

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 369**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0784** (2010.01)  
**C12N 9/12** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)  
**A61K 35/12** (2015.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2011 PCT/EP2011/005400**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO12055551**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2011 E 11787599 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2633034**

54 Título: **Células dendríticas manipuladas en su vía de transmisión de señales de NFkB**

30 Prioridad:

**26.10.2010 EP 10188893**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.03.2018**

73 Titular/es:

**FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT  
ERLANGEN-NÜRNBERG (100.0%)  
Schlossplatz 4  
91054 Erlangen, DE**

72 Inventor/es:

**BIRKHOLZ, KATRIN;  
DÖRRIE, JAN;  
SCHAFT, NIELS;  
SCHULER, GEROLD;  
VOLL, REINHARD y  
PFEIFFER, ISABELL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 661 369 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

Células dendríticas manipuladas en su vía de transmisión de señales de NFκB

La invención se refiere a las formas de realización caracterizadas en las reivindicaciones, en concreto a células dendríticas que están manipuladas por transfección de ARN en su vía de transmisión de señales de NFκB, a su producción y a su uso.

## Antecedentes de la invención

En la descripción se menciona una serie de documentos inclusive solicitudes de patente e instrucciones de uso de fabricantes del estado de la técnica. El contenido de divulgación de estos documentos no se considera relevante para la patentabilidad de la invención.

Las células dendríticas (DZ) representan el vínculo entre la respuesta inmunitaria congénita y la adaptativa. Son capaces de reconocer los patógenos como tales y de inicializar y dirigir una respuesta inmunitaria adaptativa (es decir, adaptada al patógeno especial). Las DZ también son capaces de mediar en ausencia de patógenos en la tolerancia frente a los antígenos propios. De este modo, las DZ representan la clave de la inducción dirigida de respuestas inmunitarias, pero también en la mediación de la tolerancia inmunológica. La citocina IL-12p70 desempeña un papel importante en la inducción de la inmunidad celular, mientras que la citocina IL-10 interviene en la inducción de la inmunidad tumoral, pero también de la tolerancia. La inmunoterapia de enfermedades malignas mediante el uso de DZ como adyuvante ya se ha aplicado en diversos estudios clínicos, habiéndose podido mostrar la seguridad y viabilidad de este método. No obstante, los éxitos clínicos no cumplieron con las expectativas, a pesar de que eran detectables de forma regular respuestas inmunitarias de los pacientes frente a los antígenos usados *in vitro*. Mediante la generación de las DZ en cultivo celular existe la posibilidad de manipular las mismas de forma dirigida. En este sentido es ventajoso generar DZ que sean capaces de inducir linfocitos T de memoria longevos y que a este respecto se comporten de forma resistente frente a linfocitos T reguladores (Treg) y otros mecanismos tolerogénicos. Los linfocitos T de memoria longevos en caso de un nuevo contacto con un antígeno pueden proporcionar una respuesta secundaria más rápida y más eficaz. Esta función de recuerdo puede ser asumida por linfocitos T de memoria CD4-positivos y CD8-positivos. Los linfocitos T de memoria longevos se encuentran en contraposición a las células efectoras que tienen solo un corto tiempo de vida y que la mayoría de las veces mueren después de una respuesta inmunitaria por muerte celular inducida por activación (AICD, *activation-inducing cell death*). Sin embargo, entre ambos tipos celulares existen formas de transición, tales como las células efectoras-de memoria. Estas son capaces, al igual que las células efectoras, de patrullar en todo el cuerpo y en caso de contacto con el antígeno ejercer una función efectora, además también se pueden multiplicar y son más longevas que las células efectoras. Por otro lado es concebible también el empleo de DZ para el tratamiento dirigido de la autoinmunidad y la alergia, ya que las DZ en determinadas condiciones pueden reprimir las respuestas inmunitarias y mediar en la tolerancia. Por lo tanto, los métodos y protocolos mejorados para la producción de los distintos tipos de DZ son de gran interés y son investigados a nivel mundial. Una visión general del estado de la técnica actual es proporcionada por Boczkowski y Nair, *Expert Opin. Biol. Ther.* 10 (4) (2010), 563-574 así como por Kaisho y Tanaka, *Trends in Immunology* 29 (7) (2008), 329-336.

Las DZ disponen de una pluralidad de receptores de superficie con los que pueden detectar los más diversos patógenos. Adicionalmente, las DZ son capaces de percibir diversos mensajeros propios tales como citocinas y quimiocinas así como moléculas de superficie sobre otras células del sistema inmunitario. A través de las vías de transmisión de señales intracelulares, la DZ procesa las diversas señales entrantes, por lo que se desencadenan distintos programas de diferenciación. La manipulación dirigida de estas vías de transmisión de señales puede posibilitar la generación de DZ a medida que, por ello, son más adecuadas para mediar o bien en la inmunidad (en la terapia inmunitaria del cáncer) o en la tolerancia (en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y alergias).

Ya se han formulado y llevado a cabo distintas posibilidades de intervenir en las vías de transmisión de señales en la DZ por manipulación genética. Sin embargo, a este respecto aparecen distintos obstáculos, sobre todo en la manipulación de DZ humanas. La manipulación genética en el marco de una terapia se plantea como cuestionable y la terapia génica somática está sometida a una rigurosa regulación. Además, las posibilidades de modificar genéticamente las DZ humanas usadas la mayoría de las veces en medicina (las DZ derivadas de monocitos) están muy limitadas y hasta ahora solo se ha tenido el éxito con el uso de sistemas de transfección virales que se desarrollaron a partir de lentivirus o adenovirus. Así, el documento US-A1 2009/0202492 desvela una forma activa constitutivamente de IKKα y/o IKKβ obtenida mediante sustitución de los restos serina en las posiciones 176 y 180 para IKKα y 177 y 181 para IKKβ que se expresa mediante un adenovirus. El uso de tales vehículos para la introducción de ADN, no obstante, se considera muy crítico y alberga riesgos adicionales. Así, con los lentivirus se incorporan siempre también secuencias víricas en el genoma de la célula. Por ello se pueden destruir genes activos de la propia célula o los promotores víricos pueden activar genes que de lo contrario serían inactivos. Ya que, sin embargo, la integración en el genoma se realiza de forma aleatoria no es previsible qué genes podrían verse afectados. En caso de que se trate de genes supresores de tumores u oncogenes que se destruyen o se activan, la célula en el peor de los casos puede convertirse ella misma en una célula tumoral. La respuesta inmunitaria inducida también se puede dirigir en lugar de en contra de los antígenos deseados contra los productos víricos. Esto último se aplica también a sistemas adenovirales, pudiendo resultar en este caso la respuesta inmunitaria muy intensa, ya que

muchos seres humanos ya tienen una respuesta inmunitaria existente frente a los adenovirus. En el año 1999, una respuesta inmunitaria intensa de este tipo frente a un vector adenoviral condujo incluso a un caso de muerte.

Una vía de transmisión de señales central de las DZ es la cascada de señales de NFκB. La estimulación de muchos de los receptores de superficie de las DZ conduce a una activación de esta cascada, desestabilizándose las proteínas inhibidoras por fosforilación, de tal manera que los factores de transcripción llegan al núcleo y allí causan la transcripción de diversos genes. Las cinasas que llevan a cabo esta fosforilación se denominan IKK (inhibidor de cinasas kappa).

### Breve descripción de la invención

Ahora se ha hallado que las células dendríticas (en lo sucesivo de forma abreviada "DZ") se pueden manipular mediante transfección de ARN y expresión de proteínas transmisoras de señales mutadas de la vía de transmisión de señales de NFκB en su vía de transmisión de señales de NFκB. Se han podido hallar mutantes tanto activos constitutivamente como negativos predominantemente. Mediante la maduración de las DZ antes o después de la transfección de ARN se pueden generar DZ con distintos fenotipos y perfiles de citocina, desempeñando las citocinas IL-12p70 (para la inducción de inmunidad) e IL-10 (para la inducción de tolerancia o para la generación de fenotipos inmunosuprimidos) papeles clave. La invención se refiere, por tanto, tal como se expone en las reivindicaciones, a:

- (1) células dendríticas (DZ), que están manipuladas en su vía de transmisión de señales de NFκB mediante transfección de ARN con una o varias secuencias de nucleótidos que codifican una proteína transmisora de señales mutada de la vía de transmisión de señales de NFκB;
- (2) un procedimiento para la producción de DZ manipuladas en la vía de transmisión de señales de NFκB según (1), que comprende la transfección de ARN de DZ inmaduras o maduras con una o varias secuencias de nucleótidos que codifican una proteína transmisora de señales mutada de la vía de transmisión de señales de NFκB;
- (3) una composición, composición farmacéutica o un medicamento que comprende DZ según (1);
- (4) el uso de las DZ según (1) para la estimulación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> autólogos *ex vivo*;
- (5) el uso de las DZ según (1) para la producción de un medicamento para el tratamiento y la prevención de cáncer, enfermedades infecciosas tales como SIDA mediado por VIH o enfermedades autoinmunitarias en un paciente; y del mismo modo las DZ según (1) para su uso en el tratamiento y la prevención de cáncer, enfermedades infecciosas o enfermedades autoinmunitarias en un paciente
- (6) un procedimiento para la expansión de linfocitos T, inclusive la estimulación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> autólogos *ex vivo*, que comprende la estimulación de las células con DZ según (1).
- (7) Además se describe en la descripción un procedimiento para el tratamiento de cáncer, enfermedades infecciosas o enfermedades autoinmunitarias en un paciente que comprende la administración de las DZ según (1) al paciente.

### Breve descripción de las figuras

**Figura 1:** el NFκB se encuentra en el punto central de la cadena de señal de maduración de DZ. Una pluralidad de receptores de superficie que son activados por señales de peligro y de estimulantes proinflamatorios de los que se sabe que activan la maduración de DZ causan la activación de NFκB. A su vez, la activación de NFκB causa la liberación de citocinas importantes tales como IL-12p70 y cambios fenotípicos de las DZ.

**Figura 2:** secreción de IL-12p70 (a) e IL-10 (b) por células dendríticas electroporadas con ARN de IKKβ-EEA10.

**Figura 3:** expresión de marcadores de superficie sobre células dendríticas, transfectadas con el componente de la vía de transmisión de señales de NFκB IKKβ-EEA10.

**Figura 4:** coloración de tetrámero de la estimulación de linfocitos T autólogos con células dendríticas, electroporadas con uno o dos ARN que codifican mutantes activados constitutivamente de IKKα e IKKβ y analizadas después de una sensibilización (a) y después de una reestimulación (b).

**Figura 5:** migración de células dendríticas maduras 24 h después de la transfección de ARN con uno o dos ARN que codifican mutantes activados constitutivamente de IKKα e IKKβ.

**Figura 6:** factor de inducción de marcadores de superficie sobre DZ que se electroporaron con componentes de la vía de transmisión de señales de NFκB. Se generaron DZ a partir de monocitos durante un cultivo de seis días con GM-CSF e IL-4. El día 6, las DZ se maduran durante 24 h después de la adición de un combinado de maduración convencional (IL-1β, IL-6, TNFα y PGE2) (mDZ). Después se electroporaron las DZ sin ARN con ARN de IKKα-EEA16 (activa la vía de transmisión de señales alternativas), ARN de IKKβ-EEA10 (activa la vía de transmisión de señales clásica) en solitario o en combinación (en cada caso 15 μg de ARN). Estas DZ se tiñeron 24 h después de la EP con anticuerpos frente a CD40 y CD70 y se analizaron mediante FACS. El valor medio de 8 donantes independientes está indicado con el error típico del valor medio.

**Figura 7:** factor de inducción de marcadores de superficie sobre DZ que se electroporaron con componentes de la vía de transmisión de señales de NFκB. Se generaron DZ a partir de monocitos durante un cultivo de seis días con GM-CSF e IL-4. El día 6 se maduran las DZ durante 24 h después de la adición de un combinado de maduración

convencional (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y PGE2) (mDZ). Después se electroporaron las DZ sin ARN, con ARN de IKK $\alpha$ -EE-A16 (activa la vía de transmisión de señales alternativa), ARN de IKK $\beta$ -EEA10 (activa la vía de transmisión de señales clásica) en solitario o en combinación (en cada caso 15  $\mu$ g de ARN). Estas DZ se tiñeron 24 h después de la EP con anticuerpos frente a CD83 y CD86 y se analizaron mediante FACS. El valor medio de 8 donantes independientes está indicado con el error típico del valor medio.

**Figura 8:** factor de inducción de marcadores de superficie sobre DZ que se electroporaron con componentes de la vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B. Se generaron DZ a partir de monocitos durante un cultivo de seis días con GM-CSF e IL-4. El día 6 se maduran las DZ durante 24 h después de la adición de un combinado de maduración convencional (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y PGE2) (mDZ). Después se electroporaron las DZ sin ARN, con ARN de IKK $\alpha$ -EE-A16 (activa la vía de transmisión de señales alternativa), ARN de IKK $\beta$ -EEA10 (activa la vía de transmisión de señales clásica) en solitario o en combinación (en cada caso 15  $\mu$ g de ARN). Estas DZ se tiñeron después de 24 h después de la EP con anticuerpos frente a OX-40L y CD25 y se analizaron mediante FACS. El valor medio de 8 donantes independientes está indicado con el error típico del valor medio.

**Figura 9:** secreción de las citocinas IL-12p70 e IL-10 de DZ que se electroporaron con componentes de la vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B. Se generaron DZ a partir de monocitos durante un cultivo de seis días con GM-CSF e IL-4. El día 6 se maduran las DZ durante 24 h después de la adición de un combinado de maduración convencional (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y PGE2) (mDZ). Después se electroporaron las DZ sin ARN, con ARN de IKK $\alpha$ -EE-A16 (activa la vía de transmisión de señales alternativa), ARN de IKK $\beta$ -EEA10 (activa la vía de transmisión de señales clásica) en solitario o en combinación (en cada caso 15  $\mu$ g de ARN). 24 h después de la EP se retiraron los sobrenadantes y se analizaron mediante un "Inflammation Cytometric Bead Array". Están mostrados los datos de 3 donantes independientes.

**Figura 10:** secreción de las citocinas IL-6 y TNF $\alpha$  de DZ que se electroporaron con componentes de la vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B. Las DZ se generaron a partir de monocitos durante un cultivo de seis días con GM-CSF e IL-4. El día 6 se maduran las DZ durante 24 h después de la adición de un combinado de maduración convencional (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y PGE2) (mDZ). Después, las DZ se electroporaron sin ARN, con ARN de IKK $\alpha$ -EE-A16 (activa la vía de transmisión de señales alternativa), ARN de IKK $\beta$ -EEA10 (activa la vía de transmisión de señales clásica) en solitario o en combinación (en cada caso 15  $\mu$ g de ARN). 24 h después de la EP se retiraron los sobrenadantes y se analizaron mediante un "Inflammation Cytometric Bead Array". Están mostrados los datos de 3 donantes independientes.

**Figura 11:** secreción de las citocinas IL-8 e IL-1 $\beta$  de DZ que se electroporaron con componentes de la vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B. Se generaron las DZ a partir de monocitos durante un cultivo de seis días con GM-CSF e IL-4. El día 6 se maduran las DZ durante 24 h mediante adición de un combinado de maduración convencional (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y PGE2) (mDZ). Después se electroporaron las DZ sin ARN, con ARN de IKK $\alpha$ -EE-A16 (activa la vía de transmisión de señales alternativa), ARN de IKK $\beta$ -EEA10 (activa la vía de transmisión de señales clásica) en solitario o en combinación (en cada caso 15  $\mu$ g de ARN). 24 h después de la EP se retiraron los sobrenadantes y se analizaron mediante un "Inflammation Cytometric Bead Array". Están mostrados los datos de 3 donantes independientes.

**Figura 12:** coloración de tetrámero de la estimulación de linfocitos T autólogos con DZ que se electroporaron con ARN de componentes de la vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B. Las células dendríticas maduras se electroporaron sin ARN, con ARN de IKK $\alpha$ -EE-A16 (activa la vía de transmisión de señales alternativa), ARN de IKK $\beta$ -EEA10 (activa la vía de transmisión de señales clásica) en solitario o en combinación (en cada caso 15  $\mu$ g de ARN). Una parte de las DZ se coelectroporó con ARN que codificaba MelanA (Mela). 4 h después de la electroporación se estimularon linfocitos T CD8<sup>+</sup> autólogos con esta DZ en una relación de 10:1. Una semana después de la estimulación se analizó la cantidad de los linfocitos T con especificidad antigénica mediante coloración de tetrámero y se identificó el fenotipo mediante coloración de CCR7 y CD45RA. Los linfocitos T se analizaron después de una estimulación de activación (1<sup>a</sup> estimulación) y dos nuevas estimulaciones (2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> estimulación). Está indicado el valor medio de 5 donantes independientes con el error típico del valor medio.

**Figura 13:** marcador de superficie sobre DZ que se electroporaron con componentes de la vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B con concentraciones crecientes del ARN transfectado. Las DZ se generaron a partir de monocitos durante un cultivo de seis días con GM-CSF e IL-4. El día 6, las DZ se maduran durante 24 h después de la adición de un combinado de maduración convencional (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y PGE2) (mDZ). Después se electroporaron las DZ sin ARN, con ARN de IKK $\alpha$ -EE-A16-ARN (activa la vía de transmisión de señales alternativa), ARN de IKK $\beta$ -EEA10 (activan la vía de transmisión de señales clásica) en solitario o en combinación en concentraciones crecientes. Estas DZ se tiñeron 24 h después de la EP con anticuerpos frente a CD25, CD40, CD70 y OX-40L y se analizaron mediante FACS. Está indicado el valor de tres donantes independientes con el error típico del valor medio.

**Figura 14:** secreción de las citocinas IL-12p70 e IL-10 por DZ que se electroporaron con componentes de la vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B con concentraciones crecientes del ARNm transfectado. Las DZ se generaron a partir de monocitos durante un cultivo de seis días con GM-CSF e IL-4. El día 6 se maduran las DZ durante 24 h después de la adición de un combinado de maduración convencional (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y PGE2) (mDZ). Después se electroporaron las DZ sin ARN, con ARN de IKK $\alpha$ -EE-A16 (activa la vía de transmisión de señales alternativa), ARN

de IKK $\beta$ -EEA10 (activa la vía de transmisión de señales clásica) en solitario o en combinación (en concentraciones crecientes). 24 h después de la EP se retiraron los sobrenadantes y se analizaron mediante un “*Inflammation Cytometric Bead Array*”. Está indicado el valor medio de 3 donantes independientes con el error típico del valor medio.

5 **Figura 15:** ensayo de luciferasa de células 293T que se electroporaron con componentes de la vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B. Las células 293T se electroporaron con activadores (ARN de IKK $\alpha$ -EEA16 o ARN de IKK $\beta$ -EEA10) o inhibidores de la vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B (ARN de IKK $\alpha$ -K44M-A16 o ARN de IKK $\beta$ -K44M-A10) en solitario o en combinación. Todas las células se coelectroporaron con vectores que codificaban luciferasa incluyendo un promotor de NF $\kappa$ B. La vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B de una parte de las células se activó durante una  
10 noche con CD40L soluble. Se midió la actividad de luciferasa 24 h después de la electroporación.

**Figura 16:** secreción de IL-12p70 por células dendríticas maduras que se transfectaron con ARNm que codifica mutantes de IKK activos constitutivamente.

Figura 17: migración de células dendríticas maduras que se transfectaron con ARN que codifica mutantes de IKK activos constitutivamente.

15 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a las formas de realización caracterizadas en las reivindicaciones, en concreto células dendríticas (DZ) que están manipuladas en su vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B mediante transfección de ARN con una o varias secuencias de nucleótidos que codifican al menos una proteína transmisora de señales mutada de la vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B, a su producción y a su uso. Se basa en el hallazgo de que se  
20 pueden manipular en su vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B las DZ por transfección de ARN y expresión de proteínas transmisoras de señales mutadas de la vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B.

La expresión “células dendríticas” se usa según la invención como en el estado de la técnica. Están caracterizadas en el estado inmaduro por un nivel reducido de proteínas MHC y de moléculas B7 coestimuladoras así como la capacidad de fagocitosis y de pinocitosis así como por la ausencia de las moléculas de superficie CD83 y CD25. En el estado maduro están caracterizadas, entre otras cosas, por un patrón modificado de proteínas de superficie, aumentando la expresión en superficie de algunas o de todas de las siguientes moléculas: CD25, CD40, CD70, CD80, CD83, CD86 y así como proteínas MHC. Las DZ “maduras”, se diferencian de las “inmaduras”, entre otras cosas, porque las primeras son más activas en cuanto a la inmuoestimulación, habitualmente obtienen la capacidad de migrar *in vivo* al ganglio linfático drenante y de presentar de forma intensificada antígeno expresado de forma endógena y exógeno en el contexto de MHC. En condiciones fisiológicas, solo las DZ “maduras” son capaces de activar linfocitos T indiferenciados. La expresión “transfección de ARN” se usa según la invención como en el estado de la técnica. Correspondientemente, la transfección de ARN indica la introducción de ARN extraño en una célula eucariota, en el sentido de la invención una DZ, preferiblemente una DZ humana. “Las secuencias de nucleótidos” comprenden según la invención ADN y ARN. El ARN que se va a transfectar preferiblemente es ARNm que no contiene intrones. Se puede obtener una definición de ARNm del estado de la técnica (véase “*Molekulare Genetik*”, Knippers, 9ª edición revisada, Thieme Verlag, 2006). Se puede continuar aumentando la eficiencia inmunomoduladora de las DZ según la invención al estabilizarse el ARNm. Esto se puede realizar, por ejemplo, mediante adición de un análogo de cap durante la transcripción *in vitro* de los ARNm. El uso de la denominada tecnología ARCA (“análogo de cap anti-inverso”) conduce a una orientación 100 % correcta del cap y, por ello, a un aumento adicional de la eficiencia (Stepinski *et al.*, RNA 7 (10), 2001, 1486-1495). Como alternativa a esto se puede aumentar la estabilidad de los ARNm cuando se aplica una estructura cap enzimáticamente sobre el ARNm ya sintetizado *in vitro*, tal como se describe por ejemplo en Tcherepanova *et al.*, BMC Mol. Biol. (2008), 9: 90. Se puede aumentar adicionalmente la estabilidad del ARNm mediante la unión de regiones no traducidas (UTR), por ejemplo del ARNm de  $\beta$ -globina (compárese por ejemplo con Yu *et al.*, Mol. Cell Biol. 21 (17) (2001), 5879-5888).

