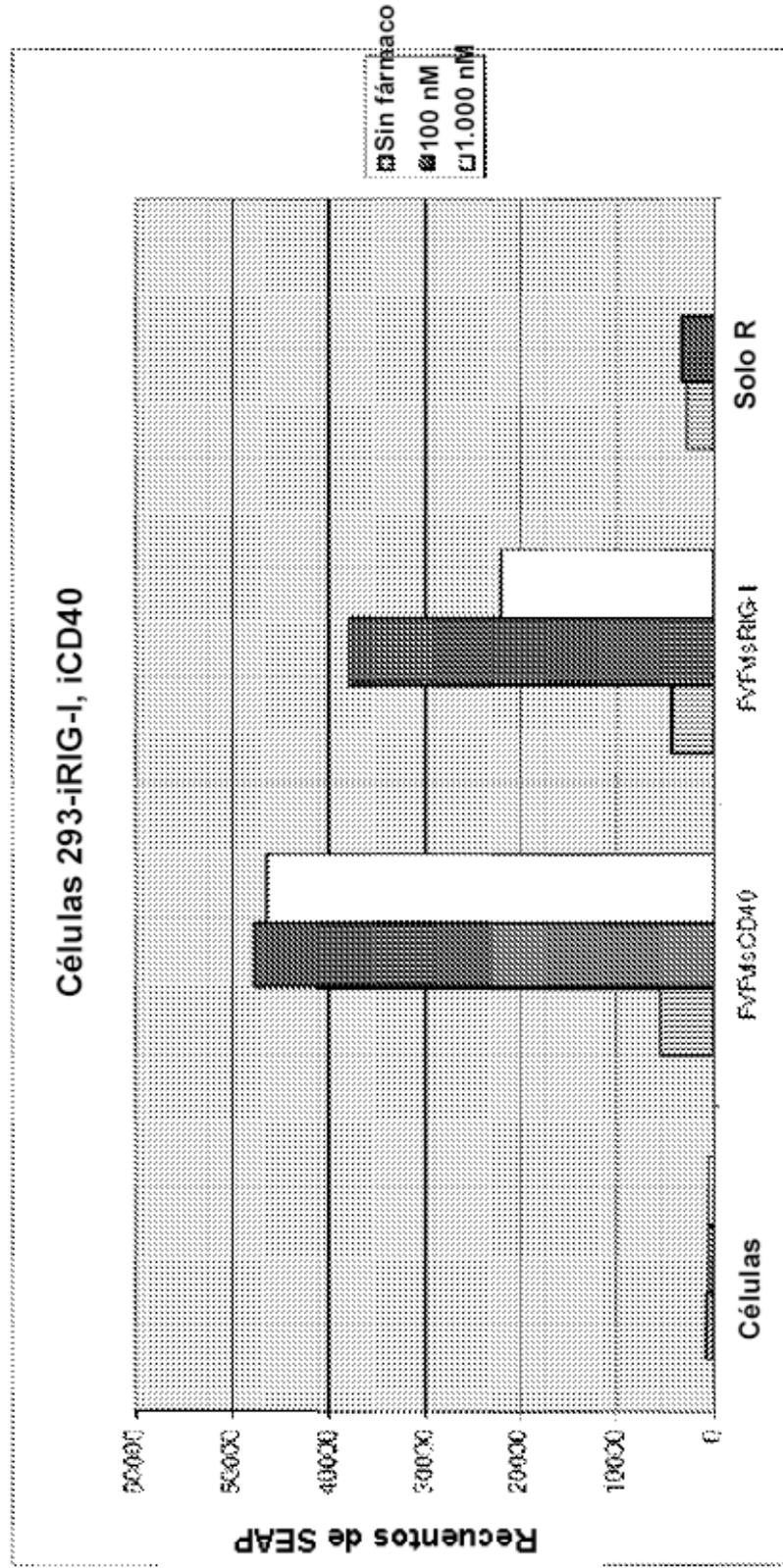


FIG.12

### Inducción del indicador de NFκB SEAP

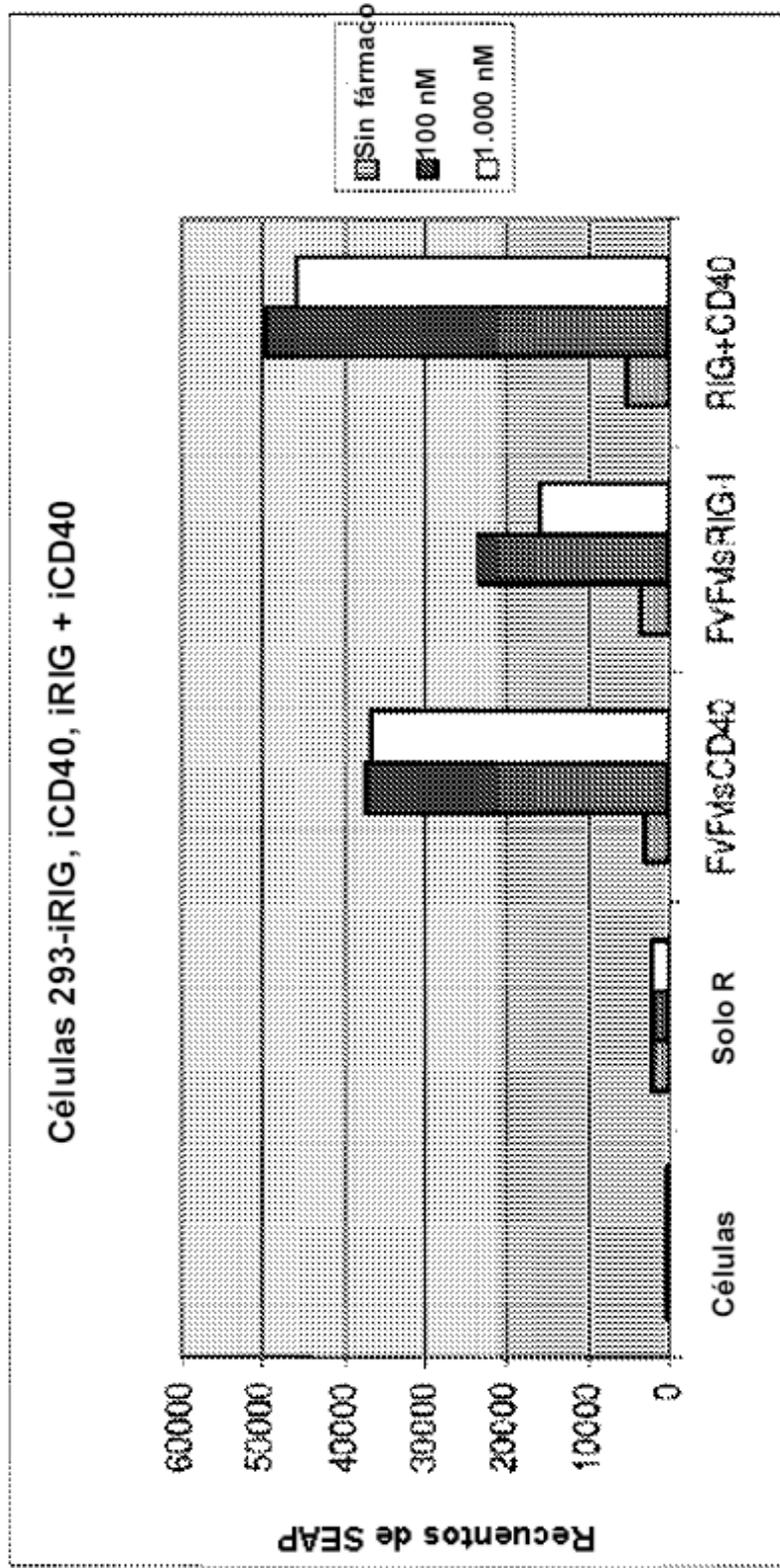


FIG.13

# Inducción del indicador de NFκB SEAP

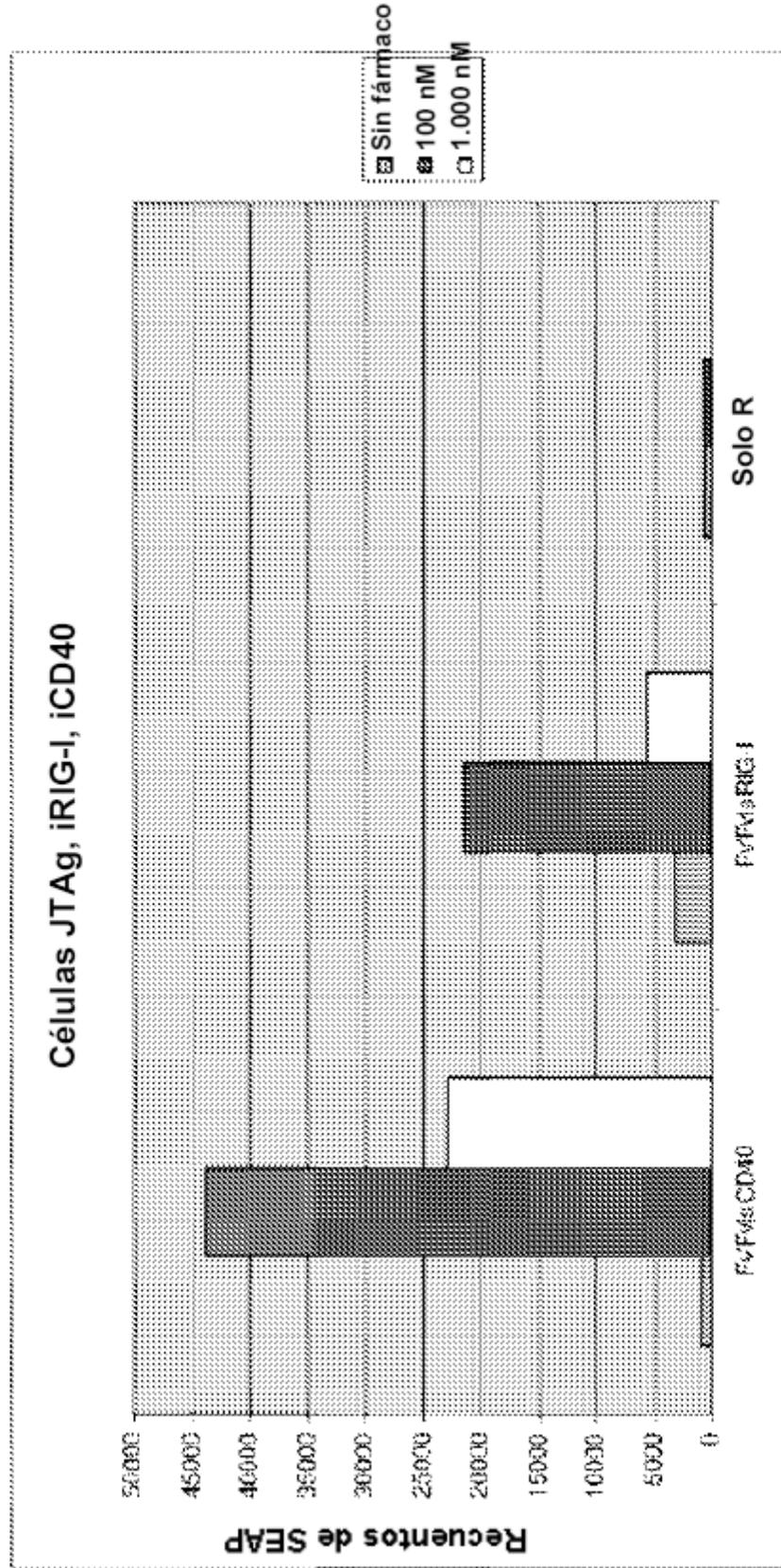
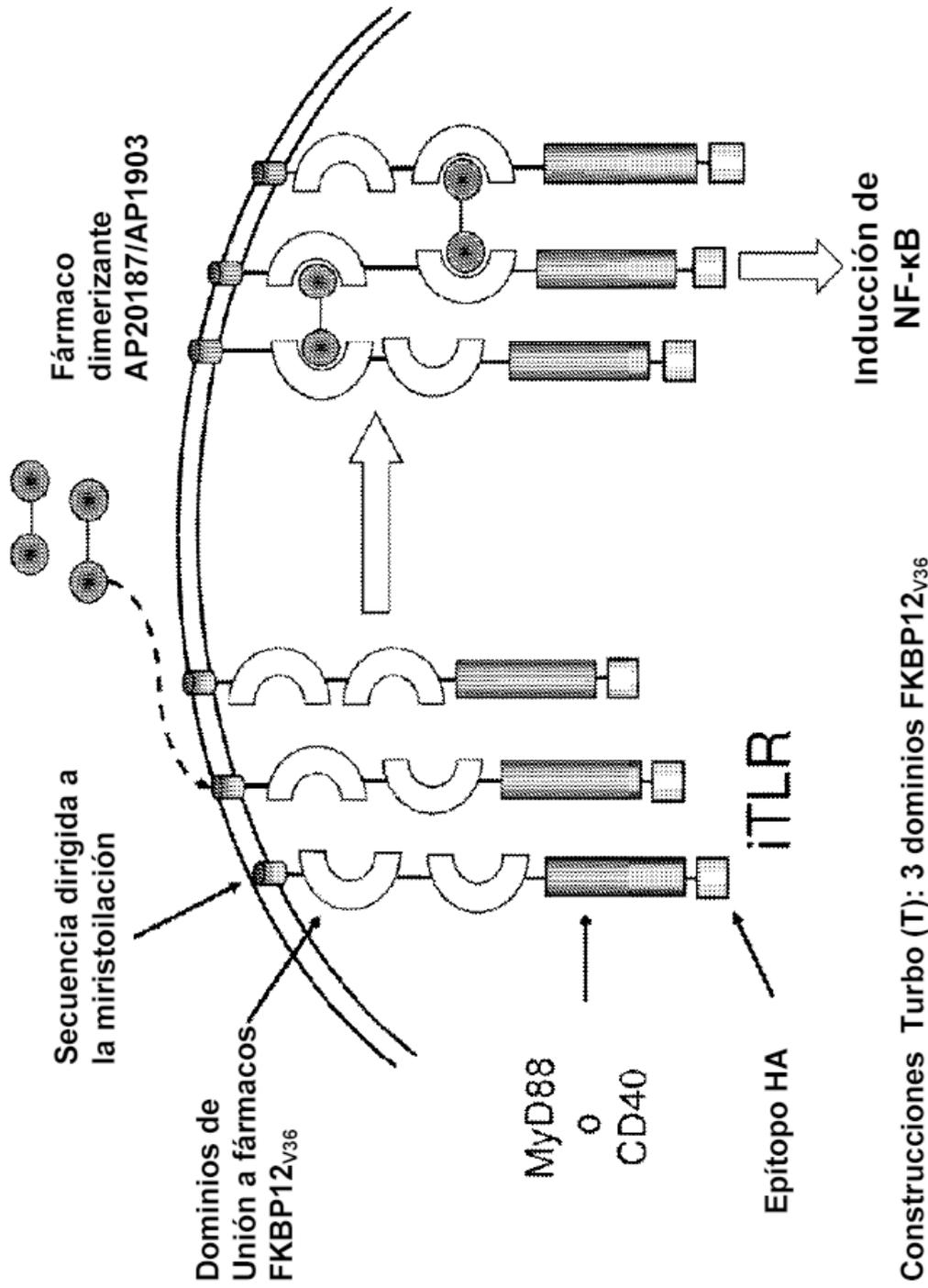


