

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 300**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2014 PCT/US2014/057525**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15048331**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2014 E 14781414 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 3049521**

54 Título: **Compuestos para inducir inmunidad antitumoral y métodos de lo mismo**

30 Prioridad:
25.09.2013 US 201361882461 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.09.2019

73 Titular/es:
**CORNELL UNIVERSITY (100.0%)
Cornell Center for Technology Enterprise And
Commercialization (CCTEC), 395 Pine Tree Road,
Suite 310
Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:
**CUBILLOS-RUIZ, JUAN R. y
GLIMCHER, LAURIE H.**

74 Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

ES 2 724 300 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

Compuestos para inducir inmunidad antitumoral y métodos de lo mismo

Antecedentes de la invención

5 El retículo endoplasmático (RE) funciona principalmente para procesar proteínas secretoras y transmembrana recién sintetizadas. Sin embargo, la acumulación anómala de proteínas desplegadas en este compartimento provoca un estado de “estrés del RE”, que es una característica distintiva de las células secretoras y muchas enfermedades, incluyendo diabetes, neurodegeneración y cáncer (Hetz *et al.*, Nature Reviews Drug Discover 2013; 12, 703-719). La adaptación al estrés por plegamiento de proteínas está mediada por la activación de una ruta de transducción de señales integrada conocida como la respuesta de estrés del RE o la respuesta de proteínas desplegadas (UPR).
 10 Esta ruta coordinada envía señales a través de tres sensores de estrés distintos ubicados en la membrana del RE: IRE-1 α , ATF6 y PERK (Hetz *et al.*, Nature Reviews Drug Discover 2013; 12, 703-719). La rama más conservada de la UPR implica a IRE-1 α . Durante el estrés del RE, esta cinasa se oligomeriza, se autofosforila y utiliza su actividad endorribonucleasa para escindir un fragmento de 26 nucleótidos del ARNm de XBP1 no sometido a corte y empalme (Yoshida *et al.*, Cell 2001; 107; 881-891). Estos hechos dan lugar a XBP1 funcional, un potente factor de transcripción multitarea que promueve la expresión de chaperonas del RE y regula distintos conjuntos de genes diana de una manera específica del tipo celular (Acosta-Alvear *et al.*, Mol Cell 2007; 27, 53-66; Lee *et al.*, Mol Cell Biol 2003; 23, 7448-7459; Yoshida *et al.*, Cell 2001; 107; 881-891). Es importante destacar que, aunque se ha demostrado que XBP1 controla el mantenimiento de diversas células inmunitarias en estados no patológicos, nunca se ha notificado un papel para este factor de transcripción como regulador negativo de las respuestas antitumorales y función inmunitaria normal en cáncer.

Los tumores agresivos han desarrollado estrategias para progresar en condiciones adversas tales como hipoxia, falta de nutrientes y alta demanda metabólica. Las células cancerosas sufren constantemente estrés del RE, pero se garantizan la supervivencia al ajustar la capacidad de plegamiento de proteínas del RE a través de la UPR (Hetz *et al.*, Nature Reviews Drug Discover 2013; 12, 703-719). En las células malignas, XBP1 confiere resistencia a fármacos al impedir la detención del ciclo celular inducida por fármacos y la permeabilidad y la apoptosis mitocondriales (Gomez *et al.*, FASEB J 2007; 21, 4013-4027). XBP1 activa la patogénia del mieloma múltiple (Carrasco *et al.*, Cancer Cell 2007; 11, 349-360; Lee *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100, 9446-9951) y de la leucemia linfocítica crónica (Sriburi *et al.*, J Cell Biol 2004; 167, 35-41). Además, recientemente se demostró que XBP1 fomenta la progresión del cáncer de mama triple negativo al promover la supervivencia de las células tumorales y la capacidad metastásica en condiciones hipóxicas (Chen *et al.*, Nature 2014; 508, 103-107). Aunque se ha demostrado que la expresión de XBP1 en células cancerosas promueve directamente la tumorigénesis, no se ha establecido el papel de este sensor de estrés del RE en la creación de un entorno inmunitario permisivo para tumores.