45 Se puede conseguir una mejora de la eficiencia de la traducción con una mejora esperada de las propiedades inmunomoduladoras de las DZ así mismo mediante el uso de los métodos de *capping* que se han descrito en el párrafo anterior, así como por procedimientos conocidos tales como la inclusión de un “Internal Ribosome Entry Site” (IRES sitio interno de entrada de ribosoma) en el extremo 5' del ARN traducido *in vitro* (Tan *et al.*, Hum. Immunol. 69 (1), 2008, 32-40). Se puede aumentar el rendimiento traducido de proteína en experimentos de transfección en general y así también en relación con la presente invención cuando se prolonga la longitud de la cola de poliA. Esta tecnología conduce a resultados aún mejores cuando se aplica junto con la técnica de ARCA (Mockey *et al.*, Biochem Biophys. Res. Commun. 340 (4) 2006), 1062-1068).

En relación con la presente invención, una “proteína transmisora de señales mutada de la vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B” se define como una proteína que es un componente de la cascada de señales conocida que conduce a la activación de NF $\kappa$ B y la siguiente translocación de esta proteína al núcleo celular. Además, esta expresión comprende según la invención proteínas que interaccionan de forma moduladora con componentes de la cascada de señales y que influyen en la misma en su actividad. Todas estas proteínas presentan cambios (mutaciones) con respecto a las correspondientes proteínas de tipo natural. Las correspondientes mutaciones están definidas entre otras cosas por deleciones, extensiones o preferiblemente la sustitución de uno o varios

aminoácidos.

La definición según la invención de la vía de transmisión de señales de NFκB comprende la vía de transmisión de señales clásica y la alternativa. La vía de transmisión de señales clásica se activa por infecciones microbiológicas y víricas o por citocinas. En este contexto, el complejo de IKK, compuesto por IKKα, IKKβ o NEMO, por fosforilación induce la degradación de IκB, después de lo cual se transloca el factor de transcripción NFκB al núcleo celular y activa diversos genes diana. La vía de transmisión de señales de NFκB alternativa es independiente de IKKβ y de NEMO. Para esto, IKKα interactúa con p100 (NFκB2) que se procesa hasta su forma p52 y que junto con RelB se transloca al núcleo celular y activa los genes diana.

Las "manipulaciones" de la vía de transmisión de señales de NFκB en relación con la presente invención se pueden medir por una actividad modificada de las células dendríticas. Estas comprenden modificaciones de la secreción de IL12p70, de la secreción de IL-10, de la migración o de la expresión de distintos factores de inducción, tales como por ejemplo OX-40L o CD25. Está comprendida preferiblemente la (mayor) secreción de IL12p70 con preferiblemente valores aumentados al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 10 veces, aún más preferiblemente al menos 30 veces y lo más preferiblemente al menos 50 veces de células dendríticas que se han transfectado con mutantes activos constitutivamente de IKKα y/o IKKβ frente a células dendríticas transfectadas con ARN de control o células dendríticas no transfectadas que preferiblemente son células dendríticas maduras. Además es preferible la secreción de IL-10 con valores aumentados al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 10 veces y lo más preferiblemente al menos 30 veces de células dendríticas, preferiblemente células dendríticas inmaduras, que se han transfectado preferiblemente con mutantes activos constitutivamente de IKKα y/o IKKβ y que se comparan con células dendríticas no transfectadas o transfectadas con ARN de control. También puede ser preferible una elevada secreción de IL-12p70 con una al mismo tiempo baja secreción de IL-10 con una relación de cantidades de IL-12p70 a IL-10 de preferiblemente al menos 3, más preferiblemente al menos 5, aún más preferiblemente al menos 10 y lo más preferiblemente al menos 20 por células dendríticas preferiblemente maduras que se han transfectado con mutantes activos constitutivamente de IKKα y/o IKKβ.

A través de la transfección de ARN de células dendríticas, los inventores de la presente invención han podido mostrar sorprendentemente que mediante la transfección de ARN se pueden manipular células dendríticas modificadas a través de la vía de transmisión de señales de NFκB en su funcionamiento. La transfección de ARN de distintos ARN en células dendríticas puede conducir o bien a una inmunoestimulación o bien a una inducción de tolerancia o una supresión de respuestas inmunológicas. Los ARN transfectados pueden intensificar la secreción de IL-12p70 y conducir, por consiguiente, a una inmunoestimulación. Otro efecto sorprendente de la presente invención se basa en que ARN idénticos, por ejemplo, ARN que codifican mutantes activadores constitutivamente de IKKα o IKKβ tienen distintos efectos sobre la inmunoestimulación de células dendríticas, dependiendo del momento de su transfección de ARN (véase las Figuras 2a y 2b). según la invención, en la transfección de DZ maduras con ARN cuya transcripción conduce a proteínas en las que los restos serina, que con activación fisiológica son fosforilados por IKK y por ello median en la actividad cinasa de IKK, están sustituidos por restos glutamina, se observa una inmunoestimulación. Por ello se puede conseguir, por ejemplo con una presentación simultánea de antígenos tumorales por las DZ una activación de linfocitos T citotóxicos eficaz, lo que se puede aprovechar después de la administración de las DZ (autólogas) transfectadas al paciente al combatir tumores. Este principio se puede aplicar correspondientemente en otras enfermedades. Sí, por el contrario, la transfección de ARN se lleva a cabo con DZ inmaduras, se espera según la invención un efecto inmunosupresor, ya que tales DZ secretan grandes cantidades de la IL-10 inmunosupresora. Ambas alternativas representan formas de realización preferentes de la invención. Sorprendentemente también se ha podido mostrar que las DZ maduras según la invención son capaces de migrar (véase la Figura 5). Un control de este tipo sobre la actividad inmunológica de células dendríticas representa un enorme avance para la aplicación médica, por ejemplo en forma de vacunación con células dendríticas para el tratamiento de pacientes con cáncer.

Según la invención, las mencionadas propiedades inmunomoduladoras, en particular presentadoras de antígenos de las DZ se pueden continuar mejorando cuando en las DZ, aparte de los ARN que codifican la o las proteínas transmisoras de señales mutadas, se incorporan ARN inhibidores, tales como ARNip o se expresan ahí para inactivar ARNm que codifican proteínas inmunosupresoras tales como entre otras A20, IL-10, TGF. Un procedimiento de este tipo está descrito en Breckpot *et al.*, J. Immunol. 182 (2) (2009), 860-870. Una mayor inducción más eficaz de la actividad citolítica específica de antígeno por las DZ como célula presentadora de antígenos también se espera cuando en la misma se inactiva el ARNm de inmunoproteosoma, por ejemplo por ARNip (Dannull *et al.*, Blood 110(13) (2007), 4341-4350). Se espera un efecto mejorado de las vacunas de ARNm de DZ, por ejemplo al combatir el cáncer también después de la estimulación de las DZ por secuencias de ARN mono- o bicatenarias (compárese por ejemplo con Diebold *et al.*, Science 303 (2004), 1529-1531).

Son a este respecto proteínas transmisoras de señales mutadas preferentes adecuadas de la vía de transmisión de señales de NFκB mutantes del inhibidor de cinasas kappa IKK y según esto mutantes de IKKα o IKKβ activos constitutivamente. Para la producción de las DZ según el aspecto (1) de la invención se produjeron experimentalmente varios mutantes activos constitutivamente o negativos predominantemente de distintos IKK. A este respecto son mutantes de IKKα e IKKβ activos constitutivamente preferiblemente aquellos que partiendo de las correspondientes secuencias del tipo natural preferiblemente de SEQ ID NO: 1 o 4 presentan una o varias sustituciones de Ser por Glu en el centro activo.

A este respecto se prefieren aquellos mutantes de IKK $\alpha$  en los que uno o varios de los restos de aminoácidos Ser176 y Ser180 del tipo natural de IKK $\alpha$  de la SEQ ID NO: 1 están sustituidos por Glu, de forma particularmente preferible en los restos de aminoácidos Ser176 y Ser180 del tipo natural de IKK $\alpha$  de la SEQ ID NO: 1 están sustituidos por Glu y opcionalmente uno o varios de los restos de serina y treonina C-terminales desestabilizantes, preferentemente restos de serina y treonina desestabilizantes en las posiciones 661, 662, 665, 669, 670, 676, 679, 680, 686, 687, 693, 695, 699, 705, 706, 721 y 722 y en una forma menos preferente 661, 662, 665, 669, 670, 676, 679, 680, 686, 687, 692, 694, 698, 704 y 705 del tipo natural de la SEQ ID NO: 1 están sustituidos por restos alanina. Todos los mutantes de IKK mencionados que están caracterizados por la inclusión de restos alanina conducen a una estabilización de la proteína y además están caracterizados porque en cada caso intensifican el efecto de la actividad aumentada o inhibitoria. La incorporación de los restos alanina estabilizantes en las proteínas representa en todas las formas de realización según la invención además formas de realización preferibles. Preferiblemente están sustituidos al menos dos, preferiblemente al menos tres, más preferiblemente al menos cuatro, más preferiblemente al menos ocho y según lo reivindicado todos los restos mencionados por restos alanina. Todas las posibles permutaciones, aunque no estén mencionadas en el presente documento, están comprendidas explícitamente por el contenido de divulgación de la presente memoria descriptiva como si se hubieran mencionado individualmente. Además se prefieren los mutantes de IKK $\beta$  en los que uno o varios de los restos de aminoácidos Ser177 y Ser181 del tipo natural de IKK $\beta$  preferiblemente de la SEQ ID NO: 4 están sustituidos por Glu, de forma particularmente preferente los restos de aminoácidos Ser177 y Ser181 del tipo natural de IKK $\beta$  de la SEQ ID NO: 4 están sustituidos por Glu y opcionalmente uno o varios de los restos de serina y treonina C terminales estabilizantes, preferiblemente los restos de serina y treonina desestabilizantes en las posiciones 670, 672, 675, 679, 682, 689, 692, 695, 697 y 705 del tipo natural de la SEQ ID NO: 4 están sustituidos por restos alanina.

La invención se refiere a los mutantes de IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  activos constitutivamente que comprenden los restos de aminoácidos 25-769 de la SEQ ID NO: 2 o los restos de aminoácidos 18-773 de la SEQ ID NO: 5, preferiblemente que presentan la secuencia de la SEQ ID NO: 2 o de la SEQ ID NO: 5 o conteniendo la secuencia de ARN codificante la SEQ ID NO: ID NO 3 o 6. Además, cada ARNm que contiene una secuencia que puede originarse por mutaciones sinónimas a partir de la secuencia SEQ ID NO: 3 o 6, tal como entre otras cosas por optimización de codones, queda comprendido por el contenido de divulgación de esta memoria descriptiva.

Los mutantes IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  inhibidores descritos así mismo en el presente documento a este respecto son aquellos que partiendo de las correspondientes secuencias de tipo natural de la SEQ ID NO: 1 o 4 presentan una sustitución de Lys por Met. A este respecto se prefieren aquellos mutantes de IKK $\alpha$  en los que el resto de aminoácido Lys44 del tipo natural de IKK $\alpha$  de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por Met y opcionalmente uno o varios de los restos de serina y treonina C terminales desestabilizantes, preferiblemente los restos de serina y treonina desestabilizantes en las posiciones 661, 662, 665, 669, 670, 676, 679, 680, 686, 687, 693, 695, 699, 705, 706, 721 y 722 del tipo natural de la SEQ ID NO: 1 están sustituidos por restos alanina. Además se prefieren aquellos mutantes de IKK $\beta$  en los que el resto de aminoácido Lys44 del tipo natural de IKK $\beta$  de la SEQ ID NO: 4 está sustituido por Met y opcionalmente uno o varios de los restos serina y treonina C terminales desestabilizantes, preferiblemente los restos de serina y treonina desestabilizantes en las posiciones 670, 672, 675, 679, 682, 689, 692, 695, 697 y 705 del tipo natural de la SEQ ID NO: 4 están sustituidos por restos alanina.

Son particularmente preferentes los mutantes de IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  inhibidores que comprenden restos de aminoácidos 24 a 768 de la SEQ ID NO: 7 o los restos de aminoácidos 24 a 779 de la SEQ ID NO: 9, preferiblemente que presentan la secuencia de la SEQ ID NO 7 o la SEQ ID NO: 9 o que presentan la secuencia de ARN de la SEQ ID NO: 8 o 10 o cuya secuencia de ARN se puede transformar por mutaciones sinónimas en la secuencia de ARN de la SEQ ID NO: 8 o 10.

Otra forma de realización particularmente preferible, tal como se ha mencionado anteriormente, se refiere a las células dendríticas según la invención, siendo las DZ (i) DZ maduras; y/o; (ii) DZ activadas con NF $\kappa$ B que producen IL-12p70; y/o (iii) DZ activadas por NF $\kappa$ B que producen IL-10; y/o (iv) además están cargadas con uno o varios antígenos diana.

La definición de "antígenos diana" comprende en la presente invención cadenas peptídicas que están unidas por ejemplo al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y que se presentan en la superficie celular de células dendríticas, linfocitos T. Estos se pueden derivar entre otras cosas de antígenos tumorales tales como por ejemplo MelanA, GP100, miembros de la familia MAGE, pero también antígenos tumorales mutados tales como BRAF-V600E y GNAQ-Q209L. Pero se pueden usar también fuentes de antígenos no definidas tales como lisado tumoral o ARNm aislado del tumor. Cualquier proteína vírica puede ser también una fuente de antígenos, tal como por ejemplo HIV-1 NEF o Proteína de Matriz de Gripe.

Los mutantes que se han mencionado anteriormente se pueden expresar por transfección de ARN por moléculas de ARNm correspondientes en DZ. La transfección de ARN no representa ningún cambio genético de las DZ y, por tanto, es inocua desde el punto de vista clínico. Si las DZ se han transfectado con un mutante de IKK activo constitutivamente después de que se hayan incubado ("madurado") con las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y PGE2, los mismos han comenzado a excretar la citocina proinflamatoria IL-12p70 (Figura 2a), a la que se adscribe un papel decisivo en la inducción de respuestas inmunitarias robustas de larga duración. Con respecto a la maduración de las DZ, aparte de IL-1beta, IL-6, TNF y PGE2 se pueden usar como alternativa o de forma complementaria otras

sustancias para la maduración de los DZ, inclusive pero sin limitación: IFN-alfa, -beta, -gamma, agonista de TLR sintéticos y naturales tales como entre otros polil: C, CpG, LPS, flagelina o sustancias solubles y unidas a superficie que se unen específicamente a los receptores de superficie de las DZ.

5 Si la transfección de ARN con los mutantes activadores, sin embargo, se ha realizado al comienzo de la maduración (es decir, en DZ inmaduras) se generaron DZ que cedieron grandes cantidades de la citocina IL-10 inmunosupresora en determinadas condiciones (Figura 2b). Además, los distintos marcadores de maduración en las DZ mostraron una mayor expresión después de la transfección de ARN de los ARN descritos, también de aquellos a los que se otorga un papel en la comunicación de la DZ con otras células del sistema inmunitario (Figura 3). En este caso es de particular interés la molécula de superficie CD70, ya que se le otorga un papel en la inducción de linfocitos T de memoria longevos (Figura 3, abajo). Al principio se ha descrito el fenotipo de linfocitos T de memoria longevos. Si se usaron las DZ tratadas de este modo para estimular reiteradamente linfocitos T CD8<sup>+</sup> autólogos, se observó que la activación de NFκB capacitó a las DZ a expandir adicionalmente los linfocitos T con la reestimulación, estando representado de forma intensificada el fenotipo de linfocitos T de las células efectoras-de memoria (Figura 4). Otro factor crítico durante la producción de las DZ inmunógenas es su capacidad de migración que la mayoría de las veces se pierde en DZ secretoras de IL-12. Las DZ transfectadas con los mutantes de NFκB activos constitutivamente sorprendentemente eran capaces de migrar con la misma eficacia frente a la quimiocina MIP-3β que las DZ que se electroporaron con un ARN de control (Figura 5). De este modo, la transfección de ARN de DZ con ARNm que codifica mutantes funcionales de la vía de transmisión de señales de NFκB representa un nuevo método innovador para la generación de DZ inmunógenas o tolerogénicas cuya aplicación clínica concreta destaca.

20 En otras formas de realización preferibles de la invención, la DZ está cotransfectada con ARNm que codifican CD70, dado el caso en combinación con aquellos que codifican caTLR4 y ligando CD40 o/ OX40L. Todas las moléculas mencionadas en la presente solicitud que se incorporan en las DZ preferiblemente humanas, codifican preferiblemente moléculas que se corresponden con las que aparecen en el ser humano en su secuencia de aminoácidos o que se derivan de las mismas.

25 El procedimiento para la producción *ex vivo* de DZ manipuladas en la vía de transmisión de señales de NFκB según el aspecto (2) de la invención comprende la transfección de ARN de DZ inmaduras o maduras con una o varias secuencias de nucleótidos que codifican una proteína transmisora de señales mutada, tal como se ha descrito anteriormente, de la vía de transmisión de señales de NFκB. A este respecto se prefiere que la transfección de ARN se produzca mediante electroporación (son así mismo aplicables otros procedimientos conocidos por el experto en la materia, tales como lipofección, etc.). Una forma de realización preferible del procedimiento de electroporación es el método descrito por Tuyaeerts *et al.*, que es particularmente adecuado para aplicaciones clínicas (Cáncer Gene Ther. 10 (9) (2003), 696-706). En otra forma de realización preferible se emplea como tecnología de transfección de ARN la nucleofección (tecnología patentada de la empresa Amaxa) (compárese por ejemplo con Melhem *et al.*, Clin. Vacuna Immunol. 15 (9) (2008), 1337-1344). Las concentraciones preferibles para la transfección de ARN por electroporación comprenden en particular aproximadamente 1 μg/100 μl a aproximadamente 100 μg/100 μl, más preferiblemente 2 μg/100 μl a 50 μg/100 μl y lo más preferiblemente de aproximadamente 20 μg a aproximadamente 40 μg/100 μl. La transfección de ARNm se puede conseguir, aparte de por la electroporación mencionada que se puede realizar mediante un impulso de onda rectangular, por un impulso decreciente de forma exponencial, por distintos reactivos para la transfección de ARNm. A modo de ejemplo se mencionan en este caso lípidos cargados y no cargados con cuya ayuda se pueden transfectar las DZ con ARNm.

40 El procedimiento según la invención puede comprender, en el caso de la transfección de ARN de DZ inmaduras, además el tratamiento con un estímulo de maduración. Además, las formas de realización preferibles comprenden la carga de las DZ con un antígeno diana y/o (iii) la crioconservación de DZ maduras.

45 Como "estímulo de maduración", se definen en el presente documento moléculas y combinaciones de moléculas con cuya ayuda se convierten las células dendríticas inmaduras en células dendríticas maduras. Una combinación de moléculas preferente en el presente documento se compone de IL-1β, IL-6, TNFα y PGE2.

En relación con la presente invención, se ha de entender por "crioconservación" la conservación de células mediante congelación a temperaturas por debajo de -75 C.

50 La composición, composición farmacéutica o medicamento según el aspecto (3) de la invención puede presentar opcionalmente compuestos coadyuvantes y excipientes farmacéuticamente adecuados. A este respecto, para el uso farmacéutico se prefiere que las DZ sean DZ autólogas.

55 Una "composición farmacéutica" o un "medicamento" incluye las células dendríticas según la invención y uno o varios componentes que se administran a pacientes, por ejemplo en forma de una vacunación para el tratamiento del cáncer o del VIH. El experto en la materia conoce procedimientos y medios para la formulación de una composición farmacéutica y se pueden obtener por ejemplo de Ansel *et al.*, "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems", 7ª edición, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1999. La composición farmacéutica o el medicamento se puede administrar a un individuo en una dosis adecuada. La administración se puede realizar en particular por vía parenteral, por ejemplo por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea o por vía intramuscular o a través de un catéter en un punto en una arteria. Los preparados para una administración

parenteral comprenden soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Son ejemplos de disolventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como por ejemplo aceite de oliva y compuestos de éster orgánicos tales como por ejemplo oleato de etilo que son adecuados para inyecciones. Los excipientes acuosos comprenden agua, soluciones, emulsiones, suspensiones alcohólicas-acuosas, soluciones salinas y medios tamponados. Los excipientes parenterales comprenden soluciones de cloruro sódico, Ringer dextrosa, dextrosa y cloruro sódico, Ringer lactato y aceites unidos. Los excipientes intravenosos comprenden por ejemplo agentes de suplemento de líquidos, nutrientes y electrolitos (tales como por ejemplo aquellos que se basan en Ringer dextrosa). La composición farmacéutica o el medicamento puede comprender además conservantes y otros aditivos, tales como por ejemplo compuestos antimicrobianos, antioxidantes o complejantes. Además, dependiendo del uso específico pretendido, pueden estar contenidos otros principios activos tales como por ejemplo interleucinas, factores de crecimiento, factores de diferenciación, interferones, proteínas quimiotácticas o un agente inmunomodulador inespecífico.

El tipo de dosificación se determina por el médico a cargo del caso de forma correspondiente a los factores clínicos. El experto en la materia sabe que el tipo de la dosificación depende de distintos factores, tales como por ejemplo el tamaño corporal o el peso, la superficie corporal, la edad, el sexo o la salud general del paciente, pero también del agente que se va a administrar en especial, de la duración y del tipo de la administración y de otros medicamentos que posiblemente se administran en paralelo. Una dosis típica se puede encontrar, por ejemplo, en un intervalo entre 5 millones y 50 millones de DZ por administración. El escalonamiento de administraciones reiteradas se realiza habitualmente en primer lugar con separaciones menores en el intervalo de 1 a 2 semanas y más tarde los intervalos se pueden extender hasta 6 meses. En los estudios hasta la fecha se inyectaron las DZ por lo habitual por vía intradérmica, subcutánea e intravenosa.

Los "compuestos coadyuvantes y excipientes adecuados" comprenden componentes sobre los que se pueden aplicar o introducir las células según la invención y que por ejemplo protegen las células. El experto en la materia conoce ejemplos de compuestos coadyuvantes y excipientes farmacéuticamente compatibles adecuados y comprenden por ejemplo soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como por ejemplo emulsiones de aceite/agua, distintos tipos de humectantes o detergentes, soluciones estériles, etc. Se pueden formular composiciones farmacéuticas o medicamentos que comprenden tales excipientes mediante métodos convencionales conocidos.

Las células dendríticas "autólogas" se han de entender como células del cuerpo del paciente o células producidas a partir de células del cuerpo del paciente.