FIG.14





Construcciones Turbo (T): 3 dominios FKBP12<sub>V36</sub>

FIG. 16

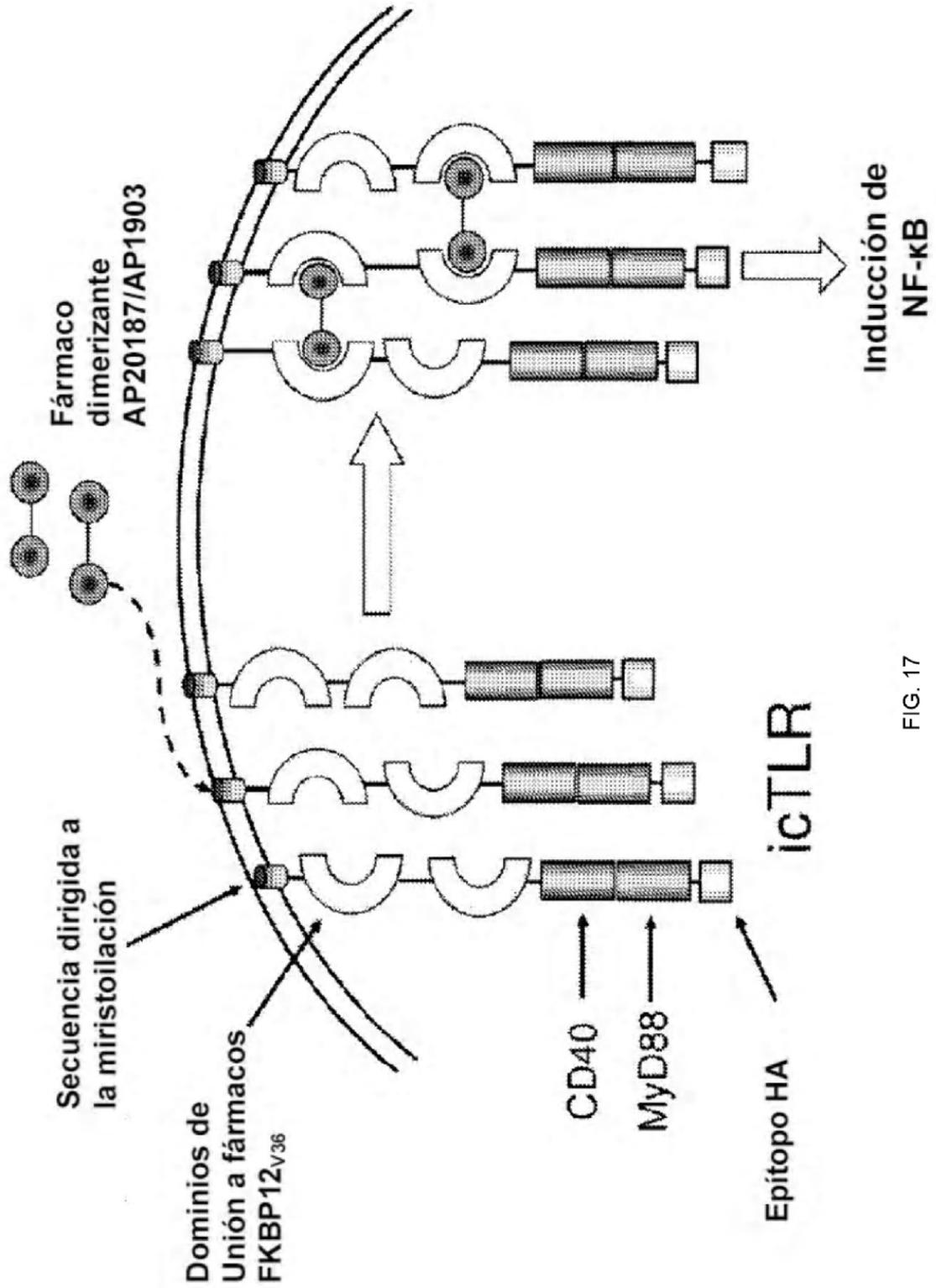


FIG. 17

# Ensayo de MyD88.CD40

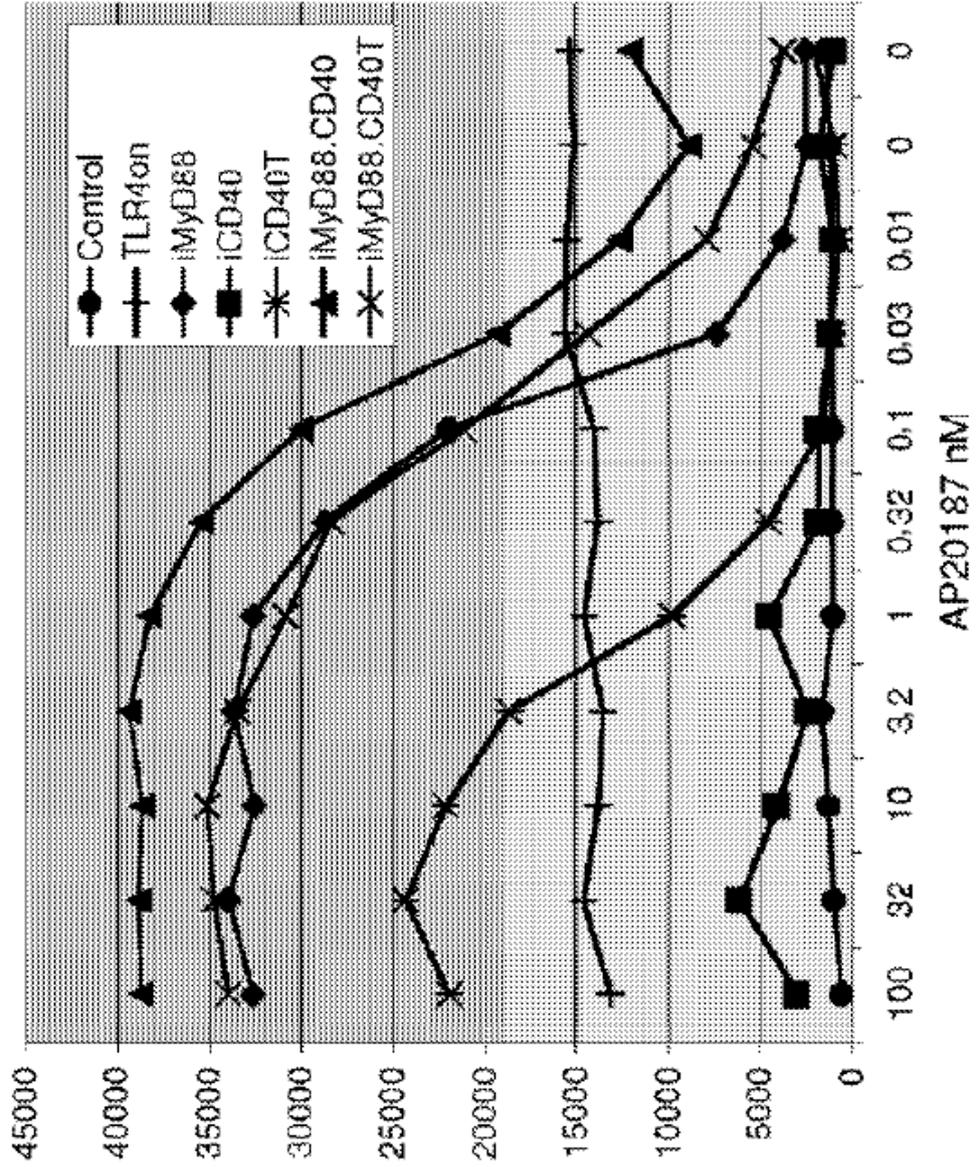


FIG. 18

Construcciones de MyD88L-CD40 –  
Actividad de NFκB SEAP

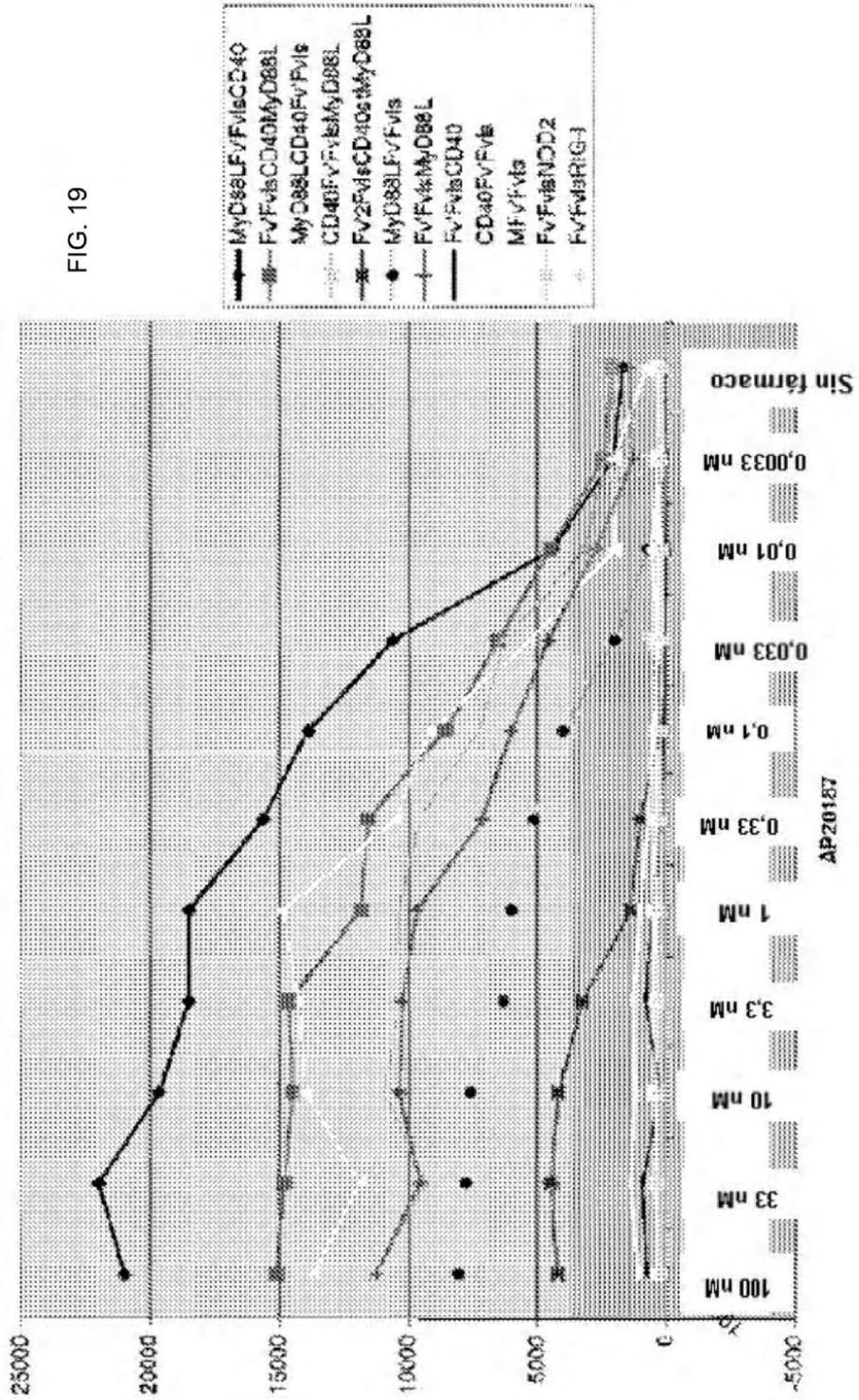
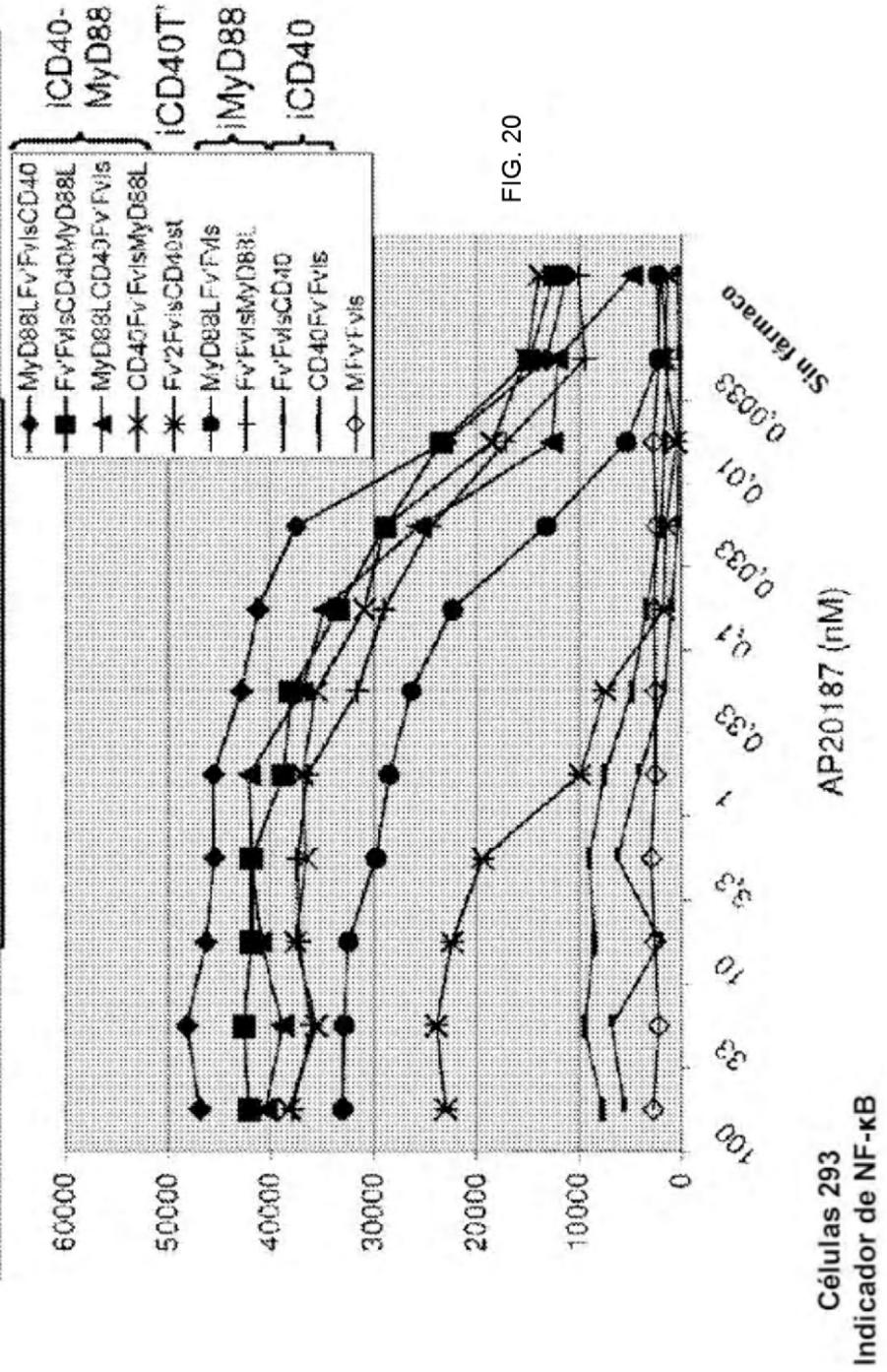


