

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 557**

51 Int. Cl.:

A61K 47/66 (2007.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2008 PCT/EP2008/009758**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2009 WO09065561**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2008 E 08852540 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2200633**

54 Título: **Sistema para la liberación en una célula XCR1 positiva y usos del mismo**

30 Prioridad:

20.11.2007 EP 07022471
12.12.2007 US 13263

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.10.2018

73 Titular/es:

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND
LETZTVERTRETEN DURCH DAS ROBERT KOCH-
INSTITUT (100.0%)
Nordufer 20
13353 Berlin, DE

72 Inventor/es:

KROCZEK, RICHARD

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes

ES 2 684 557 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

Sistema para la liberación en una célula XCR1 positiva y usos del mismo

La presente invención se refiere al uso de un sistema de liberación adecuado para administrar una sustancia a una célula presentadora de antígenos profesional positiva para XCR1 *in vitro* y un medicamento que comprende el sistema de liberación o el uno o más ácido(s) nucleico(s) que codifican el sistema de liberación para su uso como una vacuna, como se define en las reivindicaciones. El sistema inmunitario protege al cuerpo contra patógenos y células tumorales mediante una variedad de mecanismos. Para funcionar apropiadamente, éste tiene que discriminar entre "propio" y "extraño" (patógenos/tumores). Detecta y combate una variedad de patógenos, que incluyen bacterias, virus, parásitos, hongos y toxinas. Los sistemas inmunitarios de vertebrados como los seres humanos consisten en muchos tipos de proteínas, células, tejidos y órganos, que interactúan en una red dinámica. Como parte de esta respuesta inmunitaria compleja, el sistema inmunitario de vertebrados se adapta con el tiempo para reconocer patógenos específicos con mayor eficiencia. El proceso de adaptación crea la memoria inmunológica y permite una protección más eficaz durante los futuros encuentros con estos patógenos. La vacunación se basa en este proceso de inmunidad adquirida.

Los trastornos en el sistema inmunitario pueden causar enfermedades. Las enfermedades de inmunodeficiencia ocurren cuando el sistema inmunitario es menos activo de lo normal, dando como resultado infecciones recurrentes y potencialmente mortales. A diferencia, las enfermedades autoinmunitarias resultan de un sistema inmunitario hiperactivo que ataca tejidos normales como si estos fueran organismos extraños. Las enfermedades autoinmunitarias comunes incluyen artritis reumatoide, diabetes mellitus tipo 1, esclerosis múltiple y lupus eritematoso.

Las células dendríticas (DC) forman parte del sistema inmunitario. Su principal función es procesar material antigénico y presentarlo sobre la superficie a otras células del sistema inmunitario, funcionando así como células presentadoras de antígeno.

Los linfocitos T cooperadores (también conocidas como linfocitos T efectores o linfocitos T_h) también son un miembro importante del sistema inmunitario en cuanto a que desempeñan una función fundamental en establecer y llevar al máximo las capacidades del sistema inmunitario. Los linfocitos T_h participan en la activación y dirección de otras células inmunitarias, y son particularmente importantes en el sistema inmunitario. Son esenciales en determinar el cambio de clase de anticuerpos de linfocitos B, en la activación y crecimiento de linfocitos T citotóxicos y en llevar al máximo la actividad bactericida de los fagocitos, tales como los macrófagos. Es esta diversidad en su función y su papel en influenciar otras células lo que le da a los linfocitos T cooperadores su nombre. Los linfocitos T cooperadores proliferadores que se desarrollan en los linfocitos T efectores se diferencian en dos subtipos principales de células conocidas como linfocitos T_{h1} y T_{h2} (también conocidos como linfocitos T cooperadores de tipo 1 y tipo 2, respectivamente), en los que los linfocitos T_{h2} promueven principalmente el sistema inmunitario humoral (estimulación de linfocitos B en proliferación, inducción del cambio de clase de anticuerpos de linfocitos B y aumento de la producción de anticuerpos), mientras que los linfocitos T_{h1} promueven principalmente el sistema inmunitario celular (llevan al máximo la eficacia aniquiladora de los macrófagos y la proliferación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos). Dependiendo de la naturaleza del patógeno invasor, el sistema inmunitario desarrolla una respuesta inmunitaria Th1 o Th2. En el caso de la respuesta inmunitaria Th1, los linfocitos T CD8⁺ muestran una fuerte tendencia para la diferenciación en linfocitos T citotóxicos. Al mismo tiempo, tanto los linfocitos T cooperadores CD8⁺ como CD4⁺ de la respuesta inmunitaria Th1 secretan grandes cantidades de IFN- γ (y otras citocinas/quimiocinas Th1) y provocan la generación de anticuerpos predominantemente del isotipo IgG2a e IgG2b en el ratón y predominantemente del isotipo IgG en el ser humano. La respuesta inmunitaria Th1 es particularmente eficaz para defender al cuerpo contra virus y bacterias (intracelulares). En el caso de la respuesta inmunitaria Th2, los linfocitos T cooperadores generan otro patrón de citocinas (IL-4, IL-5, IL-13 y otras). Este patrón de citocinas promueve, entre otras cosas, una respuesta IgG1/IgE por los linfocitos B y las células plasmáticas en el ratón y una respuesta IgE en el ser humano. Este tipo de respuesta es particularmente eficaz contra infecciones parasitarias.

Las vacunas y sistemas adyuvantes actualmente disponibles dirigidos contra componentes patógenos vivos, atenuados o inactivados provocan principalmente una respuesta inmunitaria de anticuerpos, pero no una respuesta citotóxica Th1 eficaz (Steinman et al., 2007, Nature 449, 419-26). Los anticuerpos inducidos se unen a los componentes del patógeno y así lo inactivan biológicamente ("anticuerpos neutralizantes"). Sin embargo, hay diversas enfermedades donde los anticuerpos neutralizantes no son suficientes para proteger de la enfermedad o para controlar la enfermedad y la actual tecnología de vacunas no es eficaz. Éstas son enfermedades que pueden requerir una respuesta inmunitaria Th1 eficaz para la contención y/o erradicación de la infección. Los ejemplos son tuberculosis, malaria, leishmania, enfermedades de priones, ortomixovirus y en particular gripe, hepatitis A, hepatitis B, virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y otros lentivirus, citomegalovirus, virus del herpes, virus del papiloma, bunyavirus, calicivirus, filovirus, flavivirus y en particular virus de la hepatitis C, virus del papiloma, paramixovirus, una variedad de virus respiratorios, y otros virus que necesitan para la contención y erradicación una respuesta inmunitaria Th1 eficaz, y en particular una respuesta Th1 citotóxica. El desarrollo de una metodología de vacunación que induzca dicha respuesta Th1 eficaz es, por tanto, altamente deseable. Además, se piensa que el desequilibrio Th1/Th2 hacia la predominancia de Th1 desempeña una función significativa en el desarrollo de las enfermedades autoinmunitarias tales como esclerosis múltiple o artritis reumatoide. Por tanto, la regulación de la respuesta Th1 es

una diana prometedoras en la prevención y el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Además, la elección de la respuesta Th1 y el mecanismo de "presentación cruzada" (véase más adelante) es de importancia primordial para la inducción de una respuesta inmunitaria Th1 contra patógenos virales, bacterianos, parasíticos y fúngicos, puesto que casi siempre las células dendríticas no se infectan directamente en el transcurso de una infección. Sin el desarrollo de una respuesta inmunitaria Th1, muchas infecciones virales, bacterianas, parasíticas o fúngicas no pueden ser contenidas ni erradicadas en el cuerpo humano. Además, en el trasplante de órganos también existe la necesidad de impedir que el sistema inmunitario Th1 del hospedador destruya el tejido trasplantado y de hacer al sistema inmunitario del receptor tolerante a los componentes celulares (antígenos) del donante.

Sorprendentemente, se ha encontrado que las células que desempeñan una función importante en la respuesta Th1 se pueden elegir selectivamente. Se encontró que el receptor de quimiocina (motivo C) 1 (XCR1) está presente sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos profesionales, particularmente células dendríticas (DC), que se puede usar con el fin de liberar selectivamente sustancias en estas células. La liberación dirigida de una sustancia a las DC portadoras de XCR1 permite por primera vez la inducción de una potente reacción inmunitaria Th1 en mamíferos/humanos. Las vacunas actuales se dirigen principalmente a la vía de presentación del antígeno Th2 y conducen principalmente a la generación de anticuerpos de tipo Th2 (neutralizantes) y reacciones inmunitarias. En particular, mediante la selección de DC portadoras de XCR1 se puede provocar una reacción inmunitaria humoral y celular (citotóxica) de tipo Th1 para un inmunógeno dado. Puede anticiparse que los linfocitos NK, linfocitos T CD8⁺ y los linfocitos T Th1CD4⁺ participan en esta reacción, pero otros linfocitos T CD4⁺ también pueden contribuir a este tipo de reacción. Por primera vez, un adyuvante, tanto solo como en combinación con un inmunógeno o cualquier compuesto farmacéutico, puede ser dirigido selectivamente a las células presentadoras de antígenos (APC) portadoras de XCR1.

Como se detalló anteriormente, el sistema inmunitario en desarrollo tiene que discriminar entre "propio" y "extraño", que ocurre principalmente en el timo, donde las células dendríticas (DC) inducen "tolerancia central" presentando antígenos propios a los timocitos en desarrollo. Tales antígenos propios son proteínas endógenas que se expresan por las DC, y antígenos específicos de tejido que se expresan ectópicamente por las células epiteliales tímicas. La capacidad de las DC tímicas para presentar antígenos exógenos sobre las moléculas de la clase II del MHC, y para hacer una "presentación cruzada" (véase más adelante) de éstas sobre las moléculas de la clase I del MHC, permite a las DC tímicas mediar en la selección negativa de tanto timocitos CD4⁺ como CD8⁺. Esta tarea puede ser asistida por las DC que entran en el timo desde los tejidos periféricos. A pesar de este proceso de selección tímica, los linfocitos T auto-reactivos pueden escapar de la selección tímica y entrar en la periferia, y éstos se deben mantener en comprobación por mecanismos de tolerancia periférica que se desencadenan principalmente por las DC en el bazo y otros tejidos linfáticos.

En la periferia, el sistema inmunitario tiene que discriminar entre antígenos extraños o antígenos propios inocuos por una parte y antígenos peligrosos (virales, bacterianos, fúngicos, parásitos, de tipo toxina) por otra parte. El antígeno es captado por las DC y se rompe en péptidos ("se procesa"). Los péptidos resultantes son "presentados" a los linfocitos T (células T) en el contexto de la clase I de MHC o la clase II de MHC. El subconjunto CD4⁺ de linfocitos T reconoce el antígeno en el contexto de la clase II de MHC, el subconjunto CD8⁺ de linfocitos T reconoce el antígeno en el contexto de la clase I de MHC. Simultáneamente con la captación del antígeno, las DC son capaces de detectar a través de una gran conjunto de receptores de reconocimiento de la "señal peligrosa" (por ejemplo, los receptores de tipo toll, receptores de tipo NOD), si el antígeno es de naturaleza peligrosa o si es inocuo. Los patrones reconocidos por los receptores de reconocimiento de la "señal peligrosa" (también denominados "receptores de reconocimiento del patrón") son normalmente estructuras moleculares que son únicas para los microorganismos. Éstos pueden ser componentes de la pared celular (por ejemplo, lipopolisacárido, peptidoglucano) o modificaciones de ácido nucleico (por ejemplo, motivos CpG no metilados) en el caso de microbios, o características estructurales y modificaciones que sean únicas para el ADN viral o el ARN viral (por ejemplo, ARN bicatenario). También células que mueren de apoptosis en las moléculas de liberación corporal que son capaces de activar los receptores de reconocimiento de la "señal peligrosa" (por ejemplo, proteínas de alta movilidad del grupo B1, proteínas de choque térmico).

En el caso de un antígeno (propio) inocuo, las DC no "maduran", en cambio permanecen en un estado "inmaduro". Cuando el antígeno se presenta a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ por las "APC inmaduras", los linfocitos T se activan y proliferan extensamente, pero mueren en días debido a una esperanza de vida limitada programada. Otros linfocitos T que reconocen antígeno (propio) inocuo se diferencian en "linfocitos T reguladores", que son capaces de suprimir una respuesta inmunitaria tras la exposición repetida al mismo antígeno usando una variedad de mecanismos (por ejemplo, TGF-β, CTLA-4, IL-10). Como resultado de la muerte de los linfocitos T y/o la respuesta reguladora T, el sistema inmunitario desarrolla "tolerancia periférica" (sin sensibilidad) a un antígeno (propio) inocuo dado. Los antígenos que inducen tolerancia son "tolerogénicos".

En el caso de un antígeno peligroso, las DC activan un programa de respuesta diferente ("maduración"). El antígeno se presenta a las células CD4⁺ y CD8⁺, que reciben simultáneamente desde las DC señales adicionales que indican la naturaleza peligrosa del antígeno. Como resultado, ambos subconjuntos de linfocitos T se vuelven activos, se expanden extensamente con una esperanza de vida prolongada y se desarrollan a "linfocitos T efectores". Éstos

pueden ser linfocitos T CD4⁺ que proporcionan "ayuda" a otras DC o linfocitos B o a otras células del sistema inmunitario, o incluso pueden ser células citotóxicas CD4⁺. Dentro del subconjunto de linfocitos T CD8⁺, otra vez se desarrollan linfocitos T cooperadores, pero una gran proporción de los linfocitos T CD8⁺ se vuelven células efectoras capaces de eliminar el patógeno invasor mediante la secreción de IFN- γ y otros factores solubles o mediante aniquilación de las células corporales infectadas. Como resultado de la ayuda de los linfocitos T a los linfocitos B, los linfocitos B específicos del antígeno se diferencian en células plasmáticas que secretan anticuerpos dirigidos al antígeno (patógeno). Estos anticuerpos ayudan a combatir el patógeno mediante diversos mecanismos (por ejemplo, neutralización, captación mejorada del antígeno, opsonización, fijación de complemento).

Un cierto número de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ efectores sobreviven la fase aguda de una respuesta inmunitaria a un patógeno y se vuelven "linfocitos T de memoria" de larga vida. Los linfocitos T de memoria y las células plasmáticas de larga vida, tras la re-exposición al mismo patógeno (antígeno), organizan una respuesta inmunitaria muy rápida que permite que el sistema inmunitario elimine el patógeno (antígeno) muy eficazmente. Esta capacidad mejorada de la respuesta inmunitaria de los linfocitos T y linfocitos B tras la re-exposición al mismo patógeno se denomina "inmunidad" y los antígenos que inducen inmunidad son "inmunogénicos".

Según los hallazgos anteriores con respecto a la presencia del receptor de quimiocina (motivo C) 1 (XCR1) sobre la superficie de células presentadoras de antígenos profesionales, particularmente células dendríticas, y su función en el sistema inmunitario, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un sistema de liberación adecuado para administrar una sustancia en una célula presentadora de antígenos profesional positiva para XCR1 *in vitro*, comprendiendo el sistema de liberación:

- i) una molécula que se une al receptor de quimiocina (motivo C) 1 (XCR1), en la que la molécula i) es un anticuerpo anti-XCR1 o un fragmento del mismo o es un ligando de quimiocina (motivo C) 1 (XCL1) o una variante funcionalmente activa de los mismos, y
- ii) una sustancia para ser liberada, siendo la sustancia un inmunogén, en el que la sustancia se une a la molécula covalentemente y en el que la variante funcionalmente activa de XCL1

- se diferencia de XCL1 de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 4 por como máximo 20 deleciones de aminoácidos o
- tiene al menos el 80% de identidad de secuencia con XLR1 de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 4 o
- es un fragmento funcionalmente activo de XCL1 que comprende o que consiste en la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 7 a 10.

El sistema de liberación es particularmente adecuados para influir en la respuesta Th1, y opcionalmente también la respuesta Th2, en el sistema inmunitario.

El XCR1 es un receptor de quimiocina y hasta la fecha es el único miembro de la subfamilia "C" de los receptores de quimiocina. También se conoce como GPR5 o CCXCR1. GPR5, previamente clonado como un receptor huérfano acoplado a la proteína G, se ha reconocido primero en el ser humano y luego en el ratón como un receptor monoespecífico para XCL1 (véase más adelante) y, por consiguiente, se denominó XCR1. La expresión de XCR1 en tejidos primarios se documentó en el timo, bazo, placenta, pulmón, ganglios linfáticos, amígdalas, lámina propia en enfermedad de Crohn y lesiones melanocíticas humanas por una variedad de métodos, sin proporcionar información sobre el (los) tipo(s) de células que expresan XCR1. Los análisis más específicos afirmaron la expresión de XCR1 en células CD8⁺ esplénicas y células NK1.1⁺CD3⁻, líneas de linfocitos NK y T, linfocitos T CD3⁺, linfocitos T, linfocitos B y neutrófilos, las líneas de linfocitos T de Jurkat, líneas de células de fibroblastos humanos, sinoviocitos de tipo fibroblasto primarios, sinoviocitos y células mononucleares en articulaciones inflamadas, linfocitos T CD8⁺ murinos y neutrófilos humanos, linfocitos B, linfocitos T, linfocitos NK y monocitos. Todos los informes más recientes sobre la expresión específica del tipo de célula de XCR1 utilizaron análisis de PCR de ARN total, y los cebadores que se usaron fueron específicos para el exón 2 de XCR1 solo y así no englobaron los límites exón-intrón. Ambas estrategias tienen tendencia a errores metodológicos (véase más adelante).

El ligando natural de XCR1 es XCL1, que también se conoce como ATAC, linfotactina o SCM-1. Es el único miembro de la familia C de quimiocinas. La citosina inducida por activación, derivada de linfocitos T y relacionada con quimiocina (ATAC) se clonó en ser humano (Müller et al., 1995, Eur. J. Immunol. 25, 1744-48), e independientemente como linfotactina (Kelner et al., 1994, Science 266, 1395-99) en el ratón y SCM-1 (Yoshida et al., 1995, FEBS Lett. 360, 155-9) en el ser humano. Según la nomenclatura de las quimiocinas, ATAC/linfotactina/SCM-1 se denominada ahora "XCL1". La quimiocina XCL1 es secretada principalmente por linfocitos T CD8⁺ activados, linfocitos T CD4⁺ Th1 y por células NK. En el ser humano se ha descrito una variante de XCL1 denominada XCL2 en la que los aminoácidos aspartato y lisina de la posición 28 y 29 de la proteína de longitud completa se intercambian por histidina y arginina, respectivamente (Yoshida et al., 1996, FEBS Lett. 395, 82-8), que también se pueden usar para la presente invención. Un método a modo de ejemplo para producir XCL1 en forma biológica activa se describe en el Ejemplo 8. Se pueden usar métodos análogos con el fin de producir otras formas biológicas activas de XCL1, por ejemplo, las de otras especies.

Originalmente se ha documentado que XCL1/linfotactina/ATAC induce (en el mejor de los casos) quimiotaxis débil en una variedad de poblaciones tímicas y esplénicas no bien definidas (Kelner et al., Science 266, 1395-99), pero estas observaciones no se pudieron reproducir por otros (Müller et al., Eur. J. Immunol. 25, 1744-8; Bleul et al.,

1996, J. Exp. Med. 184, 1101-9). Después, informes más específicos sobre un efecto quimiotáctico de XCL1 sobre linfocitos T (Kennedy et al. 1995, J. Immunol. 155, 203-9) no se pudieron reproducir por otros (Müller et al., Eur. J. Immunol. 25, 1744-8, Dorner et al., 1997, J. Biol. Chem. 272, 8817-23). La quimiotaxis inducida por XCL1 en células NK, en células NKT, en linfocitos B, neutrófilos y monocitos, en el mejor de los casos, sigue siendo polémica. La quimiotaxis en DC humanas derivadas de monocitos (Sozzani et al., 1997, J. Immunol. 159, 1993-2000, Lin et al., 1998, Eur. J. Immunol. 28, 41 14-4122) y una línea celular DC murina (Foti et al., 1999, Intern. Immunol. 11, 979-86) fue específicamente descartada. El documento US 6 153 182 desvela el uso de linfotactina como un adyuvante y su uso para potenciar la respuesta inmunitaria (reivindicaciones 1-6, col. 1,1. 55-62). Se desvela que la linfotactina se ha administrado conjuntamente con una vacuna (col. 2,1. 38-47; col. 3,1. 52-57; col. 4,1. 9-13). Basándose en el análisis detallado de la expresión de ATAC en el ratón, se pudo demostrar en el pasado que XCL1 (ATAC) se co-secreta en linfocitos T y células NK con IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES. Además de esta observación, la función biológica del sistema receptor XCL1-XCR1 quimiocina-quimiocina en el sistema inmunitario sigue siendo poco clara y polémico.

Se ha encontrado ahora que en ratones las DC positivas CD8⁺ parecen ser la única población de células presentadoras de antígeno que expresan XCR1 en el sistema linfoide (véase el Ejemplo 1). Para identificar la(s) población (poblaciones) que expresan ARNm para XCR1, los presentes inventores aislaron primero el ARN total de poblaciones de células esplénicas enteras y realizaron PCR cuantitativa (qPCR) después de la transcripción inversa del ARN a ADNc. En la siguiente etapa, los presentes inventores aislaron linfocitos B, linfocitos T, células NK, o granulocitos, macrófagos, obtuvieron ARN total y realizaron PCR cuantitativa. En todos los casos, los presentes inventores obtuvieron señales significativas. Sin embargo, los presentes inventores también obtuvieron señales cuantitativamente similares cuando no se hizo la transcripción inversa del ARN total a ADNc antes de ser sometido a qPCR. En ese momento, el segundo exón del gen de XCR1 murino se consideró el único exón existente y, por tanto, el sistema PCR de los presentes inventores (como fue el caso con todos los resultados de PCR publicados sobre la expresión de XCR1 en la bibliografía) utilizaron cebadores que englobaban solo este un exón. Un análisis meticuloso de los resultados experimentales de los presentes inventores sugirió que las señales PCR obtenidas con el ARN total podían ser señales positivas falsas resultantes del ADN genómico que normalmente contamina las preparaciones de ARN total. Para excluir la posibilidad de dicho error experimental, los presentes inventores aislaron en cambio ARNm en lugar de ARN total a partir de poblaciones esplénicas enteras, así como de linfocitos B, linfocitos T, células NK o granulocitos, como se describe más adelante. A diferencia de los resultados obtenidos con el ARN total, los presentes inventores todavía obtuvieron una señal qPCR (baja) para el mensajero de XCR1 con células del bazo totales, pero ninguna señal con linfocitos B, linfocitos T, células NK, granulocitos, o macrófagos aislados (Fig. 1 y Tabla 1). Después de que los experimentos posteriores indicaron que la señal de la señal de qPCR se asociaba con células esplénicas CD11c⁺, los presentes inventores purificaron altamente DC CD11c⁺CD8⁻ y CD11c⁺CD8⁺ esplénicas por citometría de flujo (pureza >95 %), obtuvieron ARNm de estas poblaciones y sometieron este ARNm a qPCR. Los datos obtenidos en este experimento demostraron claramente que casi toda la señal para el ARNm de XCR1 reside en la población de DC CD11c⁺CD8⁺ (Fig. 1), con solo una pequeña señal en DC CD11c⁺CD8⁻ (que lo más probablemente resulta de las DC CD11c⁺CD8⁺ contaminantes). Al mismo tiempo, cuando las células CD11c⁺ fueron agotadas de las células del bazo totales, la señal de la qPCR desapareció linealmente hasta el grado del agotamiento de las células CD11c⁺.

En conjunto, los resultados de los presentes inventores demostraron claramente que los informes en la bibliografía sobre la expresión de XCR1 en linfocitos T, linfocitos B, células NK, neutrófilos y monocitos (véase más adelante) fueron erróneos, puesto que se obtuvieron con una PCR de un solo exón realizada en ARN total (que contiene pequeñas cantidades de ADN genómico). Además, los datos de los presentes inventores demostraron claramente que el ARNm de XCR1 reside en DC CD11c⁺CD8⁺. Así, los presentes inventores pudieron identificar por primera vez una población de células dentro del sistema inmunitario, las DC CD11c⁺CD8⁺, que expresan específica y exclusivamente el ARNm de XCR1. Se puede asumir que pueden existir otras poblaciones de APC en otros órganos del cuerpo de mamífero/humano que expresen el receptor de XCR1. Estas APC pueden no expresar el marcador superficial de células CD8. Estas APC pueden ser identificadas fácilmente clasificando las células hasta alta pureza basándose en una variedad de marcadores de la superficie celular y sometiéndolas a qPCR para el XCR1 de mamífero/humano.

A nivel funcional, los inventores encontraron que XCL1 activa selectivamente las DC CD8⁺ pero no las DC CD8⁻. Las DC CD8⁺ y DC CD8⁻ se clasificaron por citometría de flujo a una alta pureza (>95 %). Éstas se expusieron entonces a 100 nM de XCL1 murino sintético y se midió la activación de las células DC como un aumento de los niveles de Ca²⁺ intracelular. Los resultados obtenidos (véase el Ejemplo 2) demostraron que solo las DC CD8⁺ (Fig. 2A), pero no las DC CD8⁻ (Fig. 2B), responden a la XCL1 murina con una señal de calcio y activación. Estos resultados indican la presencia de un receptor XCR1 funcional sobre la superficie de las DC CD8⁺. Además, los datos demuestran que las DC CD8⁺, o cualquier célula positiva para XCR1, puede ser activada mediante la exposición a XCL1. Estos resultados demuestran así que XCL1 se puede usar como adyuvante para las APC de mamífero/humano portadoras de XCR1 mejorando su estado de activación y sus capacidades de presentación de antígenos a las células NK o linfocitos T. Los resultados implican además que XCL1 se puede usar para liberar antígenos, adyuvantes, o cualquier otro compuesto exclusivamente a DC que expresen XCR1 a través de su unión específica a XCR1.

Además, los inventores fueron capaces de demostrar que XCL1 induce quimiotaxis en DC CD8⁺, pero no en células DC CD8⁻, linfocitos B, linfocitos T o células NK (véase el Ejemplo 3). Las células CD11c⁺ fueron altamente enriquecidas a partir de poblaciones de esplenocitos murinos por separación magnética. Cuando dicha población se aplicó a la cámara superior de un sistema de cámaras de migración Transwell, la población de DC consistió en aproximadamente 25 % de DC CD8⁺ y 70 % de DC CD8⁻, reflejando la frecuencia relativa natural de estas DC en el bazo murino. Sin la adición de una quimiocina, solo se pudo observar una migración de fondo inespecífica muy baja de las DC en el transcurso de 2 horas (Fig. 3). Tras la adición de XCL1 murino (1, 100, o 1000 ng/ml) en la cámara inferior, se pudo observar la migración celular desde la cámara superior a la cámara inferior en un modo que dependía de la dosis, con más de 30 % de las DC CD8⁺ de entrada migrando hacia la cámara inferior a 100 ng/ml de XCL1. Las únicas células que migraron a XCL1 fueron las DC CD8⁺, mientras que las DC CD8⁻ solo mostraron la misma migración de fondo inespecífica que sin una quimiocina.