En el caso del uso de las DZ según la invención para la estimulación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> autólogos *ex vivo* según el aspecto (4) de la invención se emplean preferiblemente (i) DZ activadas con NFκB para la transmisión de linfocitos T pasiva y generación de un clon de linfocitos T (inclusive el aislamiento posterior de TCR), y (ii) DZ reexpresadas con NFκB para la expansión de Treg para el tratamiento de alergia, inflamación crónica, autoinmunidad y rechazo de trasplantes.

Los "linfocitos T CD8<sup>+</sup>" están caracterizados por la presencia del marcador de superficie CD8 y pertenecen a un subgrupo de linfocitos T que son capaces de destruir células somáticas infectadas o células tumorales.

Por inmunización pasiva o "transmisión de linfocitos T pasiva" se ha de entender la transferencia de efectores inmunológicos o linfocitos T generados fuera del receptor. El receptor, por tanto, no tiene que formar el mismo activamente la respuesta inmunitaria, sino que obtiene la misma desde el exterior, por tanto el mismo es pasivo. La inmunización pasiva con linfocitos T, es decir, la transmisión de linfocitos T pasiva, se denomina también transferencia de linfocitos T adaptativa.

En relación con la presente invención, un "clon de linfocitos T" es una población de células derivada de un linfocito T de un paciente y que se puede mantener en cultivo que se origina en un linfocito T individual.

La "expansión de Treg" indica el cultivo y la propagación de linfocitos T reguladores que puede reprimir las funciones de otros linfocitos T.

Se denomina "alergia" un exceso de reacción defensiva del sistema inmunitario a determinadas sustancias ambientales normalmente inocuas (alérgenos). La "autoinmunidad" se puede definir como un exceso de reacción defensiva del sistema inmunitario a tejido del propio cuerpo.

El "aislamiento de TCR" indica un método para la obtención de secuencias de nucleótidos a partir de un clon de linfocito T que codifican el receptor de linfocitos T (TCR). Se pueden obtener métodos para ello del estado de la técnica.

Con el uso de las DZ según la invención para la producción de un medicamento para el tratamiento de enfermedades de un paciente según el aspecto (5) de la invención y el procedimiento para el tratamiento de cáncer, y enfermedades infecciosas o autoinmunitarias en un paciente que comprende la administración de las DZ según la invención al paciente según el aspecto (7) de la invención se emplean preferiblemente DZ activadas con NFκB para la vacunación basada en DZ (en particular en ausencia de epítomos cooperadores o linfocitos T cooperadores

funcionales, y cuando lo es posible la aplicación de adyuvantes fuertes), para la vacunación terapéutica contra cáncer o enfermedades infecciosas (inclusive VIH) y como vacuna preventiva y DZ reprimidas con NFκB para la inducción de tolerancia *in vivo* y para el tratamiento de alergia, inflamación crónica, autoinmunidad y rechazo de trasplantes.

- 5 La “vacunación basada en DZ” describe un método para la administración de células dendríticas a pacientes, preferiblemente mediante una inyección.

Los “epítomos colaboradores” se presentan en el contexto de MHC/HLA-clase II y pueden inducir la proliferación de linfocitos T y la síntesis de citocinas.

- 10 Los “linfocitos T cooperadores funcionales” son un grupo de linfocitos T en la sangre que tienen una función de cooperación. Se clasifican en dos subgrupos importantes mediante las citocinas liberadas por los mismos. Un subgrupo interviene en la respuesta inmunitaria celular, mientras que el otro subgrupo interviene en la respuesta inmunitaria humoral.

Los “adyuvantes” son coadyuvantes que refuerzan el efecto de un reactivo o de un medicamento, en particular la respuesta inmunitaria.

- 15 “Cáncer” indica un tumor maligno o una leucemia maligna.

Las “enfermedades infecciosas” son enfermedades provocadas por un patógeno, por ejemplo virus, bacterias, hongos u otros microorganismos.

La “inducción de tolerancia *in vivo*” indica en la presente solicitud la represión de una reacción de rechazo inmunológico en pacientes, preferiblemente en un paciente humano.

- 20 En el procedimiento para la expansión de linfocitos T incluyendo la estimulación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> autólogos *ex vivo* que comprenden la estimulación de los linfocitos T con DZ según la invención según el aspecto (6) de la invención se emplean preferiblemente DZ activados con NFκB para la expansión de linfocitos T para linfocitos T para la transmisión de linfocitos T pasiva y generación de un clon de linfocitos T (por ejemplo para el posterior aislamiento de TCR) y DZ reprimidas con NFκB para la expansión de Treg para el tratamiento de alergia, inflamación crónica, autoinmunidad y rechazo de trasplantes.

Una proliferación de linfocitos T mejorada deseada y, con ello, un efecto médico mejorado se puede conseguir también mediante la administración simultánea o la expresión simultánea en la DZ vía ARNm transfectados de anticuerpos, preferiblemente contra CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD1 o de un anticuerpo anti-GITR agonista ((compárese por ejemplo, Leach *et al*, Science 271 (1996), 1734-1736; Quezada *et al*, J. Clin Invest, 116 (7) (2006), 1935-1945).

- 30 Otra forma de realización se refiere a un procedimiento para el tratamiento de enfermedades en un paciente que comprende la administración de las DZ según la invención al paciente, empleándose preferiblemente (i) DZ activadas con NFκB para la vacunación basada en DZ (en particular en ausencia de epítomos cooperadores o linfocitos T cooperadores funcionales y cuando no es posible la aplicación de adyuvantes fuertes) para la vacunación terapéutica contra cáncer o enfermedades infecciosas (inclusive VIH) y/o como vacuna preventiva y (ii) DZ reprimidas con NFκB para la inducción de tolerancia *in vivo* y para el tratamiento de alergia, inflamación crónica, autoinmunidad y rechazo de trasplantes.

- 35 En lo sucesivo se discuten posibles aplicaciones terapéuticas de células dendríticas. Una posible estrategia para el tratamiento de un paciente con cáncer incluye la obtención de monocitos de la sangre del paciente, la diferenciación de estos monocitos hasta dar células dendríticas (DZ) mediante GM-CSF e IL-4, o citocinas con el mismo efecto; la maduración de las DZ mediante IL-1β, IL-6, TNF y PGE2, o estimuladores de maduración con el mismo efecto; la electroporación de las DZ con ARNm, cuya secuencia codifica uno o ambos mutantes activadores de NFκB de IKK-α e IKK-β; la carga de las DZ con uno o varios antígenos asociados a tumor mediante la coelectroporación de un ARNm, cuya secuencia codifica para el mismo o los mismos o mediante la carga exógena de las DZ con uno o varios péptidos sintéticos que se pueden unir a moléculas de HLA de la DZ; la crioconservación de las DZ en porciones adecuadas; el control de la calidad de las DZ mediante determinación de la secreción de IL-12p70; la inyección intravenosa o intra- o subdérmica de las DZ en el paciente en varias administraciones escalonadas.

- 40 Con respecto a la producción de las DZ se propone según la invención la obtención directa de DZ a partir de material del paciente fresco o crioconservado, incluyendo pero sin limitación sangre o células sanguíneas u otro tejido del paciente mediante clasificación de células magnética o activada por fluorescencia o la diferenciación de las DZ a partir de células madre de médula ósea que se purificaron por ejemplo a través del marcador de células madre CD34. Para la diferenciación de los monocitos y de las células madre en las DZ, aparte de GM-CSF e IL-4 se pueden usar otras sustancias, inclusive pero sin limitación: ligando de Flt3, IL-15, IFN-α, TNF.

- 45 Como fuentes de antígenos para la carga con antígenos se puede usar, entre otras cosas como material tumoral alógeno, así como ARNm obtenido a partir de esto y amplificado, además ARNm producido enzimáticamente que codifica antígenos tumorales o parte de los mismos. Se pueden cargar péptidos que se unen a HLA que se derivan

de antígenos tumorales directamente sobre las moléculas de HLA de las DZ. Así mismo se pueden usar proteínas tumorales producidas mediante ingeniería genética o proteínas recombinantes que unen antígenos tumorales o partes de los mismos con agonistas de receptor que median en la absorción de las DZ. Estos métodos para la carga con antígenos se pueden aplicar en el estadio inmaduro y/o maduro de las DZ.

- 5 Una posible estrategia para la producción de linfocitos T citotóxicos con especificidad de antígeno para la terapia con linfocitos T adaptativa autóloga o alógena comprende la producción de DZ activadas con NFκB, como se describe en el ejemplo, el aislamiento de linfocitos T a partir de material fresco o criopreservado del paciente incluyendo pero sin limitación sangre o células sanguíneas otro tejido del paciente, además la multiplicación con especificidad de antígenos de estos linfocitos T mediante incubación reiterada con las DZ activadas con NFκB que están cargadas con el correspondiente antígeno, la criopreservación de los linfocitos T en porciones adecuadas, el control de la calidad de los linfocitos T mediante determinación de su actividad lítica específica de antígenos y su capacidad de de la secreción de citocinas específica de antígenos, la inyección intravenosa, intratumoral, intraperitoneal u otra de los linfocitos T en el paciente en una o en varias administraciones escalonadas.

- 15 A menos que se defina de otro modo, los términos usados en el presente documento tienen el mismo significado que en el estado de la técnica.

#### Protocolo de secuencia, texto libre:

SEQ ID NO:	Descripción
1	Proteína IKKα de tipo natural
2	Proteína IKKα-EEA16/64A (AA 1 -24 TAG)
3	Secuencia de nucleótidos de IKKα-EEA16/64A
4	Proteína IKKβ de tipo natural
5	Proteína IKKβ-EEA10/64 (AA 1-17 TAG)
6	Secuencia de nucleótidos de IKKβ-EEA10/64
7	Proteína IKKα-K44MA16/64A (AA 1 -23 TAG)
8	Secuencia de nucleótidos de IKKα-K44MA16/64A
9	Proteína IKKβ-K44MA10/64 (AA 1 -23 TAG)
10	Secuencia de nucleótidos de IKKβ-K44MA10/64

#### Ejemplos

##### Materiales y métodos

- 20 Electroporación de las DZ: las DZ maduras o inmaduras se ajustaron a aproximadamente 40-60 x 10<sup>6</sup> células/ml con OptiMEM (volumen mínimo para una cubeta de electroporación de 4 mm: 100 µl) y se pipetearon en las cubetas preparadas. En la cubeta entremedias se dispuso ARN que codificaba IKKβ-EEA10, IKKα-EEA16. La electroporación se realizó con el programa *square-wave-pulse* a 500 V durante 1 ms (cubeta de 4 mm). Inmediatamente después de la electroporación, las DZ se pusieron en un medio de DZ preparado (inclusive IL-4 y GM-CSF) y se incubó en la estufa de incubación para los siguientes experimentos. Si las DZ transfectadas de forma inmadura se maduraron después de la electroporación, se añadió al medio de DZ combinado de maduración (IL-1-β, IL-6, TNFα y PGE<sub>2</sub>).

##### A: secuencias de mutantes constitutivamente activos de IKKα e IKKβ

- 30 1. Secuencia de IKKα-EEA16/64A (SEQ ID NO: 2): comparación de la secuencia de aminoácidos de IKKα-EEA16/64A (SEQ ID NO: 2) con la secuencia de aminoácidos de tipo natural de IKKα (SEQ ID NO: 1): las mutaciones EE (en la posición 200 y 204 de la SEQ ID NO: 2) causan actividad constitutiva de IKKα, las mutaciones A16 (en las posiciones 685, 686, 689, 693, 694, 700, 703, 704, 710, 711, 717, 719, 723, 729, 730, 745 y 746 de la SEQ ID NO: 2) retiran las serinas y treoninas desestabilizantes lo que conduce a una estabilidad muy aumentada de la proteína. La correspondiente secuencia de nucleótidos está mostrada en la SEQ ID NO: 3.

- 35 2. Secuencia de IKKβ-EEA10/64 (SEQ ID NO: 5): comparación de la secuencia de aminoácidos de IKKβ-EEA10/64A (SEQ ID NO: 5) con la secuencia de aminoácidos de tipo natural de IKKβ (SEQ ID NO: 4) las mutaciones de EE (en las posiciones 231 y 235 de la SEQ ID NO: 5) causan actividad constitutiva de IKKβ, las mutaciones A10 (en las posiciones 724, 726, 729, 733, 736, 743, 746, 749, 751 y 759 de la SEQ ID NO: 2.) retiran las serinas desestabilizantes lo que conduce a una estabilidad muy aumentada en la proteína. La correspondiente secuencia de nucleótidos está mostrada en la SEQ ID NO: 6.

##### B: Secuencias de mutantes inhibidores de IKKα e IKKβ

- 45 3. Secuencia de IKKα-K44MA16/64A (SEQ ID NO: 7): comparación de secuencia de aminoácidos de IKKα-K44MA16/64A (SEQ ID NO: 7) con la secuencia de aminoácidos de tipo natural de IKKα (SEQ ID NO: 1). La actividad cinasa se inhibe por una sustitución del aminoácido lisina (Lys44, posición 67 en la SEQ ID NO: 7), en el punto de unión a ATP, por metionina. Mediante dimerización, este mutante tiene un efecto negativo

dominantemente. Las mutaciones A16 (posiciones 684, 685, 688, 692, 693, 699, 702, 703, 709, 710, 716, 718, 722, 728, 729, 744 y 745 de la SEQ ID NO: 7) retiran las serinas y treoninas desestabilizantes, lo que conduce a una estabilidad muy aumentada de la proteína. La correspondiente secuencia de nucleótidos está mostrada en la SEQ ID NO: 8.

- 5 4. Secuencia de IKK $\beta$ -K44MA10/64 (SEQ ID NO: 9): comparación de la secuencia de aminoácidos de IKK $\beta$ -K44MA10/64A (SEQ ID NO: 9) con la secuencia de aminoácidos de tipo natural de IKK $\beta$  (SEQ ID NO: 4) la actividad cinasa se inhibe por una sustitución del aminoácido lisina (Lys44; posición 67 en la SEQ ID NO: 9), el sitio de unión a ATP, por metionina- Mediante dimerización, este mutante tiene un efecto negativo dominantemente. Las mutaciones A10 (posiciones 693, 695, 698, 702, 705, 712, 715, 718, 720 y 728 de la SEQ ID NO: 9) retiran las serinas desestabilizantes, lo que conduce a una estabilidad muy aumentada de la proteína. La correspondiente secuencia de nucleótidos está mostrada en la SEQ ID NO: 10.

Ejemplo 1: secreción de IL-12p70 e IL-10 por células dendríticas electroporadas con ARN de IKK $\beta$ -EEA10.

- 15 Las células dendríticas se electroporaron inmaduras (iDZ) o maduras (mDZ) sin ARN, con un ARN de control o el ARN de IKK $\beta$ -EEA10 (SEQ ID NO: 6). La mitad de las células electroporadas de forma inmadura se maduraron directamente después de la electroporación (iDZm). Veinticuatro horas después de la electroporación se determinaron las concentraciones de citocina (IL-12p70 e IL-10) en los sobrenadantes en un *cytometric bead array* (CBA). Los datos mostrados en las Figuras 2 (a) o (b) representan un experimento representativo de cuatro experimentos independientes.

- 20 Ejemplo 2: expresión de marcadores de superficie sobre células dendríticas transfectadas con el componente de la vía de transmisión de señales NF $\kappa$ B y IKK $\beta$ -EEA10. Las células dendríticas inmaduras (iDZ) y maduras (mDZ) se electroporaron con ARN que codifica IKK $\beta$ -EEA10 (SEQ ID NO: 6). La mitad de las células electroporadas de forma inmadura se mezclaron después de la electroporación con combinado de maduración (iDZm). Como condiciones de control se electroporaron DZ sin ARN o con ARN irrelevante (ARN de control). Las DZ se cultivaron después de la electroporación durante 24 h en medio de DZ, se recogieron y se tiñeron con un anticuerpo marcado con PE contra CD40, CD80 y CD70. El marcaje con PE indica el acoplamiento entre el pigmento ficoeritrina y un anticuerpo. Se determinó la intensidad promedio de la fluorescencia (MFI) de las células dendríticas electroporadas mediante citometría de flujo. Los valores indicados en la Figura 3 muestran la MFI específica que se calculó a partir de la fluorescencia relativa medida menos la fluorescencia medida del anticuerpo isotípico. Los datos representan un experimento representativo de cuatro experimentos independientes.

- 30 Ejemplo 3: coloración de tetrámero de la estimulación de los linfocitos T autólogos con células dendríticas electroporadas con ARN de componentes de vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B.

- 35 Las células dendríticas maduras se electroporaron con ARN de control, ARN de IKK $\beta$  EEA10 (SEQ ID NO: 6) y ARN de IKK $\alpha$ -EE o con una combinación de ARN de IKK $\beta$ -EEA10 e IKK $\alpha$ -EE. Una parte de las células se coelectroporó con ARN que codifica el marcador tumoral MelanA (+ ARN de MelanA). Tres horas después de la electroporación, una mitad de la serie de condición sin ARN de MelanA se cargó con MelanA/péptido A2 durante 1 h (+ carga con péptido). Cuatro horas después de la electroporación se estimularon linfocitos T CD8<sup>+</sup> autólogos con las células dendríticas en una relación 10:1. Después de una semana se analizó la cantidad de linfocitos T con especificidad de antígenos y se determinó su fenotipo mediante tinción de CCR7 y CD45RA. Los linfocitos T se analizaron después de una sensibilización Figura 4(a) y después de una reestimulación Figura 4(b). Las figuras muestran datos de un donante.

Ejemplo 4: migración de células dendríticas maduras 24 horas después de la transfección de ARN con componentes de vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B.

- 45 Se electroporaron DZ maduras con ARN que codificaba GFP, IKK $\beta$ -EEA10 (SEQ ID NO: 6) e IKK $\alpha$ -EE en solitario y en combinación. Las DZ se cultivaron después de la electroporación durante 24 h y a continuación se ensayaron en cuanto a su capacidad de migración durante 2 h en un ensayo de Transwell. Los resultados están mostrados en la Figura 5 (condición sin quimiocina (= neg); quimiocina en el inserto (= anti); quimiocina en la cavidad (= cerrado)). Los datos mostrados representan valores medios con la desviación típica de tres experimentos independientes.

Ejemplo 5: mejora de DZ por transfección de ARN con mutantes de NF $\kappa$ B.

- 50 Estimulación de DZ con componentes de la vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B, IKK $\beta$ -EE-A10 e IKK $\alpha$ -EE-A16 (SEQ ID NO 3): se usaron las siguientes construcciones: IKK $\beta$ -EE A10 estimula la vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B clásica que conduce a la activación y maduración de las DZ e IKK $\alpha$ -EE-A16 es un activador de la vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B alternativa.

- 55 Los efectos de la electroporación con IKK $\beta$ -EE-A10 fueron sobre todo una regulación al alza de marcadores de superficie (CD25, CD40, CD70, CD80, CD83 y OX-40L, Figuras 6-8) y una regulación al alza de la secreción de citocina, en particular de IL12p70, mientras que IL-10 se liberó en cantidades muy reducidas (Figura 9). Otras citocinas liberadas fueron: IL-6, TNF $\alpha$  (Figura 12), IL-8 e IL-1 $\beta$  (Figura 11). Estos efectos se intensificaron cuando se coelectroporaron ARN de los activadores de la vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B clásica y de la alternativa

(IKK $\beta$ -EE-A10 e IKK $\alpha$ -EE-A16) (Figuras 6-11). La electroporación de ARN de IKK $\alpha$ -EE-A16 en solitario tuvo efectos comparables que las cantidades ligeramente menores de las citocinas liberadas y la expresión de marcadores de superficie (Figuras 6-11). Las mDZ electroporadas mostraron en particular después de la tercera estimulación una capacidad estimuladora mucho mayor frente a linfocitos T autólogos (Figura 12). Las DZ que se electroporaron con solo un (IKK $\alpha$ -EE-A16 o IKK $\beta$ -EE-A10) tuvieron capacidades estimuladoras similares (hasta tres veces en comparación con el estado de control MelA) mientras que las DZ que se electroporaron con ambos activadores tuvieron la máxima capacidad para la estimulación de linfocitos T específicos (expansión de linfocitos T específicos a un factor de siete).

Se llevaron a cabo experimentos de dependencia de la dosis para determinar la mejor cantidad de ARN que se debía usar durante la transfección de ARN de DZ. Se electroporaron DZ maduras con concentraciones crecientes de ARN. Se obtuvieron patrones de expresión crecientes de marcadores de superficie (CD25, CD40, CD70 y OX-40L) en función de la concentración de los ARN transfectados (Figura 13). Pero no obstante, el estado de la electroporación con ambos activadores, IKK $\beta$ -EE-A10 e IKK $\alpha$ -EE-A16 (en cada caso 15  $\mu$ g) condujo a una mayor expresión de todos los marcadores, en particular de CD70, en comparación con 30  $\mu$ g de ARN de un activador en solitario.

En la secreción de citocinas, se obtuvo una regulación al alza dependiente de la dosis, en particular de IL12p70, mientras que se liberó IL-10 en una cantidad muy reducida (Figura 14). Además, la secreción de IL-6, IL-8 y TNF era dependiente de la dosis con un patrón similar (datos no mostrados). Aquí, la cantidad de citocinas liberadas no fue mayor cuando se coelectroporaron ARN de los activadores de la vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B clásica y de la alternativa (IKK $\beta$ -EE-A10 e IKK $\alpha$ -EE-A16) (compárese 30  $\mu$ g del ARN en solitario con una combinación de 15  $\mu$ g de ARN de ambos activadores).

Ejemplo 6: actividad de NF $\kappa$ B en células 293T transfectadas: se electroporaron células 293T con activadores de ambas vías de transmisión de señales de NF $\kappa$ B y se coelectroporaron con un vector que codificaba la luciferasa bajo el control de un promotor de NF $\kappa$ B. En todos los casos (IKK $\alpha$ -EE-A16 e IKK $\beta$ -EE-A10 en solitario o en combinación) se midió la actividad luciferasa 24 h después de la electroporación (Figura 15). A su vez, el caso de la transfección de ARN con ambos activadores mostró el mayor efecto.

Este ensayo se llevó a cabo también en DZ, sin embargo, no condujo a ningún resultado (datos no mostrados).