FIG. 19

3 horas con sustrato (sin saturación del ensayo)

# Ensayo de iCD40-MyD88



**Resultados de transferencia Western – Ad5-iMyD88**

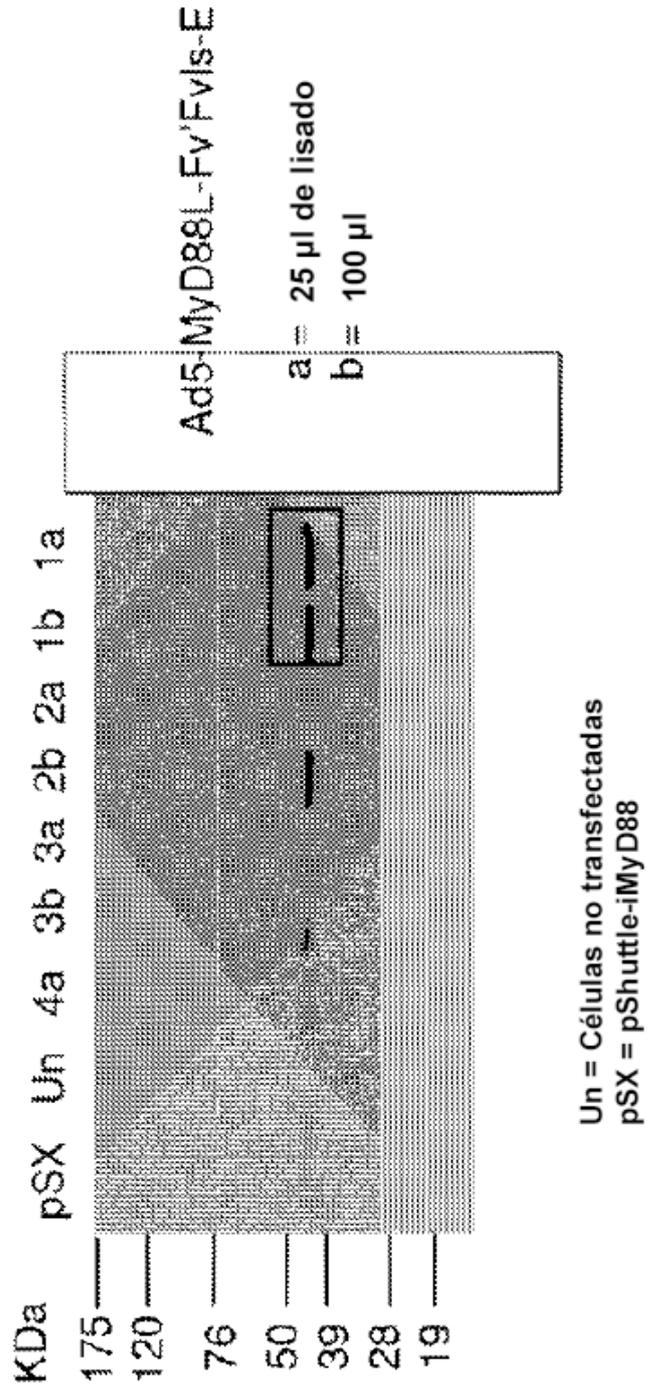
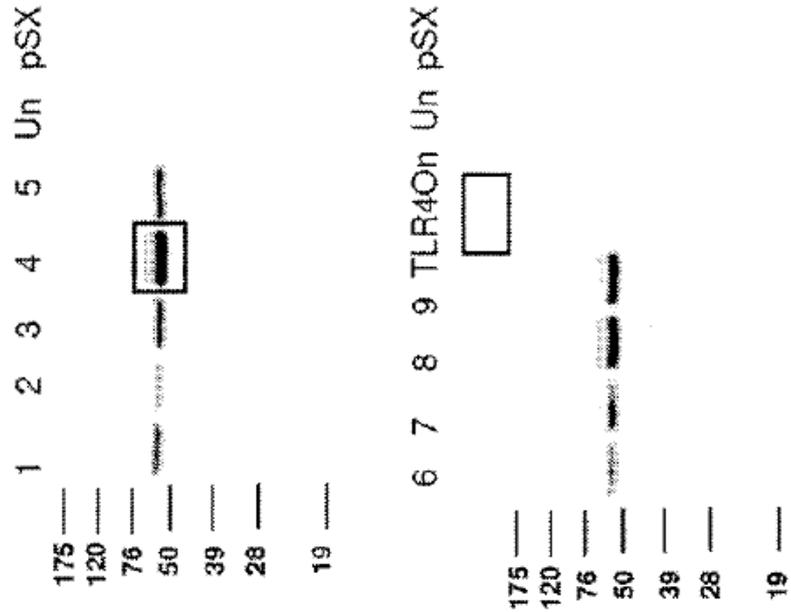