Como se esperaba, la adición de la quimiocina CCL21 a la cámara inferior, usada como control positivo, demostró un efecto quimiotáctico sobre las DC CD8⁺ y CD8⁻. La adición de XCL1 a las cámaras superior e inferior del sistema Transwell no provocó ninguna trans migración, demostrando que XCL1 no solo es un agente inductor de la quimioquinesis, sino que es un quimioatrayente verdadero. Experimentos análogos realizados con células CD11c⁺ altamente enriquecidas de los ganglios linfáticos periféricos demostraron nuevamente que la quimiocina XCL1 es quimiotáctica solamente para DC CD8⁺, pero no para DC CD8⁻ (Fig. 4). Los experimentos análogos realizados con linfocitos B, linfocitos T o células NK altamente enriquecidos dejaron de demostrar alguna quimiotaxis específica para XCL1 (Fig. 5). Estos experimentos demostraron por primera vez que XCL1 es una quimiocina que actúa específicamente sobre las DC CD8⁺ que expresan XCR1, pero no en otras poblaciones de células DC. A partir de estos resultados se puede anticipar que XCL1 actúa como una quimiocina sobre las APC que expresan XCR1 de mamífero/humano. Los resultados demuestran que XCL1 se puede usar como un adyuvante para APC que expresan XCR1 mediante su acción quimioatrayente. Además, se pudo mostrar que XCL1 (ATAC) actúa como un adyuvante en la inducción de citotoxicidad de linfocitos T CD8⁺ (véase el Ejemplo 9). Los resultados implican además que XCL1 se puede usar para liberar antígenos, adyuvantes, o cualquier otro compuesto exclusivamente a DC que expresan XCR1 mediante su unión específica a XCR1.

Además, XCL1 facilita la captación celular en células dendríticas DC CD8⁺ (véase el Ejemplo 4). Se transfectó la línea celular pre-B murina 300-19 con un vector que codificaba ATAC murino, dando como resultado el transfectante que expresa ATAC "muATAC/300-9". Cuando ratones ATAC KO se inyectaron como 10x10⁶ células "wt/300-19" no mutantes marcadas con fluoresceína, pudo detectarse una señal de fluorescencia en aproximadamente el 10 % de las DC CD8⁺ esplénicas después de 12 h, mientras que no se observó señal en DC CD8⁻. Cuando se inyectó el mismo número de células muATAC/300-19 marcadas con fluoresceína, la señal recuperada 12 h después fue constante y significativamente más alta en DC CD8⁺, cuando se comparó con la inyección de wt/300-19 (Figs. 7 y 8). También en este caso, no se observó señal en DC CD8⁻. Estos resultados indican que DC CD8⁺ captan preferencialmente células alógenas. Además, los resultados demuestran que XCL1 mejora sustancialmente la captación de células alógenas en APC portadoras de XCR1. A partir de estos resultados se puede anticipar que XCL1 también facilita la captación de células singénicas de mamífero/humanas decoradas con XCL1 (es decir, que llevan moléculas de XCL1 sobre la superficie externa), ya sea vivas o muertas, específicamente en APC de mamífero/humana que expresa XCR1. A partir de estos resultados también puede anticiparse que XCL1 puede dirigir específicamente cualquier materia viva o muerta a APC portadora de XCR1, o al menos mejorar su captación en APC portadora de XCR1.

El concepto de la presente invención se pudo confirmar mostrando la utilización de XCL1 durante la inducción de tolerancia o inmunidad *in vivo* (véase el Ejemplo 5). Para determinar si el sistema de XCL1-XCR1 se utiliza *in vivo* durante la inducción de inmunidad o tolerancia, los presentes inventores usaron un sistema de transferencia adoptiva bien establecido, en el que linfocitos T CD4⁺ transgénicos DO11.10 se transfieren a ratones singénicos BALB/c. Estos linfocitos T transgénicos reconocen un péptido derivado de ovoalbúmina de pollo (OVA) como antígeno. Los ratones receptores fueron o bien expuestos por inyección de 100 µg de OVA en las almohadillas plantares (estímulo tolerogénico), por inyección de 100 µg de OVA + 10 µg de LPS en las almohadillas plantares (estímulo inmunogénico potente, puesto que LPS proporciona una "señal de peligro"), o por inyección de 2 mg de OVA por vía intravenosa (estímulo inmunogénico potente). En este sistema, los linfocitos T transgénicos DO11.10 reconocen el antígeno, se activan y se expanden. En condiciones tolerogénicas, los linfocitos T transgénicos tienen una esperanza de vida limitada y mueren, mientras que en condiciones inmunogénicas los linfocitos T transgénicos desarrollan un grado significativo en linfocitos T de memoria. Cuando los linfocitos T transgénicos inyectados se recuperaron del drenaje de tejido linfático de los ratones receptores después de 14, 24 y 48 h, y se sometieron a análisis de expresión para ARNm de XCL1 murino, fue evidente que en todas las circunstancias la expresión de XCL1 fue muy fuerte y se reguló similarmente por incremento (aprox. por un factor de 30) tras la inyección de OVA (Tabla 2). Estos datos demostraron que XCL1 puede ser altamente expresado en linfocitos T CD4⁺. Mostraron además que el eje funcional XCL1-XCR1 se utiliza tanto en condiciones fuertemente inmunogénicas así como en condiciones fuertemente tolerogénicas. Estos datos implican que el direccionamiento de un antígeno a APC portadora de XCR1 por medio de XCL1 es una forma racional de ya sea inducir la fuerte inmunidad (cuando se dirige el antígeno junto con un adyuvante/"señal de peligro") o inducir la fuerte tolerancia (cuando se dirige el antígeno sin un adyuvante) en el hospedador mamífero/humano.

En un experimento adicional, los inventores fueron capaces de mostrar el reconocimiento mejorado mediado por XCL1 del antígeno por linfocitos T CD8⁺ que interactúan con DC CD8⁺ *in vivo* (véase el Ejemplo 6). Con el fin de probar los efectos de adyuvantes de XCL1 *in vivo*, los presentes inventores retrocruzaron ratones C57BL/6 ATAC-KO con ratones transgénicos OT-I, que produjeron ratones OT-I ATAC-KO. Los linfocitos T CD8⁺ transgénicos de OT-I reconocen el péptido de OVA SIINFEKL (SEQ ID NO: 15) como antígeno. Los linfocitos T transgénicos de OT-I u OT-I ATAC-KO se transfirieron adoptivamente a animales CD57BL/6 ATAC-KO singénicos. Veinticuatro horas después se inmunizaron todos los ratones receptores por inyección intravenosa de OVA acoplada a un anticuerpo anti-DEC-205 ("DEC-205-OVA"). En las condiciones elegidas, el antígeno es preferencialmente captado por DC CD8⁺ en el bazo y preferencialmente se presenta de forma cruzada a linfocitos T CD8⁺. Algunos ratones recibieron junto con DEC-205-OVA una inyección de un anticuerpo anti-CD40, que proporciona una "señal de peligro" a DC. Tres días después de la inyección del antígeno, se determinó la frecuencia de linfocitos T transgénicos en el bazo (Fig. 9). Tanto en condiciones tolerogénicas (inmunización con DEC-205-OVA sin una "señal de peligro"), así como en condiciones inmunogénicas (inmunización con DEC-205-OVA junto con una "señal de peligro" mediada por CD40), la capacidad de linfocitos T de OT-I para secretar XCL1/ATAC aumentó muy significativamente el número de linfocitos T transgénicos 3 días después de la exposición al antígeno (Fig. 9). Además, la capacidad de linfocitos T de OT-I para secretar XCL1/ATAC aumentó muy significativamente la capacidad de linfocitos T de OT-I para generar la citocina IFN- γ (Fig. 10). Tanto el aumento en el número de células, así como el aumento en la producción de IFN- γ en presencia de XCL1, puede ser tomado como evidencia de la capacidad de XCL1 para mejorar la interacción de DC CD8⁺ con linfocitos T CD8⁺ tras el reconocimiento del antígeno. Estos datos demuestran que el eje XCL1/XCR1 se utiliza por el sistema inmunitario para la inducción de tolerancia o para la inducción de inmunidad. Además, estos datos implican que el direccionamiento de un antígeno a APC portadora de XCR1 por medio de XCL1 es una forma racional de ya sea inducir la fuerte inmunidad (cuando se dirige el antígeno junto con un adyuvante/"señal de peligro") o inducir la fuerte tolerancia (cuando se dirige el antígeno sin un adyuvante) en el hospedador de mamífero/humano. En dichas condiciones terapéuticas, el antígeno se administraría usando XCL1 o un sistema de vector análogo para administrar el antígeno o antígeno + "señal de peligro" directamente a la APC de mamífero/humana portadora de XCR1.

Además, los inventores fueron capaces de generar un anticuerpo monoclonal específico para el receptor XCR1 humano (véase el Ejemplo 7). Para esto, se inmunizaron ratones BALB/c con un péptido que representa los primeros 31 aminoácidos del extremo N de hXCR1 (hATACR), y las células esplénicas se fusionaron con la línea de mieloma P3X63Ag8.653. Los hibridomas obtenidos se cribaron para anticuerpos secretores que reconocen específicamente el péptido inmunizante en un ensayo de ELISA. Se eligió para estudios adicionales un anticuerpo tal, 6F8, que dio un patrón de reacción específico en el ELISA. Se probó la especificidad del anticuerpo por inmunoprecipitación de XCR1 de 3 líneas celulares independientes, que se transfectaron con la región codificante completa de XCR1 humano. El anticuerpo monoclonal 6F8 inmunoprecipitó el receptor XCR1 humano nativo de los 3 transfectantes, pero no reaccionó con las líneas no mutantes respectivas (Fig. 11). Estos experimentos determinaron que los presentes inventores han generado un anticuerpo monoclonal específico para XCR1 humano.

Finalmente, los inventores fueron capaces de mostrar que ATAC actúa de adyuvante en la inducción de citotoxicidad de linfocitos T CD8⁺ (véase Ejemplo 9).

Según la presente invención y las reivindicaciones, la sustancia a ser liberada (sustancia ii) es un inmunogén.

En el presente documento también se describen sistemas de liberación en los que la sustancia ii) es cualquier sustancia adecuada. Por ejemplo, la sustancia puede ser una proteína, (poli)péptido o molécula pequeña. Puede ser una sustancia que existe de forma natural o parte de la misma o puede ser un compuesto sintético. Particularmente se prefieren sustancias que tienen un efecto sobre el sistema inmunitario.

Se describe que se puede modificar la función de presentación cruzada de APC que expresa XCR1. Esta modificación podría dar como resultado la activación, supresión, o cualquier otra modificación del metabolismo de la APC portadora de XCR1 (por ejemplo, que conduce a maduración o prevención de la maduración de la APC). Esto podría ser deseable en todas las condiciones que requirieran defensa contra una señal extraña o autoinmunitaria, y en otras condiciones, tales como enfermedad de Alzheimer. En dicho caso, la sustancia modificadora ii) sería dirigida a la APC portadora de XCR1 usando un agente de direccionamiento. El compuesto farmacéutico dirigido podría ser un compuesto químico, un fármaco, una proteína o péptido, un lípido, un hidrato de carbono, ADN o ARN natural o modificado (estabilizado), ARNip, ácido nucleico antisentido, ADN dúplex, ADN monocatenaria, ARN en cualquier forma, que incluye ARN tríplice, dúplex o monocatenario, ARN antisentido, polinucleótido, oligonucleótido, nucleótido individual o derivado del mismo (véase también más adelante). El compuesto dirigido podría ser un sistema de vector de expresión o un virus manipulado que codifica una proteína o péptido con propiedades moduladoras, como se ha descrito anteriormente. Podrían ser deseable que la proteína codificada o péptido se expresara específicamente bajo el control de un promotor de XCR1 para garantizar la expresión específica en APC portadora de XCR1.

Se describe además que se puede delecionar específicamente APC que expresa XCR1. Esto se puede lograr dirigiendo un compuesto a APC portadora de XCR1, que induce directa o indirectamente la muerte celular en la APC

portadora de XCR1. Esto podría ser deseable en todas las condiciones que incluyen alergia, autoinmunidad y trasplante. Ejemplos de tales compuestos son agentes citotóxicos (por ejemplo, metotrexato), toxinas (toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas*), agentes inductores de apoptosis (por ejemplo, caspasas), agentes de inactivación del ribosoma (por ejemplo, ricina, saponina, toxina Shiga), inhibidores de ADN o ARN (agentes que escinden ARN o ADN), o inhibidores de la síntesis de proteínas (ADN antisentido, ARN antisentido, ARNip), y otros inhibidores del metabolismo celular (véase también más adelante). El agente inductor de células proteináceas se puede liberar directamente a la APC portadora de XCR1 o por medio de un sistema de vector de expresión basado en ácido nucleico o un virus manipulado, utilizando ambos preferentemente el promotor de XCR1 para controlar la expresión de la proteína deseada.

También se describe que se puede modificar la función de células que interactúan con APC portadora de XCR1. Esto se podría lograr mediante una expresión de un péptido o proteína secretado (por ejemplo, citocina, quimiocina, factor de crecimiento u hormona), o mediante la expresión de un receptor o ligando sobre la superficie de APC portadora de XCR1 (por ejemplo, CD95L, ICOS-L, CD86, u otra). Para este fin, ADN o ARN, o un sistema de vector de expresión que codifica un péptido o proteína tal, o un virus manipulado para expresar dicho péptido o proteína, se dirigiría a la APC portadora de XCR1. Preferentemente, el sistema de expresión elegido se accionaría por un promotor de XCR1 para garantizar una expresión específica en APC portadora de XCR1. El péptido o proteína contendría un péptido señal para permitir su expresión como proteína soluble o transmembranaria, después de la internalización del ácido nucleico o virus en la APC portadora de XCR1. La proteína soluble codificada o péptido o receptor de la superficie celular o ligando se diseñaría como para interactuar con una molécula componente sobre la superficie de células inmunitarias que interactúan con APC portadora de XCR1, tales como células CD4⁺ Th1, linfocitos T CD8⁺, células NK, u otras. De esta forma, se podrían activar estas células de interacción, suprimir en su activación, o incluso eliminar (por ejemplo, mediante la inducción de apoptosis).

Además, se describe que el sistema de liberación se podría usar con el fin de detectar APC portadora de XCR1 para fines de diagnóstico. Para esto, la sustancia puede ser cualquier compuesto detectable tal como un marcador que incluye, por ejemplo, un cromóforo, un radioligando, etc.

Además, se describe que la sustancia se podría modificar con el fin de permitir el aislamiento de APC portadora de XCR1, por ejemplo para análisis médicos adicionales o manipulación *in vitro* (por ejemplo, carga con un compuesto farmacéutico). Para esto, la sustancia puede englobar una marca (fluorescente). Tales marcas incluyen marcas (His, FLAG, STREP o c-myc) o componentes del sistema biotina-avidina o el sistema digoxigenina-anti-digoxigenina, que permiten la separación por partículas magnéticas, separación de flujo, etc.

Como se detalló anteriormente, en la presente invención la sustancia ii) es un inmunogén.

Un inmunogén es un antígeno que estimula una respuesta inmunitaria. Los antígenos son sustancias reconocidas por receptores específicos sobre linfocitos T (receptor de linfocitos T) y linfocitos B (receptor de linfocitos B) dentro del sistema inmunitario y son normalmente proteínas o polisacáridos. Éste incluye partes (cubiertas, cápsulas, paredes celulares, flagelos, fimbrias y toxinas) de bacterias, virus y otros microorganismos. En general, los lípidos y ácidos nucleicos son antigénicos solo cuando se combinan con proteínas y polisacáridos. Los antígenos (no propios) exógenos no microbianos pueden incluir polen, clara de huevo y proteínas de tejidos y órganos trasplantados o sobre la superficie de glóbulos sanguíneos transfundidos.

Los antígenos se pueden clasificar como endógenos u exógenos. Los antígenos endógenos son proteínas sintetizadas por la propia célula presentadora de antígenos (APC) ("proteínas propias") o pueden ser componentes de patógenos virales, bacterianos, fúngicos o parasitarios, que han infectado/invadido el APC. Los antígenos endógenos se presentan en el contexto de la clase I y II de MHC. Los antígenos exógenos están siendo captados por pinocitosis, fagocitosis o endocitosis mediada por receptor. Los antígenos internalizados se vuelven así fácilmente accesibles a proteasas endosómicas y así se pueden presentar por moléculas de la clase II de MHC.

Además, algunas células pueden presentar antígenos exógenos mediante las moléculas de clase I de MHC, un proceso conocido como "presentación cruzada". Esta vía es de particular relevancia en DC debido a que son la principal población de células que puede presentar de forma cruzada antígenos *in vivo*, y esto les permite desempeñar una función central en la inducción de tolerancia y en inmunidad antiviral, antibacteriana, antifúngica y antiparasitaria. Dentro de DC linfoides de ratón, las DC CD8⁺ son las DC más eficientes en fagocitar células muertas y, por consiguiente, en la presentación de clase II de MHC y presentación cruzada de clase I de MHC de antígenos celulares exógenos. Las DC CD8⁺ de ratón también son las más eficientes en la presentación cruzada del subconjunto de DC para antígenos solubles exógenos, o antígenos capturados por receptores de lectina de tipo C. Se debe observar que la expresión de las moléculas CD8 no es un requisito previo para la presentación cruzada. Se puede anticipar que tanto en los sistemas humanos como de ratón que se presentan eficazmente de forma cruzada, existen DC portadoras de XCR1, que no llevan el marcador de CD8.

La mayoría de los antígenos solubles captados por DC del espacio extracelular se presentan en el contexto de la clase II de MHC y así inducen un patrón CD4/Th2 de respuesta inmunitaria (generación de ayuda de linfocitos T Th2

CD4, secreción de citocinas Th2, generación de anticuerpos patrón de Th2, pero poca respuesta citotóxica). Los antígenos intracelulares (incluyendo componentes de bacterias, hongos, virus y parásitos que han infectado las DC) se presentan después del procesamiento en el contexto de clase I de MHC y clase II de MHC, y así provocan una respuesta Th1/Th2 mixta. El antígeno presentado de forma cruzada se presenta en el contexto de clase I de MHC y provoca predominantemente una respuesta Th1 (generación de ayuda de linfocitos T Th1 CD4, producción de anticuerpos patrón de Th1, secreción de IFN- γ y otras citocinas Th1, desarrollo de citotoxicidad de linfocitos T).

El antígeno se presenta por DC, células que son altamente especializadas en la captación, procesamiento y presentación de antígeno. Existen varios subtipos de DC. Las principales poblaciones en el ratón son las DC plasmacitoides, DC CD11c⁺CD8⁻ (en resumen: "DC CD8⁻", algunas veces también denominadas CD4⁺DC), DC CD11c⁺CD8⁺ (en resumen: "DC CD8⁺"), las células de Langerhans, DC doble negativo (DN) y las DC intersticiales. La función de las DC plasmacitoides en la presentación de antígenos y el cebado de linfocitos T no es clara, como de hecho es su clasificación como DC. Existen DC resistentes a órganos linfoides (DC CD8⁻, DC CD8⁺ y DC DN) y DC migratorias (DC intersticiales y células de Langerhans) (Villadangos et al., 2007, Nat. Rev. Immunol. 7, 543-55). Todas estas DC expresan la molécula CD11c de la superficie celular. Las DC CD11c⁺CD8⁻ representan aproximadamente el 1,6 % y las DC CD11c⁺CD8⁺ el 0,4% de las células esplénicas nucleadas totales.

La presentación cruzada de antígeno también es de central importancia para la erradicación de tumores en el cuerpo. Las células tumorales y los antígenos de tumor tienen que ser captados, procesados y presentados por DC para provocar una respuesta inmunitaria antitumoral. Puesto que la eliminación de la mayoría de los tumores requiere una respuesta de linfocitos T Th1 citotóxicos eficaz, la presentación cruzada de antígenos de tumor es esencial. Así, para una respuesta antitumoral eficaz, la presentación cruzada de DC desempeña una función preeminente.

Cuando se trasplantan células u órganos extraños en receptores humanos, se recogen algunas células o componentes celulares, se procesan y se presentan por las DC del hospedador al sistema inmunitario del hospedador. Se puede esperar que la presentación de estos antígenos extraños ocurra a través de la vía de presentación cruzada y se sabe que provoca una fuerte respuesta inmunitaria Th1 contra el tejido extraño. Sin una intervención terapéutica, el sistema inmunitario Th1 del hospedador destruirá el tejido trasplantado (reacción "hospedador frente a injerto" (HVG)). Existen varias pautas terapéuticas para controlar la reacción de HVG, pero ninguna de ellas es completamente eficaz y ninguna de ellas induce eficazmente la tolerancia contra los componentes de tejido de donante. Por tanto existe una necesidad de hacer el sistema inmunitario del receptor tolerante a los componentes celulares (antígenos) del donante.

Un adyuvante es un agente que modifica el efecto de otros agentes mientras que tiene algunos efectos directos, si los tiene, cuando se administra por sí mismo. En farmacología, los adyuvantes son fármacos que tienen poco o ningún efecto farmacológico por sí mismos, pero pueden aumentar la eficacia o potencia de otros fármacos cuando se administran al mismo tiempo. En inmunología, un adyuvante es un agente que, aunque no tiene ningún efecto específico por antígeno en sí mismo, puede estimular el sistema inmunitario, aumentando la respuesta a una vacuna. Las sales de aluminio, el fosfato de aluminio y el hidróxido de aluminio son los dos adyuvantes más comunes en las vacunas humanas. También se usa escualeno en algunas vacunas humanas y se están probando más vacunas con adyuvantes de escualeno y fosfato en seres humanos. Se usan adyuvantes de aceite en vacunas animales. Otro adyuvante autorizado en el mercado y sistema portador es virosomas. Durante las dos últimas décadas se ha investigado una variedad de tecnologías para mejorar los adyuvantes ampliamente usados, pero desfavorables, basados en sales de aluminio. Estas sales desarrollan su efecto induciendo una inflamación local, que también es la base del prolongado patrón de efectos secundarios de este adyuvante. Por el contrario, las capacidades adyuvantes de los virosomas son independientes de cualquier reacción inflamatoria. Los virosomas contienen hemaglutinina y neuraminidasa unidas a la membrana derivados del virus de la gripe que amplifican la actividad fusogénica y, por tanto, facilitan la captación en células presentadoras de antígenos (APC) e inducen una vía natural de procesamiento de antígenos. La liberación del antígeno por virosomas al sistema inmunitario es una forma casi natural y esto puede ser un motivo importante por el que las vacunas basadas en virosomas sobresalen debido a su excelente perfil de seguridad.

Un fármaco es una sustancia, en general exógena, que tiene un efecto específico sobre la función de una célula u organismo. Frecuentemente, los fármacos se usan en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de enfermedad o se usan para potenciar de otro modo el bienestar físico o mental. Una medicación o medicina es un fármaco tomado para curar y/o mejorar cualquier síntoma de una enfermedad o afección médica, o se puede usar como medicina preventiva que tiene futuros beneficios pero no trata ninguna enfermedad o síntoma existente o preexistente. Los fármacos se distinguen normalmente de los productos bioquímicos endógenos por ser introducidos desde fuera del organismo.

Un agente tóxico o toxina es una sustancia o composición venenosa para las células vivas u organismos. Las toxinas son frecuentemente proteínas que son capaces de causar enfermedad tras el contacto o absorción con tejidos del cuerpo interactuando con otras proteínas tales como enzimas o receptores celulares. Las toxinas varían enormemente en su gravedad, que varían desde normalmente menores y agudas (como en una picadura de abeja)

hasta casi inmediatamente mortales (como en la toxina botulínica). Las biotoxinas varían enormemente en el fin y mecanismo, y pueden ser altamente complejas (el veneno del caracol como contiene docenas de pequeñas proteínas, que se dirigen cada una a un canal nervioso o receptor específico), o proteína relativamente pequeña.

5 En una realización más preferida de la invención, el inmunogén es un patógeno, un antígeno derivado de patógeno, un alérgeno, un antígeno de tumor o un tolerógeno.

Un patógeno o agente infeccioso es un agente biológico, especialmente un microorganismo vivo, que causa enfermedad o dolencia a su hospedador. El patógeno, según la presente invención, significa preferentemente un virus, bacteria y/o parásito eucariota. Un antígeno derivado de patógeno es un antígeno derivado de un patógeno.

10 Un alérgeno es una sustancia capaz de producir hipersensibilidad o una reacción alérgica. Normalmente, comprende un antígeno derivado no de patógeno capaz de estimular una reacción de hipersensibilidad en los individuos. Por consiguiente, se causa una reacción desorientada a sustancias extrañas por el sistema inmunitario. La reacción alérgica es desorientada por que estas sustancias extrañas son normalmente inocuas. Ejemplos de alérgenos incluyen pólenes, ácaros del polvo, mohos, caspas y ciertos alimentos.

15 Un antígeno de tumor es una sustancia producida en células tumorales que desencadenan una respuesta inmunitaria en el hospedador. Los antígenos de tumor son útiles en identificar células tumorales y son posibles candidatos para su uso en terapia del cáncer. Las proteínas normales en el cuerpo son no antigénicas debido a tolerancia propia. Sin embargo, cualquier proteína producida en una célula tumoral que tiene una estructura anormal debido a mutación puede actuar de antígeno de tumor. Particularmente, la mutación de proto-oncogenes y supresores tumorales que conducen a la producción anormal de proteínas son la causa del tumor y así dichas
20 proteínas anormales se denominan antígenos específicos de tumor. Ejemplos de antígenos específicos de tumor incluyen los productos anormales de genes ras y p53. A diferencia, la mutación de otros genes no relacionados con la formación de tumor puede conducir a la síntesis de proteínas anormales que se denominan antígenos asociados a tumor. Las proteínas que normalmente se producen en bajas cantidades, pero cuya producción es espectacularmente elevada en células tumorales, desencadenan una respuesta inmunitaria. Un ejemplo de dicha
25 proteína es la enzima tirosinasa, que se requiere para la producción de melanina. Normalmente, la tirosinasa se produce en cantidades mínimas, pero los niveles son mucho más elevados en células de melanoma. Los antígenos oncofetales son otra clase importante de antígenos de tumor. Ejemplos son alfa-fetoproteína (AFP) y antígeno carcinoembrionario (CEA). Estas proteínas normalmente se producen en las fases tempranas del desarrollo embrionario y desaparecen por el tiempo que el sistema inmunitario se ha desarrollado completamente. Así, no se desarrolla tolerancia propia contra estos antígenos. También se producen proteínas anormales por células infectadas con oncovirus, por ejemplo, VEB y VPH. Las células infectadas por estos virus contienen ADN viral latente que se transcribe y la proteína resultante produce una respuesta inmunitaria. Además de las proteínas, otras
30 sustancias como glucolípidos y glucoproteínas de la superficie celular pueden también tener una estructura anormal en células tumorales y así podrían ser dianas del sistema inmunitario.

35 Un tolerógeno es un inmunogén que estimula una respuesta inmunitaria, pero no evoca una reacción de defensa inmunitaria inflamatoria. Se puede usar para inducir tolerancia en el sistema inmunitario contra sus componentes. La tolerancia puede ocurrir debido a tolerancia central o tolerancia periférica. Tolerancia central se refiere a tolerógenos, en los que antígenos correspondientes se han expuesto a linfocitos T en el timo que conducen a eliminación de los linfocitos T específicos. La tolerancia periférica ocurre cuando los antígenos se presentan a linfocitos T sin "señal de
40 peligro" adicional apropiada.

También se describe un sistema de liberación que tiene un agente tóxico, que puede ser una citotoxina, un agente inductor de la apoptosis, un agente de inactivación de ribosomas, un agente de escisión de ADN o ARN, o un inhibidor de la síntesis de proteínas.

45 Una citotoxina es una sustancia que tiene un efecto tóxico o destructivo directo sobre ciertas células del cuerpo (normalmente las de un órgano particular). Ejemplos específicos incluyen nefrotoxinas y neurotoxinas.