IKK $\beta$ -K44M-A10 e IKK $\alpha$ -K44M-A16: con un inhibidor de la vía de transmisión de señales de NF $\kappa$ B clásica (IKK $\beta$ -K44M-A10) y de la alternativa (IKK $\alpha$ -K44M-A16) se llevó a cabo un ensayo de luciferasa con células 293T que se electroporaron con ARN de IKK $\alpha$ -K44M-A16 o IKK $\beta$  K44M-A10 en solitario o en combinación y que se coelectroporaron con vectores de luciferasa que comprenden un promotor de NF $\kappa$ B. Las vías de transmisión de señales de NF $\kappa$ B de las células 293T transfectadas se activaron durante una noche con CD40L soluble. La actividad luciferasa se midió 24 h después de la electroporación. Ambos inhibidores eran capaces inequívocamente de reducir la actividad luciferasa en comparación con el control positivo que se transfectó únicamente con vector de luciferasa y que se activó con CD40L soluble (Figura 15).

Ejemplo 7: secreción de IL-12p70 en células dendríticas maduras que se transfectaron con ARNm que codifica mutantes de IKK activos constitutivamente.

Las células dendríticas obtenidas a partir de monocitos se maduraron el día 6 con ayuda del combinado de maduración convencional (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y PGE2) durante 24 h y a continuación se electroporaron. Se transfectaron las células sin ARN, con ARN que codifica mutantes activos constitutivamente de IKK $\alpha$ -EEA16 e IKK $\beta$ -EEA10 y una combinación de ambos ARN (véase la Figura 16). A continuación se midió la concentración de IL-12p70 en el medio 4 h, 24 h y 48 h después de la electroporación. Aquí se observó la producción de IL12p70 a lo largo de un período de tiempo de 2 días. El uso de ambos mutantes condujo a la máxima producción de IL-12p70. Se muestra un experimento representativo de tres.

Ejemplo 8: migración de células dendríticas maduras que se transfectaron con ARN que codifica mutantes de IKK activos constitutivamente. Se maduraron células dendríticas obtenidas de monocitos el día 6 con ayuda de un combinado de maduración convencional (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y PGE2) durante 24 h y a continuación se electroporaron. Las células se transfectaron con 5  $\mu$ g/100  $\mu$ l de ARN que codifica MelanA y con 15  $\mu$ g/100  $\mu$ l de ARN que codifica mutantes activos constitutivamente de IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  y que codifica una combinación de ambos ARN (véase la Figura 17). A continuación se examinó la capacidad de migración de las células transfectadas hasta la quimiocina CCL19. Los resultados están mostrados en la Figura 17 (condición sin quimiocina (= neg); quimiocina en el inserto (= anti); quimiocina en la cavidad (= cerrado)). Están mostrados los valores medios con errores típicos de 4 experimentos independientes.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Friedrich-Alexander-universität Erlangen-Nürnberg
- 5 <120> Células dendríticas manipuladas en su vía de transmisión de señales de NFkappaB
- <130> T3091 PCT
- <150> EP 10 18 8893.1
- 10 <151> 26-10-2010
- <160> 10
- <170> PatentIn versión 3.3
- 15 <210> 1
- <211> 745
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 20 <400> 1
- Met Glu Arg Pro Pro Gly Leu Arg Pro Gly Ala Gly Gly Pro Trp Glu  
 1 5 10 15
- Met Arg Glu Arg Leu Gly Thr Gly Gly Phe Gly Asn Val Cys Leu Tyr  
 20 25 30
- Gln His Arg Glu Leu Asp Leu Lys Ile Ala Ile Lys Ser Cys Arg Leu  
 35 40 45
- Glu Leu Ser Thr Lys Asn Arg Glu Arg Trp Cys His Glu Ile Gln Ile  
 50 55 60
- Met Lys Lys Leu Asn His Ala Asn Val Val Lys Ala Cys Asp Val Pro  
 65 70 75 80
- Glu Glu Leu Asn Ile Leu Ile His Asp Val Pro Leu Leu Ala Met Glu  
 85 90 95
- Tyr Cys Ser Gly Gly Asp Leu Arg Lys Leu Leu Asn Lys Pro Glu Asn  
 100 105 110
- Cys Cys Gly Leu Lys Glu Ser Gln Ile Leu Ser Leu Leu Ser Asp Ile  
 115 120 125
- Gly Ser Gly Ile Arg Tyr Leu His Glu Asn Lys Ile Ile His Arg Asp  
 130 135 140
- Leu Lys Pro Glu Asn Ile Val Leu Gln Asp Val Gly Gly Lys Ile Ile  
 145 150 155 160
- His Lys Ile Ile Asp Leu Gly Tyr Ala Lys Asp Val Asp Gln Gly Ser  
 165 170 175
- Leu Cys Thr Ser Phe Val Gly Thr Leu Gln Tyr Leu Ala Pro Glu Leu  
 180 185 190
-

ES 2 661 369 T3

Phe Glu Asn Lys Pro Tyr Thr Ala Thr Val Asp Tyr Trp Ser Phe Gly  
 195 200 205  
 Thr Met Val Phe Glu Cys Ile Ala Gly Tyr Arg Pro Phe Leu His His  
 210 215 220  
 Leu Gln Pro Phe Thr Trp His Glu Lys Ile Lys Lys Lys Asp Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Cys Ile Phe Ala Cys Glu Glu Met Ser Gly Glu Val Arg Phe Ser Ser  
 245 255  
 His Leu Pro Gln Pro Asn Ser Leu Cys Ser Leu Ile Val Glu Pro Met  
 260 265 270  
 Glu Asn Trp Leu Gln Leu Met Leu Asn Trp Asp Pro Gln Gln Arg Gly  
 275 280 285  
 Gly Pro Val Asp Leu Thr Leu Lys Gln Pro Arg Cys Phe Val Leu Met  
 290 295 300  
 Asp His Ile Leu Asn Leu Lys Ile Val His Ile Leu Asn Met Thr Ser  
 305 310 315 320  
 Ala Lys Ile Ile Ser Phe Leu Leu Pro Pro Asp Glu Ser Leu His Ser  
 325 330 335  
 Leu Gln Ser Arg Ile Glu Arg Glu Thr Gly Ile Asn Thr Gly Ser Gln  
 340 345 350  
 Glu Leu Leu Ser Glu Thr Gly Ile Ser Leu Asp Pro Arg Lys Pro Ala  
 355 360 365  
 Ser Gln Cys Val Leu Asp Gly Val Arg Gly Cys Asp Ser Tyr Met Val  
 370 375 380  
 Tyr Leu Phe Asp Lys Ser Lys Thr Val Tyr Glu Gly Pro Phe Ala Ser  
 385 390 395 400  
 Arg Ser Leu Ser Asp Cys Val Asn Tyr Ile Val Gln Asp Ser Lys Ile  
 405 410 415  
 Gln Leu Pro Ile Ile Gln Leu Arg Lys Val Trp Ala Glu Ala Val His  
 420 425 430  
 Tyr Val Ser Gly Leu Lys Glu Asp Tyr Ser Arg Leu Phe Gln Gly Gln  
 435 440 445  
 Arg Ala Ala Met Leu Ser Leu Leu Arg Tyr Asn Ala Asn Leu Thr Lys  
 450 455 460

ES 2 661 369 T3

Met Lys Asn Thr Leu Ile Ser Ala Ser Gln Gln Leu Lys Ala Lys Leu  
465 470 475 480

Glu Phe Phe His Lys Ser Ile Gln Leu Asp Leu Glu Arg Tyr Ser Glu  
485 490 495

Gln Met Thr Tyr Gly Ile Ser Ser Glu Lys Met Leu Lys Ala Trp Lys  
500 505 510

Glu Met Glu Glu Lys Ala Ile His Tyr Ala Glu Val Gly Val Ile Gly  
515 520 525

Tyr Leu Glu Asp Gln Ile Met Ser Leu His Ala Glu Ile Met Glu Leu  
530 535 540

Gln Lys Ser Pro Tyr Gly Arg Arg Gln Gly Asp Leu Met Glu Ser Leu  
545 550 555 560

Glu Gln Arg Ala Ile Asp Leu Tyr Lys Gln Leu Lys His Arg Pro Ser  
565 570 575

Asp His Ser Tyr Ser Asp Ser Thr Glu Met Val Lys Ile Ile Val His  
580 585 590

Thr Val Gln Ser Gln Asp Arg Val Leu Lys Glu Leu Phe Gly His Leu  
595 600 605

Ser Lys Leu Leu Gly Cys Lys Gln Lys Ile Ile Asp Leu Leu Pro Lys  
610 615 620

Val Glu Val Ala Leu Ser Asn Ile Lys Glu Ala Asp Asn Thr Val Met  
625 630 635 640

Phe Met Gln Gly Lys Arg Gln Lys Glu Ile Trp His Leu Leu Lys Ile  
645 650 655

Ala Cys Thr Gln Ser Ser Ala Arg Ser Leu Val Gly Ser Ser Leu Glu  
660 665 670

Gly Ala Val Thr Pro Gln Thr Ser Ala Trp Leu Pro Pro Thr Ser Ala  
675 680 685

Glu His Asp His Ser Leu Ser Cys Val Val Thr Pro Gln Asp Gly Glu  
690 695 700

Thr Ser Ala Gln Met Ile Glu Glu Asn Leu Asn Cys Leu Gly His Leu  
705 710 715 720

Ser Thr Ile Ile His Glu Ala Asn Glu Glu Gln Gly Asn Ser Met Met  
725 730 735

Asn Leu Asp Trp Ser Trp Leu Thr Glu  
740 745

5 <210> 2  
<211> 769  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Mutante activo constitutivamente de IKKalfa

ES 2 661 369 T3

<400> 2

His His His His His Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Asp  
 1 5 10 15

Ile Glu Gly Arg Gly His Met Thr Met Glu Arg Pro Pro Gly Leu Arg  
 20 25 30

Pro Gly Ala Gly Gly Pro Trp Glu Met Arg Glu Arg Leu Gly Thr Gly  
 35 40 45

Gly Phe Gly Asn Val Cys Leu Tyr Gln His Arg Glu Leu Asp Leu Lys  
 50 55 60

Ile Ala Ile Lys Ser Cys Arg Leu Glu Leu Ser Thr Lys Asn Arg Glu  
 65 70 75 80

Arg Trp Cys His Glu Ile Gln Ile Met Lys Lys Leu Asn His Ala Asn  
 85 90 95

Val Val Lys Ala Cys Asp Val Pro Glu Glu Leu Asn Ile Leu Ile His  
 100 105 110

Asp Val Pro Leu Leu Ala Met Glu Tyr Cys Ser Gly Gly Asp Leu Arg  
 115 120 125

Lys Leu Leu Asn Lys Pro Glu Asn Cys Cys Gly Leu Lys Glu Ser Gln  
 130 135 140

Ile Leu Ser Leu Leu Ser Asp Ile Gly Ser Gly Ile Arg Tyr Leu His  
 145 150 155 160

Glu Asn Lys Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile Val Leu  
 165 170 175

Gln Asp Val Gly Gly Lys Ile Ile His Lys Ile Ile Asp Leu Gly Tyr  
 180 185 190

Ala Lys Asp Val Asp Gln Gly Glu Leu Cys Thr Glu Phe Val Gly Thr  
 195 200 205

ES 2 661 369 T3

Leu Gln Tyr Leu Ala Pro Glu Leu Phe Glu Asn Lys Pro Tyr Thr Ala  
 210 215 220

Thr Val Asp Tyr Trp Ser Phe Gly Thr Met Val Phe Glu Cys Ile Ala  
 225 230 235 240

Gly Tyr Arg Pro Phe Leu His His Leu Gln Pro Phe Thr Trp His Glu  
 245 250 255

Lys Ile Lys Lys Lys Asp Pro Lys Cys Ile Phe Ala Cys Glu Glu Met  
 260 265 270

Ser Gly Glu Val Arg Phe Ser Ser His Leu Pro Gln Pro Asn Ser Leu  
 275 280 285

Cys Ser Leu Ile Val Glu Pro Met Glu Asn Trp Leu Gln Leu Met Leu  
 290 295 300

Asn Trp Asp Pro Gln Gln Arg Gly Gly Pro Val Asp Leu Thr Leu Lys  
 305 310 315 320

Gln Pro Arg Cys Phe Val Leu Met Asp His Ile Leu Asn Leu Lys Ile  
 325 330 335

Val His Ile Leu Asn Met Thr Ser Ala Lys Ile Ile Ser Phe Leu Leu  
 340 345 350

Pro Pro Asp Glu Ser Leu His Ser Leu Gln Ser Arg Ile Glu Arg Glu  
 355 360 365

Thr Gly Ile Asn Thr Gly Ser Gln Glu Leu Leu Ser Glu Thr Gly Ile  
 370 375 380

Ser Leu Asp Pro Arg Lys Pro Ala Ser Gln Cys Val Leu Asp Gly Val  
 385 390 395 400

Arg Gly Cys Asp Ser Tyr Met Val Tyr Leu Phe Asp Lys Ser Lys Thr  
 405 410 415

Val Tyr Glu Gly Pro Phe Ala Ser Arg Ser Leu Ser Asp Cys Val Asn  
 420 425 430

Tyr Ile Val Gln Asp Ser Lys Ile Gln Leu Pro Ile Ile Gln Leu Arg  
 435 440 445

Lys Ala Trp Ala Glu Ala Val His Tyr Val Ser Gly Leu Lys Glu Asp  
 450 455 460

Tyr Ser Arg Leu Phe Gln Gly Gln Arg Ala Ala Met Leu Ser Leu Leu  
 465 470 475 480

ES 2 661 369 T3

Arg Tyr Asn Ala Asn Leu Thr Lys Met Lys Asn Thr Leu Ile Ser Ala  
 485 490 495

Ser Gln Gln Leu Lys Ala Lys Leu Glu Phe Phe His Lys Ser Ile Gln  
 500 505 510

Leu Asp Leu Glu Arg Tyr Ser Glu Gln Met Thr Tyr Gly Ile Ser Ser  
 515 520 525

Glu Lys Met Leu Lys Ala Trp Lys Glu Met Glu Glu Lys Ala Ile His  
 530 535 540

Tyr Ala Glu Val Gly Val Ile Gly Tyr Leu Glu Asp Gln Ile Met Ser  
 545 550 555 560

Leu His Ala Glu Ile Met Glu Leu Gln Lys Ser Pro Tyr Gly Arg Arg  
 565 570 575

Gln Gly Asp Leu Met Glu Ser Leu Glu Gln Arg Ala Ile Asp Leu Tyr  
 580 585 590

Lys Gln Leu Lys His Arg Pro Ser Asp His Ser Tyr Ser Asp Ser Thr  
 595 600 605

Glu Met Val Lys Ile Ile Val His Thr Val Gln Ser Gln Asp Arg Val  
 610 615 620

Leu Lys Glu Leu Phe Gly His Leu Ser Lys Leu Leu Gly Cys Lys Gln  
 625 630 635 640

Lys Ile Ile Asp Leu Leu Pro Lys Val Glu Val Ala Leu Ser Asn Ile  
 645 650 655

Lys Glu Ala Asp Asn Thr Val Met Phe Met Gln Gly Lys Arg Gln Lys  
 660 665 670

Glu Ile Trp His Leu Leu Lys Ile Ala Cys Thr Gln Ala Ala Ala Arg  
 675 680 685

Ala Leu Val Gly Ala Ala Leu Glu Gly Ala Val Ala Pro Gln Ala Ala  
 690 695 700

Ala Trp Leu Pro Pro Ala Ala Ala Glu His Asp His Ala Leu Ala Cys  
 705 710 715 720

Val Val Ala Pro Gln Asp Gly Glu Ala Ala Ala Gln Met Ile Glu Glu  
 725 730 735

Asn Leu Asn Cys Leu Gly His Leu Ala Ala Ile Ile His Glu Ala Asn  
 740 745 750

Glu Glu Gln Gly Asn Ser Met Met Asn Leu Asp Trp Ser Trp Leu Thr  
 755 760 765

Glu  
 <210> 3  
 <211> 2238  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>

ES 2 661 369 T3

<223> Mutante activo constitutivamente de IKKalfa

<400> 3

atggagcggc	ccccggggct	gcggccgggc	gcggcgggc	cctgggagat	gcgggagcgg	60	
ctgggcaccg	gcggcttcgg	gaacgtctgt	ctgtaccagc	atcgggaact	tgatctcaaa	120	
atagcaatta	agtcttgtcg	cctagagcta	agtacaaaa	acagagaacg	atggtgccat	180	
gaaatccaga	ttatgaagaa	gttgaaccat	gccaatgttg	taaaggcctg	tgatgttcct	240	
gaagaattga	atattttgat	tcatgatgtg	cctcttctag	caatggaata	ctgttctgga	300	
ggagatctcc	gaaagctgct	caacaaacca	gaaaattggt	gtggacttaa	agaaagccag	360	
atactttctt	tactaagtga	tataggttct	gggattcgat	atcttgcata	aaacaaaatt	420	
atacatcgag	atctaaaacc	tgaaaacata	gttcttcagg	atgttggtgg	aaagataata	480	
cataaaataa	ttgatctggg	atatgcaaaa	gatgttgatc	aaggagagct	gtgtacagag	540	
tttgtgggaa	cactgcagta	tctggcccca	gagctctttg	agaataagcc	ttacacagcc	600	
actgttgatt	atggagcctt	tgggaccatg	gtatttgaat	gtattgctgg	atataggcct	660	
ttttgcatc	atctgcagcc	atctacctgg	catgagaaga	ttaagaagaa	ggatccaaag	720	
tgtatatttg	catgtgaaga	gatgtcagga	gaagttcggg	ttagtagcca	tttacctcaa	780	
ccaaatagcc	ttttagtatt	aatagtagaa	cccatggaaa	actggctaca	gttgatgttg	840	
aattgggacc	ctcagcagag	aggaggacct	gttgacctta	ctttgaagca	gccaagatgt	900	
tttgtattaa	tgatcacat	tttgaatttg	aagatagtag	acatcctaaa	tatgacttct	960	
gcaaagataa	tttcttttct	gttaccacct	gatgaaagtc	ttcattcatt	acagtctcgt	1020	
attgagcgtg	aaactggaat	aaatactggt	tctcaagaac	ttctttcaga	gacaggaatt	1080	
tctctggatc	ctcggaaacc	agcctctcaa	tgtgttctag	atggagttag	aggctgtgat	1140	
agctatatgg	tttatttgtt	tgataaaagt	aaaactgtat	atgaagggcc	atctgcttcc	1200	
agaagtttat	ctgattgtgt	aaattatatt	gtacaggaca	gcaaataaca	gcttccaatt	1260	
atacagctgc	gtaaagcgtg	ggctgaagca	gtgcaactat	tgtctggact	aaaagaagac	1320	
tatagcaggc	tctttcaggg	acaagggca	gcaatgttaa	gtcttcttag	atataatgct	1380	
aacttaacaa	aaatgaagaa	cactttgatc	tcagcatcac	aacaactgaa	agctaaattg	1440	
gagttttttc	acaaaagcat	tcagcttgac	ttggagagat	acagcgagca	gatgacgtat	1500	
gggatattct	cagaaaaaat	gctaaaagca	tggaaagaaa	tggaaagaaa	ggccatccac	1560	
5	tatgctgagg	ttggtgtcat	tggatacctg	gaggatcaga	ttatgtcttt	gcatgctgaa	1620
atcatggagc	tacagaagag	cccctatgga	agacgtcagg	gagacttgat	ggaatctctg	1680	
gaacagcgtg	ccattgatct	atataagcag	ttaaacaaca	gaccttcaga	tcactcctac	1740	
agtgacagca	cagagatggt	gaaatcatt	gtgcacactg	tgacagatca	ggaccgtgtg	1800	
ctcaaggagc	tgtttggtca	tttgagcaag	ttgttgggct	gtaagcagaa	gattattgat	1860	
ctactcccta	agggtggaagt	ggcctcagc	aatatcaaag	aagctgacaa	tactgtcatg	1920	
ttcatgcagg	gaaaaaggca	gaaagaaatc	tggcatctcc	ttaaaattgc	ctgtacacag	1980	
gccgctgccc	gcgcccttgt	gggagccgct	ctggaaggtg	cagtggcccc	acaggccgcc	2040	
gcatggctgc	cccctgctgc	cgcagaacac	gatcacgctc	tggcctgtgt	ggtggctcct	2100	
caagatgggg	aggctgcccg	acaaatgatc	gaagaaaatt	tgaactgcct	tggccacttg	2160	
gccgctatta	ttcacgaggc	aaatgaggaa	cagggcaata	gtatgatgaa	tcttgattgg	2220	
agttggttga	cagaatga					2238	

ES 2 661 369 T3

<210> 4  
 <211> 756  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 Met Ser Trp Ser Pro Ser Leu Thr Thr Gln Thr Cys Gly Ala Trp Glu  
 1 5 10 15  
 Met Lys Glu Arg Leu Gly Thr Gly Gly Phe Gly Asn Val Ile Arg Trp  
 20 25 30  
 His Asn Gln Glu Thr Gly Glu Gln Ile Ala Ile Lys Gln Cys Arg Gln  
 35 40 45  
 Glu Leu Ser Pro Arg Asn Arg Glu Arg Trp Cys Leu Glu Ile Gln Ile  
 50 55 60  
 Met Arg Arg Leu Thr His Pro Asn Val Val Ala Ala Arg Asp Val Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Gly Met Gln Asn Leu Ala Pro Asn Asp Leu Pro Leu Leu Ala Met  
 85 90 95  
 Glu Tyr Cys Gln Gly Gly Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Asn Gln Phe Glu  
 100 105 110  
 Asn Cys Cys Gly Leu Arg Glu Gly Ala Ile Leu Thr Leu Leu Ser Asp  
 115 120 125  
 Ile Ala Ser Ala Leu Arg Tyr Leu His Glu Asn Arg Ile Ile His Arg  
 130 135 140