FIG. 21

**Resultados de transferencia Western –  
Ad5-iMyD88-CD40/Ad5-TLR4On**



Un = Células no transfectadas  
pSX = pShuttle-iMyD88-CD40

FIG. 22

**Resultados de ELISA de IL-12p70 de ratón en DC derivadas de médula ósea**

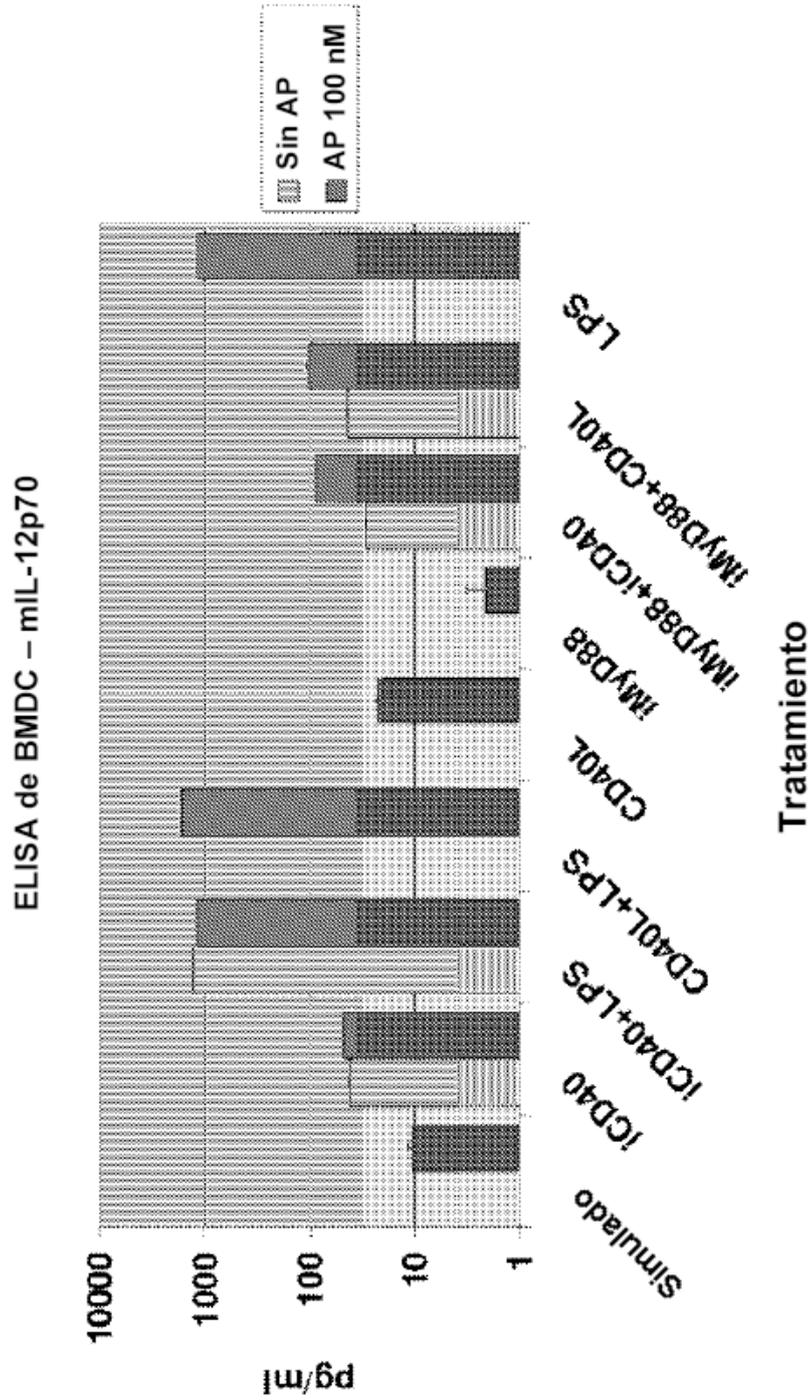


FIG. 23

ELISA de BMDC – mL-12p70

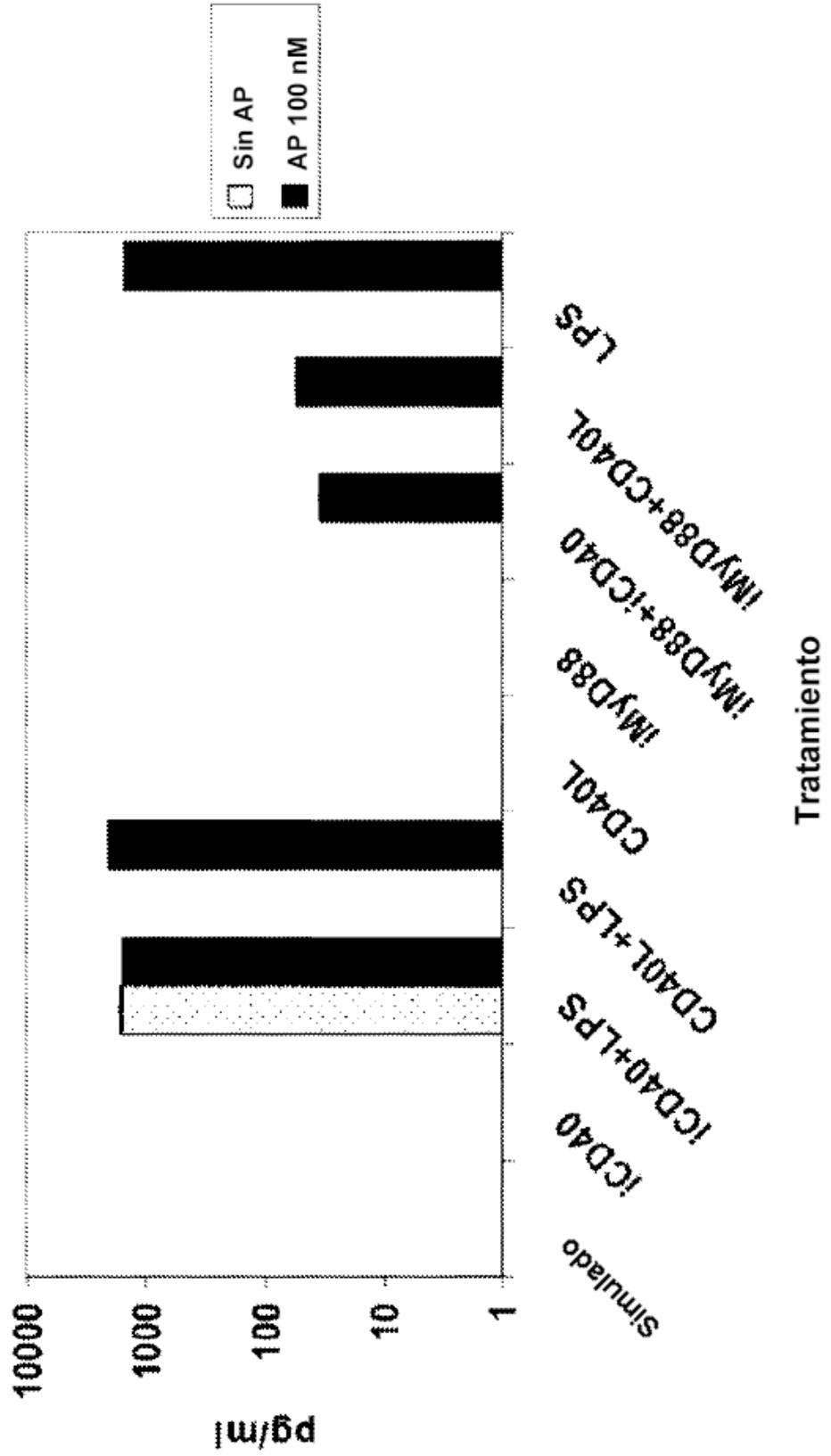


FIG. 24

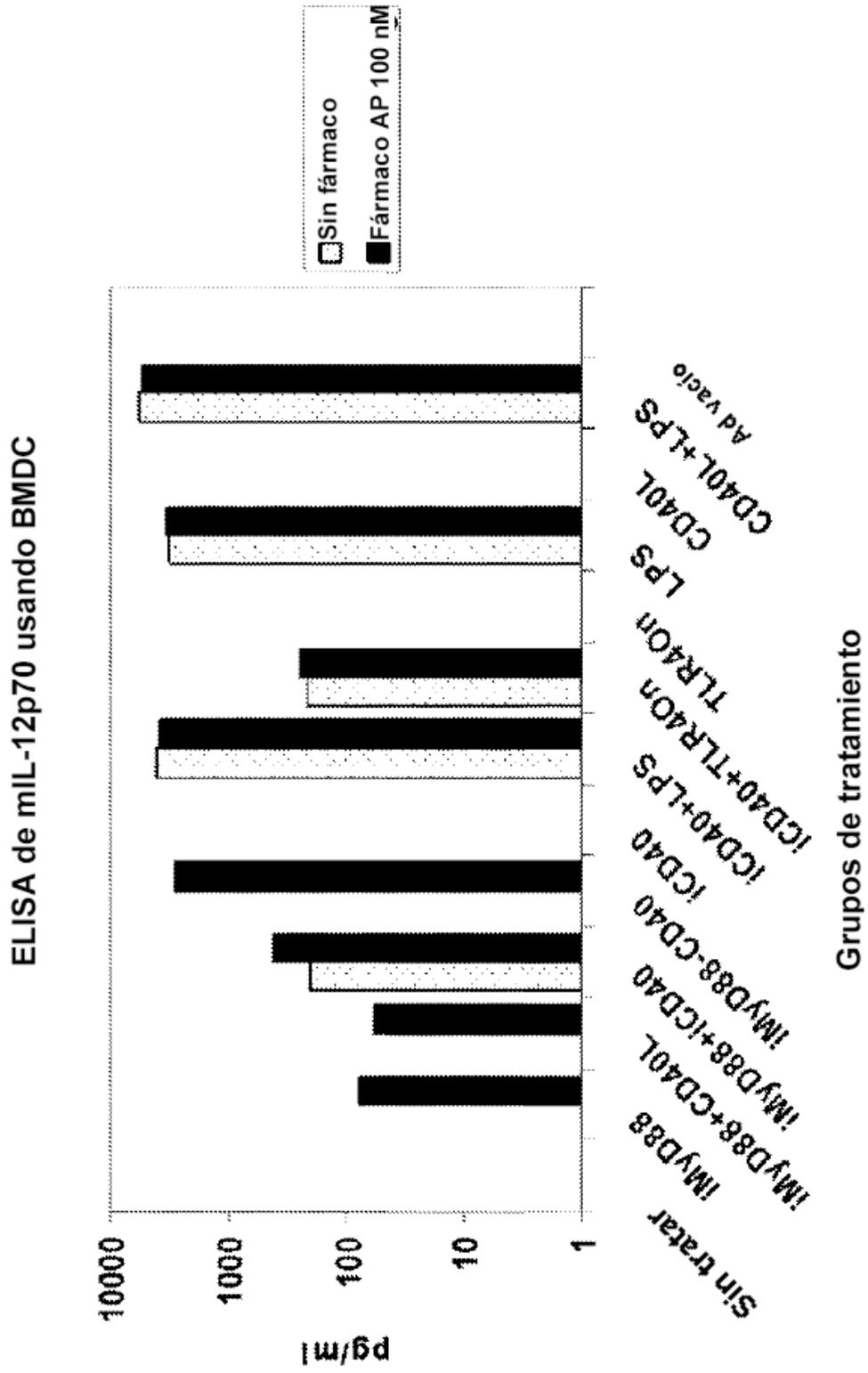
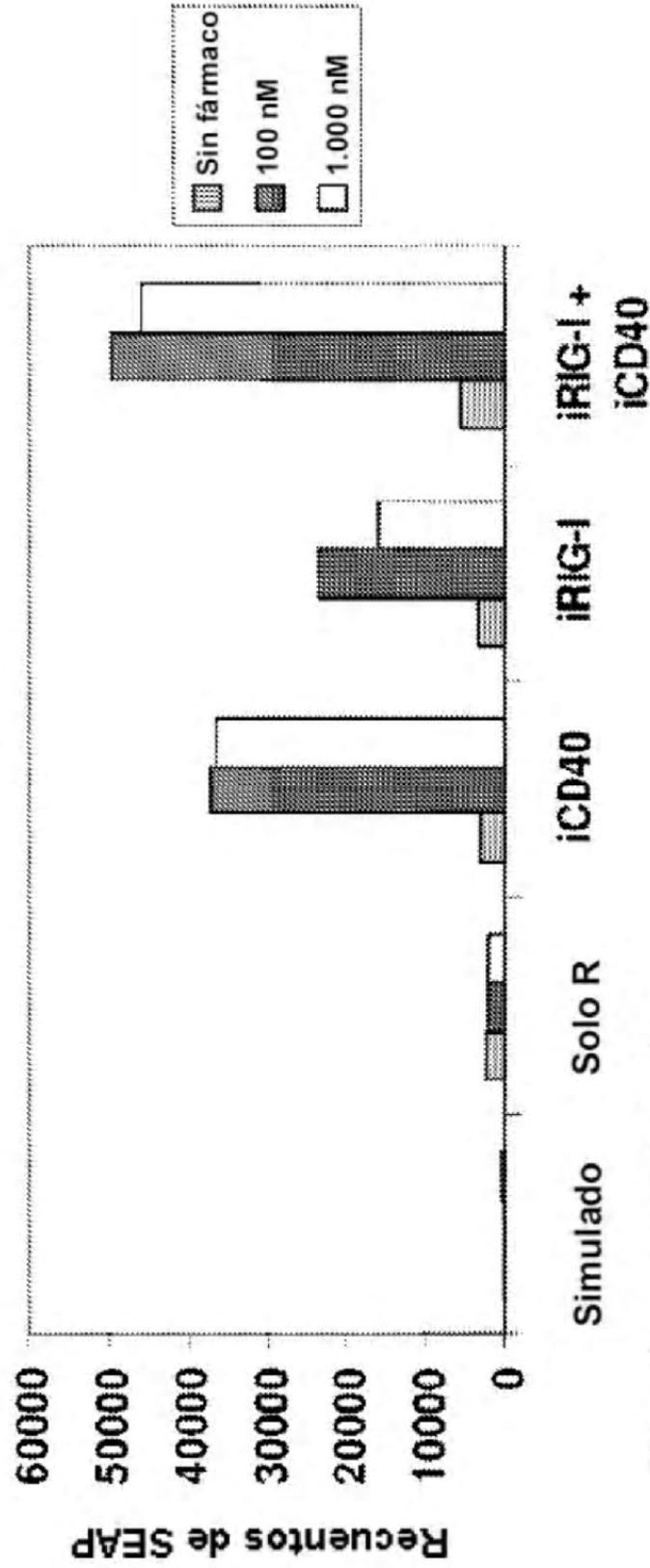


FIG. 25

**Resultados del ensayo de indicador NFκB-SEAP con iRIG-I e iCD4**

Actividad de iRIG-I en el ensayo de NFκB-SEAP



Simulado = células sin transfectar

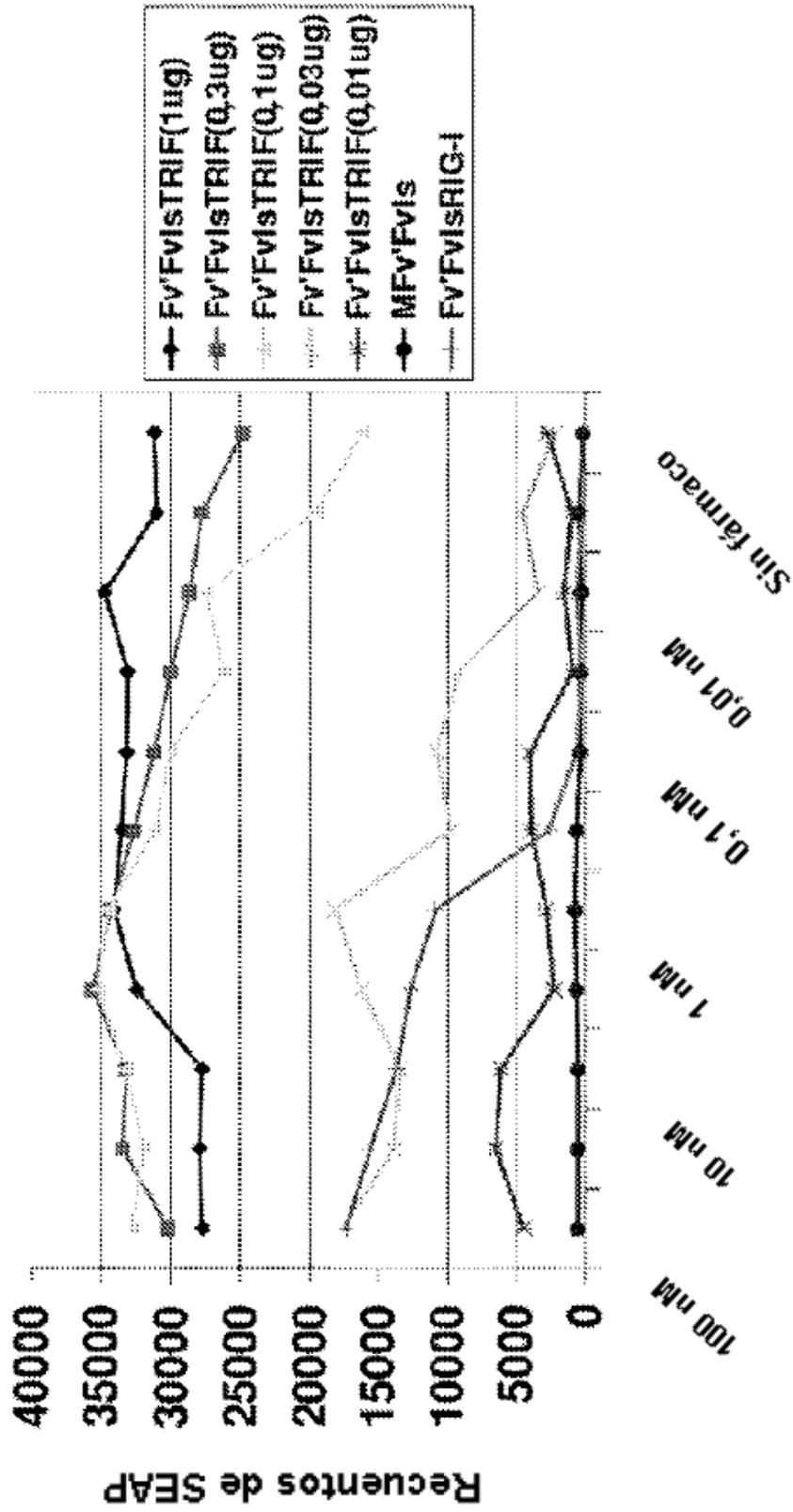
Solo R = Solo indicador

iCD40 = pBJ5-Fv'FvIs-CD40

iRIG-I = pBJ5-Fv'FvIs-RIG-I

FIG. 26

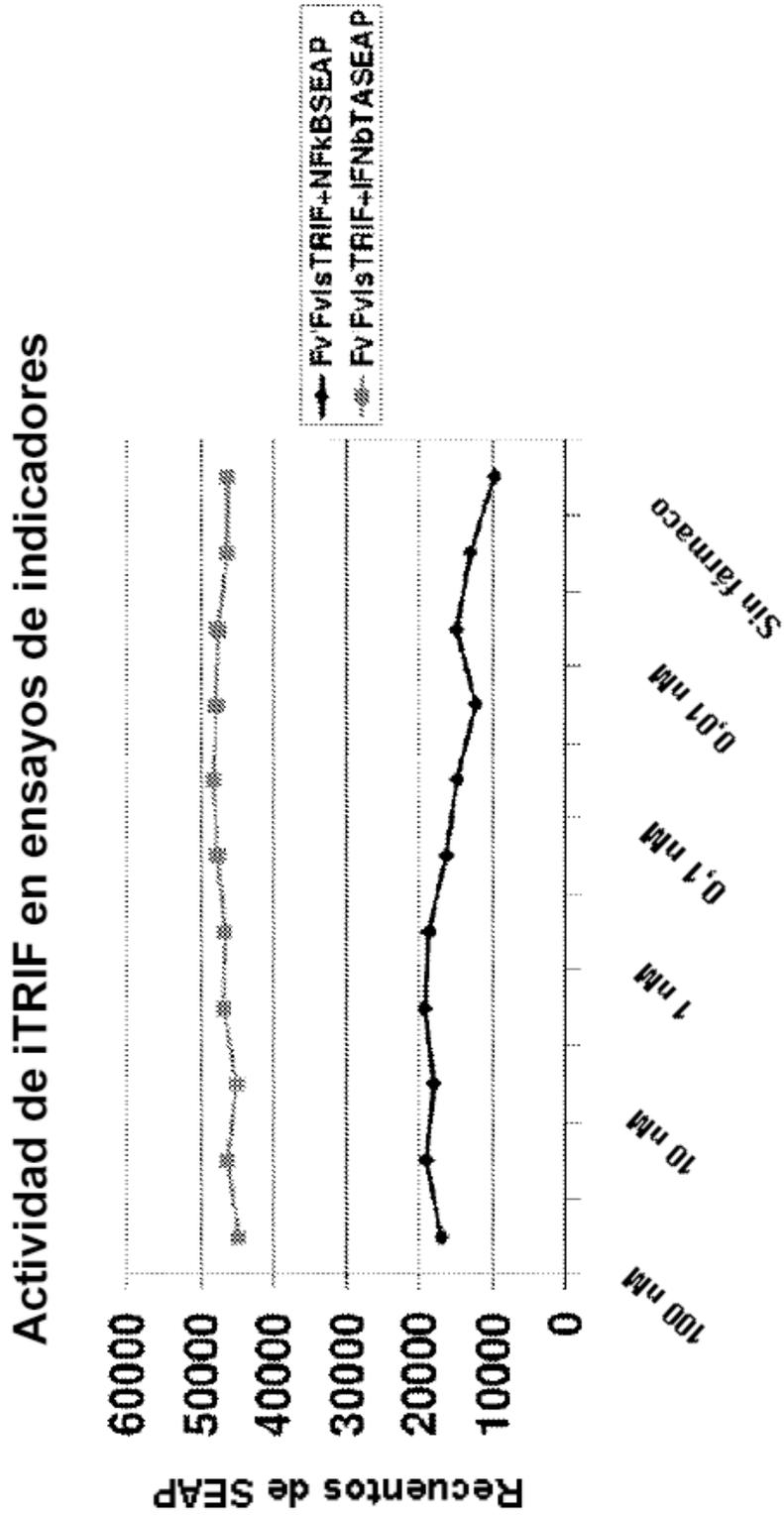
**Resultados del ensayo de indicador IFNβ-SEAP con iRIG-I e iTRIF**