En la mayoría de los cánceres sólidos, las células no malignas tales como leucocitos, células vasculares y fibroblastos, estimulan el desarrollo y la progresión del tumor (Bhowmick *et al.*, Nature 2004; 432, 332-337; Whiteside, Oncogene 2008; 27, 5904-5912). El reclutamiento de leucocitos en cánceres establecidos da como resultado diversos efectos protumorales incluyendo la secreción de factores de crecimiento que potencian la proliferación de células tumorales y la metástasis (Coussens *et al.*, Cell 2000; 103, 481-490; Coussens y Werb, Nature 2002; 420, 860-867; Mantovani *et al.*, Nature 2008; 454, 436-444); la inducción de vascularización tumoral a través de mecanismos paracrinos (De Palma *et al.*, Trends Immunol 2007; 28, 519-524); y la orquestación de redes inmunosupresoras (Zou, Nat Rev Cancer 2005; 5, 263-274) que restringen el papel protector de los escasos subconjuntos de leucocitos con capacidad antitumoral inherente. Los tumores de ovario subvierten la actividad normal de las células dendríticas (DC) infiltrantes para inhibir la función de las células T antitumorales por lo demás protectoras (Cubillos-Ruiz y otros, J Clin Invest 2009; 119, 2231-2244; Curiel *et al.*, Nat Med 2003; 9, 562-567; Huarte *et al.*, Cancer Res 2008; 68, 7684-7691; Scarlett *et al.*, Cancer Res 2009; 69, 7329-7337; Scarlett *et al.*, J Exp Med 2012). Los documentos US 2010/266618 y WO2010/088498 dan a conocer el uso de inhibidores de IRE1-alfa y XBP1 para la terapia del cáncer de ovario mediante la potenciación de la inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral, en particular, de las células dendríticas asociadas a cáncer. Se ha demostrado que la eliminación o “reprogramación” de las DC asociadas a tumor (tDC) *in vivo* anula la progresión del cáncer de ovario (Cubillos-Ruiz y otros, J Clin Invest 2009; 119, 2231-2244; Curiel *et al.*, Nat Med 2003; 9, 562-567; Huarte *et al.*, Cancer Res 2008; 68, 7684-7691; Nesbeth *et al.*, Cancer Res 2009; 69, 6331-6338; Nesbeth *et al.*, J Immunol 2010; 184, 5654-5662; Scarlett *et al.*, Cancer Res 2009; 69, 7329-7337; Scarlett *et al.*, J Exp Med 2012), pero las rutas moleculares precisas de las que se aprovechan los tumores en las DC para apropiarse de su actividad normal siguen sin entenderse bien y, por tanto, las terapias disponibles son limitadas.

Sumario de la invención

Se requieren células dendríticas (DC) para iniciar y mantener la inmunidad contra el cáncer. Sin embargo, los tumores manipulan eficazmente la función de las DC para evadir el control inmunitario. Se ha demostrado que la respuesta de estrés del retículo endoplasmático (RE) opera en las células malignas para respaldar el crecimiento tumoral, pero antes del descubrimiento de la presente invención, su papel en la creación de la respuesta inmunitaria al cáncer era difícil de comprender. La presente invención se basa, al menos en parte, en el nuevo hallazgo de que