ES 2 661 369 T3

Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile Val Leu Gln Gln Gly Glu Gln Arg Leu  
 145 150 155 160  
 Ile His Lys Ile Ile Asp Leu Gly Tyr Ala Lys Glu Leu Asp Gln Gly  
 165 170 175  
 Ser Leu Cys Thr Ser Phe Val Gly Thr Leu Gln Tyr Leu Ala Pro Glu  
 180 185 190  
 Leu Leu Glu Gln Gln Lys Tyr Thr Val Thr Val Asp Tyr Trp Ser Phe  
 195 200 205  
 Gly Thr Leu Ala Phe Glu Cys Ile Thr Gly Phe Arg Pro Phe Leu Pro  
 210 215 220  
 Asn Trp Gln Pro Val Gln Trp His Ser Lys Val Arg Gln Lys Ser Glu  
 225 230 235 240  
 Val Asp Ile Val Val Ser Glu Asp Leu Asn Gly Thr Val Lys Phe Ser  
 245 250 255  
 Ser Ser Leu Pro Tyr Pro Asn Asn Leu Asn Ser Val Leu Ala Glu Arg  
 260 265 270  
 Leu Glu Lys Trp Leu Gln Leu Met Leu Met Trp His Pro Arg Gln Arg  
 275 280 285  
 Gly Thr Asp Pro Thr Tyr Gly Pro Asn Gly Cys Phe Lys Ala Leu Asp  
 290 295 300  
 Asp Ile Leu Asn Leu Lys Leu Val His Ile Leu Asn Met Val Thr Gly  
 305 310 315 320  
 Thr Ile His Thr Tyr Pro Val Thr Glu Asp Glu Ser Leu Gln Ser Leu  
 325 330 335  
 Lys Ala Arg Ile Gln Gln Asp Thr Gly Ile Pro Glu Glu Asp Gln Glu  
 340 345 350  
 Leu Leu Gln Glu Ala Gly Leu Ala Leu Ile Pro Asp Lys Pro Ala Thr  
 355 360 365  
 Gln Cys Ile Ser Asp Gly Lys Leu Asn Glu Gly His Thr Leu Asp Met  
 370 375 380  
 Asp Leu Val Phe Leu Phe Asp Asn Ser Lys Ile Thr Tyr Glu Thr Gln  
 385 390 395 400  
 Ile Ser Pro Arg Pro Gln Pro Glu Ser Val Ser Cys Ile Leu Gln Glu  
 405 410 415

ES 2 661 369 T3

Pro Lys Arg Asn Leu Ala Phe Phe Gln Leu Arg Lys Val Trp Gly Gln  
 420 425 430

Val Trp His Ser Ile Gln Thr Leu Lys Glu Asp Cys Asn Arg Leu Gln  
 435 440 445

Gln Gly Gln Arg Ala Ala Met Met Asn Leu Leu Arg Asn Asn Ser Cys  
 450 455 460

Leu Ser Lys Met Lys Asn Ser Met Ala Ser Met Ser Gln Gln Leu Lys  
 465 470 475 480

Ala Lys Leu Asp Phe Phe Lys Thr Ser Ile Gln Ile Asp Leu Glu Lys  
 485 490 495

Tyr Ser Glu Gln Thr Glu Phe Gly Ile Thr Ser Asp Lys Leu Leu Leu  
 500 505 510

Ala Trp Arg Glu Met Glu Gln Ala Val Glu Leu Cys Gly Arg Glu Asn  
 515 520 525

Glu Val Lys Leu Leu Val Glu Arg Met Met Ala Leu Gln Thr Asp Ile  
 530 535 540

Val Asp Leu Gln Arg Ser Pro Met Gly Arg Lys Gln Gly Gly Thr Leu  
 545 550 555 560

Asp Asp Leu Glu Glu Gln Ala Arg Glu Leu Tyr Arg Arg Leu Arg Glu  
 565 570 575

Lys Pro Arg Asp Gln Arg Thr Glu Gly Asp Ser Gln Glu Met Val Arg  
 580 585 590

Leu Leu Leu Gln Ala Ile Gln Ser Phe Glu Lys Lys Val Arg Val Ile  
 595 600 605

Tyr Thr Gln Leu Ser Lys Thr Val Val Cys Lys Gln Lys Ala Leu Glu  
 610 615 620

Leu Leu Pro Lys Val Glu Glu Val Val Ser Leu Met Asn Glu Asp Glu  
 625 630 635 640

Lys Thr Val Val Arg Leu Gln Glu Lys Arg Gln Lys Glu Leu Trp Asn  
 645 650 655

Leu Leu Lys Ile Ala Cys Ser Lys Val Arg Gly Pro Val Ser Gly Ser  
 660 665 670

Pro Asp Ser Met Asn Ala Ser Arg Leu Ser Gln Pro Gly Gln Leu Met  
 675 680 685

ES 2 661 369 T3

Ser Gln Pro Ser Thr Ala Ser Asn Ser Leu Pro Glu Pro Ala Lys Lys  
690 695 700

Ser Glu Glu Leu Val Ala Glu Ala His Asn Leu Cys Thr Leu Leu Glu  
705 710 715 720

Asn Ala Ile Gln Asp Thr Val Arg Glu Gln Asp Gln Ser Phe Thr Ala  
725 730 735

Leu Asp Trp Ser Trp Leu Gln Thr Glu Glu Glu Glu His Ser Cys Leu  
740 745 750

Glu Gln Ala Ser  
755

<210> 5

<211> 773

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Mutante activo constitutivamente de IKKbeta

<400> 5

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Asp Ile Glu Gly Arg Gly  
1 5 10 15

His Met Ser Trp Ser Pro Ser Leu Thr Thr Gln Thr Cys Gly Ala Trp  
20 25 30

Glu Met Lys Glu Arg Leu Gly Thr Gly Gly Phe Gly Asn Val Ile Arg  
35 40 45

Trp His Asn Gln Glu Thr Gly Glu Gln Ile Ala Ile Lys Gln Cys Arg  
50 55 60

Gln Glu Leu Ser Pro Arg Asn Arg Glu Arg Trp Cys Leu Glu Ile Gln  
65 70 75 80

Ile Met Arg Arg Leu Thr His Pro Asn Val Val Ala Ala Arg Asp Val  
85 90 95

Pro Glu Gly Met Gln Asn Leu Ala Pro Asn Asp Leu Pro Leu Leu Ala  
100 105 110

Met Glu Tyr Cys Gln Gly Gly Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Asn Gln Phe  
115 120 125

Glu Asn Cys Cys Gly Leu Arg Glu Gly Ala Ile Leu Thr Leu Leu Ser  
130 135 140

Asp Ile Ala Ser Ala Leu Arg Tyr Leu His Glu Asn Arg Ile Ile His







ES 2 661 369 T3

acgggcatcc cagaggagga ccaggagctg ctgcaggaag cgggctggc gttgatcccc 1140  
gataagcctg ccactcagtg tatttcagac ggcaagttaa atgagggcca cacattggac 1200  
atggatcttg tttttctctt tgacaacagt aaaatcacct atgagactca gatctcccca 1260  
cggccccaac ctgaaagtgt cagctgtatc cttcaagagc ccaagaggaa tctcgccttc 1320  
ttccagctga ggaaggtgtg gggccaggtc tggcacagca tccagaccct gaaggaagat 1380  
tgcaaccggc tgcagcaggg acagcgagcc gccatgatga atctcctccg aaacaacagc 1440  
tgctctcca aatgaagaa ttccatggct tccatgtctc agcagctcaa ggccaagttg 1500  
gatttcttca aaaccagcat ccagattgac ctggagaagt acagcgagca aaccgagttt 1560  
gggatcacat cagataaact gctgctggcc tggagggaaa tggagcaggc tgtggagctc 1620  
tgtgggcggg agaacgaagt gaaactcctg gtagaacgga tgatggctct gcagaccgac 1680  
attgtggact tacagaggag ccccatgggc cggaagcagg ggggaacgct ggacgaccta 1740  
gaggagcaag caagggagct gtacaggaga ctaagggaaa aacctcgaga ccagcgaact 1800  
gagggtgaca gtcaggaat ggtacggctg ctgcttcagg caattcagag cttcgagaag 1860  
aaagtgcgag tgatctatac gcagctcagt aaaactgtgg ttgcaagca gaaggcgtg 1920  
gaactgttgc ccaaggtgga agaggtggtg agcttaatga atgaggatga gaagactgtt 1980  
gtccggctgc aggagaagcg gcagaaggag ctctggaatc tcctgaagat tgctttagc 2040  
aaggtccgtg gtcctgtcgc tggagccccg gatgccatga atgccgctcg acttgcccag 2100  
cctgggcagc tgatggctca gcccgccacg gccgccaacg ccttacctga gccagccaag 2160  
aaggctgaag aactggtggc tgaagcacat aacctctgca ccctgctaga aaatgccata 2220  
caggacactg tgaggaaca agaccagagt ttcacggccc tagactggag ctggttacag 2280  
acggaagaag aagagcacag ctgcctggag caggcctca 2319

<210> 7  
<211> 768  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Mutante inhibidor de IKKalfa

<400> 7  
His His His His Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Asp Ile  
1 5 10 15  
Glu Gly Arg Gly His Met Thr Met Glu Arg Pro Pro Gly Leu Arg Pro  
20 25 30  
Gly Ala Gly Gly Pro Trp Glu Met Arg Glu Arg Leu Gly Thr Gly Gly  
35 40 45  
Phe Gly Asn Val Cys Leu Tyr Gln His Arg Glu Leu Asp Leu Lys Ile  
50 55 60

ES 2 661 369 T3

Ala Ile Met Ser Cys Arg Leu Glu Leu Ser Thr Lys Asn Arg Glu Arg  
65 70 75 80

Trp Cys His Glu Ile Gln Ile Met Lys Lys Leu Asn His Ala Asn Val  
85 90 95

Val Lys Ala Cys Asp Val Pro Glu Glu Leu Asn Ile Leu Ile His Asp  
100 105 110

Val Pro Leu Leu Ala Met Glu Tyr Cys Ser Gly Gly Asp Leu Arg Lys  
115 120 125

Leu Leu Asn Lys Pro Glu Asn Cys Cys Gly Leu Lys Glu Ser Gln Ile  
130 135 140

Leu Ser Leu Leu Ser Asp Ile Gly Ser Gly Ile Arg Tyr Leu His Glu  
145 150 155 160

Asn Lys Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile Val Leu Gln  
165 170 175

Asp Val Gly Gly Lys Ile Ile His Lys Ile Ile Asp Leu Gly Tyr Ala  
180 185 190

Lys Asp Val Asp Gln Gly Ser Leu Cys Thr Ser Phe Val Gly Thr Leu  
195 200 205

Gln Tyr Leu Ala Pro Glu Leu Phe Glu Asn Lys Pro Tyr Thr Ala Thr  
210 215 220

Val Asp Tyr Trp Ser Phe Gly Thr Met Val Phe Glu Cys Ile Ala Gly  
225 230 235 240

Tyr Arg Pro Phe Leu His His Leu Gln Pro Phe Thr Trp His Glu Lys  
245 250 255

Ile Lys Lys Lys Asp Pro Lys Cys Ile Phe Ala Cys Glu Glu Met Ser  
260 265 270

Gly Glu Val Arg Phe Ser Ser His Leu Pro Gln Pro Asn Ser Leu Cys  
275 280 285

Ser Leu Ile Val Glu Pro Met Glu Asn Trp Leu Gln Leu Met Leu Asn  
290 295 300

Trp Asp Pro Gln Gln Arg Gly Gly Pro Val Asp Leu Thr Leu Lys Gln  
305 310 315 320

Pro Arg Cys Phe Val Leu Met Asp His Ile Leu Asn Leu Lys Ile Val  
325 330 335

ES 2 661 369 T3

His Ile Leu Asn Met Thr Ser Ala Lys Ile Ile Ser Phe Leu Leu Pro  
 340 345 350  
 Pro Asp Glu Ser Leu His Ser Leu Gln Ser Arg Ile Glu Arg Glu Thr  
 355 360 365  
 Gly Ile Asn Thr Gly Ser Gln Glu Leu Leu Ser Glu Thr Gly Ile Ser  
 370 375 380  
 Leu Asp Pro Arg Lys Pro Ala Ser Gln Cys Val Leu Asp Gly Val Arg  
 385 390 395 400  
 Gly Cys Asp Ser Tyr Met Val Tyr Leu Phe Asp Lys Ser Lys Thr Val  
 405 410 415  
 Tyr Glu Gly Pro Phe Ala Ser Arg Ser Leu Ser Asp Cys Val Asn Tyr  
 420 425 430  
 Ile Val Gln Asp Ser Lys Ile Gln Leu Pro Ile Ile Gln Leu Arg Lys  
 435 440 445  
 Ala Trp Ala Glu Ala Val His Tyr Val Ser Gly Leu Lys Glu Asp Tyr  
 450 455 460  
 Ser Arg Leu Phe Gln Gly Gln Arg Ala Ala Met Leu Ser Leu Leu Arg  
 465 470 475 480  
 Tyr Asn Ala Asn Leu Thr Lys Met Lys Asn Thr Leu Ile Ser Ala Ser  
 485 490 495  
 Gln Gln Leu Lys Ala Lys Leu Glu Phe Phe His Lys Ser Ile Gln Leu  
 500 505 510  
 Asp Leu Glu Arg Tyr Ser Glu Gln Met Thr Tyr Gly Ile Ser Ser Glu  
 515 520 525  
 Lys Met Leu Lys Ala Trp Lys Glu Met Glu Glu Lys Ala Ile His Tyr  
 530 535 540  
 Ala Glu Val Gly Val Ile Gly Tyr Leu Glu Asp Gln Ile Met Ser Leu  
 545 550 555 560  
 His Ala Glu Ile Met Glu Leu Gln Lys Ser Pro Tyr Gly Arg Arg Gln  
 565 570 575  
 Gly Asp Leu Met Glu Ser Leu Glu Gln Arg Ala Ile Asp Leu Tyr Lys  
 580 585 590  
 Gln Leu Lys His Arg Pro Ser Asp His Ser Tyr Ser Asp Ser Thr Glu  
 595 600 605

ES 2 661 369 T3

Met Val Lys Ile Ile Val His Thr Val Gln Ser Gln Asp Arg Val Leu  
 610 615 620

Lys Glu Leu Phe Gly His Leu Ser Lys Leu Leu Gly Cys Lys Gln Lys  
 625 630 635 640

Ile Ile Asp Leu Leu Pro Lys Val Glu Val Ala Leu Ser Asn Ile Lys  
 645 650 655

Glu Ala Asp Asn Thr Val Met Phe Met Gln Gly Lys Arg Gln Lys Glu  
 660 665 670

Ile Trp His Leu Leu Lys Ile Ala Cys Thr Gln Ala Ala Ala Arg Ala  
 675 680 685

Leu Val Gly Ala Ala Leu Glu Gly Ala Val Ala Pro Gln Ala Ala Ala  
 690 695 700

Trp Leu Pro Pro Ala Ala Ala Glu His Asp His Ala Leu Ala Cys Val  
 705 710 715 720

Val Ala Pro Gln Asp Gly Glu Ala Ala Ala Gln Met Ile Glu Glu Asn  
 725 730 735

Leu Asn Cys Leu Gly His Leu Ala Ala Ile Ile His Glu Ala Asn Glu  
 740 745 750

Glu Gln Gly Asn Ser Met Met Asn Leu Asp Trp Ser Trp Leu Thr Glu  
 755 760 765

<210> 8  
 <211> 2238  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Mutante inhibidor de IKKalfa

<400> 8

atggagcggc ccccggggct gcggccgggc gcgggcgggc cctgggagat gcgggagcgg	60
ctgggcaccg gcggcttcgg gaacgtctgt ctgtaccagc atcggaact tgatctcaa	120
atagcaatta tgtcttctgc cctagagcta agtaccaaaa acagagaacg atggtgccat	180
gaaatccaga ttatgaagaa gttgaaccat gccaatggtg taaaggcctg tgatgttct	240
gaagaattga atattttgat tcatgatgtg cctcttctag caatggaata ctgttctgga	300
ggagatctcc gaaagctgct caacaaacca gaaaattggt gtggacttaa agaaagccag	360
atactttctt tactaagtga tataggttct gggattcgat atttgcata gaacaaaatt	420
atacatcgag atctaaaacc tgaaaacata gttcttcagg atgttggtgg aaagataata	480
cataaaataa ttgatctggg atatgcaaaa gatgttgatc aaggaagtct gtgtacatct	540

ES 2 661 369 T3

tttgtgggaa cactgcagta tctggcccca gagctctttg aāaataagcc ttacacagcc 600  
 actgttgatt attggagctt tgggaccatg gtatttgaat gtattgctgg atataggcct 660  
 tttttgcatc atctgcagcc atttacctgg catgagaaga ttaagaagaa ggatccaaag 720  
 tgtatatttg catgtgaaga gatgtcacga gaagttcggg ttagtagcca tttacctcaa 780  
 ccaaatagcc tttgtagttt aatagtagaa cccatggaaa actggctaca gttgatgttg 840  
 aattgggacc ctcagcagag aggaggacct gttgacctta ctttgaagca gccaaagatgt 900  
 tttgtattaa tggatcacat tttgaatttg aagatagtac acatcctaaa tatgacttct 960  
 gcaaagataa tttcttttct gttaccacct gatgaaagtc ttcattcatt acagtctcgt 1020  
 attgagcgtg aaactggaat aaatactggg tctcaagaac ttctttcaga gacaggaatt 1080  
 tctctggatc ctcgaaacc agcctctcaa tgtgttctag atggagttag aggctgtgat 1140  
 agctatatgg tttatttgtt tgataaaagt aaaactgtat atgaagggcc atttgcttcc 1200  
 agaagtttat ctgattgtgt aaattatatt gtacaggaca gcaaaataca gcttccaatt 1260  
 atacagctgc gtaaagcgtg ggctgaagca gtgcactatg tgtctggact aaaagaagac 1320  
 tatagcaggc tctttcaggg acaaagggca gcaatgttaa gtcttcttag atataatgct 1380  
 aacttaacaa aaatgaagaa cactttgatc tcagcatcac aacaactgaa agctaaattg 1440  
 gagttttttc acaaaagcat tcagcttgac ttggagagat acagcgagca gatgacgtat 1500  
 gggatatctt cagaaaaaat gctaaaagca tggaaagaaa tggaaagaaa ggccatccac 1560  
 tatgctgagg ttggtgcat tggataacctg gaggatcaga ttatgtcttt gcatgctgaa 1620  
 atcatggagc tacagaagag cccctatgga agacgtcagg gagacttgat ggaatctctg 1680  
 gaacagcgtg ccattgatct atataagcag ttaaaacaca gaccttcaga tcactcctac 1740  
 agtgacagca cagagatggt gaaaatcatt gtgcacactg tgcagagtca ggaccgtgtg 1800  
 ctcaaggagc tgtttggtca tttgagcaag ttgttgggct gtaagcagaa gattattgat 1860  
 ctactcccta aggtggaagt ggcctcagt aatatcaaag aagctgacaa tactgtcatg 1920  
 ttcattgagg gaaaaaggca gaaagaaatc tggcatctcc ttaaaattgc ctgtacacag 1980  
 gccgctgcc gcgcccttgt gggagccgct ctggaagggtg cagtggcccc acaggccgcc 2040  
 gcatggctgc cccctgctgc cgcagaacac gatcacgctc tggcctgtgt ggtggctcct 2100  
 caagatgggg aggctgccgc acaaatgatc gaagaaaatt tgaactgcct tggccacttg 2160  
 gccgctatta ttcacgaggc aaatgaggaa cagggcaata gtatgatgaa tcttgattgg 2220  
 agttggttga cagaatga 2238

<210> 9  
 <211> 779  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Mutante inhibidor de IKKbeta

10

<400> 9

ES 2 661 369 T3

Ser His His His His His Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Ile Glu Gly Arg Gly His Met Ser Trp Ser Pro Ser Leu Thr Thr  
 20 25 30  
 Gln Thr Cys Gly Ala Trp Glu Met Lys Glu Arg Leu Gly Thr Gly Gly  
 35 40 45  
 Phe Gly Asn Val Ile Arg Trp His Asn Gln Glu Thr Gly Glu Gln Ile  
 50 55 60  
 Ala Ile Met Gln Cys Arg Gln Glu Leu Ser Pro Arg Asn Arg Glu Arg  
 65 70 75 80  
 Trp Cys Leu Glu Ile Gln Ile Met Arg Arg Leu Thr His Pro Asn Val  
 85 90 95  
 Val Ala Ala Arg Asp Val Pro Glu Gly Met Gln Asn Leu Ala Pro Asn  
 100 105 110  
 Asp Leu Pro Leu Leu Ala Met Glu Tyr Cys Gln Gly Gly Asp Leu Arg  
 115 120 125  
 Lys Tyr Leu Asn Gln Phe Glu Asn Cys Cys Gly Leu Arg Glu Gly Ala  
 130 135 140  
 Ile Leu Thr Leu Leu Ser Asp Ile Ala Ser Ala Leu Arg Tyr Leu His  
 145 150 155 160  
 Glu Asn Arg Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile Val Leu  
 165 170 175  
 Gln Gln Gly Glu Gln Arg Leu Ile His Lys Ile Ile Asp Leu Gly Tyr  
 180 185 190  
 Ala Lys Glu Leu Asp Gln Gly Ser Leu Cys Thr Ser Phe Val Gly Thr  
 195 200 205  
 Leu Gln Tyr Leu Ala Pro Glu Leu Leu Glu Gln Gln Lys Tyr Thr Val  
 210 215 220  
 Thr Val Asp Tyr Trp Ser Phe Gly Thr Leu Ala Phe Glu Cys Ile Thr  
 225 230 235 240  
 Gly Phe Arg Pro Phe Leu Pro Asn Trp Gln Pro Val Gln Trp His Ser  
 245 250 255  
 Lys Val Arg Gln Lys Ser Glu Val Asp Ile Val Val Ser Glu Asp Leu  
 260 265 270

ES 2 661 369 T3

Asn Gly Thr Val Lys Phe Ser Ser Ser Leu Pro Tyr Pro Asn Asn Leu  
 275 280 285  
 Asn Ser Val Leu Ala Glu Arg Leu Glu Lys Trp Leu Gln Leu Met Leu  
 290 295 300  
 Met Trp His Pro Arg Gln Arg Gly Thr Asp Pro Thr Tyr Gly Pro Asn  
 305 310 315 320  
 Gly Cys Phe Lys Ala Leu Asp Asp Ile Leu Asn Leu Lys Leu Val His  
 325 330 335  
 Ile Leu Asn Met Val Thr Gly Thr Ile His Thr Tyr Pro Val Thr Glu  
 340 345 350  
 Asp Glu Ser Leu Gln Ser Leu Lys Ala Arg Ile Gln Gln Asp Thr Gly  
 355 360 365  
 Ile Pro Glu Glu Asp Gln Glu Leu Leu Gln Glu Ala Gly Leu Ala Leu  
 370 375 380  
 Ile Pro Asp Lys Pro Ala Thr Gln Cys Ile Ser Asp Gly Lys Leu Asn  
 385 390 395 400  
 Glu Gly His Thr Leu Asp Met Asp Leu Val Phe Leu Phe Asp Asn Ser  
 405 410 415  
 Lys Ile Thr Tyr Glu Thr Gln Ile Ser Pro Arg Pro Gln Pro Glu Ser  
 420 425 430  
 Val Ser Cys Ile Leu Gln Glu Pro Lys Arg Asn Leu Ala Phe Phe Gln  
 435 440 445  
 Leu Arg Lys Val Trp Gly Gln Val Trp His Ser Ile Gln Thr Leu Lys  
 450 455 460  
 Glu Asp Cys Asn Arg Leu Gln Gln Gly Gln Arg Ala Ala Met Met Asn  
 465 470 475 480  
 Leu Leu Arg Asn Asn Ser Cys Leu Ser Lys Met Lys Asn Ser Met Ala  
 485 490 495  
 Ser Met Ser Gln Gln Leu Lys Ala Lys Leu Asp Phe Phe Lys Thr Ser  
 500 505 510  
 Ile Gln Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Ser Glu Gln Thr Glu Phe Gly Ile  
 515 520 525  
 Thr Ser Asp Lys Leu Leu Leu Ala Trp Arg Glu Met Glu Gln Ala Val  
 530 535 540