AP20187

FIG. 27

**Comparación de la activación de iTRIF de indicadores NFκB e IFNβ**

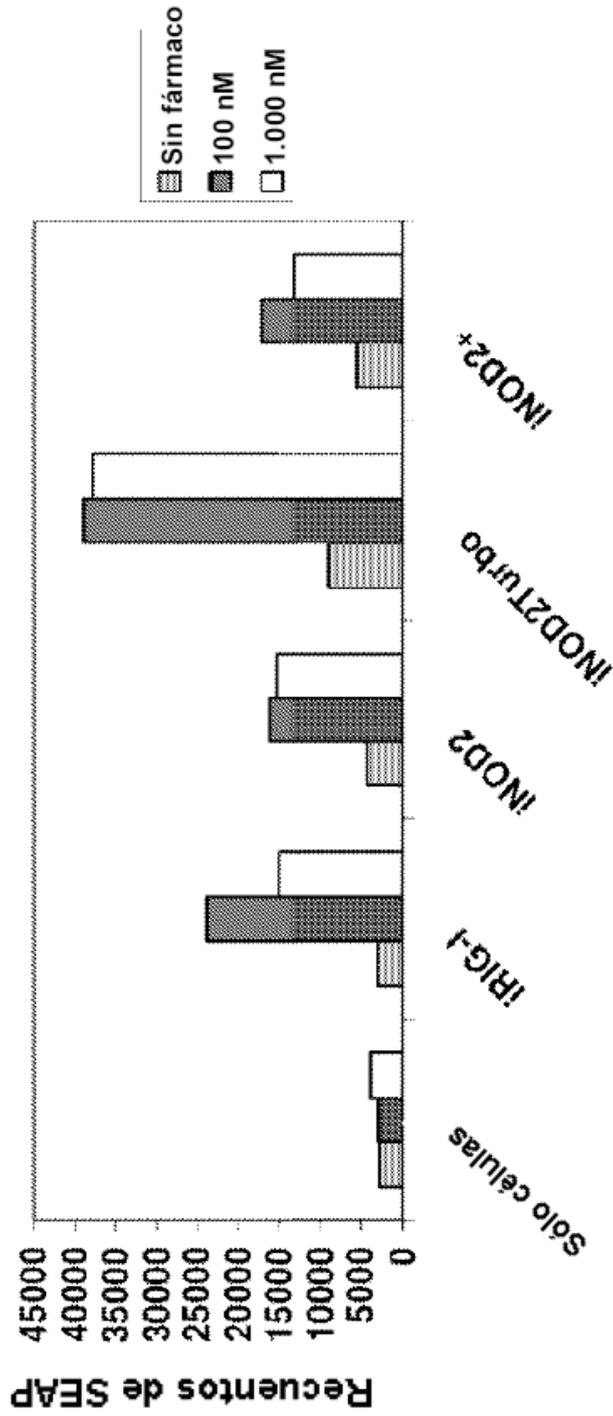


AP20187

FIG. 28

**Experimento 3: Actividad de iNOD2 en ensayos de indicador NFκB**

**Actividad de iNOD2 en ensayos de NFκB-SEAP**



iRIG-1 = pBJ5-Fv'FvIs-RIG-1  
 iNOD2 = pBJ5-Fv'FvIs-NOD2  
 iNOD2Turbo = pBJ5-Fv'Fv'FvIs-NOD2  
 iNOD2+ = pBJ5-Fv'FvIs-NOD2 (misma secuencia de NOD2 que según Nunez et al)

FIG. 29







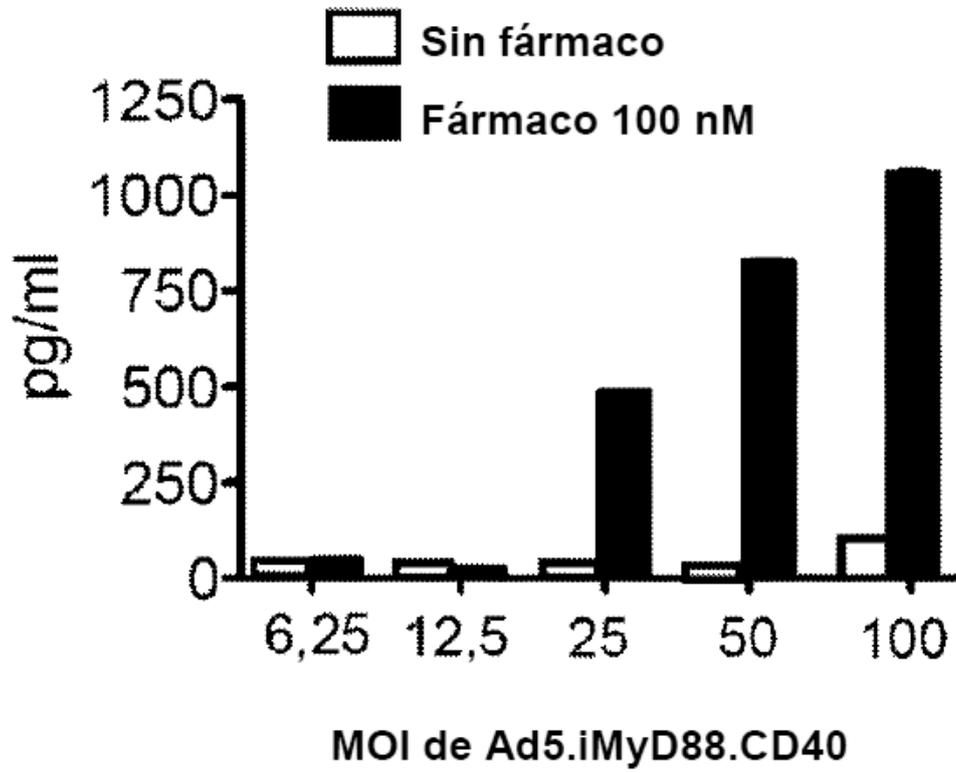


FIGURA 33

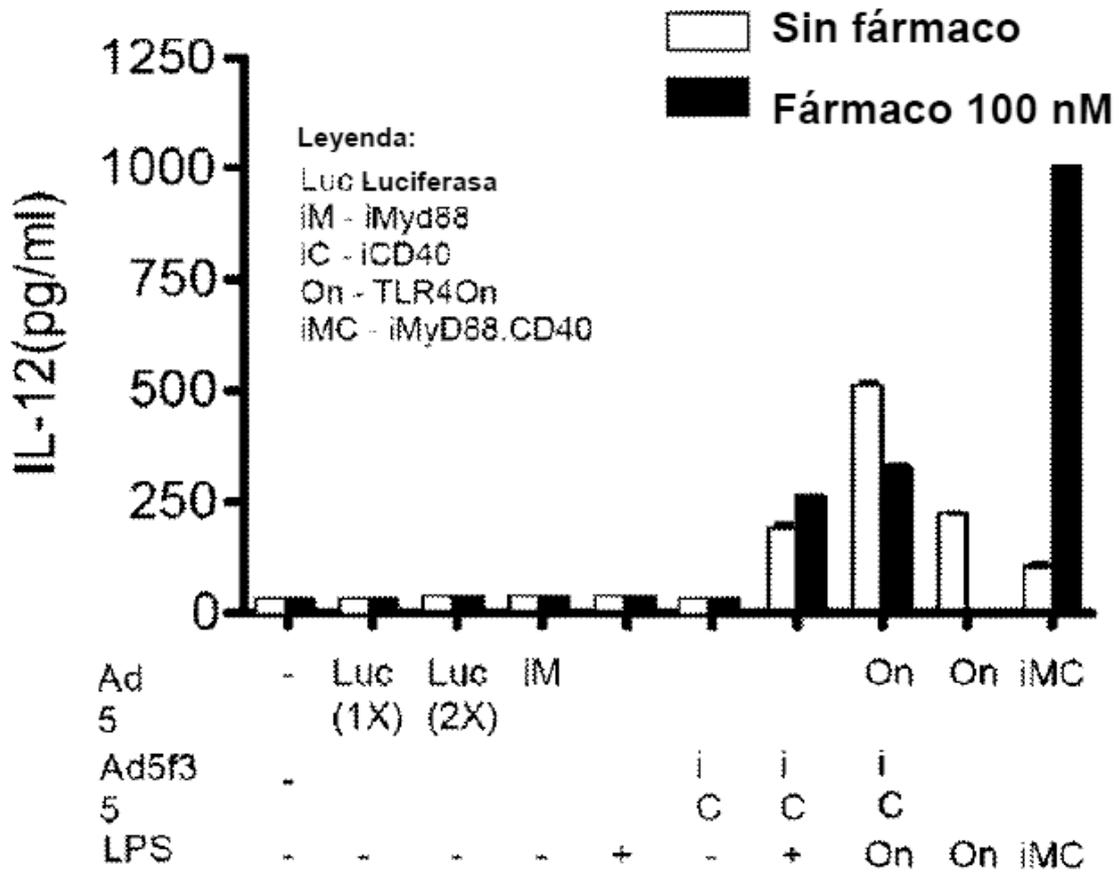


FIGURA 34

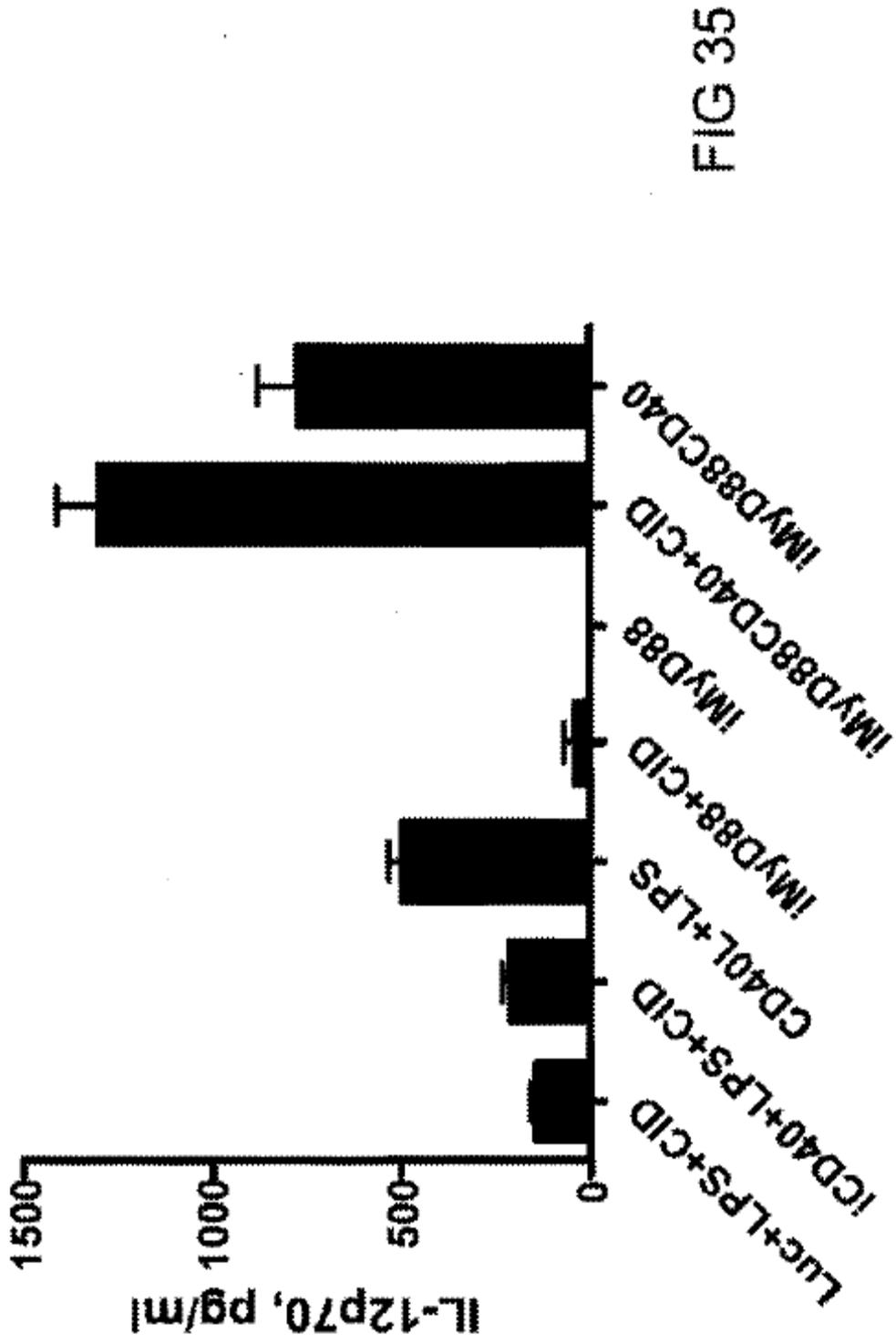


FIG 35

Fig. 36A.

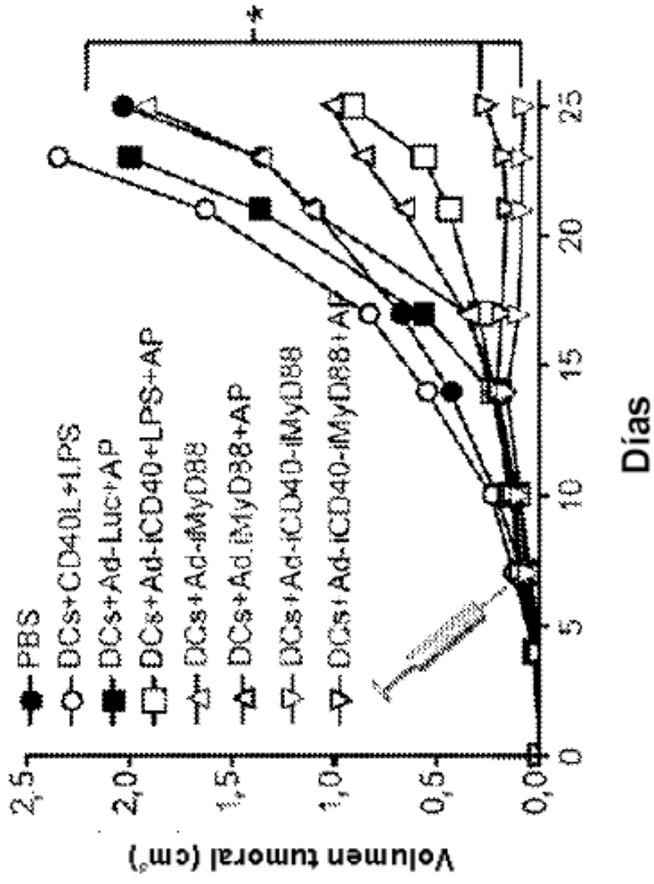
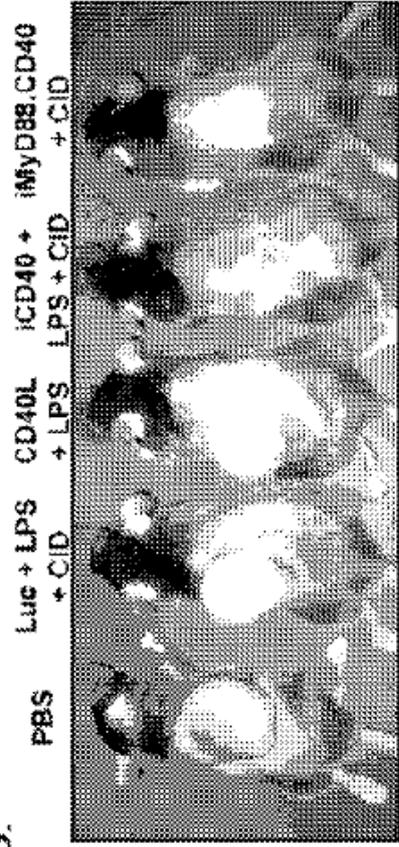


Fig. 36B.