la activación constitutiva del sensor de estrés del RE, XBP1, en las DC asociadas a tumor (tDC) activa la progresión del cáncer de ovario. En el presente documento se notifica que, las tDC deficientes en XBP1 mostraron acumulación de lípidos intracelular reducida y demostraron capacidad mejorada de presentación de antígenos, lo que conduce a una activación de células T intratumorales potenciada y a una mayor supervivencia del huésped. La presente invención también se basa, al menos en parte, en el nuevo hallazgo de que el silenciamiento terapéutico de XBP1 utilizando nanopartículas cargadas con ARNip restableció la función de tDC apropiada *in situ* y la supervivencia prolongada del huésped mediante la inducción de inmunidad antitumoral protectora. En particular, los presentes inventores han descubierto que los tumores se basan en XBP1 intrínseco de DC para eludir el control inmunitario. Estos hallazgos revelan por primera vez una función clave para XBP1 en la inmunidad antitumoral, abriendo nuevas vías para terapias que seleccionen como diana la respuesta de estrés del RE. Dichas terapias podrían inhibir potencialmente el crecimiento tumoral directamente a la vez que inducen simultáneamente una inmunidad antitumoral robusta.

En una realización, la presente invención se refiere al descubrimiento inesperado de que el sensor de estrés del RE, XBP1, funciona como un activador crucial de la disfunción de DC en el microentorno tumoral. En otra realización, la presente invención proporciona que el sensor de estrés del RE, XBP1, es constitutivamente activo en células dendríticas asociadas a cáncer de ovario. En otra realización, la presente invención proporciona que el subproducto de la peroxidación de lípidos, 4-HNE, desencadena estrés del RE y la activación de XBP1 en DC. En otra realización, la presente invención proporciona que XBP1 regula el metabolismo de lípidos y la presentación de antígenos por DC asociadas a tumor. En otras realizaciones, la invención proporciona que la selección como diana de XBP1 en las DC asociadas a tumor (tDC) prolonga la supervivencia del huésped al potenciar la inmunidad antitumoral.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención se refiere a un inhibidor directo o indirecto de XBP1 o IRE-1 α para su uso en la potenciación o inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral en un sujeto.

En otro aspecto, la invención se refiere a un inhibidor directo o indirecto de XBP1, en el que el inhibidor de XBP1 selecciona como diana células dendríticas asociadas a tumor (tDC), para su uso en el tratamiento o la reducción de la progresión del cáncer de ovario en un sujeto. En otro aspecto, la invención se refiere a un inhibidor directo o indirecto de XBP1 para su uso en la inducción, potenciación o estimulación de la respuesta inmunitaria de células dendríticas asociadas a cáncer en un sujeto.

En una realización, el sujeto tiene cáncer de ovario. En otra realización, el sujeto tiene cáncer de ovario primario o cáncer de ovario metastásico. En otra realización, el sujeto tiene un carcinoma, un adenocarcinoma, un cáncer epitelial, un cáncer de células germinales o un tumor estromal.

En otra realización, la respuesta inmunitaria antitumoral se induce o potencia en las células T en el sujeto. Por ejemplo, las células T intratumorales pueden activarse en el sujeto. En determinadas realizaciones, la respuesta inmunitaria antitumoral puede ser la presentación de antígenos por parte de las células T. En otras realizaciones, la respuesta inmunitaria antitumoral puede ser una función inmunogénica.

En una realización, el inhibidor de XBP1 es un inhibidor directo. En otra realización, el inhibidor de XBP1 es un inhibidor indirecto.

Por ejemplo, el inhibidor de XBP1 puede ser una molécula de ácido nucleico que es antisentido con respecto a una molécula de ácido nucleico que codifica para XBP1, un ARNhc de XBP1 y un ARNip de XBP1, un microARN que selecciona como diana XBP1, un ARNip de XBP1 encapsulado en nanopartículas, un nanopartícula de ARNip de XBP1-PEI, una molécula de XBP1 negativa dominante, un anticuerpo específico para XBP1 o un inhibidor de molécula pequeña de XBP1.

En determinadas realizaciones, el inhibidor de XBP1 es un agente que inhibe IRE-1 α o un agente que inhibe la generación de XBP1 funcional. Por ejemplo, el inhibidor de IRE-1 α puede ser un ARNhc de IRE-1 α , un ARNip de IRE-1 α o un ARNip de IRE-1 α encapsulado en nanopartículas. Por ejemplo, un agente que inhibe la generación de XBP1 funcional puede ser un agente que inhibe una endonucleasa que produce XBP1 funcional.