ES 2 661 369 T3

Glu Leu Cys Gly Arg Glu Asn Glu Val Lys Leu Leu Val Glu Arg Met  
 545 550 555 560  
 Met Ala Leu Gln Thr Asp Ile Val Asp Leu Gln Arg Ser Pro Met Gly  
 565 570 575  
 Arg Lys Gln Gly Gly Thr Leu Asp Asp Leu Glu Glu Gln Ala Arg Glu  
 580 585 590  
 Leu Tyr Arg Arg Leu Arg Glu Lys Pro Arg Asp Gln Arg Thr Glu Gly  
 595 600 605  
 Asp Ser Gln Glu Met Val Arg Leu Leu Leu Gln Ala Ile Gln Ser Phe  
 610 615 620  
 Glu Lys Lys Val Arg Val Ile Tyr Thr Gln Leu Ser Lys Thr Val Val  
 625 630 635 640  
 Cys Lys Gln Lys Ala Leu Glu Leu Leu Pro Lys Val Glu Glu Val Val  
 645 650 655  
 Ser Leu Met Asn Glu Asp Glu Lys Thr Val Val Arg Leu Gln Glu Lys  
 660 665 670  
 Arg Gln Lys Glu Leu Trp Asn Leu Leu Lys Ile Ala Cys Ser Lys Val  
 675 680 685  
 Arg Gly Pro Val Ala Gly Ala Pro Asp Ala Met Asn Ala Ala Arg Leu  
 690 695 700  
 Ala Gln Pro Gly Gln Leu Met Ala Gln Pro Ala Thr Ala Ala Asn Ala  
 705 710 715 720  
 Leu Pro Glu Pro Ala Lys Lys Ala Glu Glu Leu Val Ala Glu Ala His  
 725 730 735  
 Asn Leu Cys Thr Leu Leu Glu Asn Ala Ile Gln Asp Thr Val Arg Glu  
 740 745 750  
 Gln Asp Gln Ser Phe Thr Ala Leu Asp Trp Ser Trp Leu Gln Thr Glu  
 755 760 765  
 Glu Glu Glu His Ser Cys Leu Glu Gln Ala Ser  
 770 775

<210> 10  
 <211> 2271  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Mutante inhibidor de IKKbeta

10

<400> 10

ES 2 661 369 T3

Ala Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Thr Thr  
1 5 10 15

Cys Cys Cys Thr Gly Ala Cys Ala Ala Cys Gly Cys Ala Gly Ala Cys  
20 25 30

Ala Thr Gly Cys Gly Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly Ala Ala  
35 40 45

Ala Thr Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Cys Gly Cys Cys Thr Thr Gly  
50 55 60

Gly Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala Thr Thr Thr Gly Gly  
65 70 75 80

Ala Ala Ala Thr Gly Thr Cys Ala Thr Cys Cys Gly Ala Thr Gly Gly  
85 90 95

Cys Ala Cys Ala Ala Thr Cys Ala Gly Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly  
100 105 110

Gly Thr Gly Ala Gly Cys Ala Gly Ala Thr Thr Gly Cys Cys Ala Thr  
115 120 125

Cys Ala Thr Gly Cys Ala Gly Thr Gly Cys Cys Gly Gly Cys Ala Gly  
130 135 140

Gly Ala Gly Cys Thr Cys Ala Gly Cys Cys Cys Cys Cys Gly Gly Ala  
145 150 155 160

Ala Cys Cys Gly Ala Gly Ala Gly Cys Gly Thr Gly Gly Thr Gly  
165 170 175

Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Thr Cys  
180 185 190

Ala Thr Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Cys Thr Gly Ala Cys Cys Cys  
195 200 205

Ala Cys Cys Cys Cys Ala Ala Thr Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys  
210 215 220

Thr Gly Cys Cys Cys Gly Ala Gly Ala Thr Gly Thr Cys Cys Cys Thr  
225 230 235 240

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Thr Gly Cys Ala Gly Ala Ala Cys Thr  
245 250 255

Thr Gly Gly Cys Gly Cys Cys Cys Ala Ala Thr Gly Ala Cys Cys Thr



ES 2 661 369 T3

530                                      535                                      540  
 Thr Cys Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Cys Thr Gly Cys Ala  
 545                                      550                                      555                                      560  
 Gly Thr Ala Cys Cys Thr Gly Gly Cys Cys Cys Cys Ala Gly Ala Gly  
 565                                      570                                      575  
 Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Ala Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala  
 580                                      585                                      590  
 Ala Gly Thr Ala Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Ala Cys Cys Gly Thr  
 595                                      600                                      605  
 Cys Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Thr Cys  
 610                                      615                                      620  
 Gly Gly Cys Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Cys Cys Thr Thr Thr Gly  
 625                                      630                                      635  
 Ala Gly Thr Gly Cys Ala Thr Cys Ala Cys Gly Gly Gly Cys Thr Thr  
 645                                      650                                      655  
 Cys Cys Gly Gly Cys Cys Cys Thr Thr Cys Cys Thr Cys Cys Cys  
 660                                      665                                      670  
 Ala Ala Cys Thr Gly Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys Gly Thr Gly Cys  
 675                                      680                                      685  
 Ala Gly Thr Gly Gly Cys Ala Thr Thr Cys Ala Ala Ala Ala Gly Thr  
 690                                      695                                      700  
 Gly Cys Gly Gly Cys Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Thr Gly Ala Gly  
 705                                      710                                      715                                      720  
 Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala Thr Thr Gly Thr Thr Gly Thr Thr Ala  
 725                                      730                                      735  
 Gly Cys Gly Ala Ala Gly Ala Cys Thr Thr Gly Ala Ala Thr Gly Gly  
 740                                      745                                      750  
 Ala Ala Cys Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly Thr Thr Thr Thr Cys Ala  
 755                                      760                                      765  
 Ala Gly Cys Thr Cys Thr Thr Thr Ala Cys Cys Cys Thr Ala Cys Cys  
 770                                      775                                      780  
 Cys Cys Ala Ala Thr Ala Ala Thr Cys Thr Thr Ala Ala Cys Ala Gly  
 785                                      790                                      795                                      800  
 Thr Gly Thr Cys Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Ala Gly Cys Gly Ala



ES 2 661 369 T3

1070				1075				1080						
Ala	Thr	Cys	Cys	Cys	Cys	Gly	Ala	Thr	Ala	Ala	Gly	Cys	Cys	Thr
1085						1090					1095			
Gly	Cys	Cys	Ala	Cys	Thr	Cys	Ala	Gly	Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Thr
1100						1105					1110			
Thr	Cys	Ala	Gly	Ala	Cys	Gly	Gly	Cys	Ala	Ala	Gly	Thr	Thr	Ala
1115						1120					1125			
Ala	Ala	Thr	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Cys	Cys	Ala	Cys	Ala	Cys	Ala
1130						1135					1140			
Thr	Thr	Gly	Gly	Ala	Cys	Ala	Thr	Gly	Gly	Ala	Thr	Cys	Thr	Thr
1145						1150					1155			
Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Cys	Thr	Cys	Thr	Thr	Thr	Gly	Ala	Cys
1160						1165					1170			
Ala	Ala	Cys	Ala	Gly	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Cys	Ala	Cys
1175						1180					1185			
Thr	Ala	Thr	Gly	Ala	Gly	Ala	Cys	Thr	Cys	Ala	Gly	Ala	Thr	Cys
1190						1195					1200			
Thr	Cys	Cys	Cys	Cys	Ala	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	Cys	Cys	Ala	Ala
1205						1210					1215			
Cys	Cys	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Thr	Cys	Ala	Gly	Cys
1220						1225					1230			
Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Cys	Cys	Thr	Thr	Thr	Cys	Ala	Ala	Gly	Gly
1235						1240					1245			
Cys	Cys	Cys	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Ala	Thr	Cys	Thr	Cys
1250						1255					1260			
Gly	Cys	Cys	Thr	Thr	Cys	Thr	Thr	Cys	Cys	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly
1265						1270					1275			
Ala	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Thr	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Cys
1280						1285					1290			
Cys	Ala	Gly	Gly	Thr	Cys	Thr	Gly	Gly	Cys	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys
1295						1300					1305			
Ala	Thr	Cys	Cys	Ala	Gly	Ala	Cys	Cys	Cys	Cys	Thr	Gly	Ala	Ala
1310						1315					1320			
Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Ala	Cys	Cys	Gly	Gly

ES 2 661 369 T3

1325		1330		1335
Cys Thr	Gly Cys Ala Gly	Cys Ala Gly Gly Gly	Ala Cys Ala Gly	
1340		1345		1350
Cys Gly	Ala Gly Cys Cys	Gly Cys Cys Ala Thr	Gly Ala Thr Gly	
1355		1360		1365
Ala Ala	Thr Cys Thr Cys	Cys Thr Cys Cys Gly	Ala Ala Ala Cys	
1370		1375		1380
Ala Ala	Cys Ala Gly Cys	Thr Gly Cys Cys Thr	Cys Thr Cys Cys	
1385		1390		1395
Ala Ala	Ala Ala Thr Gly	Ala Ala Gly Ala Ala	Thr Thr Cys Cys	
1400		1405		1410
Ala Thr	Gly Gly Cys Thr	Thr Cys Cys Ala Thr	Gly Thr Cys Thr	
1415		1420		1425
Cys Ala	Gly Cys Ala Gly	Cys Thr Cys Ala Ala	Gly Gly Cys Cys	
1430		1435		1440
Ala Ala	Gly Thr Thr Gly	Gly Ala Thr Thr Thr	Cys Thr Thr Cys	
1445		1450		1455
Ala Ala	Ala Ala Cys Cys	Ala Gly Cys Ala Thr	Cys Cys Ala Gly	
1460		1465		1470
Ala Thr	Thr Gly Ala Cys	Cys Thr Gly Gly Ala	Gly Ala Ala Gly	
1475		1480		1485
Thr Ala	Cys Ala Gly Cys	Gly Ala Gly Cys Ala	Ala Ala Cys Cys	
1490		1495		1500
Gly Ala	Gly Thr Thr Thr	Gly Gly Ala Thr	Cys Ala Cys Ala	
1505		1510		1515
Thr Cys	Ala Gly Ala Thr	Ala Ala Cys Thr	Gly Cys Thr Gly	
1520		1525		1530
Cys Thr	Gly Gly Cys Cys	Thr Gly Gly Ala Gly	Gly Gly Ala Ala	
1535		1540		1545
Ala Thr	Gly Gly Ala Gly	Cys Ala Gly Gly Cys	Thr Gly Thr Gly	
1550		1555		1560
Gly Ala	Gly Cys Thr Cys	Thr Gly Thr Gly Gly	Gly Cys Gly Gly	
1565		1570		1575
Gly Ala	Gly Ala Ala Cys	Gly Ala Ala Gly Thr	Gly Ala Ala Ala	

ES 2 661 369 T3

1580	1585	1590
Cys Thr 1595	Cys Cys Thr Gly 1600	Gly Thr Ala Gly Ala 1605
Ala Thr 1610	Gly Ala Thr Gly 1615	Cys Thr Cys Thr 1620
Ala Cys 1625	Cys Gly Ala Cys 1630	Thr Thr Gly Thr 1635
Thr Thr 1640	Ala Cys Ala Gly 1645	Gly Gly Ala Gly 1650
Ala Thr 1655	Gly Gly Gly Cys 1660	Cys Gly Ala Ala 1665
Gly Gly 1670	Gly Gly Gly Ala 1675	Cys Gly Cys Thr 1680
Gly Ala 1685	Cys Cys Thr Ala 1690	Ala Gly Gly Ala 1695
Gly Cys 1700	Ala Ala Gly Gly 1705	Ala Gly Cys Thr 1710
Ala Gly 1715	Gly Ala Gly Ala 1720	Cys Thr Ala Ala 1725
Ala Ala 1730	Ala Cys Cys Thr 1735	Gly Ala Gly Ala 1740
Cys Gly 1745	Ala Ala Cys Thr 1750	Ala Gly Gly Gly 1755
Ala Gly 1760	Thr Cys Ala Gly 1765	Ala Ala Ala Thr 1770
Cys Gly 1775	Gly Cys Thr Gly 1780	Thr Gly Cys Thr 1785
Gly Cys 1790	Ala Ala Thr Thr 1795	Ala Gly Ala Gly 1800
Gly Ala 1805	Gly Ala Ala Gly 1810	Ala Ala Gly Thr 1815
Gly Thr 1820	Gly Ala Thr Cys 1825	Ala Thr Ala Cys 1830
Cys Thr	Cys Ala Gly Thr Ala	Ala Ala Ala Cys Thr Gly Thr Gly



ES 2 661 369 T3

2090	2095	2100
Gly Cys 2105	Cys Ala Ala Gly 2110	Ala Gly Gly Cys Thr 2115
Gly Ala 2120	Ala Cys Thr Gly 2125	Thr Gly Gly Cys Thr 2130
Gly Cys 2135	Ala Cys Ala Thr 2140	Ala Cys Cys Thr Cys 2145
Ala Cys 2150	Cys Cys Thr Gly 2155	Thr Ala Gly Ala Ala 2160
Gly Cys 2165	Cys Ala Thr Ala 2170	Ala Gly Gly Ala Cys 2175
Gly Thr 2180	Gly Ala Gly Gly 2185	Ala Ala Cys Ala Ala 2190
Cys Ala 2195	Gly Ala Gly Thr 2200	Thr Cys Ala Cys Gly 2205
Cys Thr 2210	Ala Gly Ala Cys 2215	Gly Gly Ala Gly Cys 2220
Thr Thr 2225	Ala Cys Ala Gly 2230	Cys Gly Gly Ala Ala 2235
Gly Ala 2240	Ala Gly Ala Gly 2245	Ala Cys Ala Gly Cys 2250
Cys Thr 2255	Gly Gly Ala Gly 2260	Ala Gly Gly Cys Cys 2265
Thr Gly 2270	Ala	

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Células dendríticas (DZ) que están manipuladas en su vía de transmisión de señales de NFκB mediante transfección de ARN con una o varias secuencias de nucleótidos que codifican al menos una proteína transmisora de señales mutada de la vía de transmisión de señales de NFκB, siendo la proteína transmisora de señales mutada de la vía de transmisión de señales de NFκB un mutante de IKKα o IKKβ activo constitutivamente, en donde
- (i) el mutante de IKKα activo constitutivamente comprende los restos de aminoácidos 25 a 769 de la SEQ ID NO: 2; o
- (ii) el mutante de IKKβ activo constitutivamente comprende los restos de aminoácidos 18 a 773 de la SEQ ID NO: 5.
- 10 2. DZ según la reivindicación 1, presentando los mutantes de IKKα e IKKβ activos constitutivamente la secuencia de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 5 o presentando la secuencia de ARN de la SEQ ID NO: 3 o 6.
3. DZ según la reivindicación 1 o 2, en donde las DZ
- (i) son DZ maduras; y/o
- (ii) son DZ activadas por NFκB que producen IL-12p70; y/o
- 15 (iii) son DZ activadas por NFκB que producen IL-10; y/o
- (iv) además están cargadas con uno o varios antígenos diana.
4. Procedimiento para la producción *ex vivo* de DZ manipuladas en la vía de transmisión de señales de NFκB como se define en la reivindicación 1 a 3, que comprende la transfección con ARN de DZ inmaduras o maduras con una o varias secuencias de nucleótidos que codifican una proteína transmisora de señales mutada de la vía de transmisión de señales de NFκB como se define en reivindicación 1 a 3.
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 4, realizándose la transfección de ARN mediante electroporación.
6. Procedimiento según la reivindicación 4 o 5, que además comprende
- (i) en el caso de la transfección con ARN de DZ inmaduras, el tratamiento con un estímulo de maduración; y/o
- (ii) la carga de las DZ con un antígeno diana; y/o
- 25 (iii) la crioconservación de DZ maduras.
7. Composición, composición farmacéutica o medicamento que comprende DZ según una o varias de las reivindicaciones 1 a 3 y opcionalmente compuestos coadyuvantes y excipientes farmacéuticamente adecuados, siendo preferiblemente las DZ autólogas.
- 30 8. Uso de las DZ según una o varias de las reivindicaciones 1 a 3 para la estimulación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> autólogos *ex vivo*.
9. Uso según la reivindicación 8, siendo adecuadas las DZ activadas por NFκB para la transmisión de linfocitos T pasiva y la generación de un clon de linfocitos T.
10. DZ según una o varias de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de enfermedades en un paciente.
- 35 11. DZ para su uso según la reivindicación 10, siendo adecuadas las DZ activadas por NFκB para la vacunación basada en DZ, para la vacunación terapéutica contra cáncer o enfermedades infecciosas y como vacuna preventiva.
12. Procedimiento para la expansión de linfocitos T inclusive la estimulación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> autólogos *ex vivo* que comprenden la estimulación de los linfocitos T con DZ según una o varias de las reivindicaciones 1 a 3.
- 40 13. Procedimiento según la reivindicación 12, siendo adecuadas las DZ activadas por NFκB para la expansión de linfocitos T para los linfocitos T para la transmisión de linfocitos T pasiva y para la generación de un clon de linfocitos T.