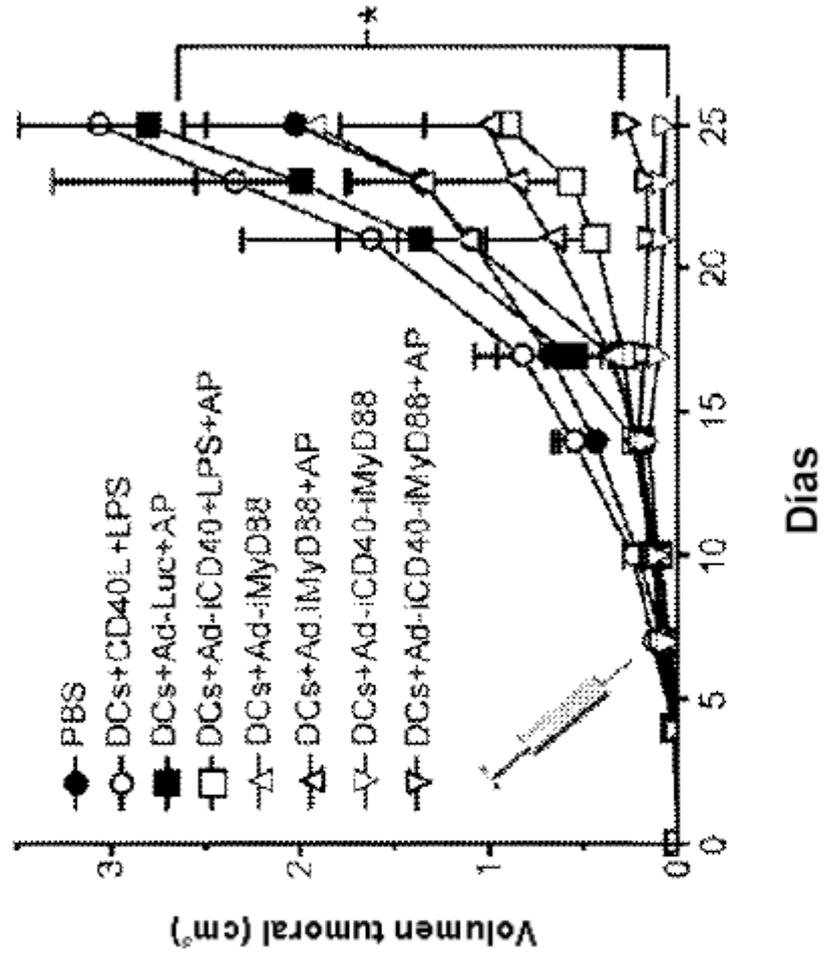


Fig. 36C.

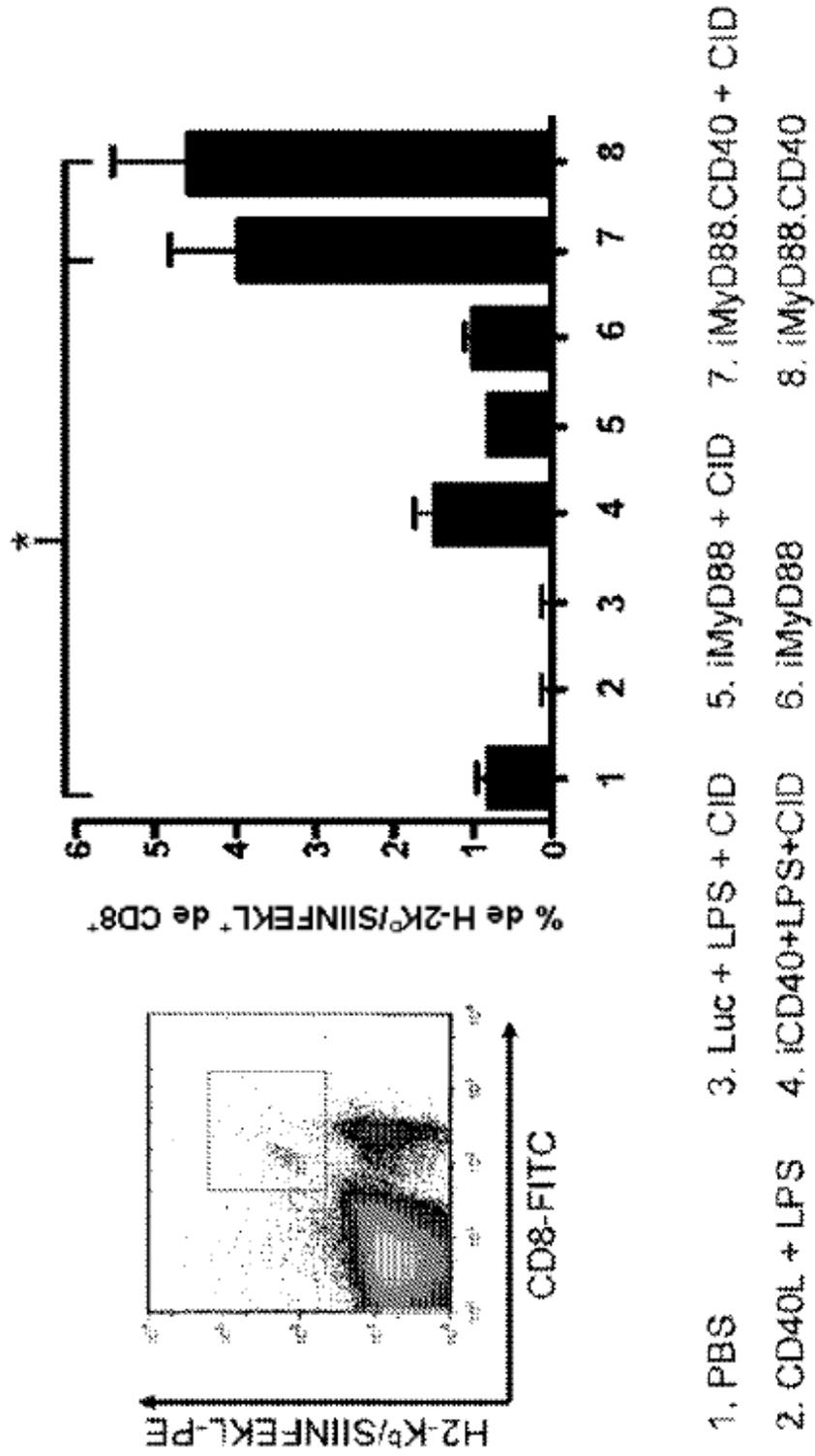
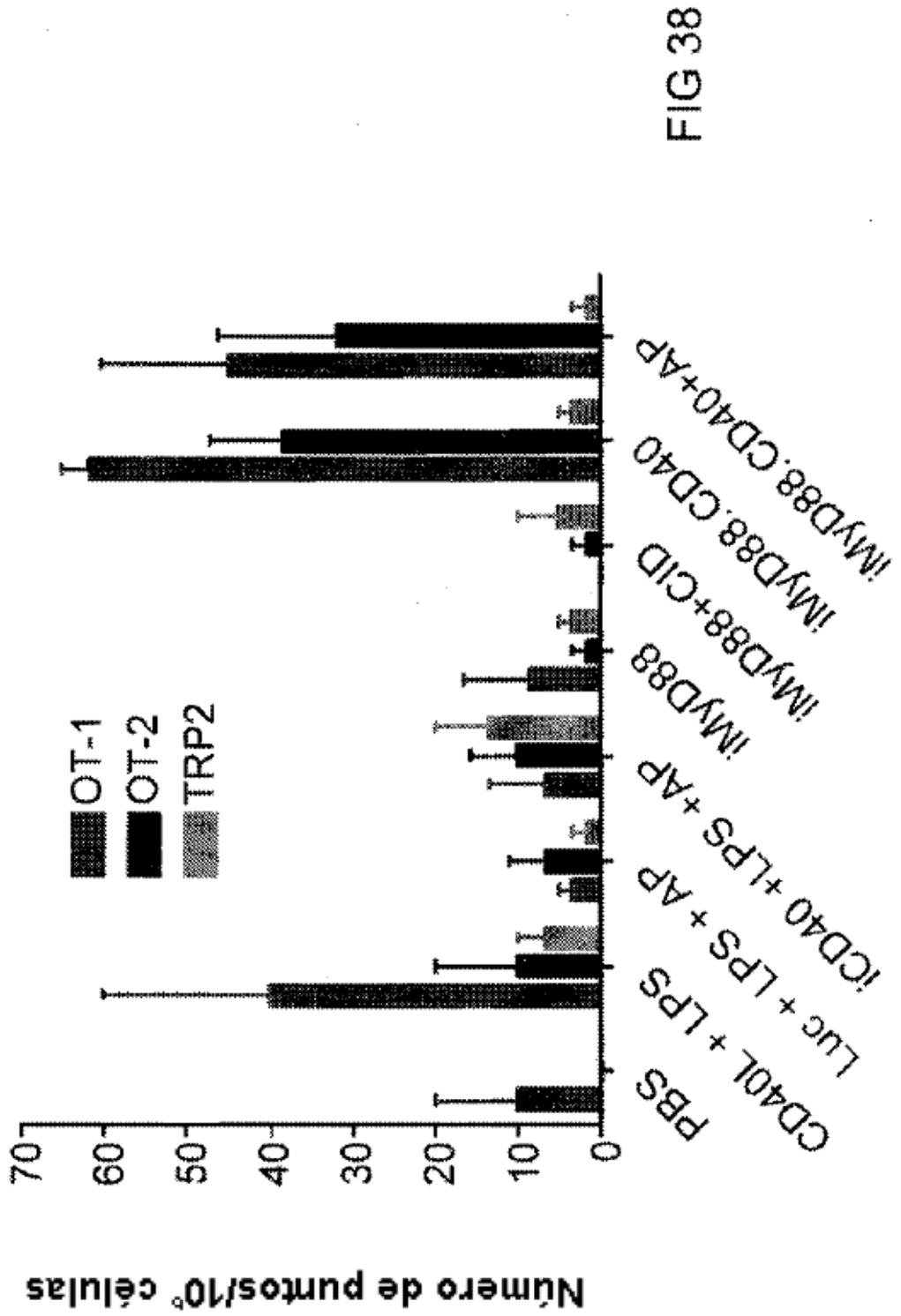