En una realización, el inhibidor de XBP1 se administra por vía sistémica, por vía parenteral o en ubicaciones tumorales en el sujeto. Por ejemplo, el inhibidor de XBP1 puede administrarse en el sitio del cáncer de ovario o tumor de ovario.

En otra realización, el inhibidor de XBP1 selecciona como diana células dendríticas asociadas a tumor (tDC)

En determinadas realizaciones, el inhibidor de XBP1 se administra en combinación con un segundo agente terapéutico contra el cáncer. Por ejemplo, el inhibidor de XBP1 puede administrarse en combinación con un agente quimioterápico.

En otra realización, el tratamiento del sujeto con un inhibidor directo o indirecto de XBP1 induce la supervivencia prolongada del sujeto.

En una realización, el inhibidor de IRE-1 α es un inhibidor directo. En otra realización, el inhibidor de IRE-1 α es un inhibidor indirecto.

5 Por ejemplo, el inhibidor de IRE-1 α puede ser una molécula de ácido nucleico que es antisentido con respecto a una molécula de ácido nucleico que codifica para IRE-1 α , un ARNhc de IRE-1 α y ARNip de IRE-1 α , un microARN que selecciona como diana IRE-1 α , un ARNip IRE-1 α encapsulado en nanopartículas, una nanopartícula ARNip de IRE-1 α -PEI, una molécula de IRE-1 α negativa dominante, un anticuerpo específico para IRE-1 α y un inhibidor de molécula pequeña de IRE-1 α .

10 En una realización, el inhibidor de IRE-1 α se administra por vía sistémica, por vía parenteral o en ubicaciones tumorales en el sujeto. Por ejemplo, el inhibidor de IRE-1 α puede administrarse en el sitio del cáncer de ovario o tumor de ovario.

En otra realización, el inhibidor de IRE-1 α selecciona como diana células dendríticas asociadas a tumor (tDC)

En determinadas realizaciones, el inhibidor de IRE-1 α se administra en combinación con un segundo agente terapéutico contra el cáncer. Por ejemplo, el inhibidor de IRE-1 α puede administrarse en combinación con un agente quimioterápico.

15 En otra realización, el tratamiento del sujeto con un inhibidor directo o indirecto de IRE-1 α induce la supervivencia prolongada del sujeto.

20 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para activar o potenciar la inmunidad de tipo 1 en células T infiltrantes de cáncer de ovario en un sujeto que incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor directo o indirecto de XBP1, activando o potenciando de este modo la inmunidad de tipo 1 en células T infiltrantes de cáncer de ovario en el sujeto.

Aún en otro aspecto, la invención se refiere a un método para reducir el estrés del RE en células dendríticas asociadas a tumor (tDC) en un sujeto que incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor directo o indirecto de 4-HNE para inhibir la activación de XBP1, reduciendo de ese modo el estrés del RE en células dendríticas asociadas a tumor en el sujeto.

25 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para reducir o prevenir la acumulación de lípidos intracelulares en células dendríticas asociadas a tumor (DC) que incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor directo o indirecto de XBP1, reduciendo o previniendo de ese modo la acumulación de lípidos intracelulares en células dendríticas asociadas a tumor en el sujeto.

30 En una realización, se reduce el número de gotitas de lípidos citosólicos en la célula dendrítica. En otra realización, se reducen los niveles intracelulares de triglicéridos totales.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para potenciar o inducir la activación de células T en un sitio tumoral en un sujeto que incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor directo o indirecto de XBP1, potenciando o incluyendo de ese modo la activación de células T en el sitio tumoral en el sujeto.