Muchos tratamientos del cáncer usan toxinas o citotoxinas para destruir las células cancerosas activamente y rápidamente divisoras. Un efecto secundario desafortunado de esta quimioterapia es que ciertas células sanas y normales en el cuerpo tales como los folículos pilosos y la médula ósea también se dividen activamente y también son atacadas por el agente citotóxico, que limita la frecuencia de administración. Muchos fármacos
50 quimioterapéuticos funcionan alterando la mitosis, dirigiéndose eficazmente a células de división rápida. Ejemplos de quimioterapéuticos comunes son agentes alquilantes (tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino), antimetabolitos (por ejemplo, los esmascaradores como purina ((azatioprina, mercaptopurina)) o pirimidina), antraciclina, alcaloides de plantas (tales como alcaloides de la vinca y taxanos) e inhibidores de la topoisomerasa (tales como irinotecán, topotecán, amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido y tenipósido) que afectan la división celular o síntesis de ADN. Quimioterapéuticos adicionales que actúan de una manera diferente incluyen anticuerpos
55 monoclonales (que se dirigen a antígenos específicos de tumor (tales como trastuzumab (Herceptin), cetuximab y rituximab) o bloquean la información de nuevos vasos tumorales (tal como bevacizumab (Avastin)) y los nuevos

inhibidores de tirosina cinasas, por ejemplo, mesilato de imatinib (Gleevec® o Glivec®), que se dirige directamente a una anomalía molecular en ciertos tipos de cáncer (leucemia mielógena crónica, tumores gastrointestinales del estroma).

5 Funcionalmente, la toxina también puede ser un agente inductor de apoptosis (un agente que induce la muerte celular programada de una célula tal como gemcitabina, ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) o un compuesto relacionado con retinoide que contiene un grupo adamantilo), un agente de inactivación de ribosomas (un grupo grande de proteínas tóxicas ampliamente distribuidas entre el reino de las plantas y los ribosomas inactivantes, por ejemplo atacando enzimáticamente la subunidad 60S de ribosomas eucariotas y modificando irreversiblemente su ARN ribosómico grande (ARNr) tal como ricina, aviscumina, o una proteína de inactivación de ribosomas de tipo Shiga), un agente que escinde ADN o ARN (es decir, un compuesto interactivo de ADN/ARN que se une y escinde ADN/ARN tal como un 1,4-dióxido de 1,2,4-benzotriazina, resveratrol, cisplatino o ribozima de cabeza de martillo) o un inhibidor de la síntesis de proteínas (un compuesto que inhibe la síntesis de proteínas por, por ejemplo, interrupción del alargamiento de la cadena de péptidos, bloqueo del sitio de ribosomas, lectura errónea del código genético o prevención de la unión de cadenas laterales de oligosacáridos a glucoproteínas tales como antibióticos (por ejemplo, anisomicina, cloranfenicol, estreptomina, tetraciclina, neomicina o eritromicina), ácido fusídico, toxina diftérica, ricina o cicloheximida.

Además de la sustancia que se va a liberar (sustancia ii)), es decir, el inmunogén, el sistema de liberación comprende una molécula que se une al receptor de quimiocina (motivo C) 1 (XCR1) (molécula i). La molécula funciona dirigiéndose selectivamente a las células presentadoras de antígenos profesionales XCR1 positivas y efectúa la introducción de la sustancia para ser liberada en esta célula. A partir de aquí, la sustancia ii) puede actuar en su modo previsto dependiendo de la naturaleza de la sustancia ii). Químicamente, la molécula i) de la invención es un anticuerpo anti-XCR1 o un fragmento del mismo o es un ligando de quimiocina (motivo C) 1 (XCL1) o una variante funcionalmente activa del mismo. También se describen moléculas i) que pueden ser cualquier compuesto químico adecuado; por ejemplo, la molécula puede ser una proteína, (poli)péptido, un anticuerpo o fragmento del mismo o molécula pequeña. Funcionalmente, la molécula puede ser un agonista o un antagonista; sin embargo, se prefiere un agonista completo o parcial. Sin quedar ligado a esta teoría, se asume que tras la unión de la molécula, particularmente el agonista, a XCR1, el complejo de ligando y XCR1 se internalizan en la célula. De los otros miembros de la familia de receptores acoplados a la proteína G se conoce que los agonistas tienden a inducir un nivel de internalización más alto del receptor que los antagonistas, por consiguiente se prefieren los agonistas. Además, se debe entender que está previsto que el ligando se una a un dominio del receptor capaz de mediar en la incorporación de la sustancia para ser liberada en la célula. Se asume que el (los) dominio(s) externo(s) del receptor es/son (a) dominio(s) particularmente adecuado(s) para mediar en la internalización de la sustancia ii). Por consiguiente, se asume que ligandos que se unen a este/estos dominio(s) son particularmente adecuados para el sistema de liberación de la invención.

35 Ya se conoce la secuencia de aminoácidos de XCR1 humano (NCBI; acceso NP_001019815):

```

MESSGNPEST TFFYYDLQSQ PCENQAWVFA TLATTVLYCL VFLLSLVGNS LVLWVLVKYE
SLESLTNIFI LNLCLSDLVF ACLLPVWISP YHWGWVLGDF LCKLLNMIFS ISLYSSIFFL
TIMTIHRYLS VVSPSLTLRV PTLRCRVLVT MAVVVASILS SILDTIFHKV LSSGCDYSEL

TWYLTSVYQH NLFFLLSLGI ILFCYVEILR TLFRRSRKRR HRTVKLIFAI VVAYFLSWGPF
YNFTLFLQTL FRTQIIRSCE AKQOLEYALL ICRNLAFSHC CFNPVLYVFFV GVKFRTHLKH
VLRQFWFCRL QAPSPASIPH SPGAFAYEGA SFY
    
```

(SEQ ID NO: 17)

Sin embargo, todavía no se conoce la estructura tridimensional exacta de XCR1 u otros receptores de quimiocinas. Basándose en el análisis de la secuencia de aminoácidos primaria, el receptor de quimiocina homólogo más próximo de XCR1 es CCR5 con un 36 % de identidad y 56 % de similitud al nivel de aminoácido a lo largo de una extensión de 321 restos. Varios estudios han presentado un análisis detallado de la estructura del dominio y sitios de unión a ligando de CCR5, y debido a la significativa homología entre CCR5 y XCR1, los resultados de estos estudios se pueden usar para predecir características estructurales de XCR1. Un estudio analizó regiones conservadas de varias quimiocinas y predicción precisa derivada sobre la localización de los dominios intracelulares, extracelulares y transmembranarios de CCR5 (Raport et al., 1996, J. Biol. Chem. 271, 17161-66). Como la mayoría de estas regiones también se conservan en XCR1, es razonable adoptar las predicciones de dominio de CCR5 y así proponer una estructura de dominio para XCR1 murino y humano, como se detalló en la tabla a continuación. Se estudiaron con detalle en otro estudio los restos de CCR5 importantes para la unión al ligando (Zhou et al, 2000, Eur. J. Immunol. 30, 164-73) y se propuso que aunque todos los dominios extracelulares podían estar implicados en la unión al ligando, el extremo N y el segundo bucle extracelular (ECL2) son los principales contribuyentes. Basándose en estos experimentos se puede derivar que los aminoácidos 1-34 y 166-191 de XCR1 humano son los principales sitios de unión para XCL1, y que los aminoácidos 89-103 y 251-271 hacen contribuciones más pequeñas. Por consiguiente, es probable que las moléculas que se unen a estos dominios sean ligandos de XCR1 adecuados y se

puede usar este fundamento para la búsqueda y/o diseño de ligandos de XCR1 adecuados, por ejemplo por modelado molecular.

dominios extracelulares	dominios de membrana	dominios intracelulares	XCR1 murino	XCR1 humano
extremo N			1-30	1-34
	dominio transmembranario 1 (TM1)		31-55	35-59
		bucle intracelular 1 (ICL1)	56-63	60-67
	TM2		64-84	68-88
bucle extracelular 1 (ECL1)			85-98	89-103
	TM3		99-117	104-122
		ICL2	118-138	123-143
	TM4		139-160	144-165
ECL2			161-186	166-191
	TM5		187-205	192-210
		ICL3	206-220	211-225
	TM6		221-245	226-250
ECL3			246-263	251-271
	TM7		264-282	272-290
		extremo C	283-322	291-333

5 Aparte de la unión a XCR1, se debe entender que la molécula i) debe ser capaz de mediar en la incorporación (por ejemplo, por internalización de receptor o endocitosis o fagocitosis) de la sustancia ii) en la célula. La capacidad de una molécula i) para unirse a XCR1 y mediar en la incorporación de una sustancia se puede examinar por métodos convencionales, por ejemplo por marcado de la molécula i) y seguimiento de su destino (captación en la célula portadora de XCR1), o determinando el nivel de XCR1 sobre la superficie de APC después de la unión de la molécula i) a XCR1, seguido por un periodo de incubación. La internalización de XCR1 se puede probar en APC

10 primaria portadora de XCR1 o alternativamente en transfectantes de XCR1 (véase el Ejemplo 7). La molécula i) que se va a probar se puede marcar (por ejemplo, usando un compuesto radiactivo o un fluorocromo, o una toxina, o un fármaco que influye en el metabolismo de células portadoras de XCR1) y reaccionar con la célula portadora de XCR1 a una temperatura, a la que ocurre la internalización de receptores de quimiocina (normalmente superior a 7 °C) durante un tiempo óptimo (normalmente superior a 5 min) (Neel et al., 2005, Cyt. Growth Factor Rev. 16, 637-58). Después de un periodo de incubación suficiente, la tasa de internalización de XCR1 se puede determinar ya sea midiendo la cantidad de molécula internalizada i) por métodos ópticos (en el caso de un marcador de fluoróforo) o midiendo la radiactividad incorporada (en el caso de un marcador radiactivo tal como [¹²⁵I]-XCL1), o evaluando la muerte celular (en caso de una toxina), o por cualquier otro método de detección adecuado para el marcador usado.

15 Alternativamente, la tasa de internalización de XCR1 puede ser indirectamente determinada comparando el nivel de expresión superficial de la célula XCR1 antes y después de la unión de la molécula i) a XCR1 usando citometría de flujo o cualquier otro ensayo (por ejemplo, ELISA celular) capaz de determinar el nivel de XCR1 sobre la superficie

20

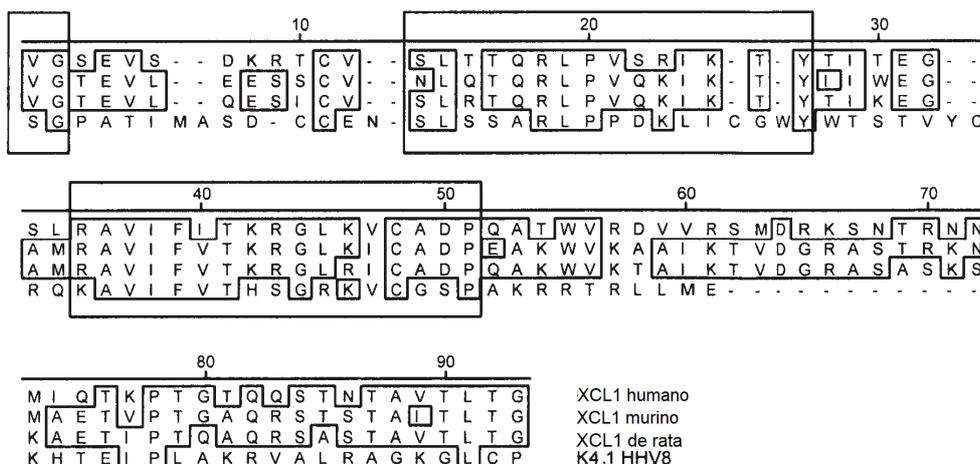
celular. Alternativamente, el receptor de XCR1 transfectado se puede marcar (por ejemplo, por un fluoróforo o usando variantes fluorescentes de la proteína de fusión de XCR1 para la transfección), de manera que el desenlace/internalización del receptor se pueda evaluar directamente, por ejemplo por métodos ópticos. Todos los enfoques descritos son adaptables para los sistemas de cribado de alto rendimiento. Los métodos descritos son muy conocidos para el experto en la materia (por ejemplo, Colvin et al., 2004, J. Biol. Chem. 279, 30219-27; Sauty et al. 2001, J. Immunol. 167, 7084-93; Rose 2004, J. Biol. Chem. 279, 24372-86; Signoret et al., 2000, J. Cell. Biol. 151, 1281-94; y publicaciones enumeradas en la Tabla 2 de Neel et al., 2005, Cyt. Growth Factor Rev. 16, 637-58). Alternativamente, la unión de la molécula i) también se puede estudiar usando una prueba de activación como se detalló en el Ejemplo 2 midiendo la concentración intracelular de Ca^{2+} o cualquier otro metabolito adecuado de activación celular inducida por XCR1. Alternativamente, la captación de la molécula i) se puede medir según los principios detallados en el Ejemplo 4.

En una realización preferida de la invención, la molécula i) es el ligando de quimiocina (motivo C) 1 (XCL1) o una variante funcionalmente activa del mismo, en la que la variante funcionalmente activa de XCL1

- se diferencia de XCL1 de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 4 por como máximo 20 deleciones de aminoácidos o
- tiene al menos el 80 % de identidad de secuencia con XLR1 de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 4 o
- es un fragmento funcionalmente activo de XCL1 que comprende o que consiste en la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 7 a 10.

Como se detalló anteriormente, XCL1 es el ligando que existe de forma natural de XCR1. Una variante que existe de forma natural del mismo es XCL2 (véase anteriormente), que también se puede usar. La estructura tridimensional de XCL1 humano recombinante se determinó por espectroscopia de RMN. Se encontró que XCL1 adoptaba un pliegue altamente conservado entre esencialmente todas las otras quimiocinas, caracterizado por un extremo N desordenado, una hoja β antiparalela de tres hebras y una hélice α del extremo C (el pliegue de quimiocina "clásico"). Al igual que con otras quimiocinas, parece que se requiere el extremo N para la función de XCL1. Así, se puede asumir que la unión de XCL1 a su receptor XCR1 es muy similar a la unión del receptor de otras quimiocinas y se puede describir por un modelo de dos etapas: En la primera etapa, el cuerpo principal de la quimiocina reconoce específicamente y se une al receptor, que induce un cambio conformacional en la quimiocina y una transposición del extremo N flexible. En la segunda etapa, el extremo N de quimiocina interacciona con el receptor e induce su activación, que normalmente desencadena la entrada de calcio. Aparte de la similitud general se identificaron tres características estructurales que son únicas para XCL1; éstas comprenden el número de enlaces disulfuro, la longitud del extremo C y la disposición particular de un dominio del extremo N. Aunque la gran mayoría de las quimiocinas muestran dos enlaces disulfuro, uno de ellos se delecciona en XCL1. Esto se propuso para desestabilizar la estructura de XCL1 debido a que en condiciones casi fisiológicas se pueden detectar dos estados conformacionales: el pliegue de quimiocina conservado y una conformación no de quimiocina. Las implicaciones biológicas de esta heterogeneidad estructural no están claras, pero se ha propuesto que la conformación no de quimiocina no se une al receptor. La segunda característica estructural de ATAC es la presencia de una gran extensión del extremo C (restos 73-93). La función de este extremo C único no está clara, y las consecuencias funcionales de su deleción son objeto de controversia. Se han encontrado ocho posibles sitios de glucosilación en el extremo C prolongado, pero no se detectó una influencia en la glucosilación sobre la estructura o función de XCL1. Finalmente, la ausencia del segundo enlace disulfuro da como resultado una orientación diferente del denominado bucle de 30, que es importante para la interacción de receptores. Además, este bucle se acorta dos aminoácidos y se desacopla del extremo N. Las implicaciones funcionales de esta disposición particular no están claras.

Se conocen las secuencias de aminoácidos de XCL1 (ATAC) de varias especies (incluyendo humana: SEQ ID NO: 1, acceso de GenBank P47992; ratón: SEQ ID NO: 2, acceso de GenBank P47993; y rata: SEQ ID NO: 3, acceso de GenBank P51672) y se muestran como SEQ ID NO: 1 a 3 (véase más adelante). Además, también se conoce un agonista de XCLR1 específico denominado K4.1 HHV8 (SEQ ID NO: 4, acceso de GenBank AAB62672.1) (véase a continuación), que es una proteína viral de tipo quimiocina. Se puede usar cualquiera de estos ligandos de XCR1 que existen de forma natural o cualquier otro ligando de XCR1 que existe de forma natural.



Alternativamente, se puede usar una variante funcionalmente activa de cualquier XCL1 que existe de forma natural como se define en las reivindicaciones. El término variante engloba fragmentos, variantes derivadas por una o más adiciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos y moléculas, particularmente proteínas, que comprenden cualquier XCL1 que existe de forma natural o parte del mismo, tal como proteínas de fusión. La porción de XCL1 de la proteína de fusión se puede flanquear por el (los) resto(s) de aminoácido del extremo C, extremo N, o extremo C y N.

En una realización, el fragmento funcionalmente activo se caracteriza por derivar de cualquier ligando de XCR1 que ocurre de forma natural de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 4, por una o más, como máximo 20, deleciones de aminoácidos. La(s) deleción (deleciones) pueden ser del extremo C, extremo N y/o internamente. Preferentemente, el fragmento se obtiene por como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 15 o 20, más preferentemente como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, todavía más preferentemente como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, lo más preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 deleción (deleciones) de aminoácidos. El fragmento funcionalmente activo de la invención se caracteriza por que tiene una actividad biológica similar a la presentada por el ligando del que deriva, que incluye la capacidad de unirse a XCR1 y mediar en la internalización de una sustancia ii). El fragmento del ligando de XCR1 que existe de forma natural, particularmente XCL1, especialmente los de SEQ ID NO: 1 a 4, es funcionalmente activo en el contexto de la presente invención, si la actividad (unión así como internalización) del fragmento asciende a al menos el 10 %, preferentemente al menos el 25 %, más preferentemente al menos el 50 %, incluso más preferentemente al menos el 70 %, todavía más preferentemente al menos el 80 %, especialmente al menos el 90 %, particularmente al menos el 95 %, lo más preferentemente al menos el 99 % de la actividad de XCL1 sin alteración de secuencia.

El fragmento funcionalmente activo del ligando de XCR1 que existe de forma natural, particularmente XCL1, especialmente los de SEQ ID NO: 1 a 4, también se puede caracterizar por otras características estructurales. Por consiguiente, en una realización preferida de la invención, los fragmentos funcionalmente activos consisten en al menos el 60 %, preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 80 %, todavía más preferentemente al menos el 90 %, incluso más preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente el 99 % de los aminoácidos del ligando de XCR1 de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 4. El fragmento activo funcional como se ha definido anteriormente se puede derivar del péptido por una o más deleciones de aminoácido. Las deleciones pueden ser del extremo C, extremo N y/o internamente. El alineamiento de secuencias anterior de SEQ ID NO: 1 a 4 muestra dominios de los ligandos que existen de forma natural que parecen estar conservados. En una realización preferida de la invención, estos dominios se deben mantener en el fragmento.

Los dominios conservados incluyen los aminoácidos del extremo N procesado (el extremo N procesado que empieza con los aminoácido 22 del extremo N no procesado) para SEQ ID NO: 1 a 3 y con el aminoácido 27 para SEQ ID NO: 4) en las posiciones 1-2 (V/S G), 13-27 (S/N L X T/S Q/A R L P V/P X K/R I/L K/I X T/G X Y, X = cualquiera o ningún aminoácido; SEQ ID NO: 5), 35 a 51 (R/K A V I F I/V T K/H R/S G L/R K/R I/V C A/G D/S P; SEQ ID NO: 6) y un puente disulfuro entre los restos de cisteína en las posiciones 11 y 48 (véase también el alineamiento anterior). Una secuencia consenso para las secuencias de SEQ ID NO: 1 a 4 es XGXXXXXXXXXXCXXXLXXXRLPXXXXXXXXXXVIFXTXXG-XXXCXXP (SEQ ID NO: 7) si solo se consideran aminoácidos idénticos y (V/S)GX(E/A)(V/T)XXXXXXXXC(V/E)X(S/N)LX(T/S)(Q/A)RLP(V/P)X(K/R)(I/L)(K/I)-X(T/G)XYX(I/T)X(E/T)(G/V)XXXX(R/K)AVIF(V/I)T(K/H)(R/S)G(L/R)(K/R)XC(A/G)-(D/S)P (SEQ ID NO: 8) si se consideran aminoácidos idénticos y la mayoría de los aminoácidos (es decir, aminoácidos que están presentes en 3 de las 4 secuencias, el aminoácido alternativo se enumera después de la barra). Una secuencia consenso para las secuencias de SEQ IDNO: 1 a 3 es VGXEVXXXXXCVLXTQRLPXXIKTYXIXEGXXRA VIFXTRGLXXCADPXAX-WVXXXXXXXXDXXXXXXXXXXXTPTXXQXSXXTAXTLTG (SEQ ID NO: 9) si solo se consideran aminoácidos

idénticos y VG(T/S)EV(L/S)X(E/K)(S/R)XCV-
(S/N)LXTQRLPV(Q/S)(K/R)IKTY(T/I)IXEG(A/S)(M/L)RAVIF(V/I)TKRGL(K/R)(I/V)-
CADP(Q/E)A(K/T)WV(K/R)X(A/V)(I/V)(K/R)(T/S)(V/M)D(G/R)(R/K)(A/S)(S/N)(T/A)-

5 (R/S)(K/N)(N/S)(M/K)(A/I)(E/Q)TXPT(G/Q)(A/T)Q(R/Q)S(T/ A)(S/N)T A(V/I)TLTG (SEQ ID NO: 10) si se consideran aminoácidos idénticos y la mayoría de los aminoácidos (es decir, aminoácidos que están presentes en 2 de las 3 secuencias, el aminoácido alternativo se enumera después de la barra). Por consiguiente, en un sistema de liberación preferido de la invención la variante funcionalmente activa, preferentemente el fragmento funcionalmente activo, de XCL1 comprende o consiste en la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 7 a 10, preferentemente de SEQ ID NO: 8 a 10, más preferentemente de SEQ ID NO: 9 o 10, especialmente de SEQ ID NO: 10.

10 Otra realización preferida de la invención se refiere a una variante de XCL1 como se ha definido anteriormente, en la que el ligando de XCR1 es una variante funcionalmente activa de un ligando de XCR1 de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 4 y en la que la variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el ligando de XCR1 de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 4. En una realización más preferida, la variante funcionalmente activa tiene una identidad de secuencia de al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, lo más preferentemente el 99 % con el antígeno de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 4.

15 El porcentaje de identidad de secuencia se puede determinar, por ejemplo, por alineamiento de secuencias. Los métodos de alineamiento de secuencias para la comparación son muy conocidos en la técnica. Se han descrito diversos programas y algoritmos de alineamiento, por ejemplo, en Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981 o Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444-2448, 1988.

20 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de NCBI (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990) está disponible de varias fuentes, que incluyen el Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI, Bethesda, MD) y en internet, para su uso a propósito de los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Variantes de un antígeno de cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 1 a 4 normalmente se caracterizan usando NCBI Blast 2.0, blastp con huecos establecido a parámetros por defecto. Para comparaciones de secuencias de aminoácidos de al menos 35 aminoácidos, se emplea la función de secuencias de Blast 2 usando la matriz por defecto BLOSUM62 establecida a los parámetros por defecto (coste por existencia de hueco de 11, y un coste de hueco por residuo de 1). Cuando se alinean los péptidos cortos (menos de alrededor 35 aminoácidos), el alineamiento se realiza usando la función de secuencias Blast 2, empleando la matriz PAM30 establecida a parámetros por defecto (hueco abierto 9, penalizaciones por hueco de extensión 1). Los métodos de determinación de la identidad de secuencia a lo largo de dichas ventanas cortas tales como 15 aminoácidos o menos se describen en la página web que se mantiene por el centro Nacional para Información Biotecnológica en Bethesda, Maryland (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

30 Alternativamente, se puede realizar el alineamiento de múltiples secuencias usando el software MegAlign de DNASTar (Madison, WI, EE.UU.) empleando el algoritmo de alineamiento ClustalV (Higgins et al., 1992, Comput. Appl. Biosci. 8, 189-91). En el alineamiento anterior se usó este software y se estableció a los siguientes parámetros por defecto: penalización por hueco 10, penalización por longitud de hueco 10. Debido a la homología muy baja, fueron necesarios ajustes manuales para la inclusión de SEQ ID NO 4 en el alineamiento.

40 La variante activa funcional se obtiene por alteraciones de secuencia en el ligando de XCR1 que existe de forma natural, en el que el ligando de XCR1 con las alteraciones de secuencia retiene una función del ligando de XCR1 no alterado, por ejemplo que tiene una actividad biológica similar a la presentada por el ligando de XCR1 que existe de forma natural, que incluye la capacidad de unirse a XCR1 y mediar en la internalización de una sustancia ii). Dichas alteraciones de secuencia pueden incluir, pero no se limitan a, sustituciones conservativas, deleciones, mutaciones e inserciones. Estas características de la variante funcional activa se pueden evaluar, por ejemplo, como se detalló anteriormente.

45 Aún en una realización más preferida de la invención, la variante funcionalmente activa deriva del ligando de XCR1 que existe de forma natural de cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 1 a 4 por sustituciones conservativas. Sustituciones conservativas son las que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales y propiedades químicas. Ejemplos de dichas familias son aminoácidos con cadenas laterales básicas, con cadenas laterales ácidas, con cadenas laterales alifáticas no polares, con cadenas laterales aromáticas no polares, con cadenas laterales polares sin carga, con cadenas laterales pequeñas, con cadenas laterales grandes, etc. En una realización, una sustitución conservativa se incluye en el péptido. En otra realización, se incluyen dos sustituciones conservativas o menos en el péptido. En una realización adicional, se incluyen tres sustituciones conservativas o menos en el péptido.

55 Ejemplos de sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, las enumeradas a continuación:

Resto original	Sustituciones conservativas
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Asn
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

En otra realización preferida de la invención, la molécula i) es un anticuerpo anti-XCR1 o fragmento funcionalmente activo del mismo que es capaz de unirse específicamente a XCR1. El fragmento funcionalmente activo del anticuerpo se define análogamente al fragmento funcionalmente activo de XCL1 (véase anteriormente), es decir, el fragmento funcionalmente activo (a) se caracteriza por derivar de cualquier anticuerpo anti-XCR1 por una o más 5 deleciones de aminoácidos, tales como deleciones del extremo C, extremo N y/o internas y (b) se caracteriza por tener una actividad biológica similar a la presentada por el anticuerpo anti-XCR1 del que deriva, que incluye la capacidad de unirse a XCL1. Los anticuerpos que existen de forma natural son proteínas usadas por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar objetos extraños. Cada anticuerpo que existe de forma natural tiene dos cadenas pesadas grandes y dos cadenas ligeras pequeñas y se pueden unir a un antígeno diferente. La presente 10 invención incluye, por ejemplo, anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos quiméricos, de una sola cadena y humanizados, así como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o el producto de una biblioteca de expresión de Fab. El anticuerpo o componente de anticuerpo se puede modificar adicionalmente para prolongar su semivida biológica o de otra forma para hacerlo más adecuado para el direccionamiento. Los anticuerpos generados contra XCR1 se pueden obtener por inyección directa de XCR1 o un fragmento del mismo en un animal o 15 administrando XCR1 o un fragmento del mismo a un animal, preferentemente un no humano. El anticuerpo así obtenido se unirá entonces a XCR1. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede usar cualquier técnica conocida en la técnica, que proporciona anticuerpos producidos por cultivos continuos de líneas celulares, por ejemplo una línea celular de hibridoma. La producción de un anticuerpo monoclonal adecuado también se detalla en el Ejemplo 7. Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente de EE.UU. N.º 20 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios contra XCR1. Por tanto, se pueden usar ratones transgénicos u otros organismos tales como otros mamíferos para expresar anticuerpos humanizados contra XCR1.