Figura 37



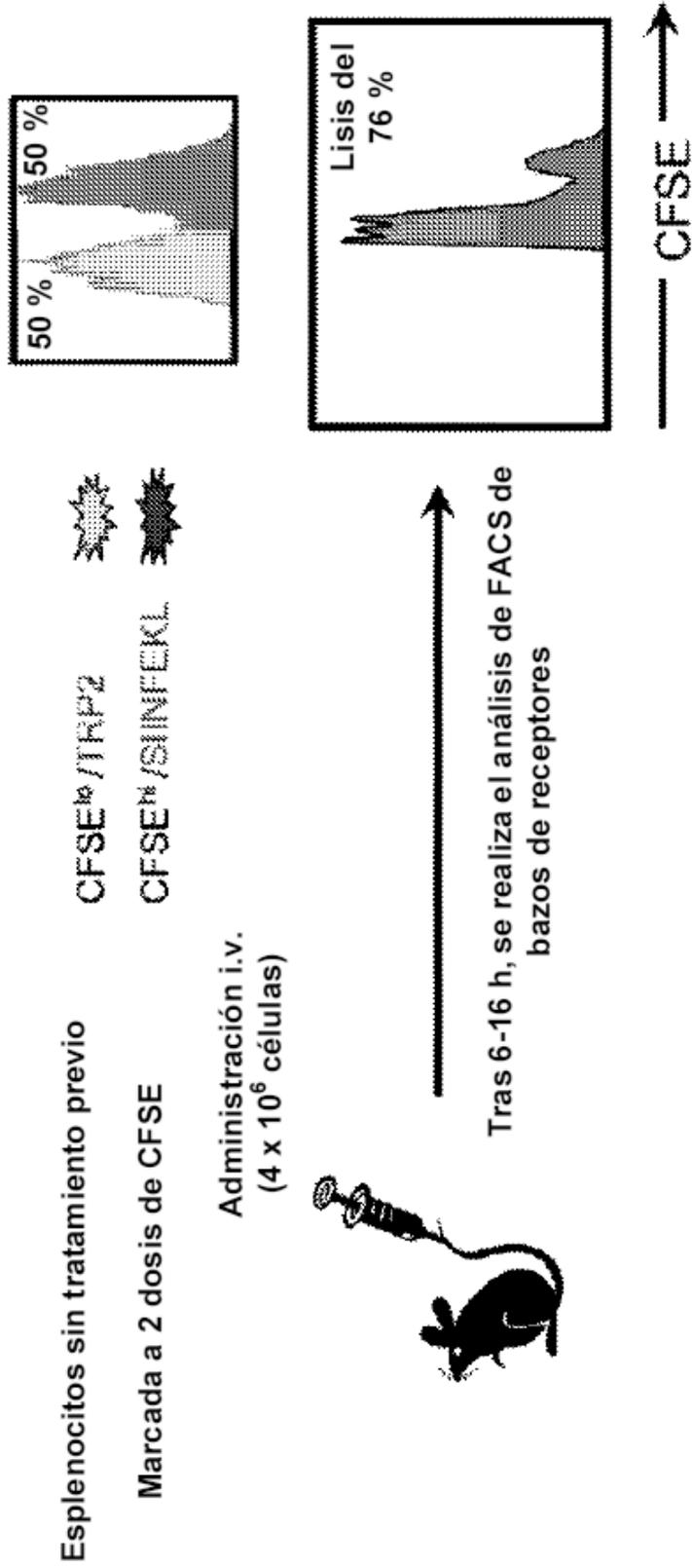


Figura 39

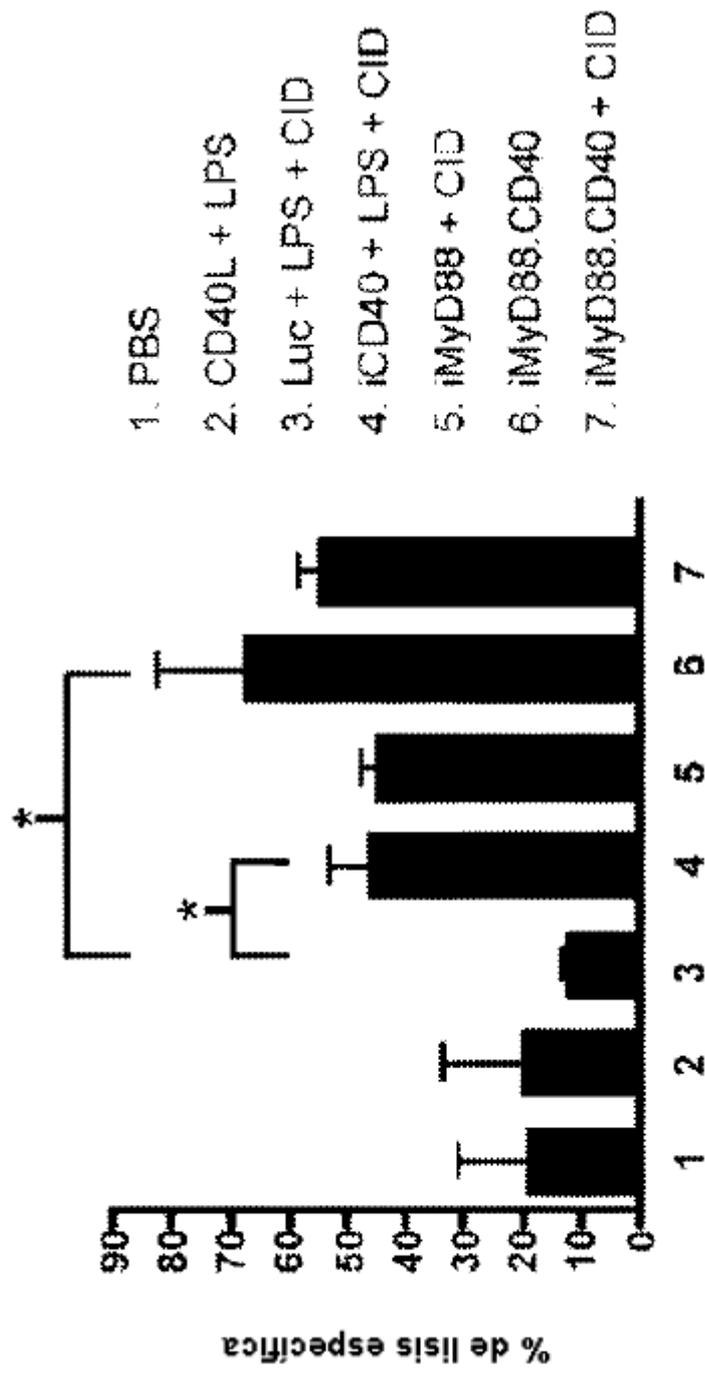


Figura 40

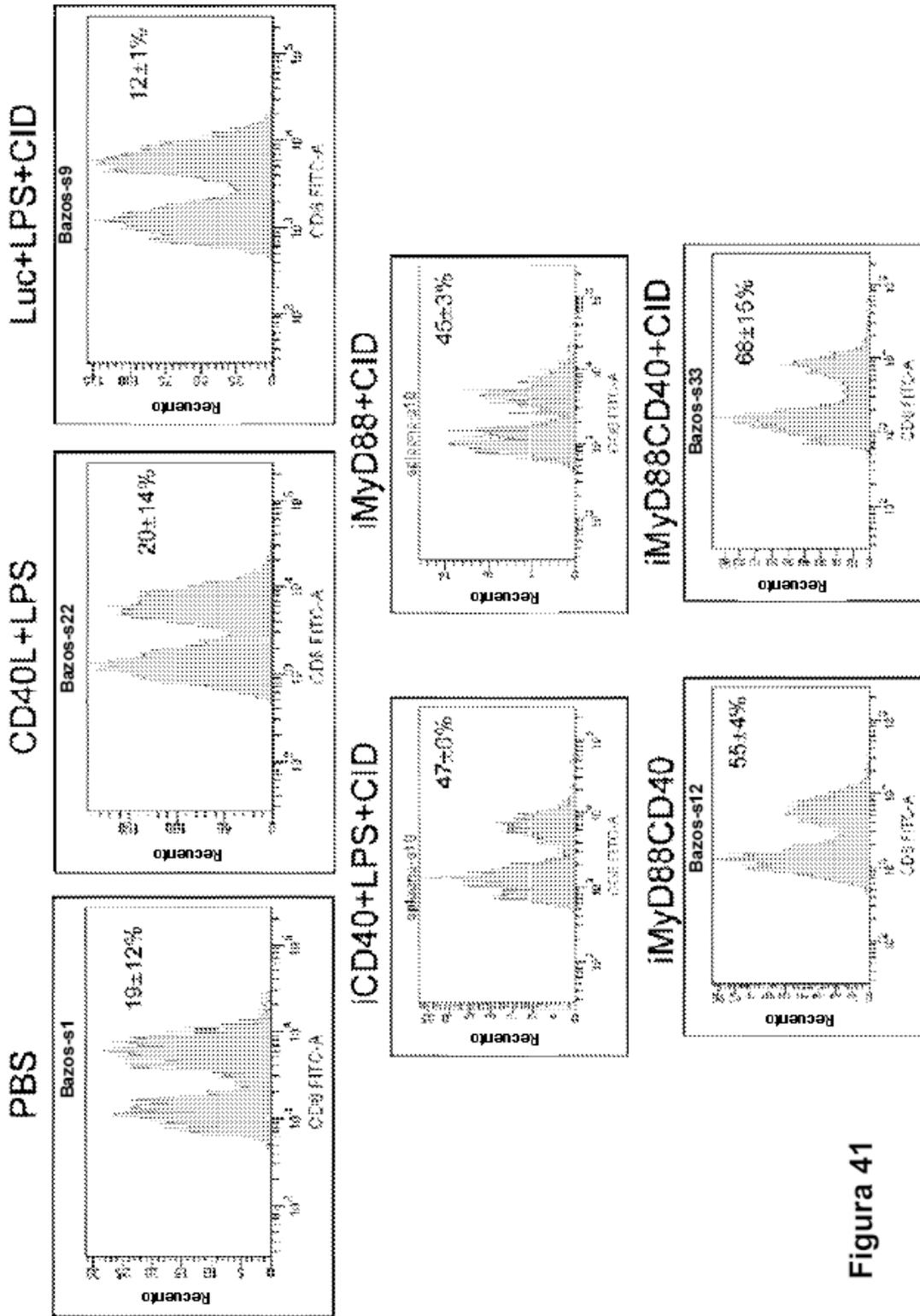


Figura 41

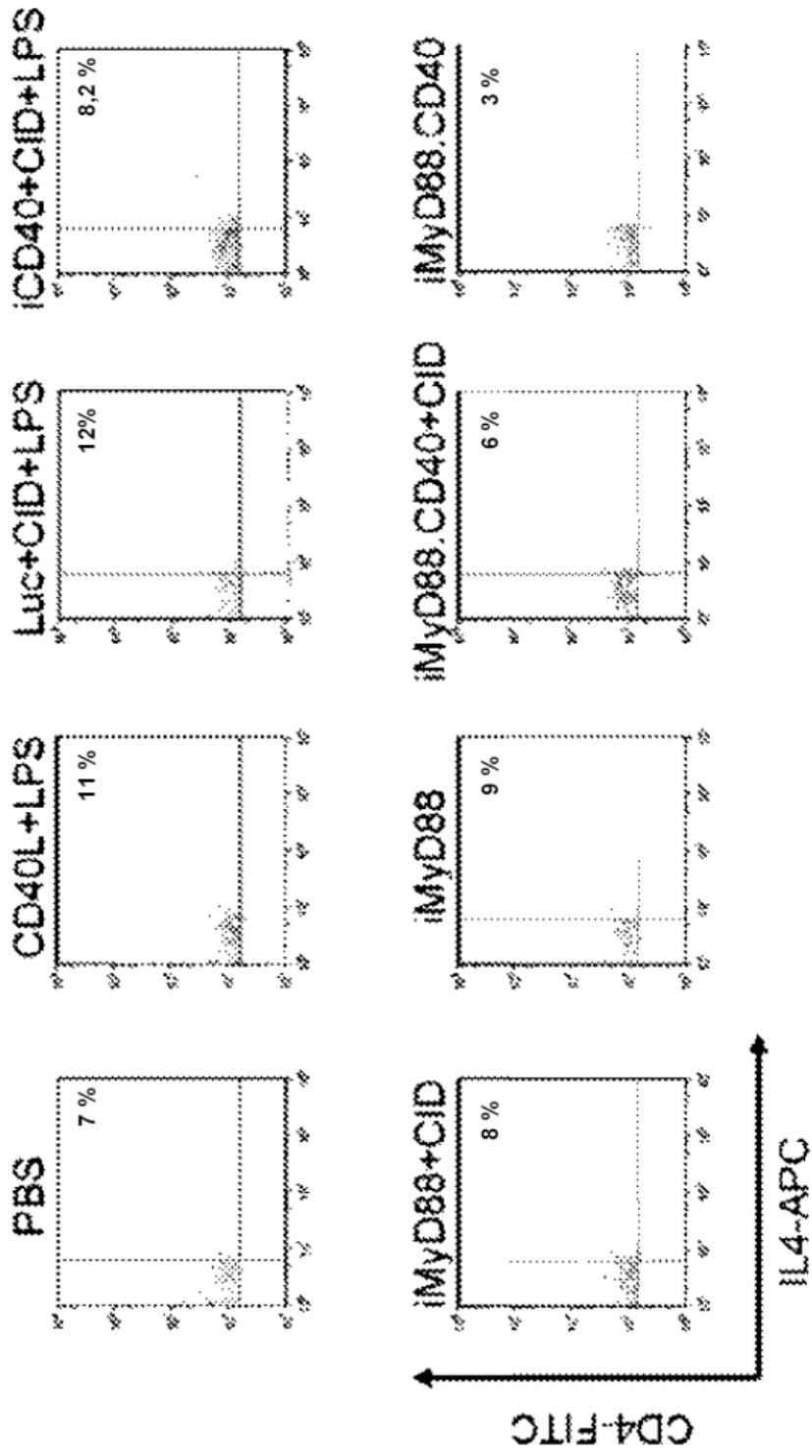


Figura 42

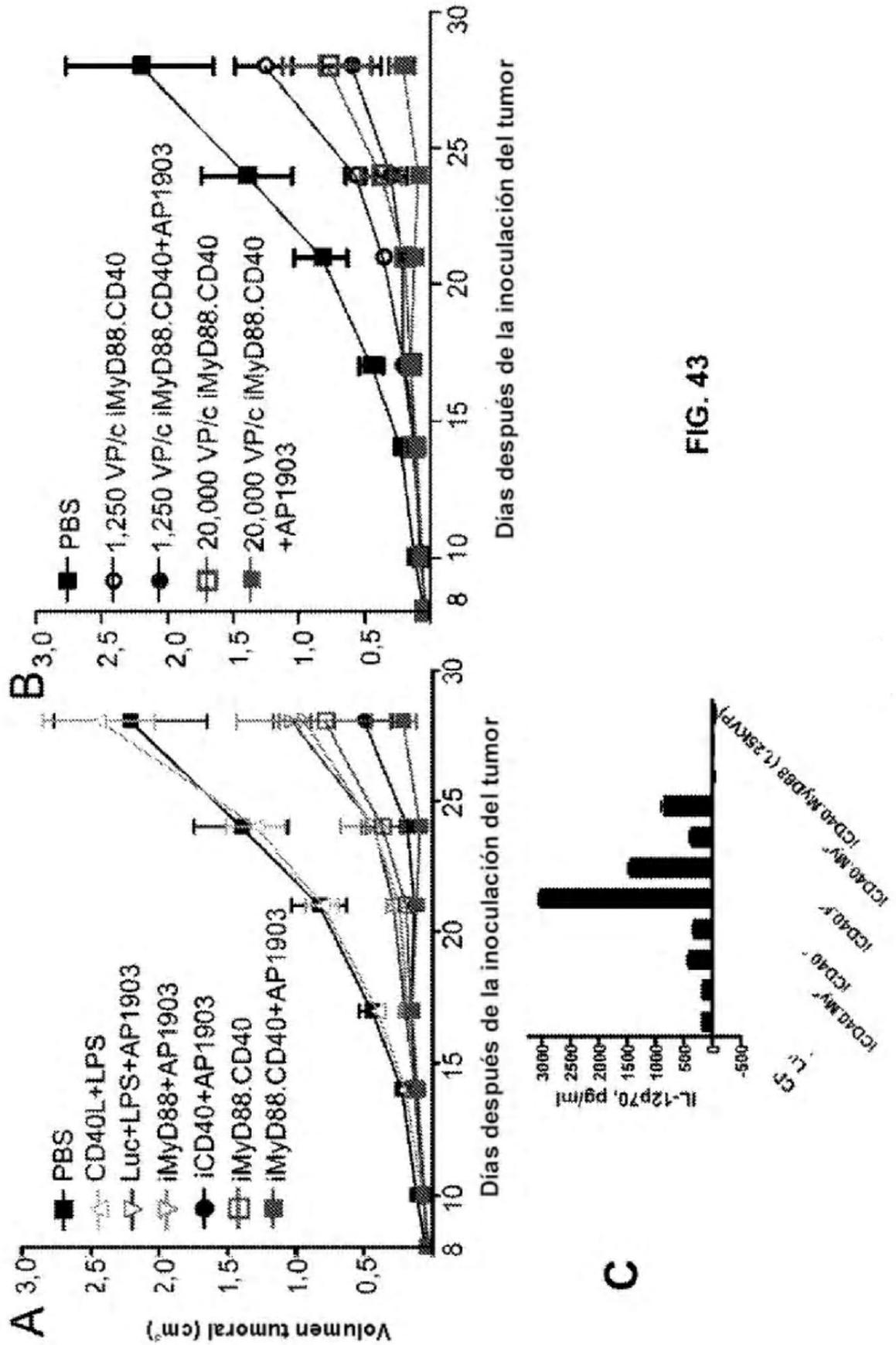
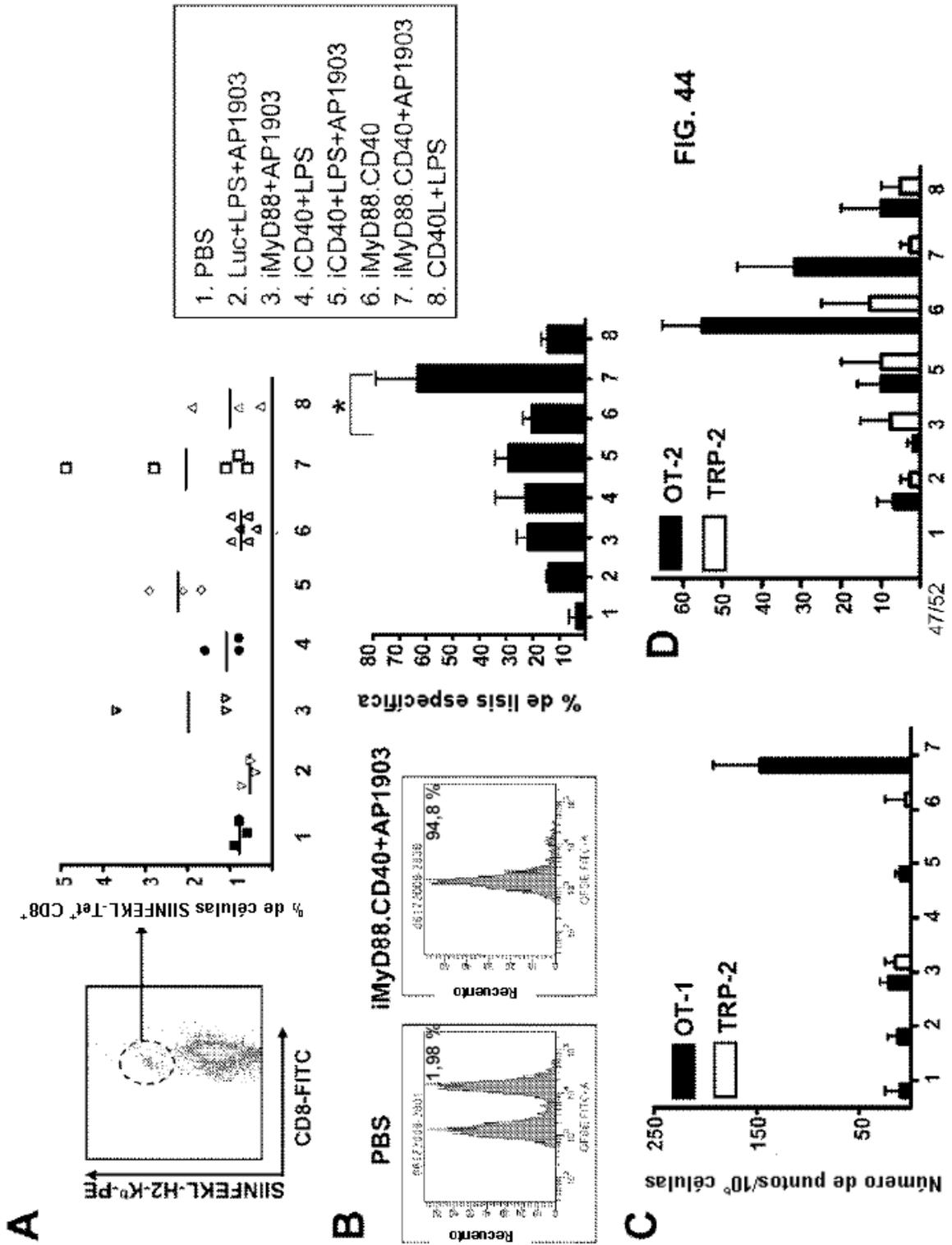


FIG. 43



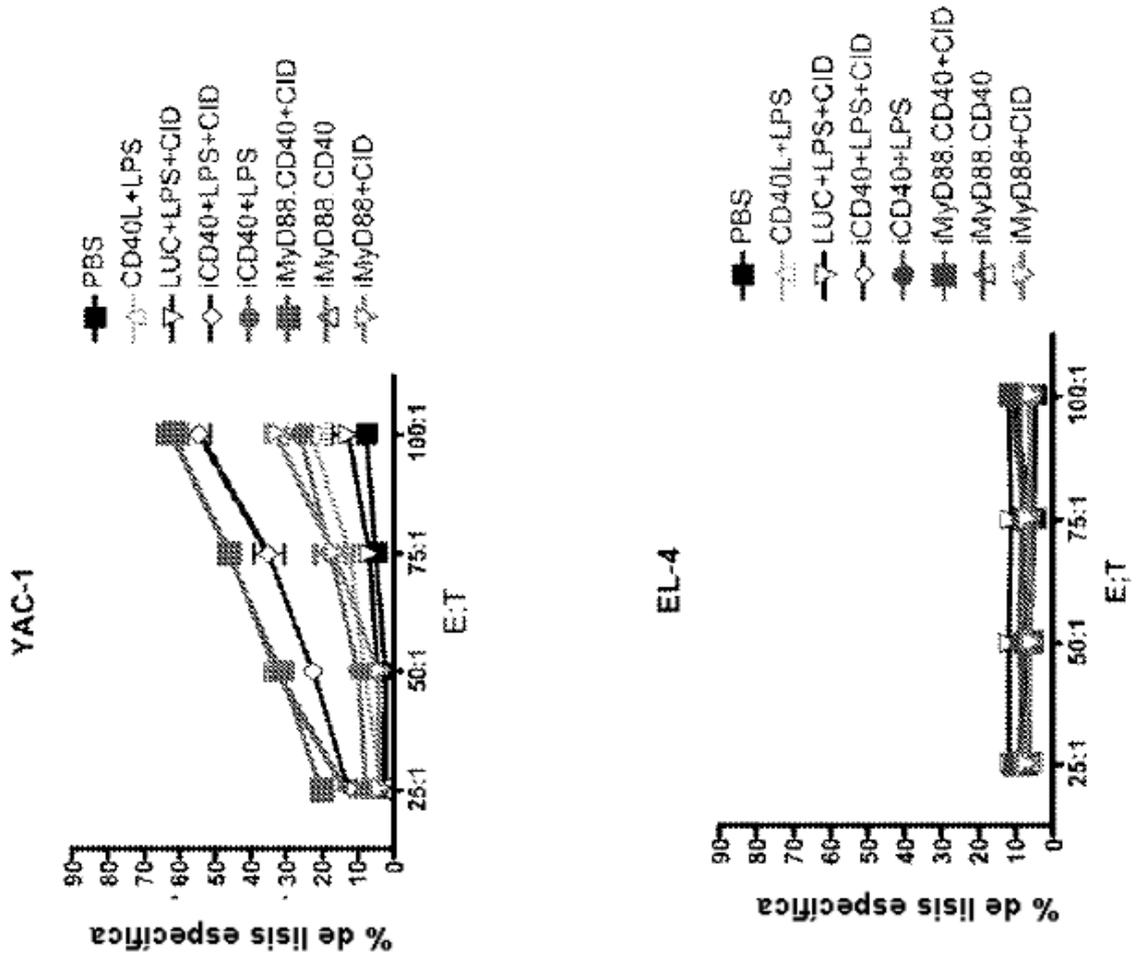