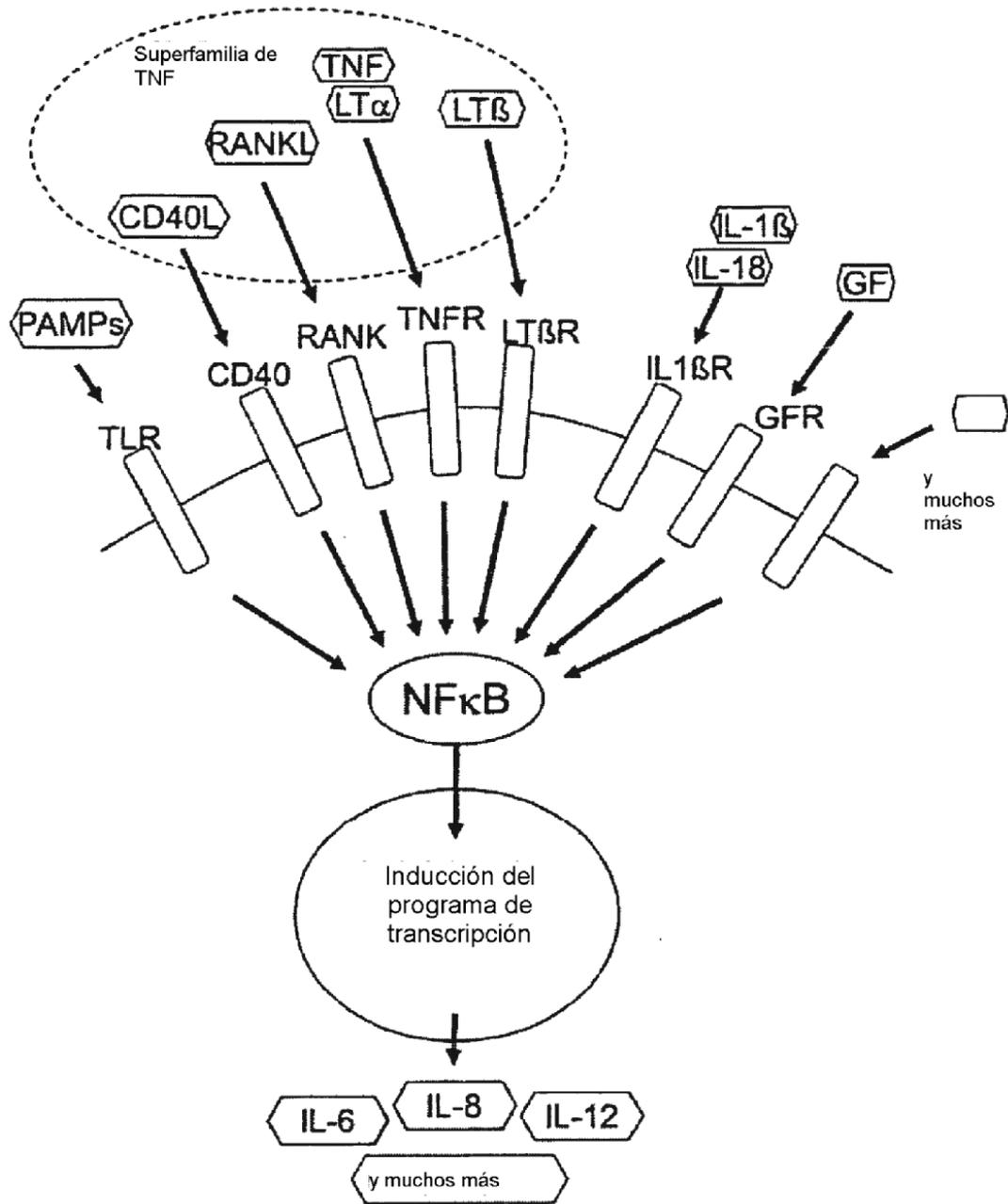


Figura 1

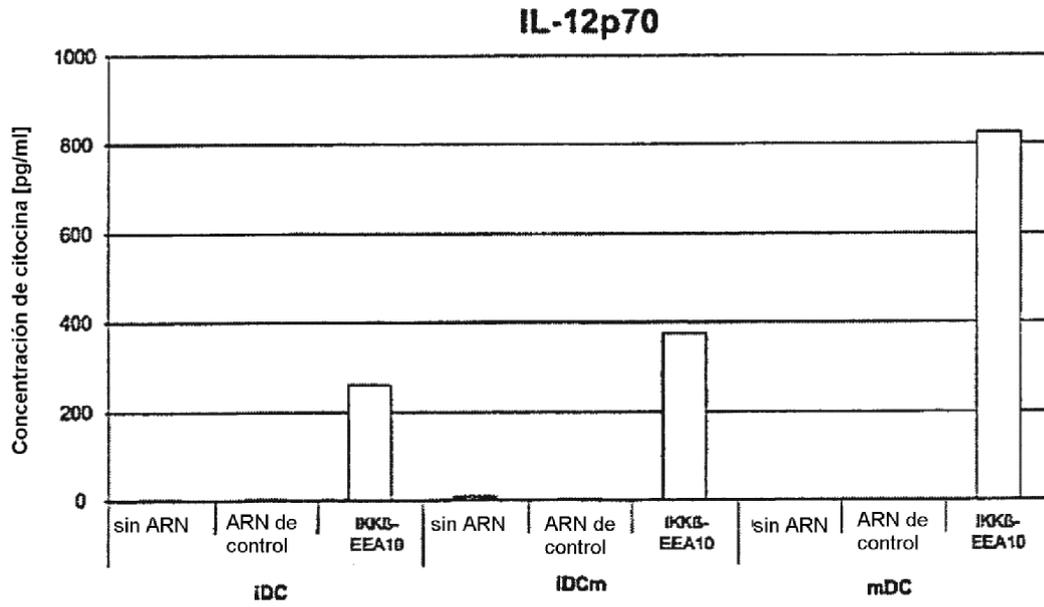


Figura 2a

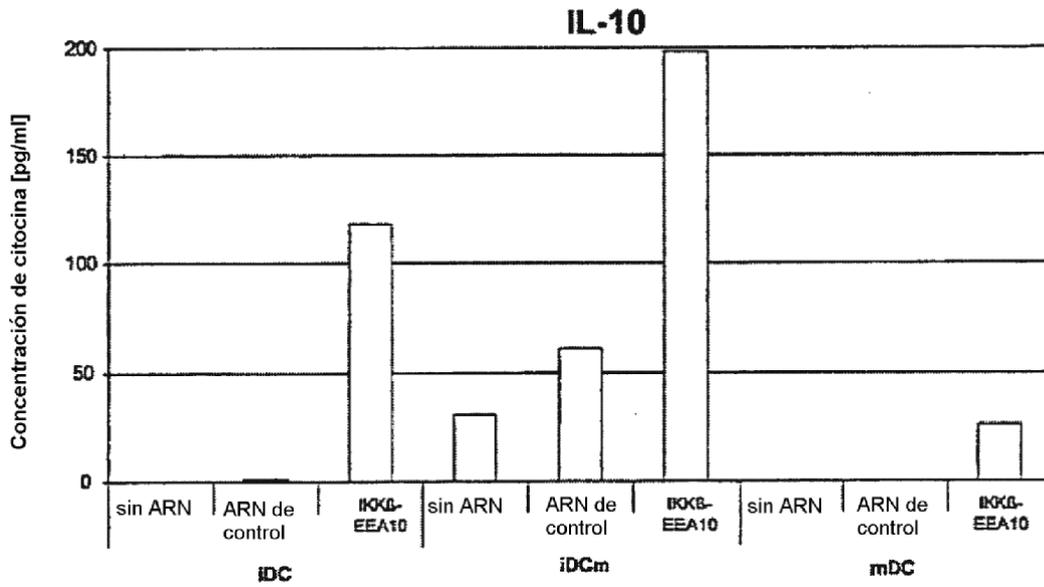


Figura 2b

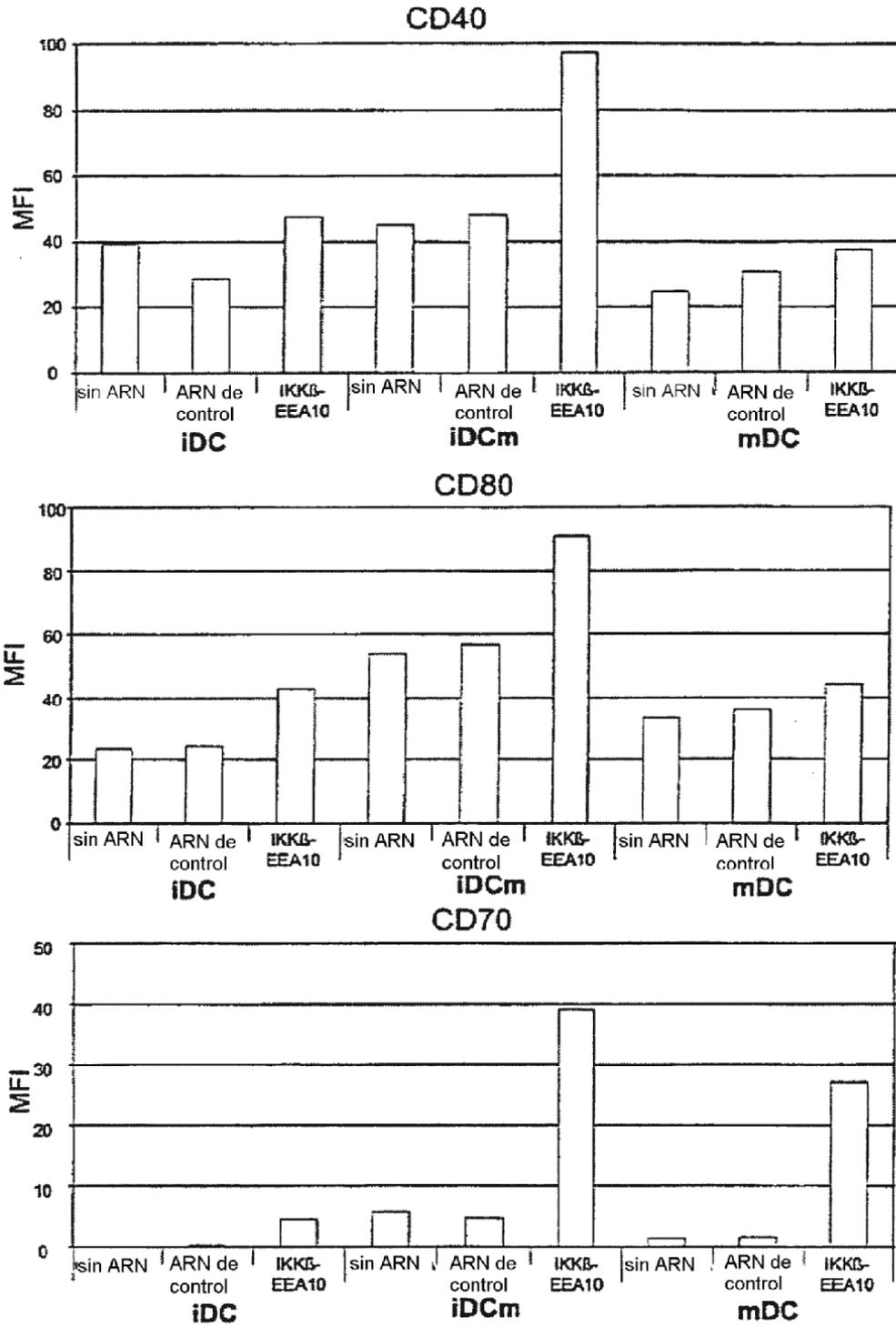


Figura 3

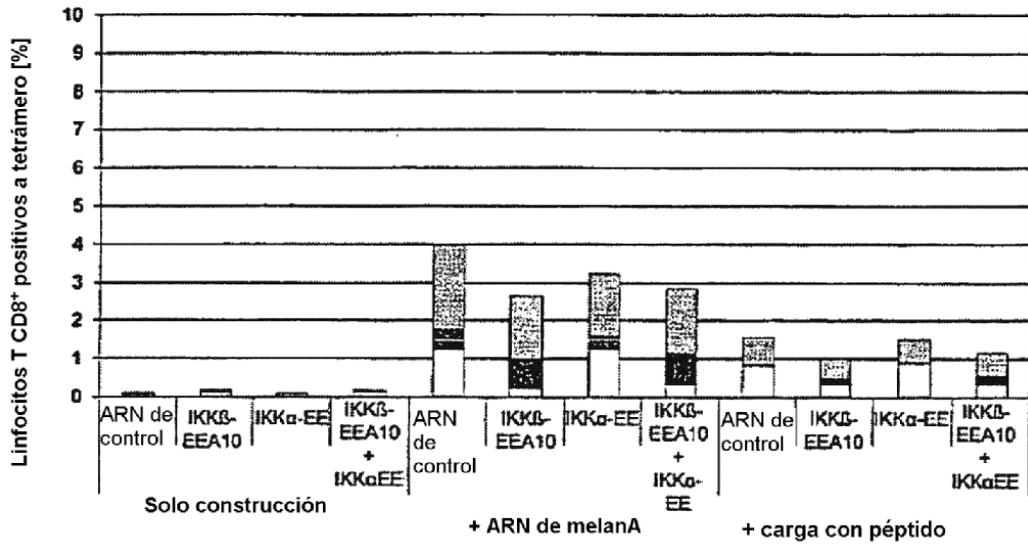


Figura 4a

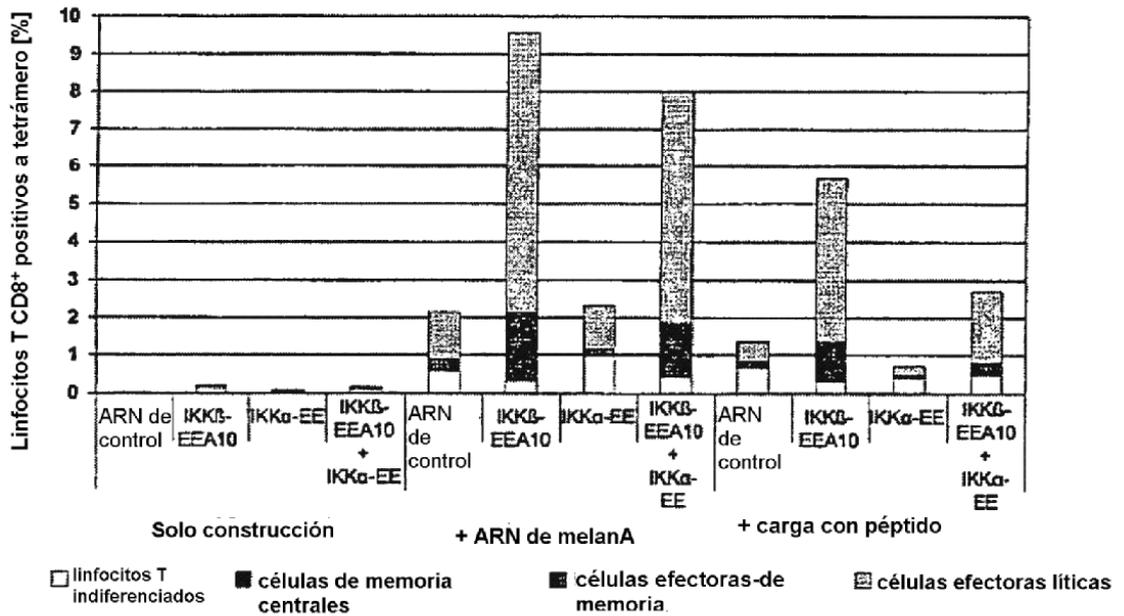


Figura 4b

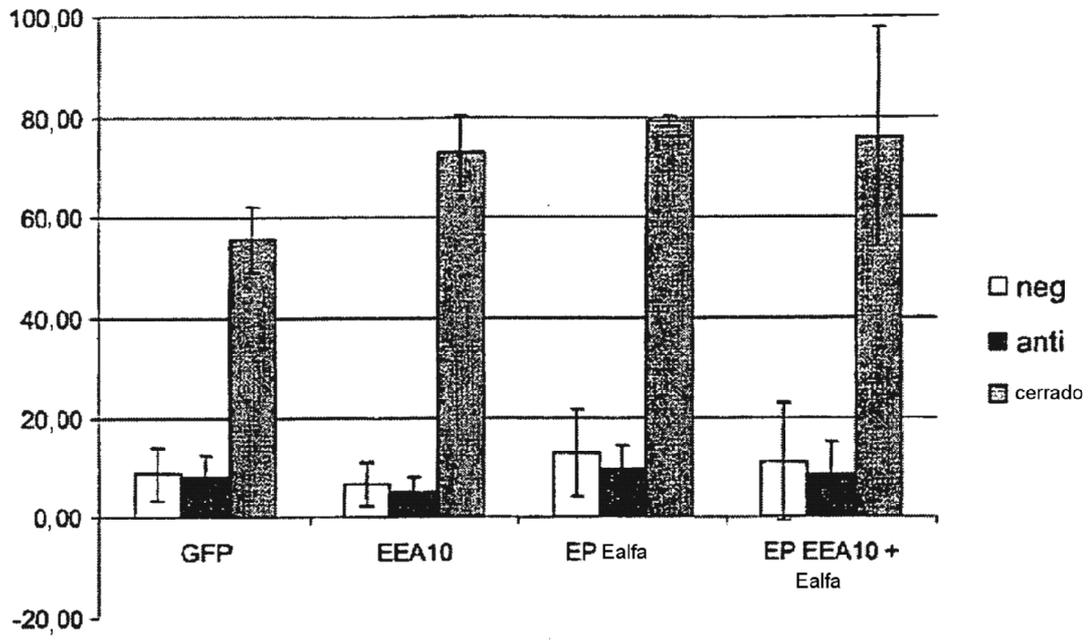
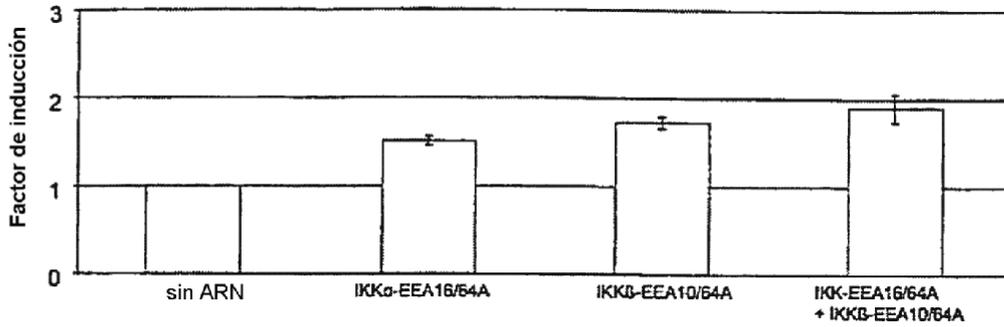


Figura 5

Figura 6

Factor de inducción de CD40



Factor de inducción de CD70

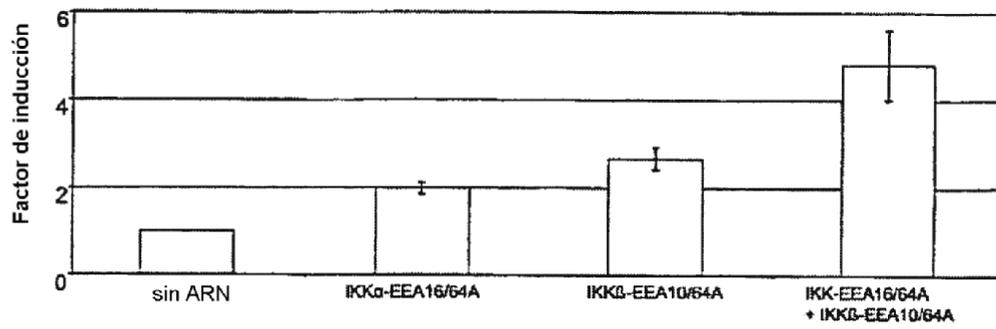
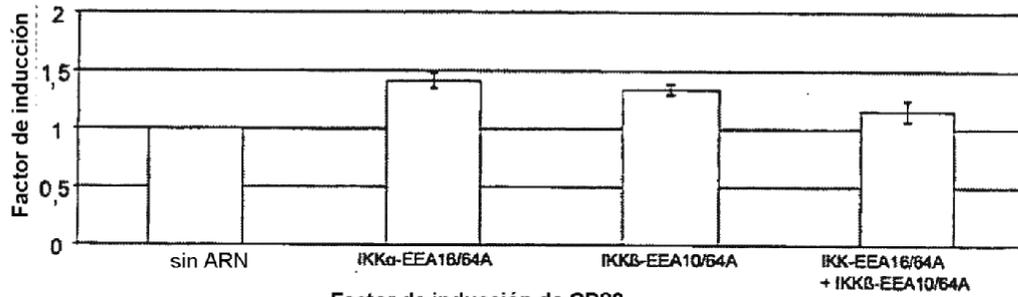