En otra realización preferida de la invención, la molécula i) es un (poli)péptido. Los péptidos o polipéptidos son polímeros formados a partir del enlace, en un orden definido, de α -aminoácidos. El enlace entre un resto de

aminoácido y el siguiente se conoce como un enlace amida o un enlace peptídico. Las proteínas son moléculas de polipéptido (o consisten en subunidades de polipéptidos múltiples). La distinción es que los péptidos son cortos y los polipéptidos/proteínas son largos. Sin embargo, en el contexto de la presente invención, los términos péptido, polipéptido y proteína se usan indistintamente. Los (poli)péptidos usados preferentemente como moléculas i) en la presente invención se detallan anteriormente a propósito de XCL1 y variantes del mismo. Alternativamente, también podrían usarse bibliotecas de (poli)péptidos para identificar (poli)péptidos capaces de unirse al XCR1, capaces de activar APC portadora de XCR1, y preferentemente capaces de provocar la endocitosis en APC portadora de XCR1. Los sistemas de ensayo para identificar (poli)péptidos inductores de endocitosis se han descrito anteriormente y en los Ejemplos 2 y 4 .

También se describe que la molécula i) es una molécula orgánica pequeña, es decir, un compuesto que contiene carbono que normalmente tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 2.000 g/mol, preferentemente inferior a aproximadamente 1500 g/mol, todavía más preferentemente inferior a 1000 g/mol. La molécula orgánica puede ser, por ejemplo, un alcohol, aldehído, alcano, alqueno, amina o compuesto aromático. También se podrían usar bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas o bibliotecas de productos naturales para identificar moléculas capaces de unirse a XCR1, capaces de activar APC portadora de XCR1, y preferentemente capaces de provocar la endocitosis en APC portadora de XCR1. Los sistemas de ensayo para identificar moléculas orgánicas pequeñas inductoras de la endocitosis se han descrito anteriormente y en los Ejemplos 2 y 4.

Como se detalló anteriormente, el sistema de liberación de la invención es adecuado para administrar una sustancia en una célula presentadora de antígenos profesional XCR1 positiva, en la que la célula es una célula dendrítica. XCR1 positiva significa que las células presentadoras de antígenos profesionales poseen el receptor XCR1 sobre sus superficies. Una célula presentadora de antígenos (APC) es una célula que muestra antígeno extraño complejado con MHC sobre su superficie. Los linfocitos T pueden reconocer este complejo usando su receptor de linfocitos T (TCR). Las APC se clasifican en dos categorías: profesionales o no profesionales. Puesto que casi cada célula en el cuerpo es técnicamente una APC (puesto que pueden presentar antígeno a linfocitos T CD8⁺ mediante las moléculas de clase I de MHC), el término "célula presentadora de antígenos profesional" se limita a las APC que pueden sensibilizar a linfocitos T intactos (es decir, activan un linfocito T que no ha sido previamente expuesto a un antígeno). Las APC profesionales expresan moléculas de clase II de MHC, así como de clase I de MHC, y pueden estimular células CD4⁺ ("cooperadoras"), así como linfocitos T CD8⁺ ("citotóxicos"). Estas APC profesionales son muy eficientes en la internalización del antígeno, por ejemplo ya sea por fagocitosis o por endocitosis (mediada por receptor), y entonces muestran un fragmento del antígeno, unido a la molécula de MHC de clase I o clase II, sobre su membrana. El linfocito T reconoce e interacciona con el complejo antígeno-molécula de MHC de clase I o II sobre la membrana de la APC. Entonces se produce una señal coestimulante adicional por la célula presentadora de antígenos, que conduce a la activación del linfocito T. Aunque los macrófagos y linfocitos B pueden presentar eficientemente el antígeno, actualmente las únicas APC profesionales muy conocidas son las células dendríticas (DC), entre ellas las células dendríticas CD8⁺. Más preferentemente, el sistema de liberación es capaz de mediar en la presentación de la sustancia o un fragmento de la misma como un antígeno por las células presentadoras de antígenos profesionales XCR1 positivas en un sujeto, particularmente por una molécula de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) ("presentación cruzada").

Según la presente invención, el sistema de liberación puede ser cualquier sistema adecuado que comprenda los componentes (molécula i) y la sustancia ii)) como se definen en las reivindicaciones y se especifican en el presente documento.

Por ejemplo, la sustancia ii) del sistema de liberación (es decir, el inmunogén) se puede unir no covalentemente a la molécula i) (es decir, el agente de direccionamiento como se define en las reivindicaciones), por ejemplo por fuerzas de intensidad iónica, adhesión, cohesión, y otros. Alternativamente y preferentemente, la sustancia ii) puede ser directamente enlazada a la molécula i) por acoplamiento químico, o utilizando un conector tal como un conector peptídico, o como una proteína de fusión en caso de componentes proteínicos.

Alternativamente, la sustancia que va a liberar (es decir, el inmunogén) se podría envasar/encapsular en un "vehículo" para conservar la integridad y eficacia de la sustancia que se va a dirigir a la APC portadora de XCR1. Dicho vehículo podría ser una célula viva o muerta, virus, partícula de tipo virus, nanopartícula, sistema basado en lípidos (por ejemplo, liposoma), exosoma, cuerpo apoptótico, sistema de dispersión coloidal, polímero, hidrato de carbono, microesfera, o cualquier otro vehículo adecuado. Este vehículo se dirigiría a la APC portadora de XCR1 por la presencia de un agente de direccionamiento, es decir, una molécula i), (véase anteriormente) sobre la superficie (externa) del vehículo, con el fin de permitir una unión específica del vehículo a la APC portadora de XCR1, seguido por internalización, si se requiere.

Un vehículo particularmente preferido es una proteína estructural de un virus o una estructura multimérica del mismo, tal como un capsómero, una partícula de tipo virus o un virus. La estructura multimérica puede ser un agregado de al menos aproximadamente 5, preferentemente al menos aproximadamente 10, más preferentemente al menos aproximadamente 30, lo más preferentemente al menos aproximadamente 60 proteínas estructurales y puede contener la sustancia que se va liberar dentro de la estructura multimérica. Se sabe que una proteína

estructural de virus tal como parvovirus (por ejemplo, virus adeno-asociado 2) se puede modificar para presentar sobre su superficie una proteína particular. Según aquella, la proteína estructural se podría modificar para presentar una molécula proteinácea que se une al XCR1 tal como un ligando de XCR1 que existe de forma natural o variante del mismo, como se ha definido anteriormente, sobre la superficie del vehículo. Entonces, el vehículo se une a DC mediante XCR1 y se podría incorporar en DC. Sitios de inserción adecuados se desvelan, por ejemplo, en el documento US 6.719.978.

En una realización adicional de la invención, el sistema de liberación de la invención comprende además

iii) un adyuvante, particularmente una "señal de peligro".

El adyuvante es un compuesto capaz de mejorar la respuesta inmunitaria contra el antígeno administrado por al menos uno de varios mecanismos que incluyen captación mejorada del antígeno, semivida biológica prolongada del antígeno, efecto de tipo depósito, activación de la respuesta inmunitaria innata proporcionando una "señal de peligro", inducción de citocinas, activación y/o maduración de DC, inducción de ligandos para moléculas coestimulantes de linfocitos T, y otros. Cualquier compuesto que mejore la interacción específica de células NK o linfocitos T con DC también actuaría de adyuvante. Los adyuvantes se pueden agrupar en dos categorías. Un tipo de adyuvante mejora el reconocimiento de un antígeno por el sistema inmunitario, por ejemplo mejorando la captación del antígeno en APC profesionales u optimizando la interacción de linfocitos T de células NK con APC profesionales. Este tipo de adyuvante no induce la inflamación ni proporciona una "señal de peligro" y así se podría usar para mejorar el efecto de un tolerógeno en un intento por inducir la anergia o tolerancia en el sistema inmunitario contra este tolerógeno. El otro tipo de adyuvante induce la inflamación en el sistema inmunitario, por ejemplo proporcionando una "señal de peligro" (véase anteriormente). Ejemplos de adyuvantes de tipo "señal de peligro" son complejos inmunoestimulantes (ISCOM), partículas de tipo virus (VLP), LPS, BCG, motivos CpG sin metilar, ARN bicatenario, y otros. Ejemplos de adyuvantes proteináceos de tipo "señal de peligro" son proteínas de choque térmico o proteína B1 del grupo de alta movilidad.

En una realización de la invención la molécula i), la sustancia ii) y opcionalmente el adyuvante iii) son uno o más (poli)péptido(s), en la que el polipéptido es como se ha definido anteriormente. La molécula i), la sustancia ii) y opcionalmente el adyuvante iii) pueden estar en un (poli)péptido (es decir, una proteína de fusión) y pueden ser dos o más (poli)péptidos.

En una realización adicional de la invención, la molécula i), sustancia ii) y opcionalmente el adyuvante se unen entre sí covalentemente y/o no covalentemente. Como se detalló anteriormente, los componentes pueden estar en una proteína de fusión. Alternativamente, los componentes se pueden unir entre sí por un conector adecuado. En caso de una proteína de fusión, el conector está compuesto por uno o más restos de aminoácidos. Alternativamente, los componentes se pueden unir entre sí no covalentemente, tal como por un enlace iónico, enlaces de hidrógeno y/o enlaces de van der Waals. Los componentes pueden englobar dominios adecuados que proporcionan el enlace covalente o no covalente. Para el enlace covalente, éste incluye conector peptídico o grupos de acoplamiento, que permiten el acoplamiento de los componentes entre sí. Para el enlace no covalente, ejemplos de dominios que demuestran la unión incluyen el sistema de biotina-avidina, un anticuerpo o fragmento del mismo y su antígeno, o una enzima o parte de la misma y su sustrato.

También se describen en el presente documento uno o más ácidos nucleicos que codifican el (los) (poli)péptido(s) del sistema de liberación descritos anteriormente, si la molécula i), la sustancia ii) y opcionalmente el adyuvante iii) son uno o más (poli)péptido(s). Las moléculas de ácidos nucleicos pueden estar en forma de ARN, tal como ARNm o ARNc, o en forma de ADN, que incluyen, por ejemplo, ADNc y ADN genómico, por ejemplo, obtenido clonando o producido por técnicas de síntesis química o por una combinación de las mismas. El ADN puede ser de triple cadena, doble cadena, o monocatenario. El ADN monocatenario puede ser la hebra codificante, también conocida como la hebra codificante, o puede ser la hebra no codificante, también denominada la hebra no codificante. La molécula de ácido nucleico como se usa en el presente documento también se refiere a, entre otras cosas, ADN mono o bicatenario, ADN que es una mezcla de ARN mono y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más normalmente, bicatenarias, o de triple cadena, o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, la molécula de ácido nucleico como se usa en el presente documento se refiere a regiones de triple cadena que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN.

Además, cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican el sistema de liberación puede ser funcionalmente enlazada, usando técnicas convencionales tales como técnicas estándares de clonación, a cualquier secuencia reguladora, tales como una secuencia promotora o potenciadora o una conductora, o una secuencia codificante heteróloga para crear una proteína de fusión.

El uno o más ácido(s) nucleico(s) pueden estar comprendidos en un vector. Un vector puede incluir además secuencias de ácidos nucleicos que permiten que se replique en la célula hospedadora, tal como un origen de replicación, uno o más genes terapéuticos y/o genes marcadores de selección y otros elementos genéticos

conocidos en la técnica tales como elementos reguladores que dirigen la transcripción, traducción y/o secreción de la proteína codificada. El vector se puede usar para transducir, transformar o infectar una célula, causando así que la célula exprese ácidos nucleicos y/o proteínas distintas de las nativas a la célula. El vector incluye opcionalmente materiales para ayudar a lograr la entrada del ácido nucleico en la célula, tales como una partícula viral, liposoma, recubrimiento de proteína o similares. Se conocen en la técnica numerosos tipos de vectores de expresión apropiados para la expresión de proteínas, por técnicas estándares de biología molecular. Tales vectores se seleccionan de entre tipos de vectores convencionales que incluyen insectos, por ejemplo, expresión de baculovirus, o sistemas de expresión en levadura, fúngicos, bacterianos o virales. Otros vectores de expresión apropiados, de los que se conocen en la técnica numerosos tipos, también se pueden usar para este fin. Los métodos de obtención de dichos vectores de expresión son muy conocidos (véase, por ejemplo Sambrook et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)). En una realización, el vector es un vector viral. Los vectores virales incluyen, pero no se limitan a, vectores retrovirales y adenovirales.

Las células hospedadoras adecuadas o líneas celulares para la transfección por este método incluyen células bacterianas. Por ejemplo, las diversas cepas de *E. coli* son muy conocidas como células hospedadoras en el campo de la biotecnología. Diversas cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y otros bacilos y similares, también se pueden emplear en este método. También están disponibles muchas cepas de células de levadura conocidas para aquellos expertos en la materia como células hospedadoras para la expresión de los péptidos de la presente invención. Otras células fúngicas o células de insecto tales como células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) también se pueden emplear como sistemas de expresión. Alternativamente, se puede usar células de mamífero, tales como células 293 humanas, células de ovario de hámster chino (CHO), la línea celular COS-1 de mono o células 3T3 murinas derivadas de ratones Swiss, BALB/c o NIH. Aún se conocen en la técnica otras células hospedadoras adecuadas, así como los métodos para la transfección, cultivo, amplificación, cribado, producción y purificación.

Los (poli)péptidos se pueden producir expresando el (los) ácido(s) nucleico(s) en una célula hospedadora adecuada. Las células hospedadoras se pueden transfectar, por ejemplo, mediante medios convencionales tales como electroporación con al menos un vector de expresión que contiene un ácido nucleico de la invención bajo el control de una secuencia reguladora transcripcional. La célula hospedadora transfectada o transformada se cultiva entonces en condiciones que permiten la expresión de la proteína. La proteína expresada se recupera, aísla y purifica opcionalmente de la célula (o del medio de cultivo, si se expresa extracelularmente) por medios apropiados conocidos para un experto en la materia. Por ejemplo, las proteínas se aíslan en forma soluble tras la lisis celular, o se extraen usando técnicas conocidas, por ejemplo, en cloruro de guanidina. Si se desea, el (poli)péptido de la invención se produce como una proteína de fusión. Tales proteínas de fusión son las descritas anteriormente. Alternativamente, por ejemplo, se puede desear producir las proteínas de fusión para potenciar la expresión de la proteína en una célula hospedadora seleccionada o para mejorar la purificación. Las moléculas que comprenden los componentes de la presente invención se pueden purificar adicionalmente usando cualquiera de una variedad de métodos convencionales que incluyen, pero no se limitan a: cromatografía de líquidos tales como fase normal o inversa, usando HPLC, FPLC y similares; cromatografía de afinidad (tal como con ligandos inorgánicos o anticuerpos monoclonales); cromatografía de exclusión por tamaño; cromatografía de quelatos metálicos inmovilizados; electroforesis en gel; y similares. Un experto en la materia puede seleccionar las técnicas más apropiadas de aislamiento y purificación sin apartarse del alcance de la presente invención. Tal purificación proporciona el antígeno en una forma sustancialmente libre de otros materiales proteináceos y no proteináceos del microorganismo.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un medicamento que comprende el sistema de liberación como se describe en el contexto del primer aspecto de la invención o uno o más ácido(s) nucleico(s) que lo codifican, por tanto, en el que el medicamento es para su uso como una vacuna.

Con respecto al medicamento de la invención, que incluye todos los casos de vacunaciones, inmunogénicas o tolerogénicas, descritas en el presente documento, la sustancia ii), concretamente el inmunogén (incluyendo antígeno derivado de patógeno, alérgeno, antígeno de tumor, tolerógeno, antígeno de tejido extraño, antígeno autoinmunitario, etc.) dirigido a la APC portadora de XCR1, se puede aplicar como un (poli)péptido o proteína. Alternativamente, la sustancia ii) se puede aplicar como ADN o ARN natural o modificado (estabilizado) que codifica el (poli)péptido o proteína. Alternativamente, se puede aplicar como un vector de expresión conducido por promotor basado en ácido nucleico (por ejemplo, ARN o ADN de plásmido o linealizado) capaz de expresar la proteína/péptido inmunogénico, una vez se internaliza en la APC portadora de XCR1. Preferentemente, dicho sistema de vector utilizaría el promotor de XCR1 para conducir la expresión del (poli)péptido o proteína, de manera que el (poli)péptido/proteína codificado se expresara selectivamente en APC de mamífero/humana portadora de XCR1. Alternativamente, el (poli)péptido o proteína se puede manipular por tecnología recombinante en un virus, que después de ser selectivamente dirigido a APC portadora de XCR1, se internalizaría y empezaría a expresar el (poli)péptido/proteína. Nuevamente, sería preferible que la expresión del (poli)péptido o proteína se accionara por el promotor de XCR1. Tanto en el caso de un sistema de vector de expresión basado en ácido nucleico como un sistema de virus, el (poli)péptido o proteína se expresaría en la APC portadora de XCR1, se procesaría y se presentaría sobre la superficie celular de la APC. Dependiendo del contexto (inflamación/"señal de peligro" frente a ausencia de una "señal de peligro"), el péptido expresado induciría o bien una reacción inmunitaria o una tolerancia.

El (poli) péptido o proteína podría ser dirigido a células portadoras de XCR1 solas o junto con un adyuvante, o cualquier compuesto farmacéutico que modificara la función de APC portadora de XCR1.

5 El medicamento de la invención se puede administrar a un sujeto en necesidad del mismo, preferentemente mamíferos, y todavía más preferentemente seres humanos. Los posibles modos de administración incluyen intradérmica (subcutánea), intramuscular, parenteral, gastrointestinal, intravenosa, intrarterial, intrarticular, intracisternal, intraocular, intraventricular, intratecal, intratraqueal, intraperitoneal, intratímica, intraesplénica, a la mucosa, o por vía tópica o por vía oral, y combinaciones de los mismos, pero lo más preferentemente inyección intramuscular o subcutánea o intravenosa. El volumen de la dosis para administración intramuscular es preferentemente hasta aproximadamente 5 ml, por ejemplo, entre 0,3 ml y 3 ml, entre 1 ml y 3 ml, aproximadamente 10 0,5 a 1 ml, o aproximadamente 2 ml. La cantidad de principio activo en cada dosis debe ser suficiente para proporcionar el tratamiento o la prevención. En diferentes realizaciones, la dosis unitaria de sustancia que se va a liberar debe ser de hasta aproximadamente 5 µg de sustancia/kg de peso corporal, entre aproximadamente 0,2 y 3 µg, entre aproximadamente 0,3 y 1,5 µg, entre aproximadamente 0,4 y 0,8 µg, o aproximadamente 0,6 µg. En realizaciones alternativas, las dosis unitarias podrían ser hasta aproximadamente 6 µg de sustancia/kg de peso corporal, entre aproximadamente 0,05 y 5 µg, o entre aproximadamente 0,1 y 4 µg. En diferentes realizaciones, la 15 dosis se administra 1 a 3 veces, por ejemplo con un intervalo de 1 a 3 semanas. Cantidades representativas de proteína por dosis son desde aproximadamente 1 µg hasta aproximadamente 1 mg, más preferentemente desde aproximadamente 5 µg hasta aproximadamente 500 µg, todavía más preferentemente desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 250 µg y lo más preferentemente desde aproximadamente 25 µg hasta 20 aproximadamente 100 µg.

El tratamiento implica administrar una cantidad eficaz de la sustancia ii), es decir, el inmunógeno, a un sujeto, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano. Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de prevención o tratamiento de una enfermedad (como se especifica en el presente documento), en el que una cantidad eficaz de sustancia ii) se administra al sujeto usando el sistema de liberación. 25 La prevención y el tratamiento se pueden especificar adicionalmente como se describe en el presente documento.

Una "cantidad eficaz" del medicamento o sustancia ii) se puede calcular como la cantidad capaz de presentar un efecto *in vivo*, por ejemplo, prevenir o mejorar un signo o síntoma de cualquiera de las enfermedades especificadas en el presente documento. Dichas cantidades se pueden determinar por un experto en la materia. Preferentemente, dicho medicamento se administra por vía parenteral, preferentemente por vía intramuscular o por vía subcutánea. Sin embargo, también se puede formular para ser liberada por cualquier otra vía adecuada, que incluye por vía oral o por vía tópica. La selección de la vía de administración y la dosificación de dichas composiciones terapéuticas está dentro de la experiencia de la materia. 30

El tratamiento en el contexto de la presente invención se refiere a tanto tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas, en el que el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) la afección patológica dirigida o trastorno. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno, así como los propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se va a prevenir el trastorno. 35

El medicamento puede comprender en general al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado o sustancia auxiliar. Ejemplos de dichas sustancias son agua desmineralizada, solución salina isotónica, solución de Ringer, tampones, ácidos y bases orgánicos o inorgánicos, así como sus sales, cloruro sódico, hidrogenocarbonato de sodio, citrato de sodio o fosfato de dicalcio, glicoles, tales como propilenglicol, ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo, azúcares tales como glucosa, sacarosa y lactosa, almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de soja, aceite de ricino, 45 ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo, adyuvantes poliméricos tales como gelatina, dextrano, celulosa y sus derivados, albúminas, disolventes orgánicos, agentes complejantes tales como citratos y urea, estabilizadores, tales como inhibidores de proteasa o nucleasa, preferentemente aprotinina, ácido ε-aminocaproico o pepstatina A, conservantes tales como alcohol bencílico, inhibidores de la oxidación tales como sulfito de sodio, ceras y estabilizadores tales como EDTA. También pueden estar presentes en la composición agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorante, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes. La disolución fisiológica de tampón preferentemente tiene un pH de aproximadamente 6,0-8,0, especialmente un pH de aproximadamente 6,8-7,8, en particular un pH de aproximadamente 7,4, y/o una osmolaridad de aproximadamente 200-400 miliosmol/litro, preferentemente de aproximadamente 290-310 miliosmol/litro. El pH del medicamento se ajusta en general usando un tampón orgánico o inorgánico adecuado, tal como, por ejemplo, preferentemente usando un tampón fosfato, tampón Tris (tris(hidroxil-metil)aminometano), 50 tampón HEPES (ácido [4-(2-hidroxietil)piperazino]etanosulfónico) o tampón MOPS (ácido 3-morfolino-1-propanosulfónico). La elección del tampón respectivo depende en general de la molaridad deseada del tampón. El tampón fosfato es adecuado, por ejemplo, para disoluciones para inyección e infusión. Los métodos para formular un medicamento, así como un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado o sustancia auxiliar, son muy conocidos para el experto en la materia. Vehículos farmacéuticamente aceptables y sustancias auxiliares se eligen, 60

entre otras cosas, según la forma farmacéutica y compuesto predominantes.

El sistema de liberación podría dirigirse a la APC portadora de XCR1, dependiendo del requisito o condición. Puede anticiparse que la APC portadora de XCR1 reside no solo en el bazo, los ganglios linfáticos y los tejidos linfáticos drenantes, sino también en todos los otros órganos del mamífero/cuerpo humano, tales como el timo, hígado, pulmón, en el cerebro, y bajo superficies de la mucosa (por ejemplo, en el intestino). Por tanto, el direccionamiento de un compuesto farmacéutico se puede lograr por inyección/administración en los tejidos respectivos.

En la presente invención, el medicamento es una vacuna. Como se detalló anteriormente, las vacunas consisten en componentes celulares, virales, bacterianos, fúngicos, parasíticos, o toxina, u otros componentes antigénicos, que se administran en el cuerpo de un mamífero o un ser humano. Alternativamente, las vacunas se pueden administrar como ADN o ARN que codifica componentes celulares, virales, bacterianos, fúngicos, parasíticos, o toxina; una vez en el cuerpo, el ácido nucleico se traduce por células del cuerpo en la proteína codificada, que entonces actúa de antígeno. Las vacunas se administran frecuentemente junto con "adyuvantes", compuestos capaces de mejorar significativamente la respuesta inmunitaria contra el antígeno administrado por varios mecanismos que incluyen captación mejora del antígeno, semivida biológica prolongada del antígeno, efecto de tipo depósito, activación de la respuesta inmunitaria innata proporcionando una "señal de peligro", inducción de citocinas, activación y/o maduración de DC, inducción de ligandos para moléculas coestimulantes de linfocitos T, y otros. Cualquier compuesto que mejore la interacción específica de células NK o linfocitos T con DC también actuaría de adyuvante. En muchos casos, el adyuvante contiene componentes de patógenos, que proporcionan al sistema inmunitario "señales de peligro" (véase anteriormente).

Se podría usar una vacuna dirigida a APC y específicamente para presentar de forma cruzada APC, para inmunizar individuos sanos para protegerlos de la infección ("vacuna protectora"). Alternativamente, una vacuna tal se podría usar para fines terapéuticos. El individuo infectado, que puede no ser capaz de organizar una respuesta inmunitaria Th1 suficiente al patógeno, se podría vacunar con una vacuna diseñada para provocar una respuesta Th1 poderosa y específica, en particular respuesta citotóxica, y así sería capaz de contener o erradicar la infección ("vacuna terapéutica"). Ejemplos serían malaria, tuberculosis, leishmania, enfermedades de priones, ortomixovirus y en particular gripe, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C crónica, VIH y otros lentivirus, citomegalovirus, virus del herpes, virus del papiloma, bunyavirus, calicivirus, filovirus, flavivirus y en particular virus de la hepatitis C, virus del papiloma, paramixovirus, una variedad de virus respiratorios y otros virus, o cualquier otra infección especificada en la descripción.

La vacuna también se podría usar para proteger individuos sanos del desarrollo de tumores con componentes antigénicos conocidos (por ejemplo, melanoma, carcinoma de próstata) ("vacuna protectora de tumor"). Alternativamente, dicha vacuna que provoca una poderosa respuesta inmunitaria Th1, en particular respuesta citotóxica Th1, se podría usar para curar pacientes que ya han desarrollado tumores. Ejemplos de dichos tumores serían los tumores inducidos por virus humanos, en particular tumores inducidos por el virus del papiloma, tumores inducidos por VHC, tumores inducidos por el virus de la hepatitis B y otros virus que inducen tumores tras la infección crónica. Además, la superinducción de inmunidad Th1, en particular inmunidad citotóxica, sería deseable para hacer surgir espontáneamente tumores sólidos (por ejemplo, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, adenocarcinoma del intestino, cáncer de pulmón) y leucemias. En tal caso, el paciente se trataría con antígenos de tumor conocidos o su propio material tumoral (extirpado) dirigido de tal forma a las APC como para provocar una poderosa respuesta inmunitaria Th1 citotóxica contra antígenos específicos de tumor.