35 Aún en otro aspecto, la invención se refiere a un método para inducir, potenciar o promover la capacidad de presentación de antígenos de células dendríticas (DC) asociadas a tumor en un sujeto que incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor directo o indirecto de XBP1, induciendo, potenciando o promoviendo de ese modo la capacidad de presentación de antígenos de células dendríticas asociadas a tumor en el sujeto.

40 Aún en otro aspecto, la invención se refiere a un método para inducir, potenciar o promover la capacidad de presentación de antígenos de células dendríticas asociadas a tumor (tDC) en un sujeto que incluye poner en contacto las células dendríticas con una cantidad eficaz de un inhibidor directo o indirecto de XBP1 y luego administrar las células dendríticas al sujeto, induciendo, mejorando o promoviendo de ese modo la capacidad de presentación de antígenos de células dendríticas asociadas a tumor en el sujeto.

45 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para identificar un compuesto útil en la potenciación o inducción de inmunidad antitumoral en un sujeto, que incluye proporcionar una composición indicadora que comprende XBP1, o partes biológicamente activas del mismo; poner en contacto la composición indicadora con cada miembro de una biblioteca de compuestos de prueba; seleccionar de la biblioteca de compuestos de prueba un compuesto de interés que interacciona con XBP1, o partes biológicamente activas del mismo; y poner en contacto las células de cáncer de ovario con el compuesto de interés, en el que la capacidad del compuesto para potenciar o inducir inmunidad antitumoral en el sujeto está indicada por la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento de células de cáncer de ovario en comparación con el crecimiento de células de cáncer de ovario en ausencia del compuesto.

50

Breve descripción de los dibujos

FIGURAS 1A-F: muestran la estrategia de separación utilizada para el análisis de FACS.

Figura 1A: representa la estrategia de separación utilizada para aislar DC asociadas a cáncer de ovario humano presentes en tumores sólidos.

Figura 1B: representa la estrategia de separación utilizada para aislar DC asociadas a cáncer de ovario humano presentes en muestras de ascitis maligna.

- 5 *Figura 1C:* representa la estrategia de separación utilizada para aislar tDC de tumores de ovario primarios activados por p53-Kras de ratones que portan tumores de ovario ID8-*Defb29-VegfA* metastásicos avanzados.

Figura 1D: representa la estrategia de separación utilizada para aislar tDC de la ascitis ovárica maligna de ratones que portan tumores de ovario ID8-*Defb29-VegfA* metastásicos avanzados.

- 10 *Figura 1E:* representa gráficamente la expresión robusta de *Clec9A/DNGR-1* y *Zbtb46* por células mieloides infiltrantes de tumor CD45⁺CD11c⁺MHC-II⁺CD11b⁺CD8 α ⁻, lo que refuerza su identidad como verdaderas DC clásicas (CDC). Estos dos marcadores distinguen las CDC y sus progenitores diferenciados de otros linajes fagocíticos mononucleares estrechamente relacionados.

Figura 1F: representa la estrategia de separación para aislar DC CD45⁺CD11c⁺MHC-II⁺CD11b⁺CD8 α ⁻ de control del bazo (sDC).

- 15 FIGURAS 2A-F: muestran la activación constitutiva de XBP1 en DC asociadas a cáncer de ovario en seres humanos y ratones.

Figura 2A: representa el análisis mediante PCR del corte y empalme del ARNm de Xbp1 en tDC de cáncer de ovario de origen humano (1-12) y de ratón (p53/K-ras e ID8-Def29/Vegf-A). XBP1u, forma no sometida a corte y empalme; XBP1s, forma sometida a corte y empalme; Actb, β -actina.

- 20 *Figura 2B:* representa gráficamente la expresión del ARNm de XBP1 total (izquierda) y el ARNm de XBP1 sometido a corte y empalme (XBP1s) (derecha). La expresión del transcrito indicado se determinó mediante RT-qPCR. sDC, DC esplénicas.

- 25 *Figura 2C:* representa una transferencia de tipo western de la expresión de la proteína XBP1s en extractos nucleares obtenidos de las DC indicadas. Se usó lámina B como control de carga. En todos los casos, los datos son representativos de 3 experimentos independientes con resultados similares.