FIG. 45

Resumen de datos del control inmune del experimento 2 con EG7  
**Ensayo de CTL**

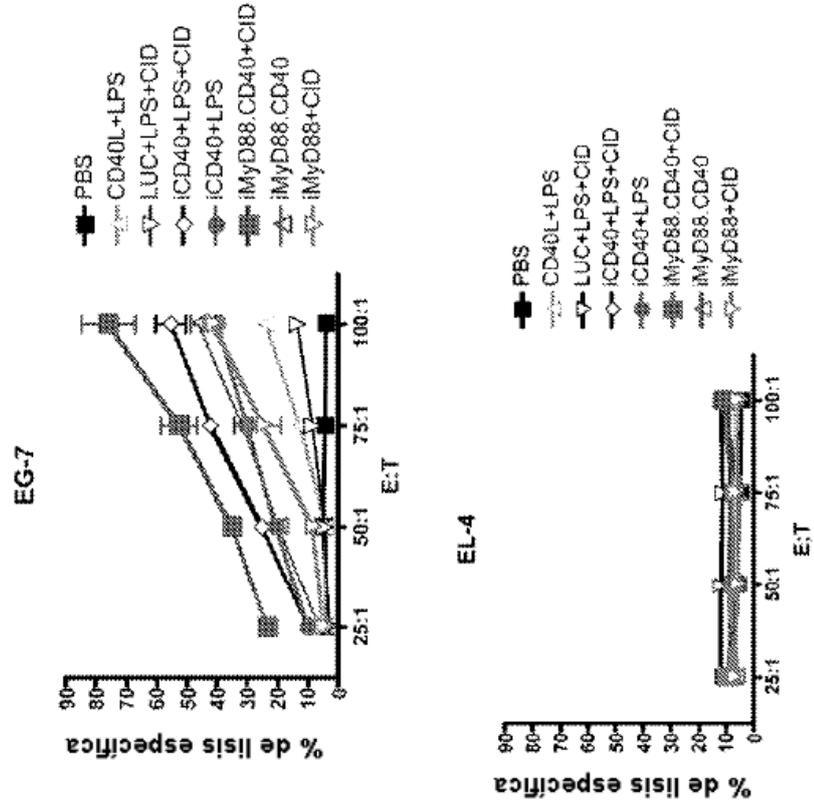


FIG. 46

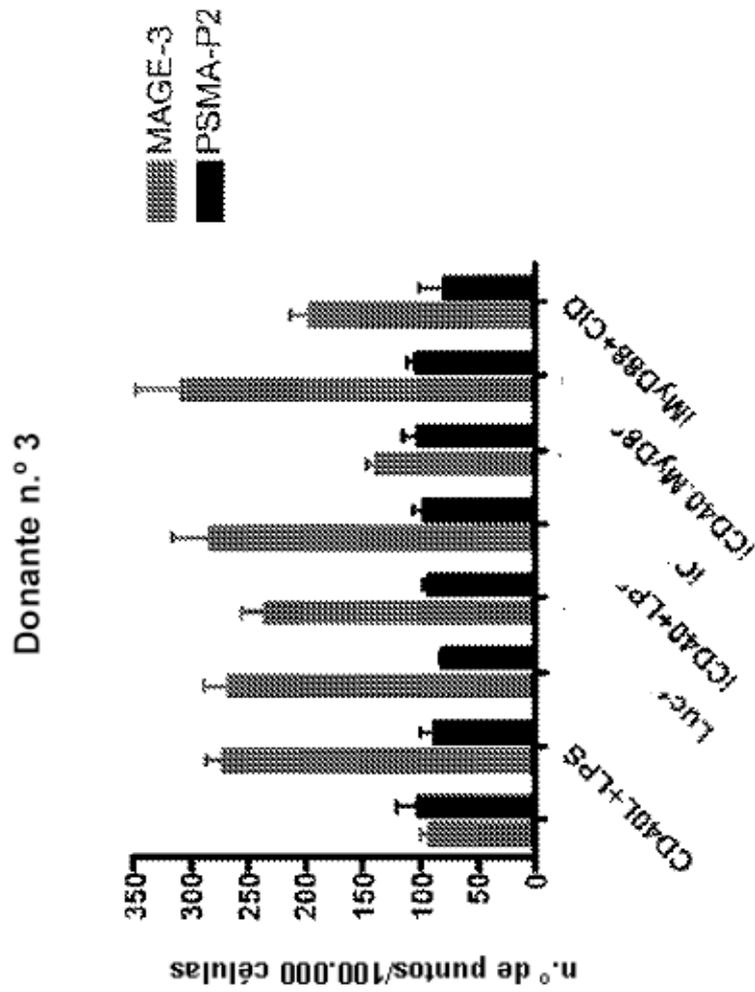


FIG. 47

### Regulación positiva de CCR7 en mBMDC

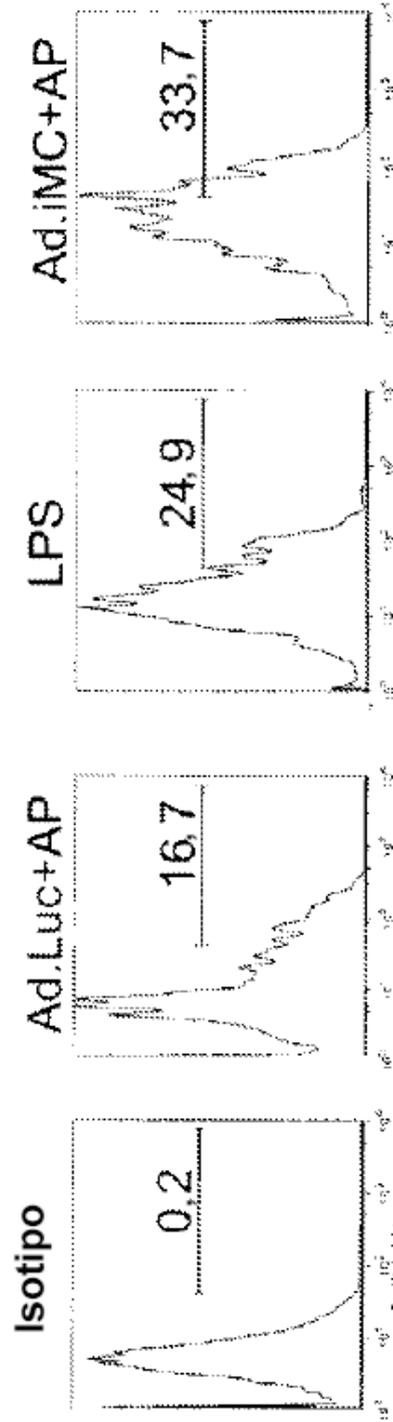


FIG. 48

### Regulación positiva de CCR7 en mBMDc



FIG. 49