Algunas vacunas se usan para la desensibilización de individuos alérgicos. Los individuos alérgicos son propensos a desarrollar una reacción excesiva de Th2 a antígenos medioambientales. Como resultado, desarrollan diversas respuestas alérgicas tales como rinitis, conjuntivitis, alergia alimenticia, alergia a venenos y alérgica asmática. Los esquemas de desensibilización actualmente disponibles y los tratamientos que pretenden inclinar el equilibrio inmunitario hacia una respuesta inmunitaria más propensa a Th1 al alérgeno respectivo no son completamente eficaces. Por tanto, son altamente deseables nuevos enfoques para inducir una inmunidad más orientada hacia Th1 a los alérgeno(s) respectivo(s). Esto se podría lograr mediante el direccionamiento del alérgeno respectivo a APC, en particular DC, capaces de provocar una respuesta Th1 eficaz al alérgeno, y podrían incluir el uso de adyuvantes co-dirigidos al sistema inmunitario Th1 ("desensibilización terapéutica"). Antes de inclinar el equilibrio hacia una respuesta inmunitaria Th1 puede ser útil delectar primero una población de APC dirigiendo específicamente una toxina a esta población. Una vacuna de desensibilización también se podría aplicar a individuos que tienen una predisposición a desarrollar reacción alérgica, pero todavía no han desarrollado los síntomas alérgicos ("desensibilización preventiva").

El mismo principio de desensibilización se podría aplicar a enfermedades autoinmunitarias que son causadas por la reacción inmunitaria a antígenos propios, en particular anticuerpo sesgados para Th1 o reacciones inmunitarias celulares, por ejemplo artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmunitaria y otras enfermedades autoinmunitarias basadas en una reacción excesiva Th1 a antígenos propios. Dicha vacuna de desensibilización se aplicaría en una formulación que no proporcionara "señales de peligro" al sistema inmunitario y APC. La vacuna de desensibilización se dirigiría alternativamente de tal forma y formulación que previniera la

5 maduración de DC que presentan el inmunogén propio respectivo o incluso inducen un estado "inmaduro" de las DC dirigidas. Una forma de lograr esto incluiría la delección transitoria de una población de APC dirigiendo específicamente una toxina a esta población. Estas pautas completas tendrían como objetivo modificar el estado de las células dendríticas de tal forma que se proporcionaran señales tolerogénicas a linfocitos T específicos de antígeno que interactúan con estas DC. De tal forma, se esperaría provocar una tolerancia inmunitaria contra el antígeno (propio) respectivo.

En otra realización preferida de la invención, el medicamento de la invención es para inducir una respuesta inmunitaria de memoria contra el péptido, particularmente en la que la respuesta inmunitaria de memoria es una respuesta Th1, especialmente una respuesta citotóxica Th1.

10 En condiciones en las que se desea una vacunación inmunogénica, el inmunogén tiene que dirigirse a APC de mamífero/humana portadora de XCR1 en el contexto de una "señal de peligro" (véase anteriormente). El inmunogén dirigido se podría aplicar en una formulación de vacuna, en la que el inmunogén dirigido y el adyuvante de tipo señal de peligro se mezclan en una formulación (por ejemplo, emulsión) y luego se aplican. Alternativamente, y preferentemente, el adyuvante de tipo señal de peligro se acopla directamente al inmunogén dirigido y así se co-
15 dirige a APC portadora de XCR1 usando un agente de direccionamiento, como se describe.

En otra realización preferida de la invención referente a la vacunación inmunogénica, el medicamento de la invención es para prevenir o tratar un tumor y/o una infección.

La vacuna inmunogénica se puede usar para la prevención o tratamiento de tumores, particularmente en mamíferos/seres humanos. El inmunogén dirigido es un antígeno de tumor. Éste puede ser un antígeno de tumor conocido; ejemplos de antígenos de tumor conocidos son antígenos de melanoma, antígenos de próstata y antígenos de adenocarcinoma (véase también anteriormente). En ese caso, el antígeno de tumor se puede aplicar como un resto de proteína o péptido capaz de inducir una reacción inmunitaria al tumor. En el caso de un tumor ya establecido sin antígenos de tumor conocidos, se puede usar una preparación de tejido específica de paciente de material tumoral extirpado como preparación de antígeno de tumor. El inmunogén dirigido también puede ser un virus, micoplasma, o bacteria que induce un tumor tras la infección crónica. Ejemplos de tales agentes infecciosos son virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B, ambos inductores de carcinomas de hígado, y VPH, inductor de carcinomas de cuello uterino, y otros. Para una vacuna inmunogénica, es necesaria una aplicación simultánea de un adyuvante de tipo "señal de peligro". Este enfoque se puede usar en dos ámbitos diferentes. Para el primero, se puede usar vacunar el mamífero/ser humano contra un tumor o un patógeno inductor de tumor de un modo preventivo, con antígenos de tumor conocidos, en individuos propensos al desarrollo tumoral. En tal caso, la inmunidad Th1 desarrollada contra los componentes tumorales o inductores de tumor prevendrá el desarrollo del tumor. En el segundo ámbito, el paciente que ya ha desarrollado un tumor se vacuna de una forma terapéutica con el fin de organizar una respuesta inmunitaria eficaz, en particular una respuesta inmunitaria Th1 (citotóxica), contra el tumor y/o el patógeno inductor de tumor con el objetivo de erradicar el tumor. Este tipo de enfoque se puede aplicar a una variedad de tipos de tumor, entre ellos melanoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, carcinoma del intestino, cáncer de pulmón, sarcomas, leucemias, linfomas, gliomas, mielomas, sarcomas, sarcoidosis, microgliomas, meningiomas, astrocitomas, oligodendrogliomas, enfermedad de Hodgkin.

La vacuna inmunogénica se puede usar para la prevención o el tratamiento de una infección, particularmente en mamíferos/seres humanos. Como inmunógenos dirigidos pueden servir patógenos vivos, atenuados o muertos, es decir, virus, bacterias, parásitos, hongos, micoplasma, toxinas inactivadas, o componentes inmunogénicos de los mismos. El inmunogén también se puede aplicar como un resto de proteína o péptido que induce la inmunidad al patógeno. Para una vacuna inmunogénica, en general es necesaria una aplicación simultánea de un adyuvante de tipo "señal de peligro", a menos que el patógeno o su componente ya proporcione la "señal de peligro" necesaria. Dicha "señal de peligro" se podría proporcionar mediante una variedad de componentes, ejemplos son LPS, CpG no metilado, proteína B del grupo de alta movilidad, proteínas de choque térmico, y otras, véase anteriormente). Este enfoque se puede aplicar a una variedad de patógenos. Ejemplos son tuberculosis, helicobacter, malaria, leishmania, enfermedades de priones, ortomixovirus y en particular gripe, coronavirus y en particular el virus de SARS, virus del Nilo occidental, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis A, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y otros lentivirus, citomegalovirus, virus del herpes, virus del papiloma, bunyavirus, calicivirus, filovirus, flavivirus y en particular virus de la hepatitis C, paramixovirus, una variedad de virus respiratorios y otros virus que se necesitan para la contención y erradicación de una respuesta inmunitaria Th1 eficaz, y en particular una respuesta citotóxica Th1.

La vacuna inmunogénica se puede usar para la prevención o tratamiento (desensibilización) de una enfermedad alérgica, particularmente en mamíferos/seres humanos. El inmunogén dirigido es un alérgeno. Ejemplos de alérgenos son alérgeno de los ácaros del polvo, alérgenos del polen, alérgenos del pasto, alérgenos de veneno, alérgenos de los alimentos, y otros. El alérgeno también se puede aplicar como un componente inmunogénico del alérgeno, o un resto de proteína o péptido capaz de inducir una reacción inmunitaria al alérgeno. Para una vacuna inmunogénica es necesaria una aplicación simultánea de un adyuvante de tipo "señal de peligro". El objetivo es cambiar la respuesta inmunitaria del individuo al alérgeno de un patrón inmunitario Th2 a uno Th1 en una variedad

de condiciones. Ejemplos son asma alérgica, otras enfermedades pulmonares alérgicas, alergia alimentaria, sinusitis alérgica, rinitis alérgica (fiebre del heno), poliposis, y otras afecciones alérgicas. Este enfoque se puede usar en una afección alérgica ya establecida como una vacunación terapéutica (desensibilización). Alternativamente, se pueden vacunar los individuos propensos a reacciones alérgicas contra alérgenos conocidos de un modo preventivo, de manera que ya no desarrollen un patrón de reacción inmunitaria Th2 no deseada hacia el alérgeno.

En otra realización preferida de la invención, el medicamento de la invención es para inducir tolerancia contra el (poli)péptido.

Existen varias afecciones en las que se desea el desarrollo de tolerancia en lugar de inmunidad a un inmunógeno dado. Esto se hace posible, puesto que existe por primera vez la posibilidad de dirigir específicamente un inmunógeno (es decir, tolerógeno) en la APC portadora de XCR1, que desempeña una función preeminente en el establecimiento y el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria en el cuerpo del mamífero/ser humano. La inducción de tolerancia se desea en trasplante de órganos, en enfermedades autoinmunitarias y en afecciones alérgicas. En estas afecciones no debe estar presente en el medicamento "señal de peligro".

Preferentemente, el medicamento es para inhibir el rechazo de trasplante, una alergia y/o una enfermedad autoinmunitaria.

Se puede usar vacunación tolerogénica en el trasplante de órganos. El receptor humano del órgano o tejido puede ser tolerizado antes del trasplante a los antígenos de tejido extraño dirigiendo el inmunógeno a APC portadora de XCR1 en ausencia de un adyuvante de señal de peligro. El inmunógeno en tal caso puede ser células del donante, componentes de células, péptidos o proteínas del donante. En estas condiciones, el sistema inmunitario Th1 del hospedador se hará tolerante a los antígenos extraños de tejido y tolerará el injerto. Este enfoque se puede aplicar en trasplante de órganos (por ejemplo, trasplante de hígado, corazón, pulmón, piel, riñón), trasplante de hueso-médula ósea, o trasplante de células de insulina, o cualquier otro trasplante de tejido extraño. Mediante la aplicación del antígeno de tejido extraño en el timo o la médula ósea se induciría la tolerancia central. Mediante la aplicación del inmunógeno en la periferia se induciría tolerancia periférica.

Se puede usar la vacunación tolerogénica para el tratamiento y/o la prevención de alergia. El individuo alérgico o el individuo propenso a reacciones alérgicas se pueden hacer tolerantes a un alérgeno dirigiendo el alérgeno a APC portadora de XCR1 en ausencia de un adyuvante de señal de peligro. Esto se puede hacer de un modo preventivo en individuos propensos a alergia o en alergia ya establecida. El inmunógeno dirigido es un alérgeno o parte de un alérgeno. El objetivo es hacer el sistema inmunitario del individuo tolerante a un alérgeno dado. Este enfoque se puede aplicar para afecciones alérgicas, en las que la respuesta alérgica se conduce por el sistema inmunitario Th1, tal como en sensibilización a metal pesado (níquel, cromo, otro). Este enfoque también se puede aplicar en individuos en los que se desea tolerizar tanto el sistema inmunitario Th2 como Th1 al alérgeno o agente de sensibilización, tal como en asma alérgica, otras enfermedades pulmonares alérgicas, alergia alimentaria, sinusitis alérgica, rinitis alérgica (fiebre del heno), poliposis y otras afecciones alérgicas.

La vacunación tolerogénica se puede usar para el tratamiento y/o la prevención de afecciones autoinmunitarias. Muchas enfermedades autoinmunitarias humanas son conducidas por un proceso autoinmunitario Th1. Sería deseable hacer los individuos autoinmunitarios o individuos propensos a reacciones autoinmunitarias tolerantes a los antígenos autoinmunitarios. Se conocen estos antígenos autoinmunes (como en miastenia grave, tiroiditis autoinmune, esclerosis múltiple, diabetes mellitus autoinmune), o se pueden determinar en el futuro predecible. El individuo se haría tolerante al antígeno propio dirigiendo el antígeno propio a APC portadora de XCR1 en ausencia de adyuvante. Este enfoque se podría aplicar en miastenia grave, tiroiditis autoinmune, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), SLE, espondilitis anquilosante, artritis reactiva, artritis psoriásica, y otras afecciones autoinmunitarias conducidas por Th1.

El inconveniente de muchos adyuvantes es el amplio e inespecífico efecto que ejercen sobre varios tipos de células en el cuerpo, cuando se administran de un modo no dirigido. Por tanto, se realizaron intentos para hacer el efecto de los adyuvantes más específico, por ejemplo acoplado el adyuvante al inmunógeno. Sin embargo, actualmente no existen métodos disponibles que permitan el direccionamiento de un adyuvante selectivamente a DC, y más específicamente a presentar de forma cruzada DC, tanto para minimizar los efectos no deseados como para dirigir selectivamente la población de DC presentadora de antígeno más eficaz. Por tanto, existe una necesidad de desarrollar dicho direccionamiento de adyuvantes. Como se detalló anteriormente, ahora es posible dirigir específicamente DC usando un ligando de XCR1. Además, podrían mostrarse que XCL1 (ATAC) actúa de adyuvante en la inducción de citotoxicidad de linfocitos T CD8⁺.

Por consiguiente, la descripción proporciona un adyuvante que comprende XCL1 o un fragmento funcionalmente activo del mismo (como se ha definido anteriormente), particularmente para potenciar la respuesta inmunitaria en un sujeto modulando la función de células presentadoras de antígenos XCR1 positivas.

La capacidad de XCL1 para atraer, activar y mejorar las capacidades de presentación de antígenos de APC portadora de XCR1 hace que XCL1 sea un adyuvante de vacuna ideal sin propiedades de señal de peligro. Se puede esperar que la adición de XCL1 a cualquier vacuna o formulación farmacéutica atraiga APC portadora de XCR1 al sitio de aplicación en el mamífero/cuerpo humano. En caso de un inmunogén aplicado, esto mejoraría la captación de antígeno y la presentación en APC portadora de XCR1, en particular presentación cruzada, y mejoraría la respuesta inmunitaria de linfocitos T y B. Dependiendo del contexto de la aplicación, esta respuesta inmunitaria podría dar como resultado un mayor grado de tolerancia al inmunogén aplicado (afecciones no inflamatorias, sin "señal de peligro"), o dar como resultado una inmunidad mejorada al antígeno aplicado, cuando se administran en afecciones inflamatorias ("señal de peligro"). Se puede esperar que la coadministración de XCL1 con un compuesto farmacéutico conduzca a un aumento de la captación de este compuesto en APC portadora de XCR1.

Figuras

La **Fig. 1** muestra el número observado de copias de XCR1 después de la PCR cuantitativa de ARNm de poliA de diversas poblaciones de células esplénicas murinas, normalizadas a la expresión en 10.000 células. Solo las DC CD11c⁺CD8⁺ expresan cantidades significativas de ARNm de XCR1.

La **Fig. 2** muestra la activación de DC portadoras de XCR1 por XCL1. Se inmovilizaron células dendríticas (DC) CD8⁺CD11c⁺ (A) o CD8⁻CD11c⁺ (B) sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina y se cargaron con fura-2/AM (2 μM). Se obtuvieron imágenes de las células en un sistema de obtención de imágenes de vídeo digital asistido por monocromador y se expusieron a ATAC 100 nM a 60 s. Los datos representan concentraciones de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i) en 27-33 células individuales (líneas finas) medidas en 3 experimentos independientes. Líneas gruesas: señal de [Ca²⁺]_i media promediada para todas las células medidas. XCL1 induce una señal de [Ca²⁺]_i en CD8⁺CD11c⁺ (A) pero no en células dendríticas CD8⁻CD11c⁺ (B).

La **Fig. 3** muestra el porcentaje de DC CD8⁺ y DC CD8⁻ esplénicas migradas en un ensayo de quimiotaxis Transwell *in vitro* en presencia de 1-1000 ng/ml de XCL1 y 500 ng/ml de CCL21. Solo DC CD8⁺ migran en respuesta a XCL1.

La **Fig. 4** muestra el porcentaje de DC CD8⁺ y DC CD8⁻ de ganglio linfático migradas en un ensayo de quimiotaxis Transwell *in vitro* en presencia de 100 ng/ml de XCL1 y 500 ng/ml de CCL21. Solo las DC CD8⁺ migran en respuesta a XCL1.

La **Fig. 5** muestra el comportamiento de migración de linfocitos B esplénicos, linfocitos T y células NK en un ensayo de quimiotaxis Transwell *in vitro* en presencia de 1-1000 ng/ml de XCL1 o 200 ng/ml de CXCL12, 100 ng/ml de CCL21 o 200 ng/ml de CXCL9, respectivamente. Ningunas de las poblaciones de células migran en respuesta a XCL1.

La **Fig. 6** muestra mapas del locus endógeno de ATAC que contiene tres exones (recuadros negros numerados, arriba), para el vector de direccionamiento ATAC_{mut}/pTV-0 (centro) y la estructura esperada del locus dirigido (abajo). Sitios de restricción: X, XbaI; Sc, SacI; E₁, EcoRI. Marcadores de selección: neo, resistencia a neomicina; tk, timidina cinasa del virus del herpes simple. Se indican los tamaños de los fragmentos de restricción XbaI esperados del locus de ATAC endógeno y dirigido (16 kb y 22,5 kb, respectivamente).

La **Fig. 7** muestra la estrategia de apertura para el análisis de DC esplénicas CD11c⁺CD8⁺ por citometría de flujo. Los marcadores superficiales celulares teñidos se indican en los ejes. Las células CD11c⁺MHC-II⁺ representaron aproximadamente el 4 % de células nucleadas esplénicas, después de que las células muertas (DAPI⁺, 7D) y células CD19⁺ (7E) hayan salido. Estas células CD11c⁺MHC-II⁺ se subdividieron además en células (dendríticas) CD11b⁺ y CD8⁺ (7G). La señal de fluorescencia (CFSE) se muestra para células (dendríticas) CD11c⁺CD8⁺ (7H) y CD11c⁺CD11b⁺ (7I).

La **Fig. 8** muestra el porcentaje de DC esplénicas CSFE⁺ después de la inyección de líneas celulares marcadas con CSFE. Los datos obtenidos con DC CD8⁺ se muestran en A, los datos obtenidos con DC CD8⁻ se muestran en B. XCL1 mejora significativamente la captación de células (antígeno) en DC CD8⁺.

La **Fig. 9** muestra el porcentaje de células de OT-I en bazos de ratones receptores en el día 3 después de la inyección de PBS, DEC-205-OVA o DEC-205-OVA/α-CD40. Se observa un mayor porcentaje en ratones no mutados (círculos negros) en comparación con ratones ATAC-KO (círculos blancos).

La **Fig. 10** muestra el porcentaje de células de OT-I que expresan IFN-γ aisladas de bazos de ratones receptores en el día 3 y restimuladas *in vitro*. Se observa un mayor porcentaje de células que secretan IFN-γ en ratones no mutados (círculos negros) en comparación con ratones ATAC-KO (círculos blancos), que indica el efecto adyuvante de XCL1 sobre la diferenciación de linfocitos T.

La **Fig. 11** muestra una transferencia Western de inmunoprecipitados (i.p.) de la proteína XCR1 humana con el mAb

6F8.

carril 1: marcador

carril 2: i.p. con mAb 6F8 del transfectante "5'c-myc/hATACR/P3X"

carril 3: i.p. con mAb 6F8 de la línea no mutante P3X

5 carril 4: i.p. con mAb 6F8 del transfectante "3'c-myc/hATACR/P3X"

carril 5: i.p. con mAb 6F8 del transfectante "hATACR/300-19"

carril 6: i.p. con mAb 6F8 de la línea no mutante 300-19

La **Fig. 12** muestra una SDS-PAGE teñida con Coomassie cargada con diferentes preparaciones de XCL1 murino recombinante.

10 carril 1: marcador

carril 2: proteína de fusión XCL1-SUMO purificada por afinidad por metal

carril 3: proteína de fusión XCL1-SUMO después de la digestión con la proteasa SUMO

carril 4: XCL1 purificado

15 La **Fig. 13** muestra la citotoxicidad específica de OVA de linfocitos T de OT-I y linfocitos T de ATAC-KO OT-I después de la transferencia adoptiva en ratones C57BL/6 o ATAC-KO, respectivamente. Se usaron células OVA/300-19 para la inmunización en el día 1 después de la transferencia, y el ensayo de citotoxicidad *in vivo* se realizó en el día 6.

La **Fig. 14** muestra la expresión de XCR1 en DC esplénicas.

Ejemplos

20 **Ejemplo 1: Detección exclusiva de ARNm de XCR1 en DC CD8⁺**

Se digirieron bazos de ratones C57BL/6 en RPMI1640 que contenía 2 % (v/v) de FBS (de baja endotoxina; PAA, Pasching, Austria), 500 µg/ml de colagenasa D y 20 µg/ml de DNasa I (ambos de Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Alemania) durante 25 min en un baño de agua con agitación a 37 °C. La suspensión se ajustó a EDTA 10 mM y se incubó durante 5 minutos adicionales. Las células se pasaron a través de una malla de 70 µm (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.) y se aclararon con MACS-PBS (PBS, EDTA 2 mM, 0,5 % (peso/volumen) de BSA de baja endotoxina). Después de la sedimentación con 380 × g a 4 °C, las células se suspendieron en MACS-PBS.

30 Para el aislamiento magnético de linfocitos B, linfocitos T, células NK, granulocitos o macrófagos, las células de bazo digerido se agotaron de DC (células dendríticas) por selección negativa con microperlas anti-CD11c (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Los linfocitos B se purificaron por selección positiva con microperlas anti-CD19, linfocitos T totales con microperlas anti-CD90, células NK con microperlas anti-DX5, granulocitos con microperlas anti-Ly6G, macrófagos con el mAb F4/80 conjugado con biotina (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.) y microperlas anti-biotina (Miltenyi Biotec, arriba), todos según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, arriba). Para el aislamiento de DC, las células de bazo digeridas se sustentaron con 1,069 g/ml de disolución de Nycodenz (Axis-Shield, Oslo, Noruega) y se centrifugaron durante 20 min con 800 × g a 4 °C. Se recogieron las células de baja densidad de la interfase y se lavaron una vez con MACS-PBS. Se purificaron DC totales por citometría magnética con microperlas anti-CD11c según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, arriba). Brevemente, las células se preincubaron durante 5 min a 4 °C con MACS-PBS que contenía 200 µg/ml de anti-FcR1/III (mAb 2.4G2; ATCC, arriba) y 500 µg/ml de IgG de rata purificada (Nordic, Tilburg, Países Bajos) para prevenir la unión no específica. Se añadieron microperlas de CD11c durante 15 min adicionales, y se lavaron dos veces con MACS-PBS. Las células se cargaron sobre una columna de LS (Miltenyi Biotec, arriba) acoplada en un imán MidiMACS Separator (Miltenyi Biotec, arriba) y se lavaron 3 veces; se retuvieron células CD11c positivas en la columna y se eluyeron después de retirar la columna del campo magnético añadiendo 5 ml de MACS-PBS. Se tiñeron células esplénicas CD11c⁺ en FACS-PBS (PBS, 2,5 % (v/v) de FBS, 0,1 % (peso/volumen) de NaN₃) que contenía 200 µg/ml de anti-FcR1/III (mAb 2.4G2), 500 µg/ml de IgG de rata purificada (ambos como reactivos de bloqueo), con anti-CD8 (mAb 53-6.72; ATCC, arriba), anti-CD11b (mAb 5C6; ATCC, arriba), anti-CD11c (mAb N418; ATCC, arriba) y anti-clase II de MHC (mAb M5/114.15.2; ATCC, arriba) durante 20 min a 4 °C. Después de lavar, las células se clasificaron en un citómetro Aria (BD Bioscience) en subpoblaciones de DC CD11c⁺CD8⁻ y CD11c⁺CD8⁺ a una pureza > 95 %.

50 Se preparó ARN total usando el kit High Pure RNA Isolation (Roche Diagnostics GmbH, arriba) según el protocolo. En resumen, se recogieron células (10⁵-10⁷) por centrifugación y se suspendieron en 200 µl de PBS y se mezclaron con 400 µl de tampón de lisis/de unión. El lisado se aplicó sobre el tubo de filtración y se centrifugó durante 15 s con 8000 × g. El filtro se lavó una vez con 500 µl de tampón de lavado I y se incubó durante 15 min con DNasa I para retirar el ADN restante. Después de lavar con 500 µl de tampón de lavado I y dos veces con tampón de lavado II, el ARN se eluyó dos veces con 50 µl de tampón de elución. La concentración y pureza de ARN del eluato combinado se determinó en el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) y por lectura fotométrica.

55

Se aisló ARNm a pequeña escala a partir de 10^5 - 10^7 células con el kit μ MACS mRNA Isolation (Miltenyi Biotec, arriba). El sedimento celular se lisó en 1 ml de tampón de lisis/de unión y se centrifugó con $13000 \times g$ durante 3 min. Después de la adición de 50 μ l de microperlas Oligo-(dT), el lisado se cargó sobre una columna μ MACS acoplada en un imán de separación μ MACS. La columna se aclaró dos veces con 200 μ l de tampón de lisis/de unión y 4 veces con tampón de lavado. Las trazas de ADN restante se retiraron por digestión con 5 U de DNasa I (Promega, Madison, WI, EE.UU.) durante 1 min. Las etapas de lavado se repitieron para eliminar el ADN digerido y la DNasa. Se usó tampón de elución precalentado (120 μ l, 70 °C) para eluir el ARNm purificado. El control de calidad se realizó como se ha descrito anteriormente.

Se transcribieron de forma inversa ARN total o ARNm en ADNc con el sistema de transcripción inversa según las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI, EE.UU.). En resumen, se desnaturalizaron 0,1-1 μ g de ARN total o 1-10 ng de ARNm de poli(A)⁺ a 70 °C durante 10 min y se enfrió inmediatamente a partir de aquí. Se realizó transcripción inversa con cebadores Oligo(dT)15 y transcriptasa inversa AMV durante 15 min a TA, seguido por una incubación a 42 °C. La reacción se detuvo por una etapa de calentamiento de 5 min a 95 °C seguido por incubación a 4 °C durante 5 min. Entonces se analizó el ADNc por PCR cuantitativa para su contenido en copias de XCR1 y se usó β 2-microglobulina como patrón interno. Para la amplificación de XCR1 murino, se usaron cebador directo 400 nM (5'-TGCCTGTGTTGATCTCAGCAC-3'; SEQ ID NO: 11), cebador inverso 200 nM (5'-CGGTGGATGGTCATGATGG-3'; SEQ ID NO: 12) y sonda de hibridación 150 nM (5'-FAM-CATCAGCCTCTACAGCAGCATCTTCTTCCT-TAMRA-3'). Se amplificó la β 2-microglobulina murina usando cebador directo 300 nM (5'-CGCTCGGTGACCCCTAGTCTTT-3'; SEQ ID NO: 13), cebador inverso 300 nM (5'-TTCAGTATGTTCCGGCTTCCCA-3'; SEQ ID NO: 14) y sonda de hibridación 150 nM (5'-FAM-CGGCTTGTATGCTATCCAGAAAACCCCTCA-TAMRA-3'). Con el fin de generar un patrón para la cuantificación de copias de ARNm/ADNc, se amplificaron los fragmentos de gen XCR1 específicos y se clonaron en el vector pZER0 usando el kit Zero Background cloning (Invitrogen, Groningen, Países Bajos). Para qPCR, los cebadores se mezclaron con 10 μ l de Absolute QPCR Mix que incluye ROX (ABgene, Epsom, R.U.) y 1/10 del ADNc en una reacción de PCR de 20 μ l. Se realizó PCR y se cuantificó en los sistemas ABI Prism 7000 o 7700 Sequence Detection (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con activación enzimática inicial durante 15 min a 95 °C seguido por 50 ciclos (95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min). Para la cuantificación, se realizaron en paralelo varias diluciones del fragmento génico clonado que varían desde 10^9 hasta 10^8 copias para generar una curva patrón. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 1.