Figura 7

Factor de inducción de CD83



Factor de inducción de CD86

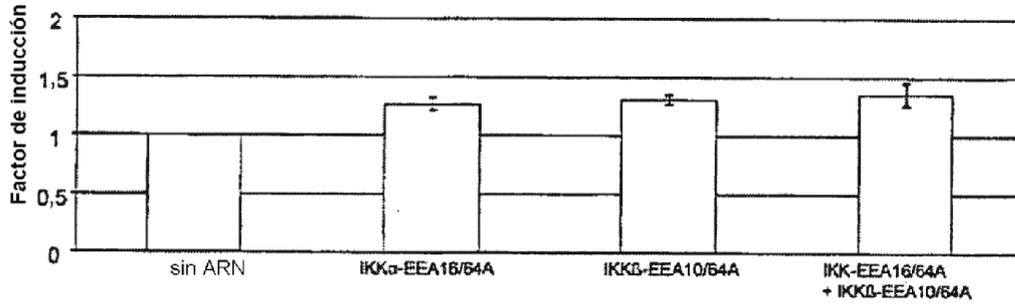


Figura 8

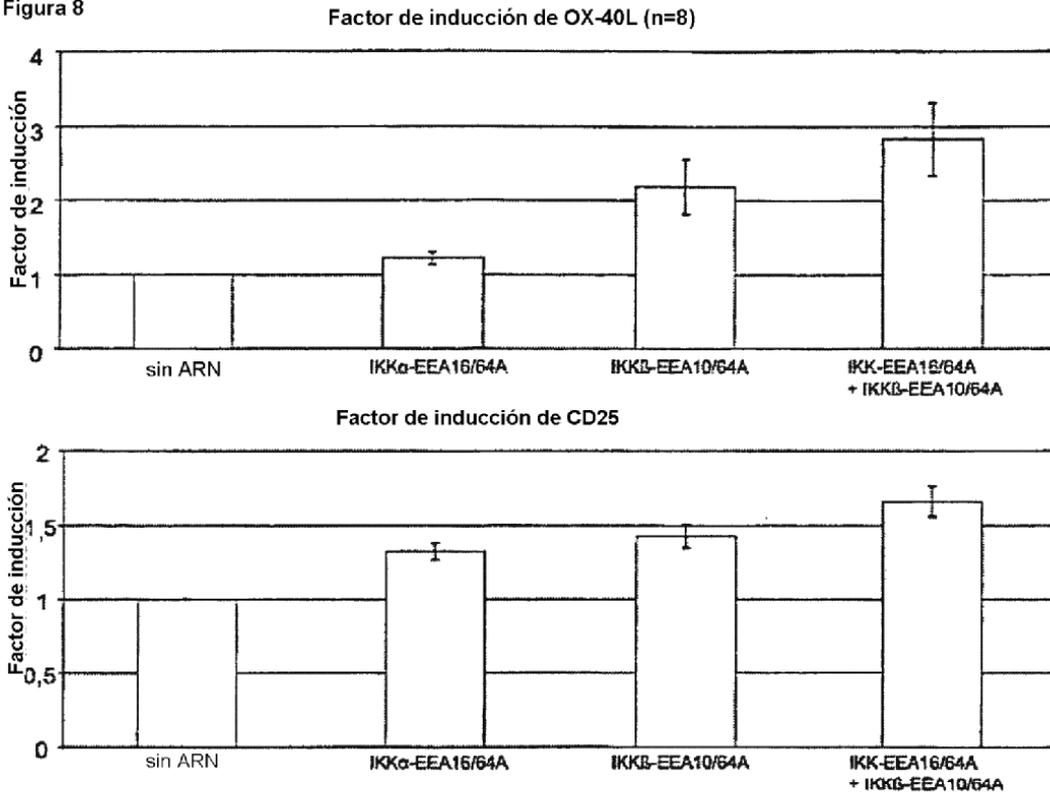
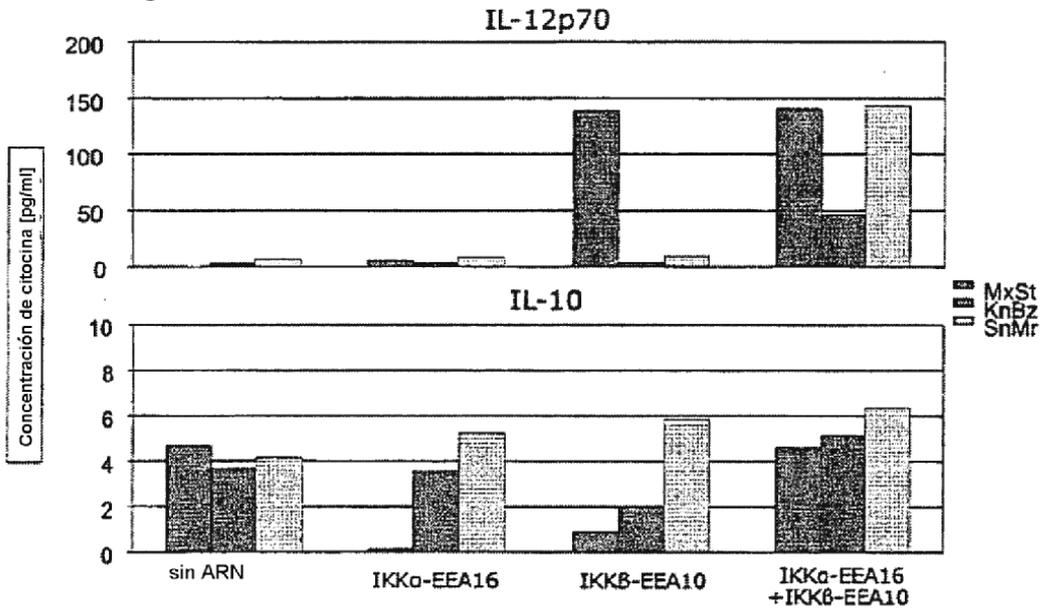
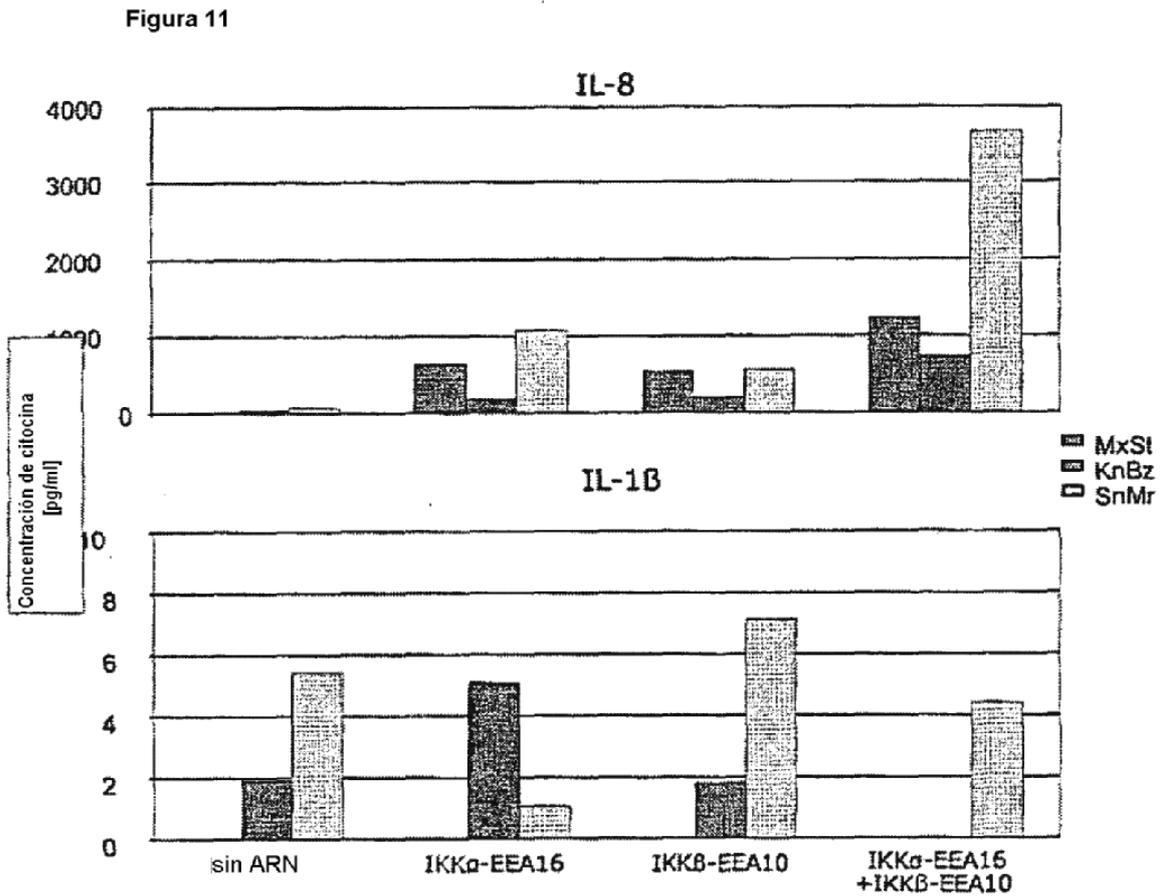
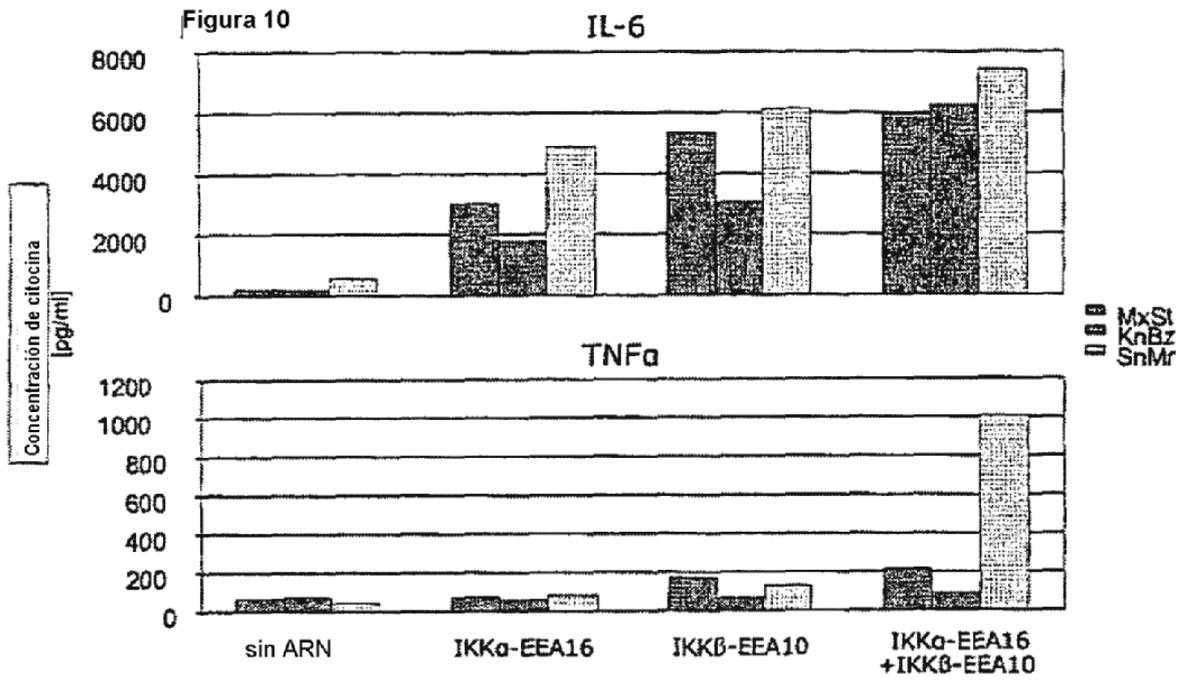


Figura 9





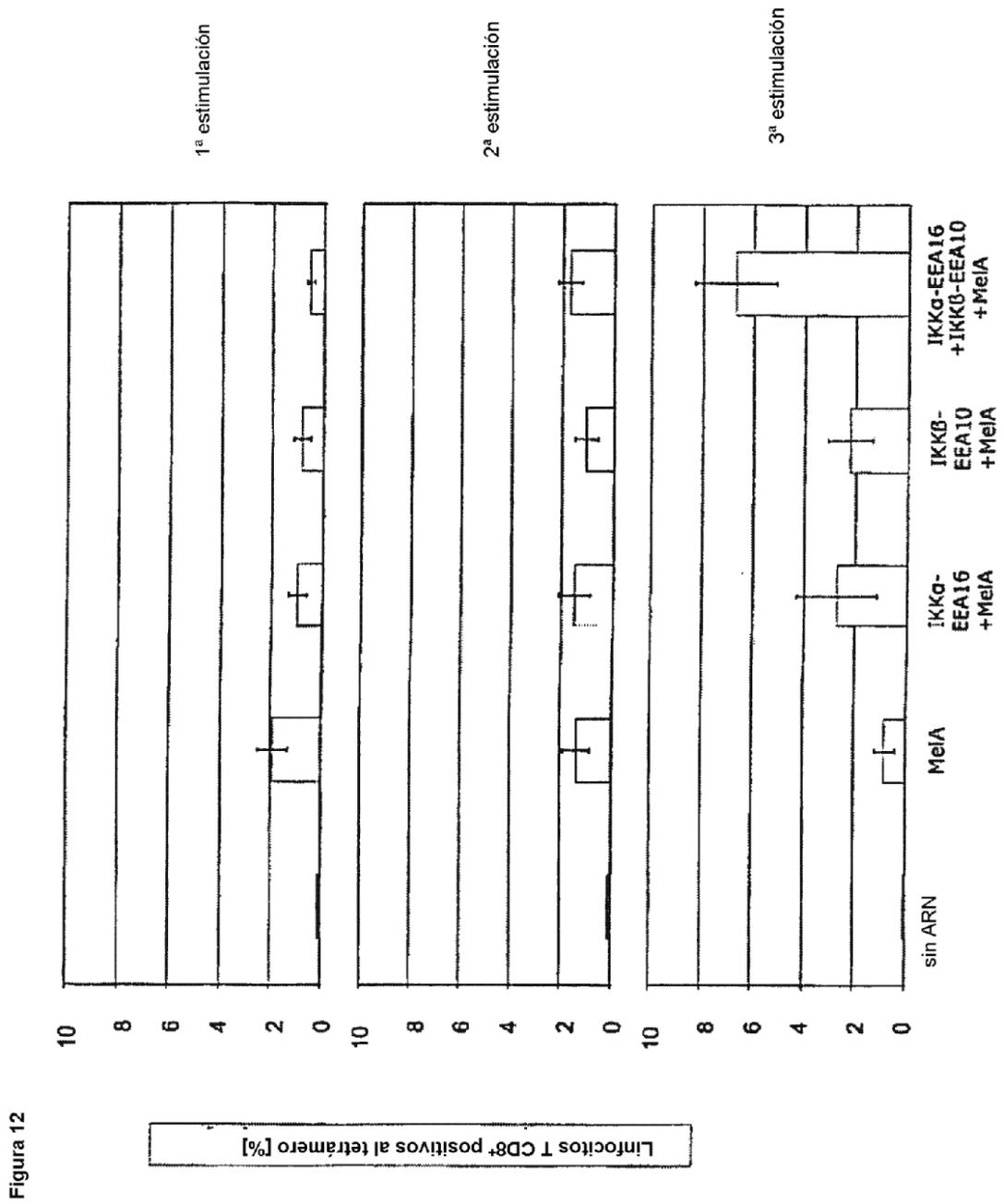
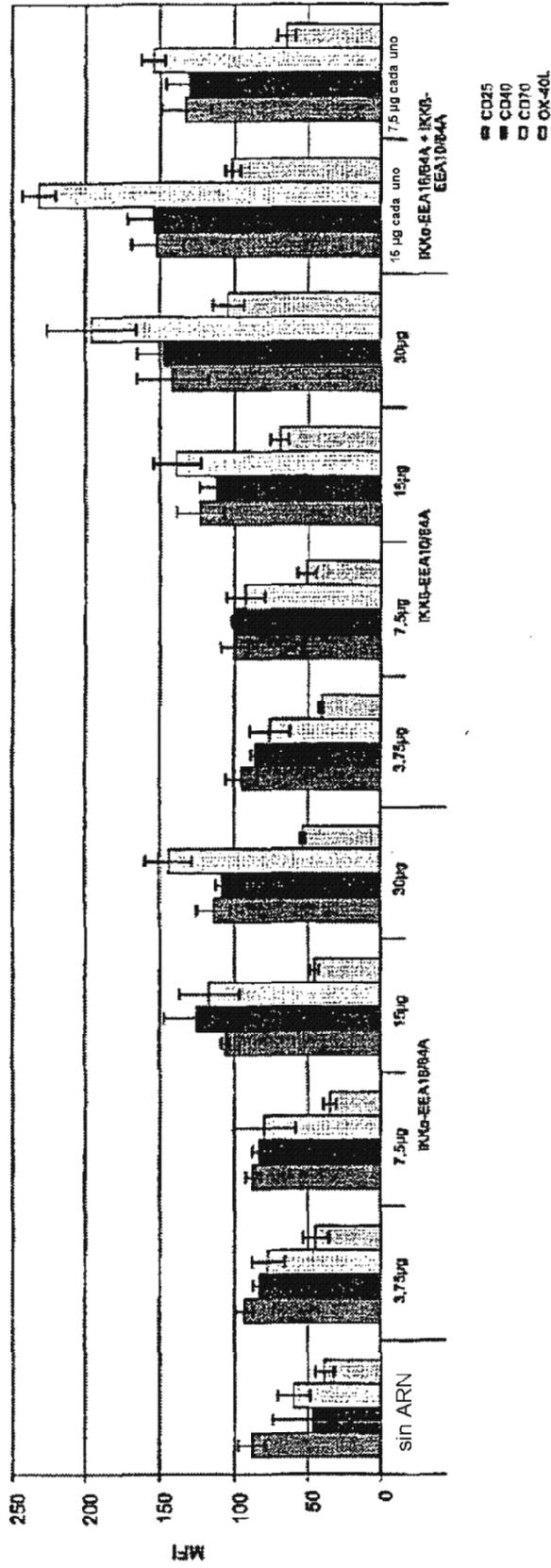


Figura 13  
MFI = dependencia de la dosis n=3; SEM



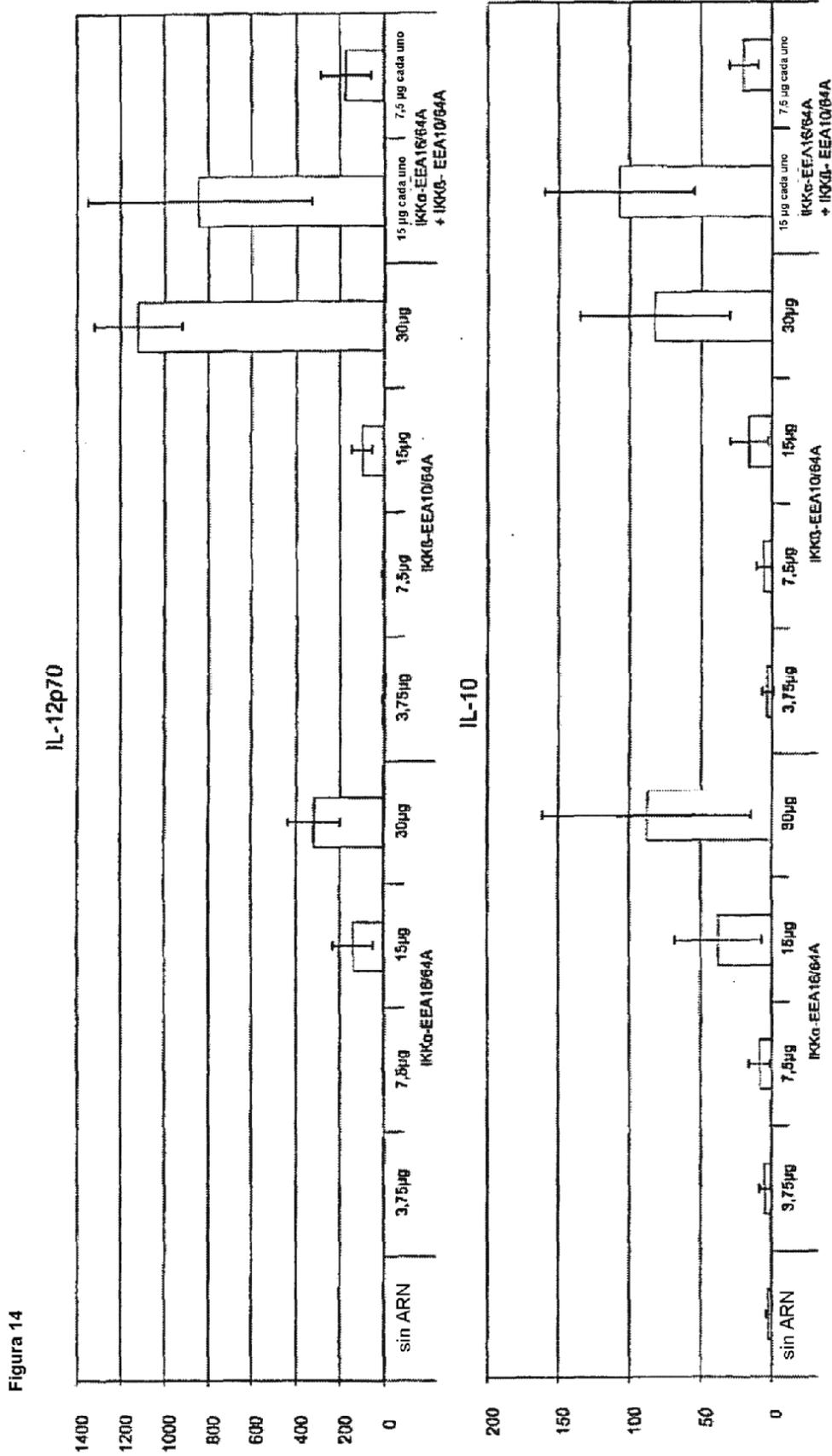
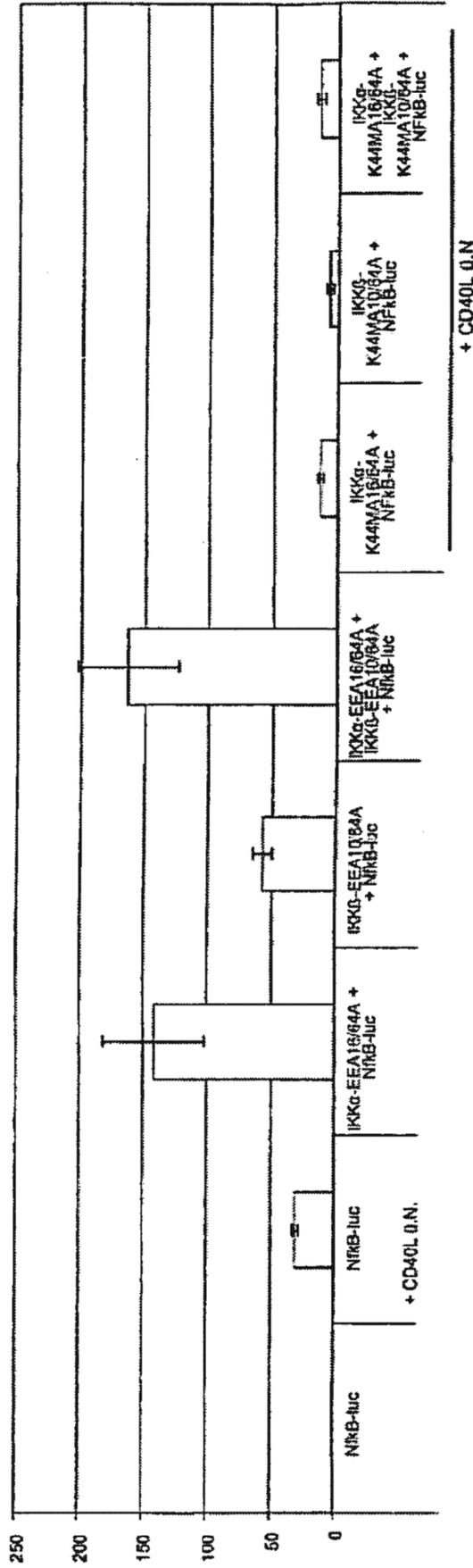


Figura 15  
Factor de inducción de NFκB-luciferasa en EP293T n=3



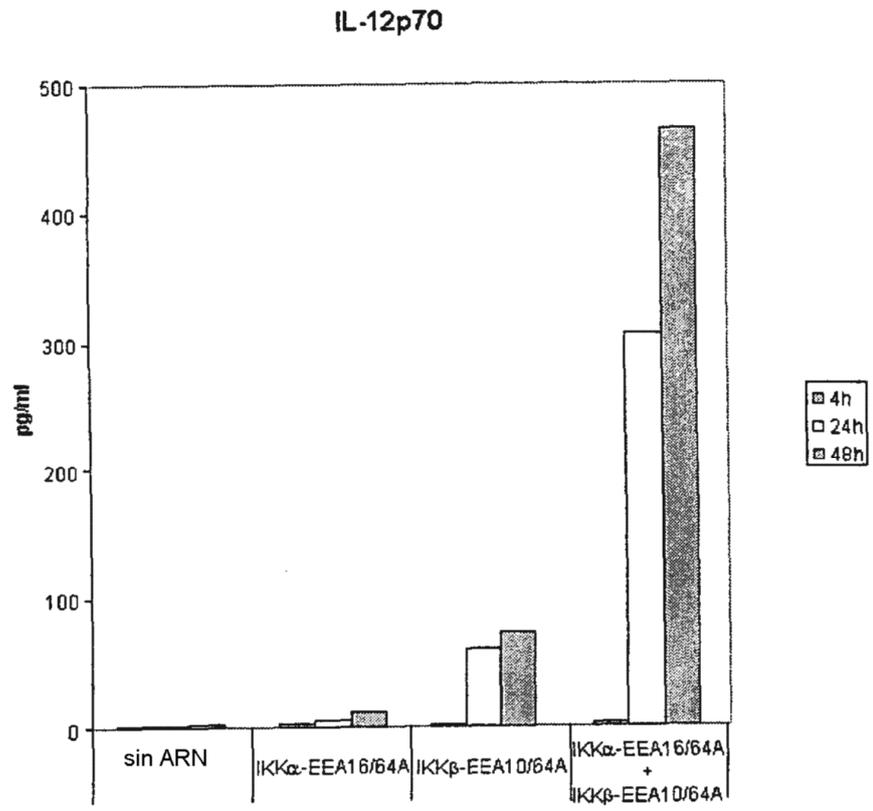


Figura 16

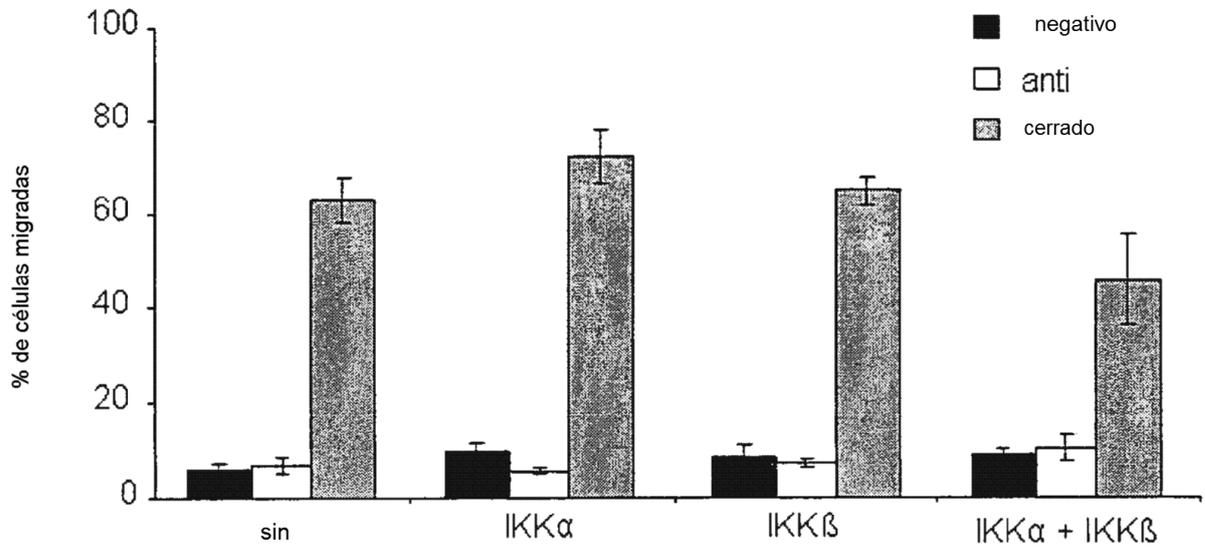


Figura 17