Tabla 1: Cuantificación del número de copias de ARNm

Tipo de célula	número de copia de ARNm / 10000 células
esplenocitos	912
linfocitos T	15
linfocitos B	16
células NK	0
granulocitos	5
macrófagos	41
DC CD11c ⁺ CD8 ⁺	925
DC CD11c ⁺ CD8 ⁻	148717

30

Ejemplo 2: Activación selectiva de DC CD8⁺ por XCL1

DC CD8⁺ y CD8⁻, recién seleccionadas a una pureza >95 % por citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 1, se complementaron con fura-2/AM 2 μ M (Molecular Probes, Brattleboro) y se dejó que sedimentaran sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos de poli-L-lisina a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 30 min en una atmósfera humidificada. Las células adherentes se superfundieron con una solución tamponada con HEPES que contenía (en mM) 128 NaCl, 6 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 5,5 glucosa, 10 HEPES, 0,2 % (p/v) de BSA, y se montaron en la platina de un microscopio invertido (Axiovert 100, Zeiss, Jena, Alemania). Durante la aplicación de XCL1 (100 nM de XCL1 murino sintético (Dictagene, Lausanne, Suiza)), fura-2 se excitó secuencialmente con luz monocromática de 340 nm, 358 nm, 380 nm y 480 nm, y se detectó la emisión de fluorescencia a través de un filtro de paso largo de 512 nm con una cámara de CCD enfriada (TILL-Photonics, Gräfelfing, Alemania). Se eliminaron las señales

40

débilmente interferentes de anticuerpos marcados con FITC unidos a DC CD8⁺, y se calculó [Ca²⁺]_i después de la segregación espectral (Lenz J. Cell Biol. 2002, 179:291-301). Los datos representan concentraciones de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i) en 45-56 células individuales (líneas negras) medidas en 3 experimentos independientes. Líneas negras gruesas: señal de [Ca²⁺]_i media promediada para todas las células medidas. Los resultados demuestran que XCL1 induce una fuerte señal de Ca²⁺ en DC CD8⁺ (Fig. 2, A), pero no DC CD8⁻ (Fig. 2, B). Los resultados demuestran así la capacidad de XCL1 para activar específicamente DC CD8⁺ y XCL1 actúa así de un adyuvante para APC portadora de XCR1.

Ejemplo 3: XCL1 induce quimiotaxis de DC CD8⁺, pero no de DC CD8⁻, linfocitos B, linfocitos T, o células NK

Se enriquecieron altamente células CD11c⁺ de esplenocitos C57BL/6 por separación magnética usando microperlas de CD11c según el protocolo del fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Las células CD11c⁺ (0,5-1x10⁶) se suspendieron en 100 µl de medio y se transfirieron a un soporte permeable Transwell de 6,5 mm que contenía una membrana de policarbonato de 5 µm de poro (Corning Costar Co., Acton, MA, EE.UU.). El soporte permeable Transwell se insertó en la placa de 24 pocillos (Corning Costar Co., arriba) llena de 600 µl de medio que contenía o bien diluciones sucesivas de XCL1/ATAC químicamente sintetizado (Dictagene, Lausanne, Suiza) o de 500 ng/ml de CCL21 (ligando 21 de quimiocina (motivo C-C); R&D Systems, Mineápolis, MN, EE.UU.), este último usado como control positivo; todos los experimentos se realizaron por duplicado. Las células se incubaron durante 120-150 minutos a 37 °C en una estufa de incubación de células. Se aclaró suavemente la parte inferior de la membrana y las células en la cámara inferior se analizaron por citometría de flujo para la expresión de CD8 (53-6.72-FITC; ATCC, arriba), CD11b (5C6-PE; ATCC, arriba) y CD11c (N418-Cy5; ATCC, arriba). Se analizaron las suspensiones de células de cada pocillo durante un tiempo definido (5 min) y se determinó el número absoluto de células vivas (DAPI-negativas). Se calculó el porcentaje de células migradas dividiendo el número de células en la cámara inferior entre el número de células de entrada [número de células migradas/número de células de entrada x 100]. Se muestra un experimento representativo en la Fig 3. En respuesta a XCL1, las DC CD8⁺ muestran la curva de campana característica de migración quimiotáctica sin migración a una concentración de 1 ng/ml, una migración máxima a 100 ng/ml y una respuesta en descenso a 1000 ng/ml. Las DC CD8⁻ no respondieron a XCL1 pero migraron en presencia de CCL21.

Se aislaron DC de ganglios linfáticos periféricos por digestión con colagenasa de los tejidos, seguido por clasificación magnética positiva con microperlas CD11c como se ha descrito anteriormente. Se realizó el ensayo de quimiotaxis en cámaras Costar Transwell como antes, usando XCL1 a una concentración de 100 ng/ml y CCL21 en una concentración de 500 ng/ml. Las células se analizaron por citometría de flujo, y se calculó el porcentaje de células migradas como antes. Otra vez, solo migraron DC CD8⁺ en respuesta a XCL1, mientras que las DC CD8⁻ solo respondieron a CCL21 (Fig. 4).

Para investigar la respuesta quimiotáctica de otras poblaciones de células esplénicas, se aislaron linfocitos T por selección magnética positiva de esplenocitos C57BL/6 con perlas conjugadas anti-CD90, células NK con perlas conjugadas anti-49b y linfocitos B con una combinación de anticuerpo biotilado anti-CD19 (clon 1D3) y perlas conjugadas anti-biotina, según las instrucciones del fabricante (véase también el Ejemplo 1). Se realizaron ensayos de quimiotaxis como antes usando diluciones sucesivas de XCL1/ATAC. El control positivo para los linfocitos B fue CXCL12 (ligando 12 de quimiocina (motivo C-X-C)) a 200 ng/ml, CCL21 (ligando 21 de quimiocina (motivo C-C)) para linfocitos T a 100 ng/ml, y CXCL9 (ligando 9 de quimiocina (motivo C-X-C)) para células NK a 200 ng/ml (todos de R&D Systems, Mineápolis, MN, EE.UU.). Linfocitos B, linfocitos T o células NK dejaron de responder a XCL1/ATAC con quimiotaxis, mientras que los controles positivos respectivos indujeron la significativa migración de células en estas poblaciones de células (Fig 5). Estos experimentos demostraron que XCL1 induce la quimiotaxis en DC CD8⁺, pero no en DC CD8⁻, linfocitos T, linfocitos B, o células NK. Estos experimentos demostraron así que XCL1 actúa de adyuvante específico para APC portadora de XCR1.

Ejemplo 4: Captación de células/antígenos facilitada XCL1 en células dendríticas CD8⁺

Se generaron ratones deficientes para XCL1 ("ATAC-KO") por alteración del gen ATAC murino en células madre embrionarias por recombinación homóloga usando un vector de direccionamiento en el que los exones dos y tres del gen ATAC se sustituyeron por el gen de neomicina invertido (Fig. 6). Se usaron células madre embrionarias correctamente dirigidas, como se definió por transferencia Southern, para la generación de ratones quiméricos. Después de la transmisión de la línea germinal del alelo mutante y la cría de ratones deficientes en ATAC heterocigóticos juntos, nacieron ratones deficientes en ATAC homocigóticos a la frecuencia mendeliana esperada en la generación F₂ y se retrocruzaron con el acervo de C57BL/6 durante 10 generaciones. La línea murina de linfocitos pre-B 300-19 (Alt et al., 1981, Cell 27, 381-90) se transfirió por electroporación con el vector BCMGS_{neo} (Karasuyama et al., 1989, J Exp Med 169, 13-25) en el que la región codificante completa de XCL1 murino (Acc. de GenBank N°: NM_008510) se clonó por métodos convencionales. Después de subclonar en medio de selección que contenía G418, se obtuvo una línea celular (denominada muATAC/300-19) que secretó establemente XCL1/ATAC murino, como se ha determinado por citometría de flujo intracelular (Dorner et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 6181-86). Se marcaron con fluorescencia células 300-19 no mutantes ("wt/300-19") y células muATAC/300-19 por incubación con éster succinimidílico de 5,6-carboxifluoresceína 10 µM (CFSE, Molecular Probes) durante 10 min

a 37 °C, se lavaron y se inyectaron (10x10⁶ células cada uno) por vía intravenosa en ratones hembra C57BL/6 deficientes en XCL1 ("ATAC-KO"); los ratones de control se inyectaron con PBS solo. Después de 12 h, los ratones se sacrificaron, se retiraron los bazo y se aislaron los esplenocitos según métodos convencionales. Los esplenocitos se tiñeron para CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD19, MHC II y NK1.1 por métodos convencionales y la señal de CFSE se correlacionó con marcadores superficiales celulares por análisis en el citómetro de flujo LSR II (BD Biosciences) (el resultado se muestra en la Fig. 7) usando FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EE.UU.) para la evaluación de los datos. Los resultados demostraron que células 300-19 no mutantes ya fueron captadas por DC CD8⁺ en el bazo (Fig. 8A). Sin embargo, las células 300-19 transfectadas con XCL1 ("muATAC/300-19") se recogieron a un grado claramente mayor (aumento de aproximadamente el 50 %) (Fig. 8A). Estos resultados demostraron que XCL1 facilita la captación de antígeno por DC CD11c⁺CD8⁺. No se observó captación celular por DC esplénicas CD11c⁺CD8⁻ (Fig. 8B).

Ejemplo 5: Expresión de ATAC por linfocitos T CD4⁺ durante la inducción de tolerancia o inmunidad *in vivo*

Se transfirieron adoptivamente en ratones BALB/c singénicos células esplénicas que contenían 5-7x10⁶ linfocitos T CD4⁺ DO11.10 transgénicos KJ1-26⁺ (Murphy et al., 1990, Science 250, 1720-3). Estos linfocitos T CD4⁺ DO11.10 transgénicos son específicos para el péptido 323-339 (ISQAVHAAHAEINEAGR) de ovoalbúmina de pollo (OVA). Se inmunizaron ratones receptores con 100 µg de OVA, o 100 µg de OVA + el adyuvante LPS (10 µg) en las almohadillas plantares. Alternativamente, se inmunizaron ratones receptores con 2 mg de OVA inyectado por vía intravenosa. Se recuperaron linfocitos T CD4⁺ KJ1-26⁺ específicos de OVA de los receptores después de 14 h, 24 h o 48 h por citometría de citometría de flujo (pureza >97 %), ya fuera de los ganglios linfáticos poplíteos drenantes (en el caso de inyección de OVA en la almohadilla plantar), o de todos los ganglios linfáticos periféricos (en el caso de inyección intravenosa de OVA). Se aisló ARN total de los linfocitos T transgénicos recuperados y se sometió a análisis de expresión génica usando una matriz de baja densidad de TaqMan (Applied Biosystems). Los datos obtenidos se enumeran en la Tabla 2.

Los valores de Ct (un parámetro obtenido cuando se usa PCR cuantitativa) aumentaron en todos los sistemas experimentales a las 14, 24 y 48 h aproximadamente en un valor de 5, cuando se compararon con el control del momento de tiempo de 0 h. Este aumento representa un aumento de aproximadamente 30 veces en la expresión de ARNm de XCL1 tras la activación *in vivo* de los linfocitos T transgénicos en todas las condiciones experimentales. Estos datos indican que XCL1 se expresa y se utiliza por el sistema inmunitario, tanto en condiciones inmunogénicas así como tolerogénicas. Estos datos indican así que XCL1 se puede usar para la administración de una sustancia tanto para lograr la inmunidad/memoria (en presencia de una "señal de peligro") como para lograr la tolerancia (en ausencia de una "señal de peligro").

Tabla 2

tiempo	OVA s.c.		OVA + LPS s.c.		OVA i.v.	
	Ct promedio de ARN 18S	Ct de XCL1	Ct promedio de ARN 18S	Ct de XCL1	Ct promedio de ARN 18S	Ct de XCL1
0 h	7,55	33,94	7,55	33,94	7,55	33,94
14 h	8,59	29,02	10,04	33,91	8,25	27,64
24 h	7,20	28,99	9,53	n.d.	7,82	28,63
48 h	5,96	28,64	6,03	32,04	6,20	30,85

Ejemplo 6: Reconocimiento del antígeno mejorado mediado por XCL1 por linfocitos T CD8⁺ que interaccionan con DC CD8⁺ *in vivo*

Se retrocruzaron 10x ratones ATAC-KO (véase el Ejemplo 4) con el acervo C57BL/6 y entonces se retrocruzaron con ratones transgénicos OT-I ("OT-I ATAC-KO"). Los ratones transgénicos OT-I expresan un receptor de linfocitos T transgénico específico para el péptido SIINFELK (SEQ ID NO: 15) un epítipo de 8 aminoácidos de ovoalbúmina derivado de ovoalbúmina de pollo (OVA) (Hogquist et al., 1994, Cell 76, 17-27). Se transfirieron adoptivamente esplenocitos totales que contenían 2x10⁶ linfocitos T de OT-I en ratones receptores C57BL/6 singénicos por inyección intravenosa (i.v.). En paralelo, se transfirieron adoptivamente esplenocitos totales que contenían 2x10⁶ linfocitos T de OT-I ATAC-KO en ratones receptores C57BL/6 ATAC-KO singénicos. En todos los casos, se usaron ratones hembra donantes y receptores. Veinticuatro horas después de la transferencia celular, los ratones

receptores se expusieron a 100 ng de OVA conjugada con un anticuerpo anti-DEC205 ("DEC-205-OVA") para lograr una administración preferencial de antígeno para DC CD8⁺, como se describe previamente (Bonifaz et al., 2002, J. Exp. Med. 196, 1627-38).

5 Se generó DEC-205-OVA incubando 1 mg de mAb anti-DEC-205 NLDC-145 (obtenido de Georg Kraal, Ámsterdam) con 2 mg de OVA activada con SMCC según el protocolo del fabricante (Pierce Chemical Co.). Se realizó la precipitación de proteína G del reactivo para eliminar OVA no conjugada, y se determinó cuidadosamente la cantidad de OVA conjugada por mg de anticuerpo analizando geles de SDS no reductores teñidos con Coomassie. Se aplicó i.v. DEC-205-OVA en un volumen de 200 µl; los ratones de control recibieron PBS. Algunos ratones se inyectaron con DEC-205-OVA solo que, en ausencia de una "señal de peligro", tiene efectos tolerogénicos (Bonifaz et al., 2002, J. Exp. Med. 196, 1627-38). Otros ratones se inyectaron con DEC-205-OVA en combinación con 6 µg del anticuerpo anti-CD40 FGK (obtenido de Ton Rolink, Basilea), en el que el mAb anti-CD40 proporciona "señales de peligro" a DC (Bonifaz et al., 2002, J. Exp. Med. 196, 1627-38). Tres días después de la inyección de DEC-205-OVA, los ratones se sacrificaron y los esplenocitos se teñieron para expresión de CD3, CD8, CD90.1 y MHC II por métodos convencionales, y se analizaron en un citómetro de flujo LSR II usando el software FlowJo con el fin de determinar la presencia de linfocitos T de OT-I CD8⁺. Además, se incubaron *in vitro* esplenocitos de los ratones sacrificados con 50 ng/ml del péptido SIINFEKL en presencia de 5 µg/ml de Brefeldin A durante 5 h. Después de este periodo, se analizaron los linfocitos T de OT-I y linfocitos T de OT-I ATAC-KO para la secreción de IFN-γ por citometría de flujo intracelular según los métodos convencionales. Los resultados demostraron que en ausencia de XCL1, la interacción de linfocitos T CD8⁺ de OT-I con DC CD8⁺, ya fuera en condiciones tolerogénicas (sin mAb anti-CD40) o inmunogénicas (adición del mAb anti-CD40), conduce a la activación y expansión reducida de linfocitos T (Fig. 9). Al mismo tiempo, la ausencia de XCL1 conduce, ya sea en condiciones tolerogénicas o inmunogénicas, a diferenciación reducida de linfocitos T CD8⁺ en linfocitos T efectores que secretan IFN-γ (Fig 10). Ambos resultados demuestran los efectos activantes y adyuvantes de XCL1 sobre la interacción de DC CD8⁺ con linfocitos T CD8⁺.

Ejemplo 7: Generación de anticuerpos monoclonales contra XCR1 humano (hXCR1)

25 Se inmunizaron ratones BALB/c hembra con un péptido que representaba los primeros 31 aminoácidos del extremo N de HXCR1 (MESSGNPEST TFFYYDLQSQ PCENQAWVFA T; SEQ ID NO: 18). El extremo N del péptido se acopló a hemocianina de lapa californiana usando glutaraldehído (31-N-hXCR1-KLH; síntesis por P. Henklein, Charité, Berlín). Se realizó inmunización inicial con 31-N-hXCR1-KLH (30 µg administrados por vía intraperitoneal y 30 µg por vía subcutánea) en adyuvante completo de Freund. Los ratones se reforzaron dos veces después de intervalos de 3-4 semanas con 50 µg de 31-N-hXCR1-KLH en adyuvante incompleto de Freund administrado por vía intraperitoneal. Seis semanas después del segundo refuerzo, los ratones se inyectaron con el péptido 31-N-hXCR1 unido a albúmina de suero bovino (31-N-hXCR1-BSA) por vía intravenosa (50 µg) en solución salina. Tres días después, los ratones se sacrificaron y las células del bazo se fusionaron con la línea de mieloma P3X63Ag8.653 según protocolos convencionales para la generación de anticuerpos monoclonales. Se realizó el cribado de los sobrenadantes de hibridomas usando el péptido 31-N-hXCR1 sin acoplar adsorbido a placas de 96 pocillos en un ensayo estándar de ELISA. Un hibridoma (6F8) dio una señal fuerte y coherente en el ensayo de ELISA; por tanto, se subclonó el hibridoma y se usó el anticuerpo 6F6 para la caracterización adicional de hXCR1. Para este fin, se generaron varios transfectantes de hXCR1 clonando la región codificante entera de hXCR1/hATACR (Acc. de GenBank N°: L36149) en el vector BCMGS_{neo} (arriba) de tal forma que no estuviera ni en el 3' ni en el extremo 5' marcado con un epítipo c-myc EQKLISEEDL (SEQ ID NO: 19). Posteriormente, se transfectó por electroporación la línea de mieloma murino P3X63Ag8.653 con cualquier versión del vector y las dos líneas celulares transfectadas "5'c-myc/hATACR/P3X" y "3'c-myc/hATACR/P3X" se establecieron después de la subclonación en medio de selección que contenía G418. En los estudios también se incluyó la línea celular murina transfectada con hXCR1 obtenida del Dr. Bernhard Moser, Berna, Suiza ("hATACR/300-19"). Se usaron los sobrenadantes del mAb 6F8 para inmunoprecipitar la proteína hXCR1 de diversas líneas celulares (Fig. 11). Para este fin, se generaron lisados de los transfectantes "5'c-myc/hATACR/P3X", "3'c-myc/hATACR/P3X" y "hATACR/300-19", y las líneas no mutantes respectivas de 5-10x10⁶ células cada una según métodos convencionales (tampón de lisis: Tris/HCl 50 mM (pH 8), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, + 1 % (v/v) de Nonident P-40, PMSF 1 mM, leupeptina A 10 µM, pepstatina 1 µM, 10 µg/ml de aprotinina). Estos lisados, después de aclararse previamente, se incubaron con sobrenadante del mAb 6F8 (5-10 ml), y se inmunoprecipitaron con perlas de proteína G según métodos convencionales. El inmunoprecipitado se desnaturalizó en tampón SDS, se separó sobre un gel de SDS reductor al 12 % y se electrotransfirió sobre una membrana Immobilon P (Millipore) según métodos convencionales. La transferencia se teñió con un suero policlonal de conejo anti-hXCR1 (generado contra un péptido que representa el extremo N de hXCR1, MESSGNPEST TFFYYDLQSQ PCENQAWVFA T, SEQ ID NO: 18, usando un protocolo estándar) diluido 1:2500 en tampón de bloqueo y se desarrolló usando cabra-anti-IgG de conejo acoplado a biotina (1:5000 en tampón de bloqueo), avidina-fosfatasa alcalina y el sistema de detección Western Light/CDP-Star (Tropix). La detección de la señal de luz se hizo con la película XOMatAR (Kodak). El suero de conejo anti-hXCR1 se había generado inmunizando conejos 3x con 250 µg del péptido 31-N-hXCR1 en adyuvante completo de Freund durante un periodo de 11 semanas.

60 **Ejemplo 8: Generación de XCL1 murino recombinante en su forma biológicamente activa**

Se genera *in vivo* XCL1 murino nativo por eliminación proteolítica de un péptido señal, dando como resultado una proteína con valina del extremo N (Dorner et al., 1997, J. Biol. Chem. 272, 8817-23). Para generar un XCL1 murino recombinante correspondiente a partir de la valina del extremo N, se fusionaron los aminoácidos 22-114 de ATAC murino de longitud completa con el extremo C de una proteína SUMO marcada con histidina usando tecnología estándar de ADN recombinante y el vector de expresión pET SUMO (Invitrogen, Groningen, Países Bajos). La proteína de fusión se expresó en *E. coli* usando protocolos convencionales y se purificó por cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (Ni-NTA Superflow, Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante. Se logró la escisión específica de sitio de la proteína de fusión por incubación con la proteasa SUMO (Invitrogen) durante 3 h a 37 °C. Se realizó una segunda etapa de cromatografía de afinidad por metal inmovilizado para eliminar la parte de fusión de SUMO marcada con histidina. Usando este protocolo, se generó una forma biológicamente activa de la proteína XCL1 murina recombinante con alto rendimiento y pureza (Fig. 12).

Ejemplo 9: Citotoxicidad potenciada por WT OT-I en comparación con ATAC-KO OT-I

Se purificaron linfocitos T CD8⁺ transgénicos específicos para el péptido OVA de esplenocitos de ratones OT-I o ATAC-KO OT-I por agotamiento magnético de otras poblaciones de células esplénicas usando anticuerpos contra CD4, CD11b, CD11c, NK1.1 y B220. Se transfirieron adoptivamente linfocitos T de OT-I u OT-I ATAC-KO (3 x10⁵) en ratones C57BL/6 o ATAC-KO singénicos, respectivamente. Ambos grupos de ratones se inmunizaron 24 h después con 3 x10⁶ células 300-19 transfectadas con OVA ("OVA/300-19"). Se generaron células OVA/300-19 por electroporación de células 300-19 no mutantes con el vector BCMGS_{neo} (Karasuyama et al., 1989, J Exp Med 169, 13-25) en el que se clonó una región codificante truncada de OVA (correspondiente a los aminoácidos 138-386; Acc. de GenBank N^o: NM_205152) por métodos convencionales. En el día 6 después de la inmunización con OVA/células 300-19, se realizó un ensayo de citotoxicidad *in vivo* como se ha descrito previamente (Romano et al., 2004, J. Immunol. 172, 6913-6921). Brevemente, se aislaron esplenocitos de ratones C57BL/6 y se incubaron durante 1 h a 37 °C, ya fuera en medio solo o en presencia de 10 μM del péptido de OVA específico SIINFEKL. Después de lavar, se marcaron las células pulsadas con péptido con éster succinimidílico de diacetato de 5,6-carboxifluoresceína 10 μM (CSFE, Molecular Probes, Oregon, EE.UU.), mientras que las células no pulsadas se marcaron con CSFE 1 μM. Se inyectaron cantidades iguales de esplenocitos CSFE-bajo y CSFE-alto/SIINFEKL (10 x10⁶ células cada uno) en los ratones inmunizados con OVA/300-19 y se determinó la abundancia relativa de esplenocitos CSFE-bajo y CSFE-alto/SIINFEKL sobrevivientes por citometría de flujo 18 h después. Se calculó la citotoxicidad específica de OVA como se ha descrito (Hernandez et al., 2007, J. Immunol. 178, 2844-2852). La inyección de OVA/células 300-19 indujo 32 ± 4 % de citotoxicidad específica de OVA en presencia de linfocitos T de OT-I, pero solo el 14 ± 10 % de citotoxicidad en presencia de linfocitos T de ATAC-KO OT-I (Fig. 13). La inmunización de control de ratones con células 300-19 no mutantes no indujo citotoxicidad por linfocitos T de OT-I transferidos. Este experimento demuestra que ATAC actúa de adyuvante en la inducción de citotoxicidad de linfocitos T CD8⁺.

Ejemplo 10: La expresión de XCR1 *in vivo* está limitada a una subpoblación de DC

Se analizaron tejidos de órgano de ratones B6.129P2-Xcr1^{tm1Dgen}/J (The Jackson Laboratory, Maine, EE.UU.), en el que el gen ATAC se ha sustituido por un gen indicador lacZ ("activado") para la actividad de β-galactosidasa *in situ*. Para este fin, se sumergieron trozos de órganos en 0,1 % de glutaraldehído y 4 % de paraformaldehído en PBS durante 4 h a 4 °C, se incubaron en 10 % de sacarosa/PBS a 4 °C durante la noche, y se ultracongelaron. Se volvieron a fijar los criocortes de los tejidos en 0,1 % de glutaraldehído y 4 % de paraformaldehído en PBS durante 10 min a TA, se lavaron 3x con PBS frío (pH 7,4) durante 5 min, se incubaron con disolución de tinción X-Gal (Sanes et al., 1986, EMBO J. 5, 3133-3142) durante la noche a 37 °C, se lavaron 3x en PBS y contratñeron por rojo neutro.

Se observó la expresión de lacZ (y así el gen XCR1) en el bazo, timo, ganglios linfáticos, pulmón, hígado, testículo, ovario, placenta, parches de Peyer, intestino delgado e intestino grueso.) En el bazo, las señales obtenidas correspondieron al patrón de distribución de DC CD8⁺. En los otros órganos la abundancia (normalmente baja), la morfología y la distribución en tejido de las señales fueron completamente compatibles con el concepto de una expresión de XCR1 limitada a una subpoblación de DC.

Ejemplo 11: Expresión de XCR1 en esplenocitos murinos analizados por citometría de flujo

Se aislaron esplenocitos de ratones B6.129P2-Xcr1^{tm1Dgen}/J y se tiñeron para CD3, CD4, CD8, CD19, CD11c, MHC II y NK1.1 por métodos convencionales. Se detectó la expresión del gen indicador lacZ, ensayada con di-β-D-galactopiranosido de fluoresceína (FDG, Invitrogen) según el protocolo del fabricante en el 7 %-10 % de DC CD4⁻CD8⁻ y en el 75 %-90 % de DC CD8⁺, pero no en DC CD4⁺ (Fig. 14). Todas las otras poblaciones esplénicas fueron negativas. Estos resultados demuestran que XCR1 solo se expresa, dentro del sistema inmunitario, en una subpoblación de DC, que en el bazo lleva principalmente el marcador superficial de células CD8.

Listado de secuencias

<110> República Federal de Alemania, representado por el

ES 2 684 557 T3

Instituto Robert-Koch, representado por su presidente

<120> Sistema para la liberación en una célula XCR1 positiva y usos del mismo

5 <130> R65205PC

<160> 19

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 114

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Arg Leu Leu Ile Leu Ala Leu Leu Gly Ile Cys Ser Leu Thr Ala
1 5 10 15

Tyr Ile Val Glu Gly Val Gly Ser Glu Val Ser Asp Lys Arg Thr Cys
20 25 30

Val Ser Leu Thr Thr Gln Arg Leu Pro Val Ser Arg Ile Lys Thr Tyr
35 40 45

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

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

Val Arg Ser Met Asp Arg Lys Ser Asn Thr Arg Asn Asn Met Ile Gln
85 90 95

Thr Lys Pro Thr Gly Thr Gln Gln Ser Thr Asn Thr Ala Val Thr Leu
100 105 110

Thr Gly

20 <210> 2

<211> 114

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

25 <400> 2

Met Arg Leu Leu Leu Leu Thr Phe Leu Gly Val Cys Cys Leu Thr Pro
1 5 10 15

Trp Val Val Glu Gly Val Gly Thr Glu Val Leu Glu Glu Ser Ser Cys
20 25 30

Val Asn Leu Gln Thr Gln Arg Leu Pro Val Gln Lys Ile Lys Thr Tyr

ES 2 684 557 T3

35 40 45
 Ile Ile Trp Glu Gly Ala Met Arg Ala Val Ile Phe Val Thr Lys Arg
 50 55 60
 Gly Leu Lys Ile Cys Ala Asp Pro Glu Ala Lys Trp Val Lys Ala Ala
 65 70 75 80
 Ile Lys Thr Val Asp Gly Arg Ala Ser Thr Arg Lys Asn Met Ala Glu
 85 90 95
 Thr Val Pro Thr Gly Ala Gln Arg Ser Thr Ser Thr Ala Ile Thr Leu
 100 105 110

Thr Gly

<210> 3
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

5

<400> 3

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

Thr Gly

<210> 4
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> *Virus del herpes humano 8*

10

15

<400> 4

ES 2 684 557 T3

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

Cys Pro

5 <210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia consenso

15 <220>
 <221> Xaa
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = S o N

20 <220>
 <221> Xaa
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido

25 <220>
 <221> Xaa
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = T o S

30 <220>
 <221> Xaa
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = Q o A

35 <220>
 <221> Xaa
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa = V o P

<220>
 <221> Xaa
 <222> (10)..(10)

ES 2 684 557 T3

<223> Xaa = R o S

<220>
 <221> Xaa
 5 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa = L o R

<220>
 <221> Xaa
 10 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa = K o R

<220>
 <221> Xaa
 15 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa = I o V

<220>
 <221> Xaa
 20 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa = A o G

<220>
 <221> Xaa
 25 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa = D o S

<400> 6

Xaa Ala Val Ile Phe Xaa Thr Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
 1 5 10 15

30 Pro

<210> 7
 <211> 58
 <212> PRT
 35 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia consenso

<220>
 <221> Xaa
 40 <222> (1)..(57)
 <223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido

45 <400> 7

Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Leu Xaa Xaa Xaa Arg Leu Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr
 20 25 30

Xaa Ala Val Ile Phe Xaa Thr
 35 40 45

Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Pro
 50 55

<210> 8

	<211> 58
	<212> PRT
	<213> Artificial
5	<220> <223> secuencia consenso
	<220>
10	<221> Xaa <222> (1)..(1) <223> Xaa = V o S
	<220>
15	<221> Xaa <222> (3)..(3) <223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido
	<220>
20	<221> Xaa <222> (4)..(4) <223> Xaa = E o A
	<220>
25	<221> Xaa <222> (5)..(5) <223> Xaa = V o T
	<220>
30	<221> Xaa <222> (6)..(12) <223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido
	<220>
35	<221> Xaa <222> (14)..(14) <223> Xaa = V o E
	<220>
40	<221> Xaa <222> (15)..(15) <223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido
	<220>
45	<221> Xaa <222> (16)..(16) <223> Xaa = S o N
	<220>
50	<221> Xaa <222> (18)..(18) <223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido
	<220>
55	<221> Xaa <222> (19)..(19) <223> Xaa = T o S
	<220>
60	<221> Xaa <222> (20)..(20) <223> Xaa = Q o A
	<220>
65	<221> Xaa <222> (24)..(24)

- <223> Xaa = V o P
- 5
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido
- 10
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa = K o R
- 15
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa = I o L
- 20
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa = K o I
- 25
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido
- 30
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa = T o G
- 35
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido
- 40
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido
- 45
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa = I o T
- 50
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido
- 55
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (36)..(36)
 <223> Xaa = E o T
- 60
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (37)..(37)
 <223> Xaa = G o V
- 65
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (38)..(41)
 <223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido

ES 2 684 557 T3

5
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (42)..(42)
 <223> Xaa = R o K

10
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (47)..(47)
 <223> Xaa = V o I

15
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (49)..(49)
 <223> Xaa = K o H

20
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (50)..(50)
 <223> Xaa = R o S

25
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (52)..(52)
 <223> Xaa = L o R

30
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (53)..(53)
 <223> Xaa = K o R

35
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (54)..(54)
 <223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido

40
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (56)..(56)
 <223> Xaa = A o G

45
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (57)..(57)
 <223> Xaa = D o S

<400> 8

Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Leu Xaa Xaa Xaa Arg Leu Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Val Ile Phe Xaa Thr
 35 40 45

Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Pro
 50 55

50
 <210> 9
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Artificial

- <220>
<223> secuencia consenso
- 5 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 10 <220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(10)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 15 <220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 20 <220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 25 <220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 30 <220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 35 <220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 40 <220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(34)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 45 <220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(40)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 50 <220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(47)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 55 <220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(52)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 60 <220>
<221 > misc_feature
<222> (54)..(54)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 65 <220>
<221> misc_feature
<222> (57)..(63)

ES 2 684 557 T3

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (65)..(75)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (77)..(77)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (80)..(81)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (83)..(83)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (85)..(86)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (89)..(89)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 9

Val Gly Xaa Glu Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Val Xaa Leu Xaa Thr
 1 5 10 15

Gln Arg Leu Pro Val Xaa Xaa Ile Lys Thr Tyr Xaa Ile Xaa Glu Gly
 20 25 30

Xaa Xaa Arg Ala Val Ile Phe Xaa Thr Lys Arg Gly Leu Xaa Xaa Cys
 35 40 45

Ala Asp Pro Xaa Ala Xaa Trp Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp
 50 55 60

Xaa Thr Xaa Pro Thr Xaa
 65 70 75 80

Xaa Gln Xaa Ser Xaa Xaa Thr Ala Xaa Thr Leu Thr Gly
 85 90

<210> 10
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia consenso

<220>

	<221> Xaa <222> (3)..(3) <223> Xaa = T o S
5	<220> <221> Xaa <222> (6)..(6) <223> Xaa = L o S
10	<220> <221> Xaa <222> (7)..(7) <223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido
15	<220> <221> Xaa <222> (8)..(8) <223> Xaa = E o K
20	<220> <221> Xaa <222> (9)..(9) <223> Xaa = S o R
25	<220> <221> Xaa <222> (10)..(10) <223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido
30	<220> <221> Xaa <222> (13)..(13) <223> Xaa = S o N
35	<220> <221> Xaa <222> (15)..(15) <223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido
40	<220> <221> Xaa <222> (22)..(22) <223> Xaa = Q o S
45	<220> <221> Xaa <222> (23)..(23) <223> Xaa = K o R
50	<220> <221> Xaa <222> (28)..(28) <223> Xaa = T o I
55	<220> <221> Xaa <222> (30)..(30) <223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido
60	<220> <221> Xaa <222> (33)..(33) <223> Xaa = A o S
65	<220> <221> Xaa

	<222> (34)..(34)
	<223> Xaa = M o L
5	<220> <221> Xaa <222> (40)..(40) <223> Xaa = V o I
10	<220> <221> Xaa <222> (46)..(46) <223> Xaa = K o R
15	<220> <221> Xaa <222> (47)..(47) <223> Xaa = I o V
20	<220> <221> Xaa <222> (52)..(52) <223> Xaa = Q o E
25	<220> <221> Xaa <222> (54)..(54) <223> Xaa = K o T
30	<220> <221> Xaa <222> (57)..(57) <223> Xaa = K o R
35	<220> <221> Xaa <222> (58)..(58) <223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido
40	<220> <221> Xaa <222> (59)..(59) <223> Xaa = A o V
45	<220> <221> Xaa <222> (60)..(60) <223> Xaa = I o V
50	<220> <221> Xaa <222> (61)..(61) <223> Xaa = K o R
55	<220> <221> Xaa <222> (62)..(62) <223> Xaa = T o S
60	<220> <221> Xaa <222> (63)..(63) <223> Xaa = V o M
65	<220> <221> Xaa <222> (65)..(65)

	<223> Xaa = G o R
	<220>
	<221> Xaa
5	<222> (66)..(66)
	<223> Xaa = R o K
	<220>
	<221> Xaa
10	<222> (67)..(67)
	<223> Xaa = A o S
	<220>
	<221> Xaa
15	<222> (68)..(68)
	<223> Xaa = S o N
	<220>
	<221> Xaa
20	<222> (69)..(69)
	<223> Xaa = T o A
	<220>
	<221> Xaa
25	<222> (70)..(70)
	<223> Xaa = R o S
	<220>
	<221> Xaa
30	<222> (71)..(71)
	<223> Xaa = K o N
	<220>
	<221> Xaa
35	<222> (72)..(72)
	<223> Xaa = N o S
	<220>
	<221> Xaa
40	<222> (73)..(73)
	<223> Xaa = M o K
	<220>
	<221> Xaa
45	<222> (74)..(74)
	<223> Xaa = A o I
	<220>
	<221> Xaa
50	<222> (75)..(75)
	<223> Xaa = E o Q
	<220>
	<221> Xaa
55	<222> (77)..(77)
	<223> Xaa = cualquiera o ningún aminoácido
	<220>
	<221> Xaa
60	<222> (80)..(80)
	<223> Xaa = G o Q
	<220>
	<221> Xaa
65	<222> (81)..(81)
	<223> Xaa = A o T

ES 2 684 557 T3

<220>
 <221> Xaa
 <222> (83)..(83)
 <223> Xaa = R o Q
 5

<220>
 <221> Xaa
 <222> (85)..(85)
 <223> Xaa = T o A
 10

<220>
 <221> Xaa
 <222> (86)..(86)
 <223> Xaa = S o N
 15

<220>
 <221> Xaa
 <222> (89)..(89)
 <223> Xaa = V o I
 20

<400> 10
 Val Gly Xaa Glu Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Val Xaa Leu Xaa Thr
 1 5 10 15
 Gln Arg Leu Pro Val Xaa Xaa Ile Lys Thr Tyr Xaa Ile Xaa Glu Gly
 20 25 30
 Xaa Xaa Arg Ala Val Ile Phe Xaa Thr Lys Arg Gly Leu Xaa Xaa Cys
 35 40 45
 Ala Asp Pro Xaa Ala Xaa Trp Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp
 50 55 60
 Xaa Thr Xaa Pro Thr Xaa
 65 70 75 80
 Xaa Gln Xaa Ser Xaa Xaa Thr Ala Xaa Thr Leu Thr Gly
 85 90

<210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25

<220>
 <223> cebador directo
 <400> 11
 tgcctgtgtt gatctcagca c 21
 30 35

<210> 12
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40

<220>
 <223> cebador inverso
 <400> 12
 cggatgatgg tcatgatgg 19
 45

ES 2 684 557 T3

5
 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador directo
 <400> 13
 10 cgctcgggtga ccctagtctt t 21

15
 <210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador inverso
 20 <400> 14
 ttcagtatgt tcggcttccc a 21

25
 <210> 15
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido OVA
 30 <400> 15

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
 1 5

35
 <210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> péptido OVA
 <400> 16

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
 1 5 10 15

45 Arg
 <210> 17
 <211> 333
 <212> PRT
 50 <213> *Homo sapiens*
 <400> 17

Met Glu Ser Ser Gly Asn Pro Glu Ser Thr Thr Phe Phe Tyr Tyr Asp
 1 5 10 15

Leu Gln Ser Gln Pro Cys Glu Asn Gln Ala Trp Val Phe Ala Thr Leu
 20 25 30

ES 2 684 557 T3

Ala Thr Thr Val Leu Tyr Cys Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Val Gly
35 40 45

Asn Ser Leu Val Leu Trp Val Leu Val Lys Tyr Glu Ser Leu Glu Ser
50 55 60

Leu Thr Asn Ile Phe Ile Leu Asn Leu Cys Leu Ser Asp Leu Val Phe
65 70 75 80

Ala Cys Leu Leu Pro Val Trp Ile Ser Pro Tyr His Trp Gly Trp Val
85 90 95

Leu Gly Asp Phe Leu Cys Lys Leu Leu Asn Met Ile Phe Ser Ile Ser
100 105 110

Leu Tyr Ser Ser Ile Phe Phe Leu Thr Ile Met Thr Ile His Arg Tyr
115 120 125

Leu Ser Val Val Ser Pro Leu Ser Thr Leu Arg Val Pro Thr Leu Arg
130 135 140

Cys Arg Val Leu Val Thr Met Ala Val Trp Val Ala Ser Ile Leu Ser
145 150 155 160

Ser Ile Leu Asp Thr Ile Phe His Lys Val Leu Ser Ser Gly Cys Asp
165 170 175

Tyr Ser Glu Leu Thr Trp Tyr Leu Thr Ser Val Tyr Gln His Asn Leu
180 185 190

Phe Phe Leu Leu Ser Leu Gly Ile Ile Leu Phe Cys Tyr Val Glu Ile
195 200 205

Leu Arg Thr Leu Phe Arg Ser Arg Ser Lys Arg Arg His Arg Thr Val
210 215 220

Lys Leu Ile Phe Ala Ile Val Val Ala Tyr Phe Leu Ser Trp Gly Pro
225 230 235 240

Tyr Asn Phe Thr Leu Phe Leu Gln Thr Leu Phe Arg Thr Gln Ile Ile
245 250 255

Arg Ser Cys Glu Ala Lys Gln Gln Leu Glu Tyr Ala Leu Leu Ile Cys
260 265 270

Arg Asn Leu Ala Phe Ser His Cys Cys Phe Asn Pro Val Leu Tyr Val
275 280 285

Phe Val Gly Val Lys Phe Arg Thr His Leu Lys His Val Leu Arg Gln
290 295 300

ES 2 684 557 T3

Phe Trp Phe Cys Arg Leu Gln Ala Pro Ser Pro Ala Ser Ile Pro His
305 310 315 320

Ser Pro Gly Ala Phe Ala Tyr Glu Gly Ala Ser Phe Tyr
325 330

5
<210> 18
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial

10
<220>
<223> 31 aminoácidos del extremo N de XCR1 humano
<400> 18

Met Glu Ser Ser Gly Asn Pro Glu Ser Thr Thr Phe Phe Tyr Tyr Asp
1 5 10 15

Leu Gln Ser Gln Pro Cys Glu Asn Gln Ala Trp Val Phe Ala Thr
20 25 30

15
<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

20
<220>
<223> epítoto c-myc
<400> 19

25
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Uso de un sistema de liberación para administrar una sustancia en una célula presentadora de antígenos profesional XCR1 positiva *in vitro*, comprendiendo el sistema de liberación
- 5 i) una molécula que se une al receptor de quimiocina (motivo C) 1 (XCR1), en la que la molécula i) es un anticuerpo anti-XCR1 o un fragmento del mismo o es un ligando de quimiocina (motivo C) 1 (XCL1) o una variante funcionalmente activa del mismo, y
 ii) una sustancia que se va a liberar, siendo la sustancia un inmunogén,
- en el que sustancia se une a la molécula covalentemente y en el que la variante funcionalmente activa de XCL1
- 10 - se diferencia de XCL1 de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 4 por como máximo 20 deleciones de aminoácidos o
 - tiene al menos el 80 % de identidad de secuencia con XCL1 de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 4 o
 - es un fragmento funcionalmente activo de XCL1 que comprende o que consiste en la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 7 a 10,
- en la que la célula es una célula dendrítica.
- 15 2. El uso de la reivindicación 1, en el que la variante funcionalmente activa de XCL1 es un fragmento funcionalmente activo de XCL1 que comprende o que consiste en SEQ ID NO: 8 a 10, preferentemente de SEQ ID NO: 9 o 10, especialmente de SEQ ID NO: 10.
3. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la molécula i) es un anticuerpo anti-XCR1 o fragmento del mismo.
4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la molécula i) es un (poli)péptido.
- 20 5. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el inmunogén es un tolerógeno.
6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende además
- iii) un adyuvante, particularmente una "señal de peligro".
7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la molécula i), la sustancia ii) y opcionalmente el adyuvante iii) son uno o más (poli)péptido(s).
- 25 8. El uso de la reivindicación 6 o 7, en el que el adyuvante iii) se une al sistema de liberación que comprende la molécula i) y la sustancia ii) covalentemente o no covalentemente.
9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el sistema de liberación es capaz de mediar en la presentación de la sustancia o un fragmento de la misma como antígeno por las células presentadoras de antígenos profesionales XCR1 positivas en un sujeto, particularmente por una molécula de clase I del complejo mayor de
- 30 histocompatibilidad (MHC).
10. Un medicamento que comprende el sistema de liberación como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o uno o más ácidos nucleicos que codifican el sistema de liberación como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en el que el sistema de liberación está compuesto por el (los) (poli)péptido(s), en el que el medicamento es para su uso como una vacuna.
- 35 11. El medicamento como se define en la reivindicación 10 para su uso en un método de inducción de una respuesta inmunitaria de memoria contra el péptido, particularmente en el que la respuesta inmunitaria de memoria es una respuesta Th1, especialmente una respuesta citotóxica Th1, particularmente para prevenir o tratar un tumor y/o una infección.
- 40 12. El medicamento como se define en la reivindicación 10 para su uso en un método de inducción de tolerancia contra el (poli)péptido, particularmente para inhibir el rechazo de trasplante, una alergia y/o una enfermedad autoinmunitaria.

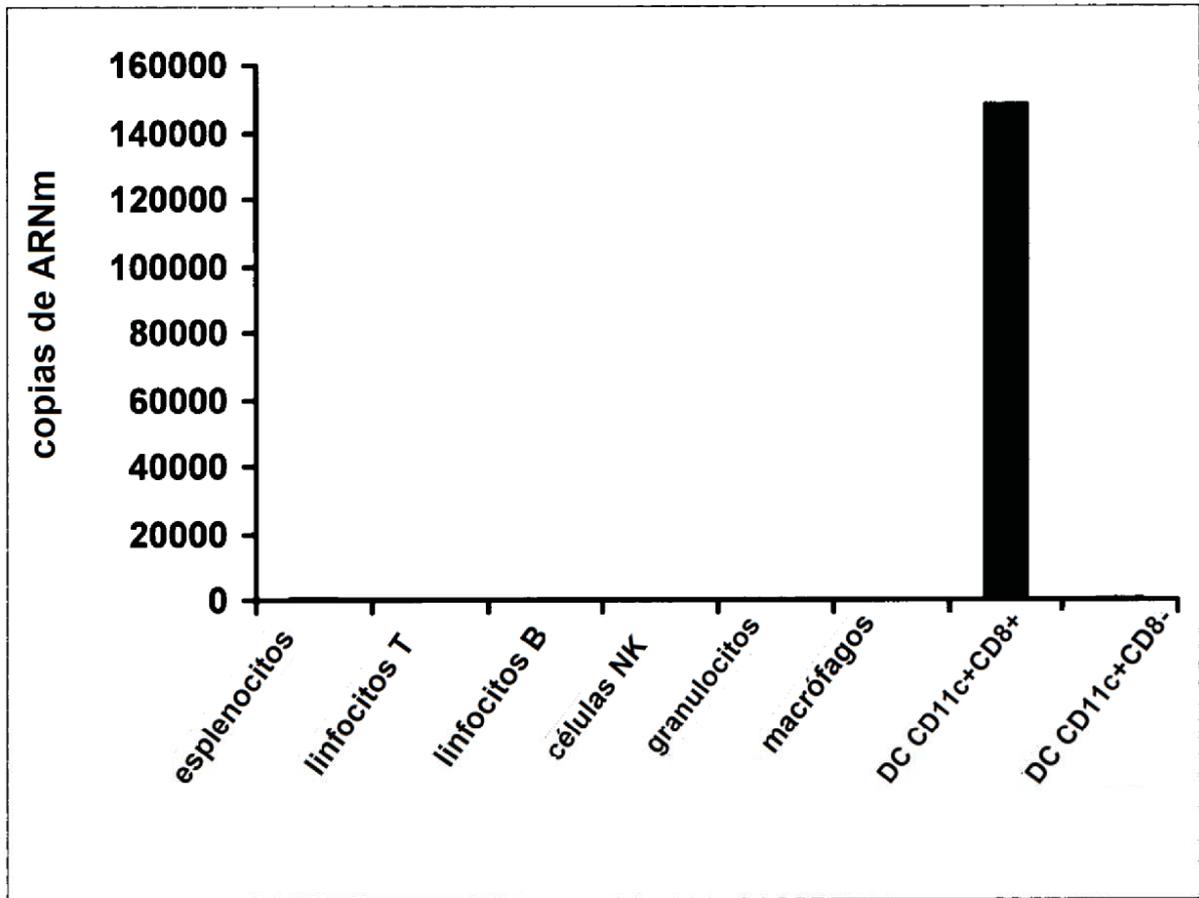


Fig. 1

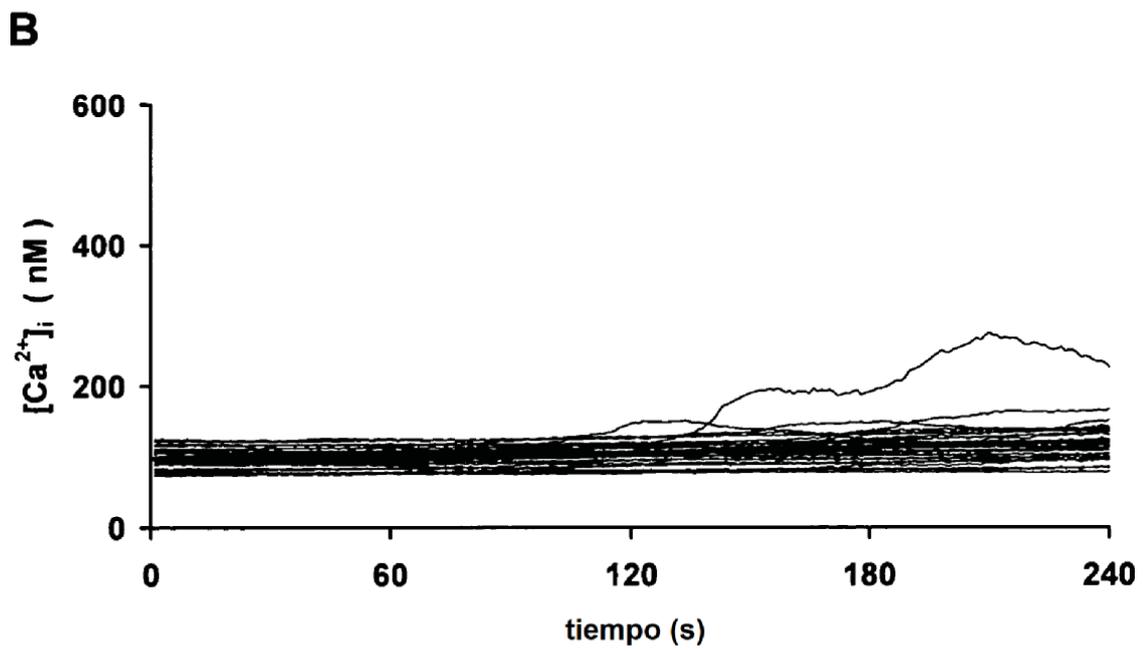
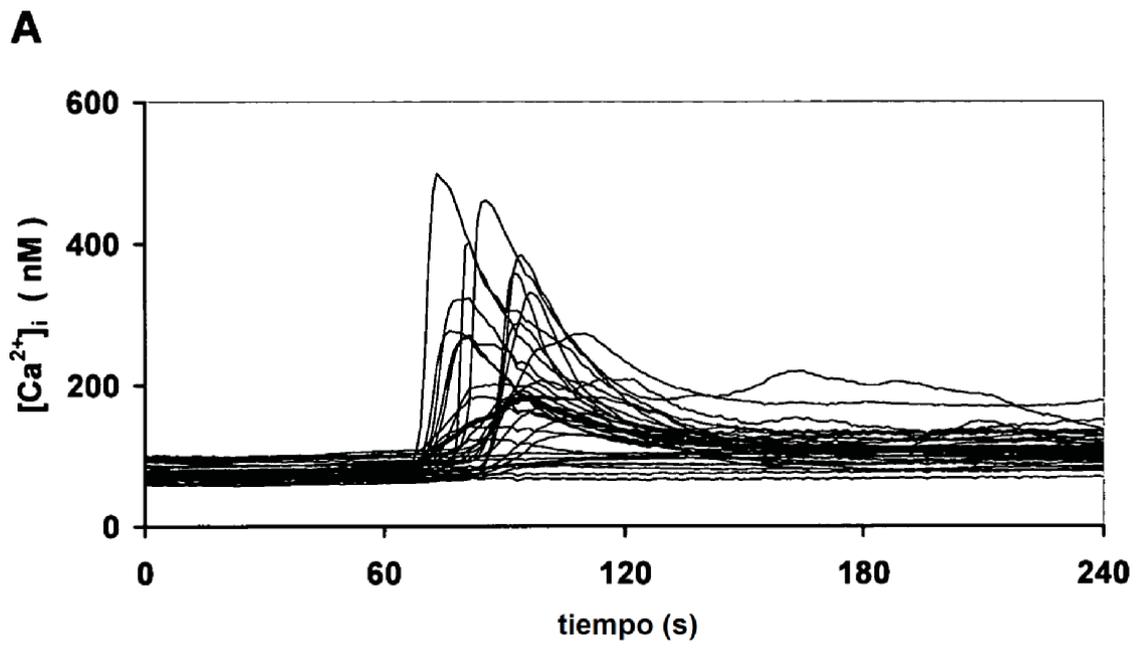


Fig. 2

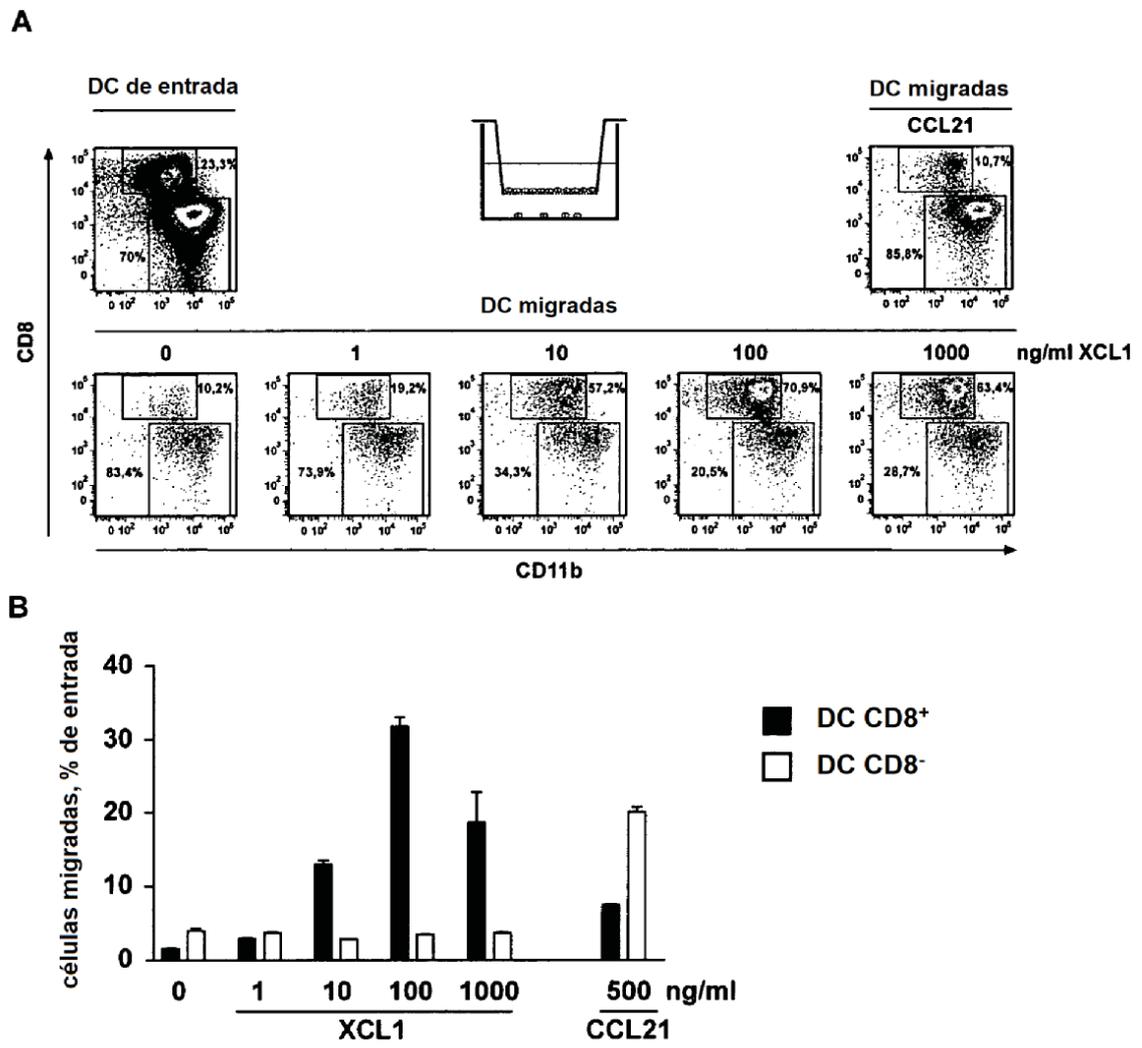


Fig. 3

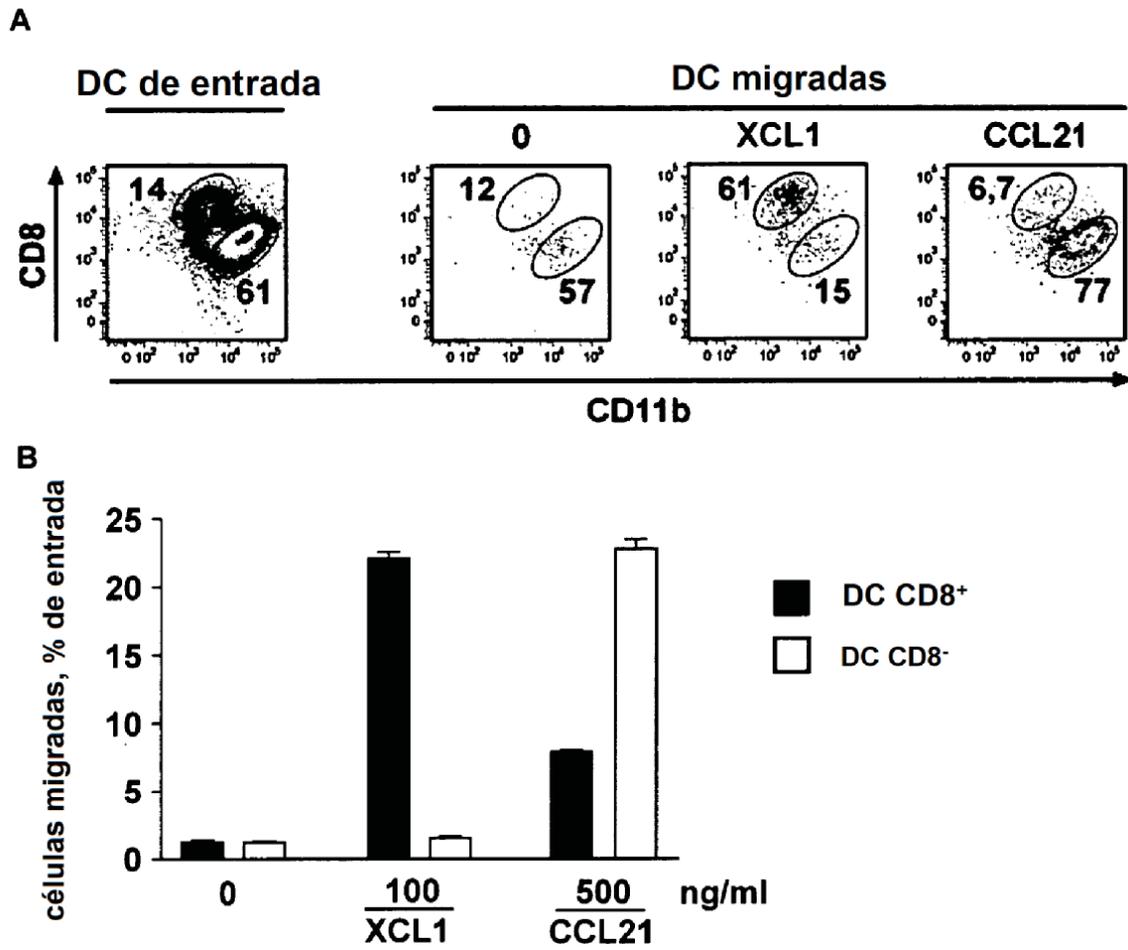


Fig. 4

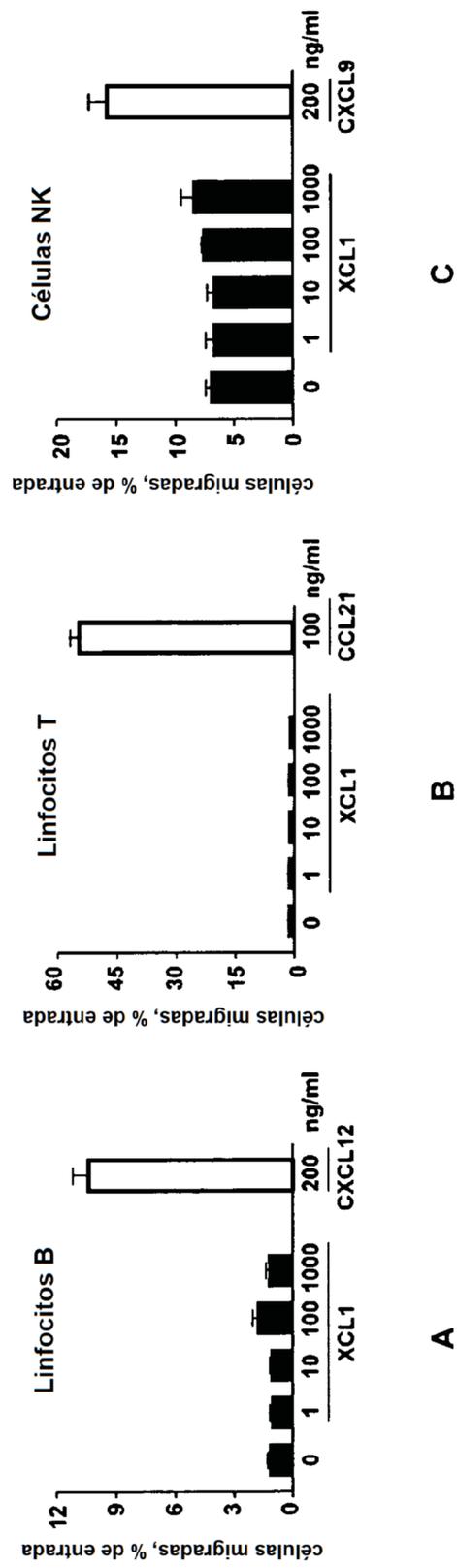


Fig. 5

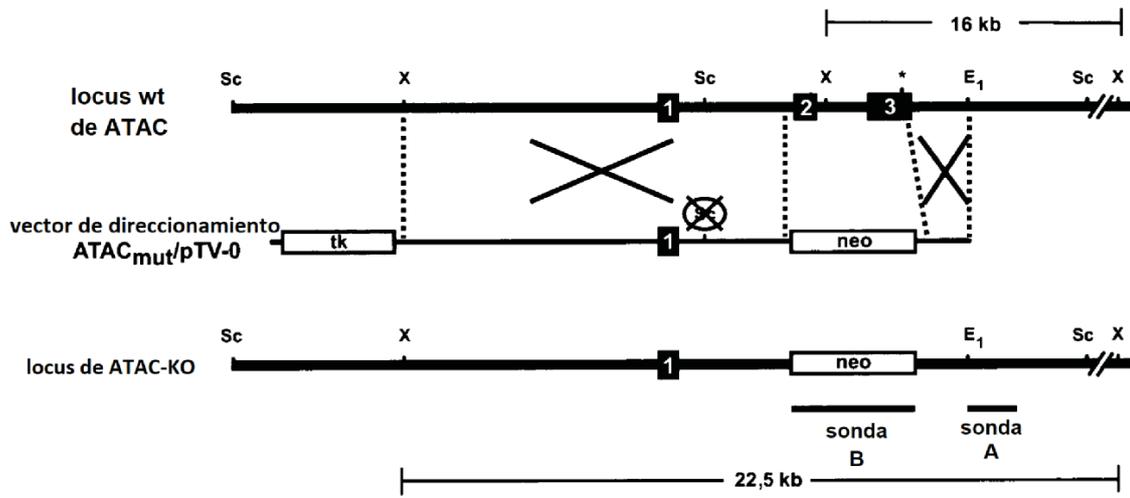


Fig. 6

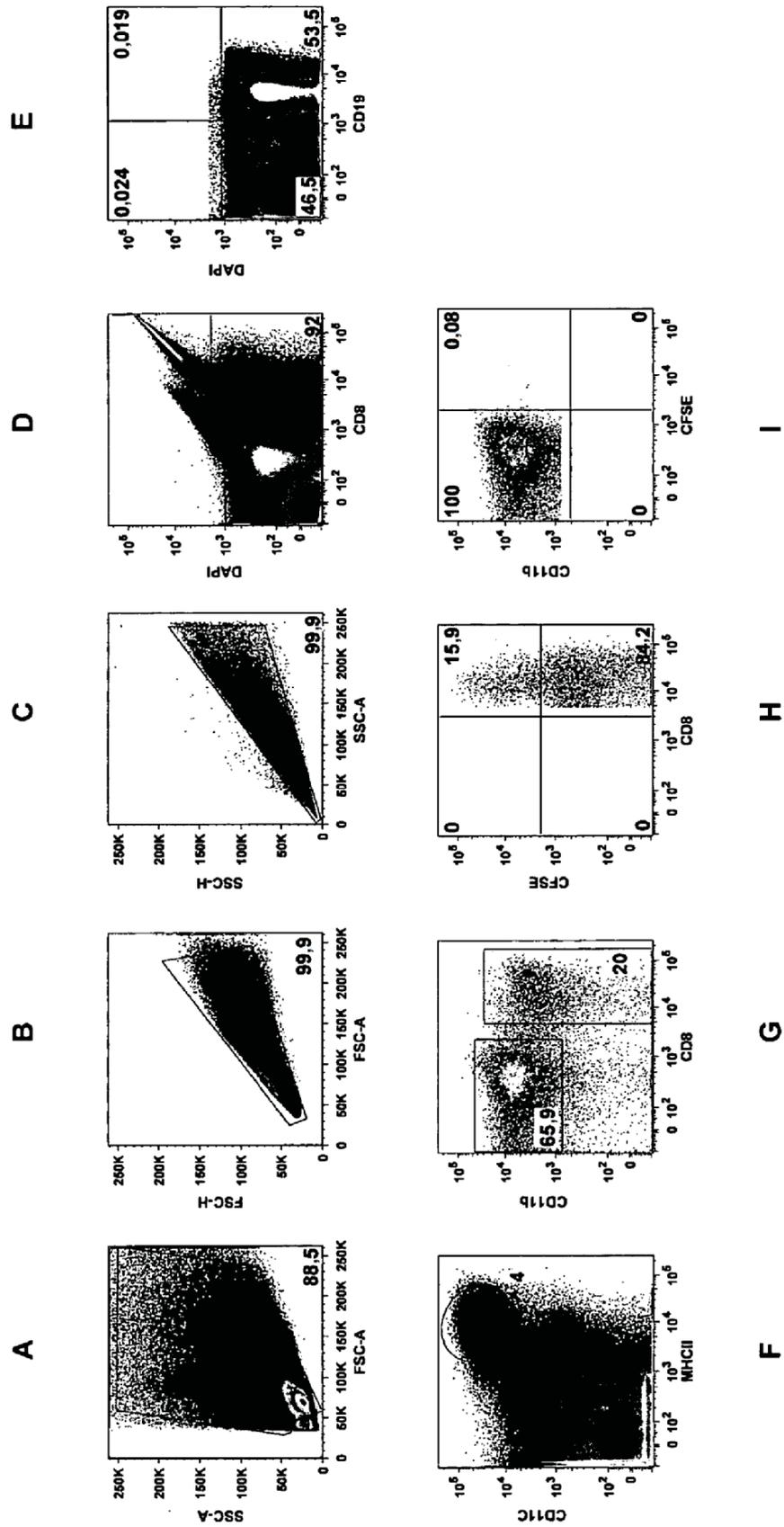


Fig. 7

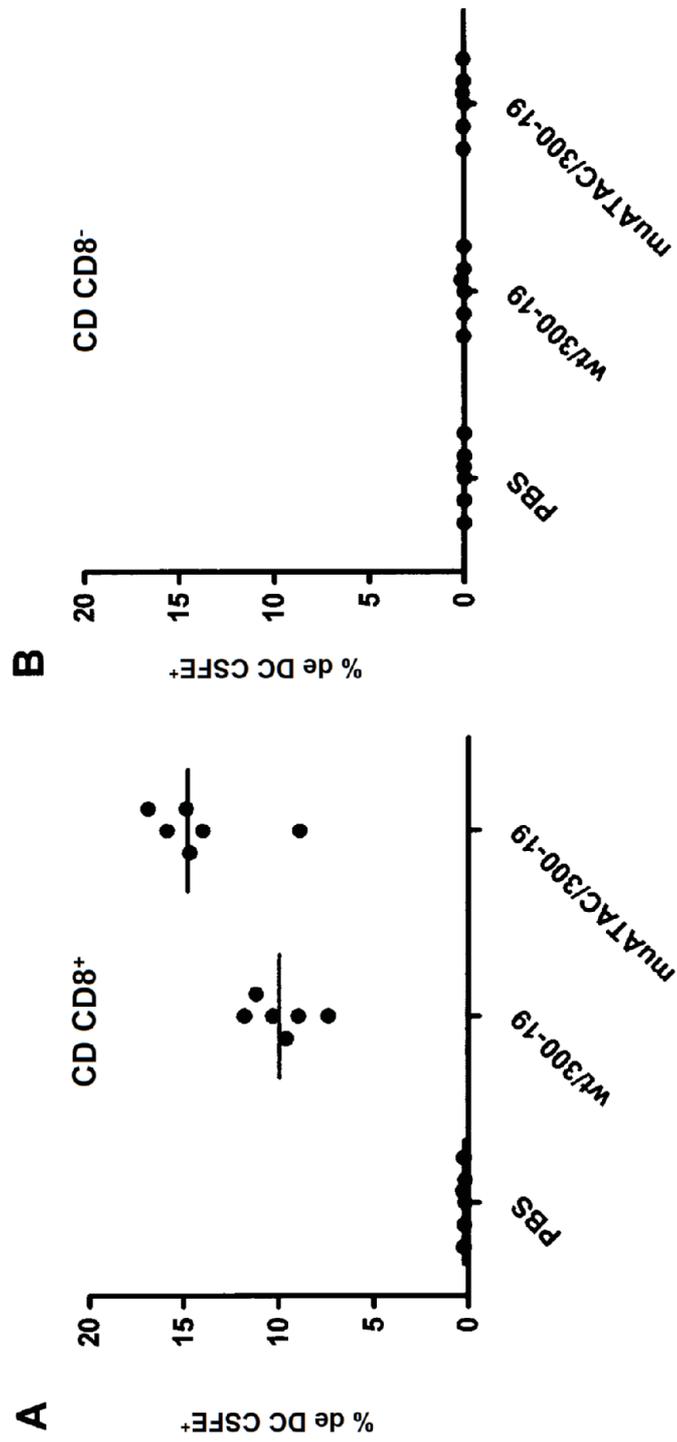


Fig. 8

Fig. 9

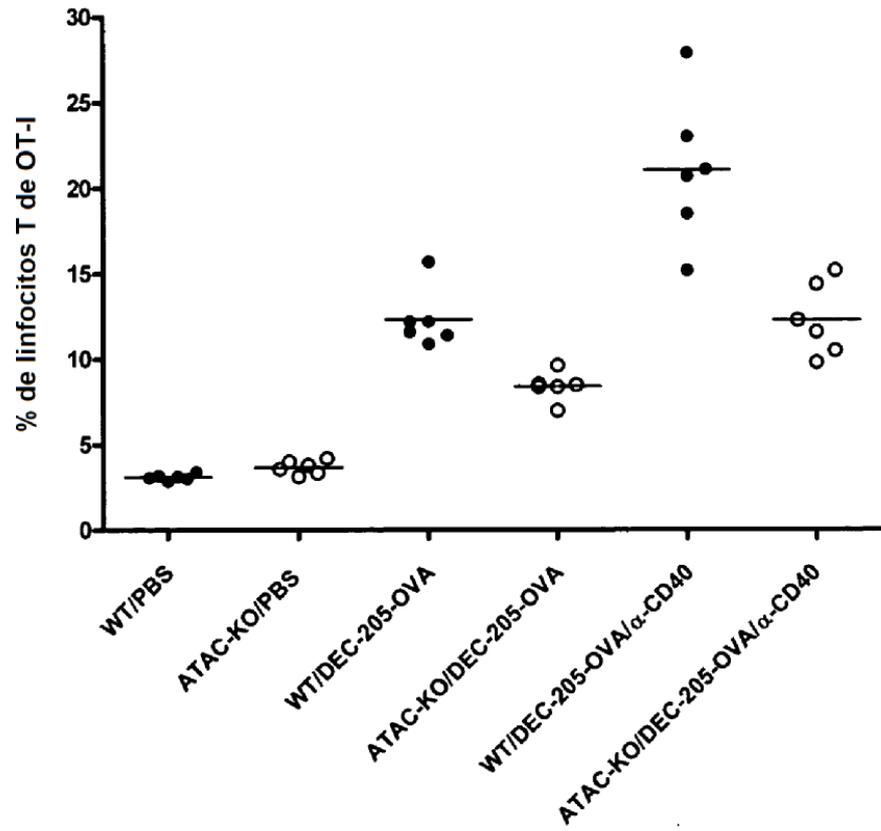
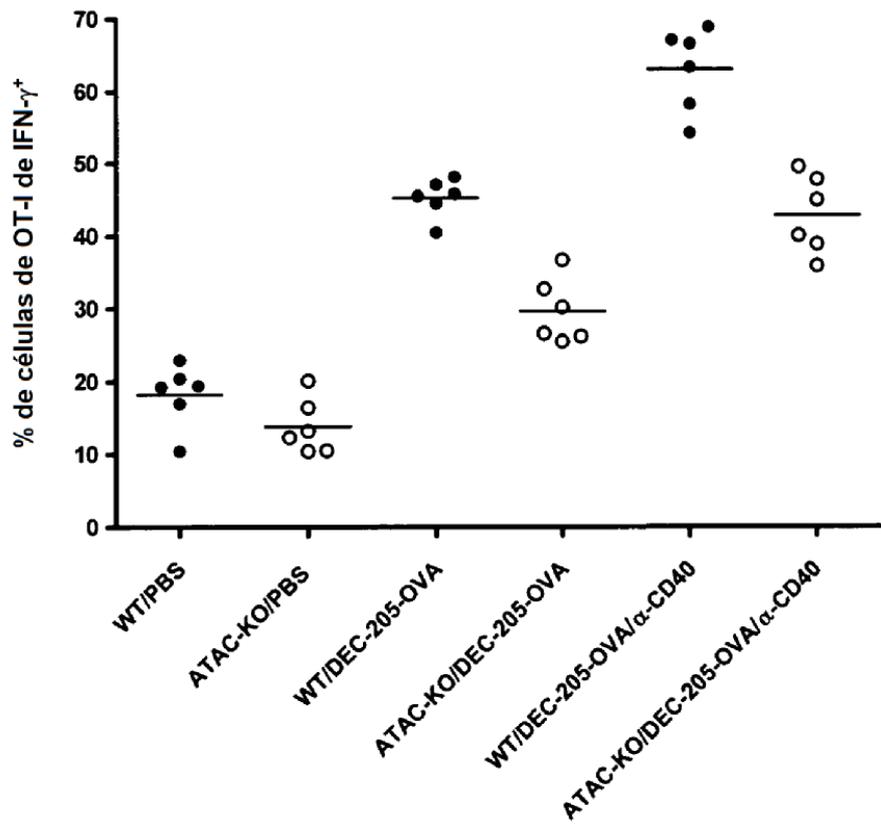


Fig. 10



hATACR →
(30-35 kDa)

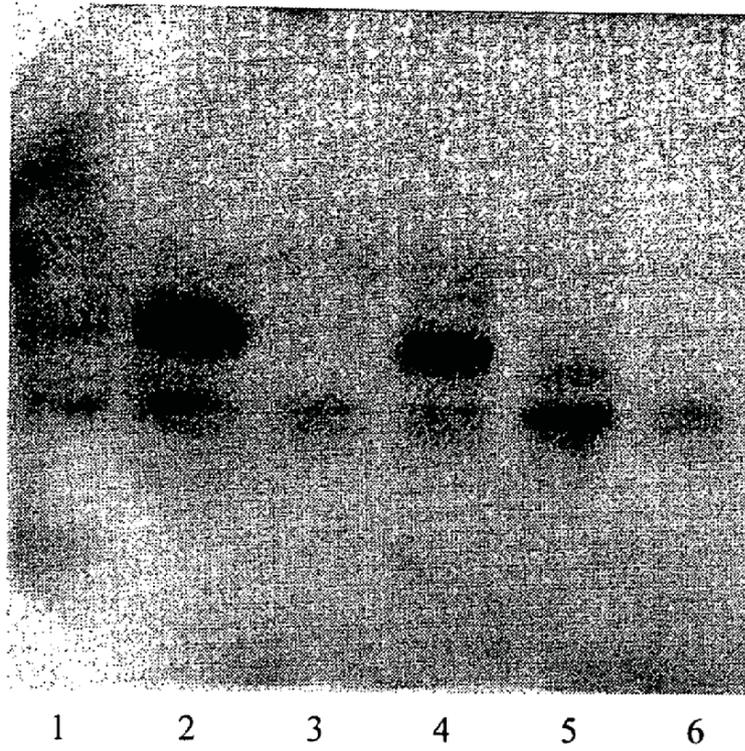


Fig. 11

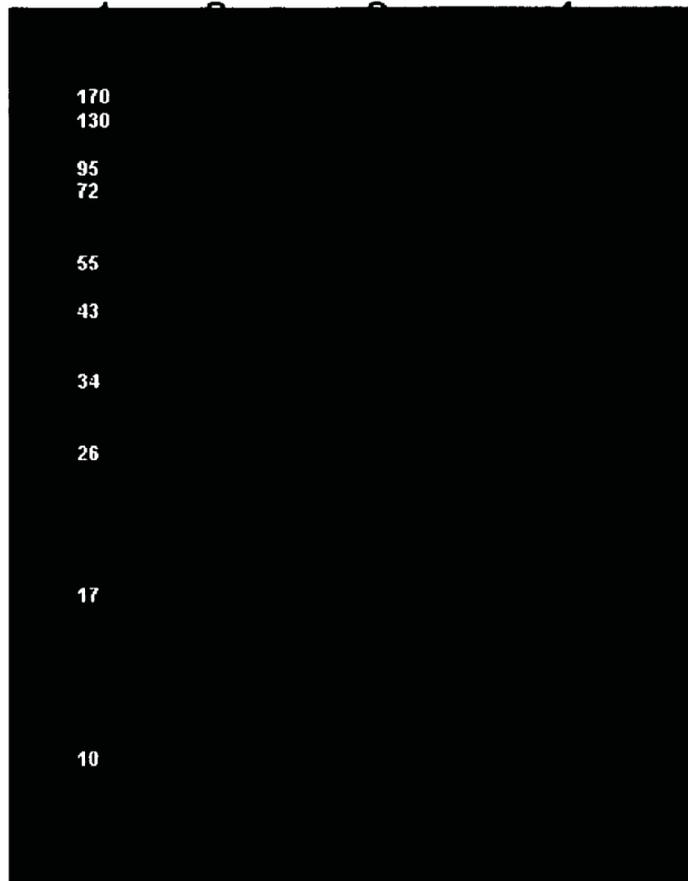


Fig. 12

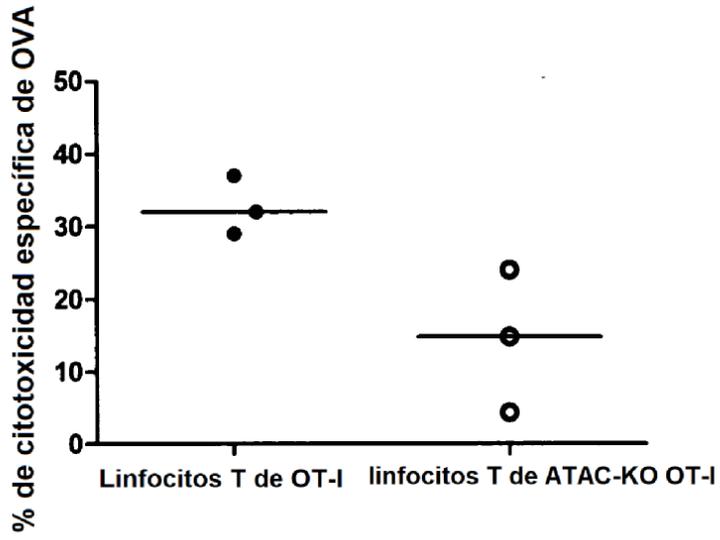


Fig. 13

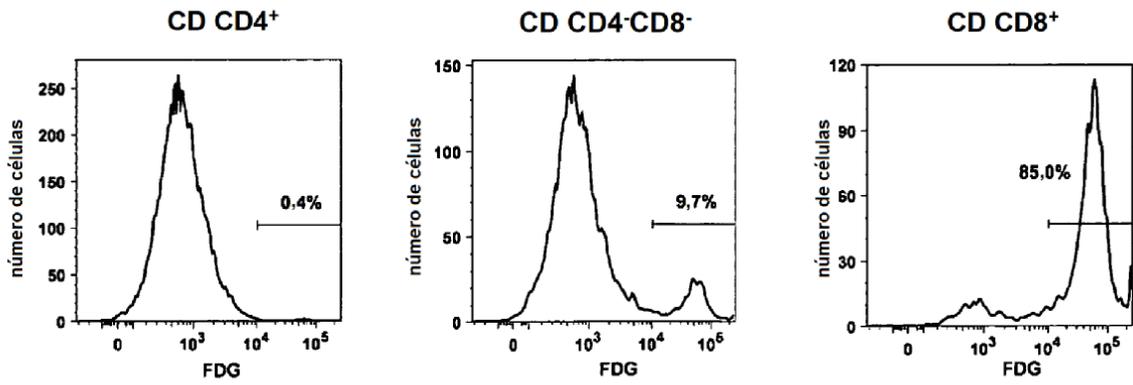


Fig. 14