Figura 2D: representa gráficamente la expresión del ARNm de ERdj4 (izquierda) y el ARNm de Sec61a1 (derecha). La expresión del transcrito indicado se determinó mediante RT-qPCR.

Figura 2E: representa gráficamente la expresión del ARNm de BiP (izquierda) y el ARNm de CHOP (derecha). La expresión del transcrito indicado se determinó mediante RT-qPCR.

- 30 *Figura 2F:* representa gráficamente la expresión de CHOP en tDC clasificadas a partir de muestras de cáncer de ovario de pacientes humanos (determinada por RT-qPCR) correlacionadas con el porcentaje de células T CD45⁺CD3⁺ presentes en cada muestra individual de tumor (círculo) o ascitis (cuadrado). r, coeficiente de correlación de rangos de Spearman.

- 35 FIGURAS 3A-F: muestran el efecto de diversas citoquinas y condiciones que simulan hipoxia sobre la activación de XBP1 por DC.

Figuras 3A-D: representan gráficamente el efecto de diversas citoquinas sobre la activación de XBP1 por DC. El corte y empalme y la regulación por incremento de XBP1 se determinaron mediante análisis de RT-qPCR.

Figuras 3E-F: representan gráficamente el efecto de las condiciones que simulan la hipoxia sobre la activación de XBP1 por DC.

- 40 FIGURAS 4A-J: proporcionan que el subproducto de la peroxidación de lípidos, 4-HNE, desencadena el estrés del RE en DC.

- 45 *Figura 4A:* representa el aumento del contenido de lípidos intracelulares en tDC en comparación con sDC de control de ratones sin tratamiento previo o que portan tumores (Ovca). Análisis de FACS representativo de la tinción de lípidos para DC de las fuentes indicadas (izquierda). Cuantificación de lípidos intracelulares expresada como intensidad de fluorescencia media (MFI) de la tinción con Bodipy 493/503 (derecha).

Figura 4B: representa gráficamente la cuantificación de los niveles de ROS intracelulares en DC expresados como MFI geométrica (gMFI) de la tinción con DCFDA.

Figura 4C: representa gráficamente los niveles de aductos de 4-HNE-proteína en ascitis maligna libre de células obtenida de huéspedes que portan cáncer de ovario metastásico.

- Figura 4D:* representa gráficamente la cuantificación de aductos de 4-HNE-proteínas intracelulares totales en tDC aisladas de muestras de ascitis de cáncer de ovario metastático de origen humano y de ratón.
- Figura 4E:* representa gráficamente los niveles intracelulares de aductos de 4-HNE-proteína en tDC aisladas de ratones con tumores de ovario ID8-*Defb29-VegfA* avanzados y expuestos a ascitis maligna libre de células en presencia o ausencia de vitamina E (VitE).
- Figura 4F:* representa gráficamente la rápida generación de aductos de 4-HNE-proteína intracelulares en sDC indiferenciadas incubados con concentraciones crecientes de 4-HNE purificado.
- Figuras 4G-H:* representan la cuantificación de la expresión génica de XBP1s en sDC expuestas durante 3 h a cantidades crecientes de 4-HNE purificado. Los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes con resultados similares.
- Figura 4I:* representan la cuantificación de la expresión génica total de XBP1 (izquierda) y ERdj4 (derecha) en sDC expuestas durante 3 h a cantidades crecientes de 4-HNE purificado. Los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes con resultados similares.
- Figura 4J:* representan la cuantificación de la expresión génica total de BiP (izquierda) y CHOP (derecha) en sDC expuestas durante 3 h a cantidades crecientes de 4-HNE purificado. Los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes con resultados similares.
- FIGURAS 5A-C: muestran la delección eficaz y selectiva de XBP1 en DC a través de la expresión de Cre controlada por CD11c.
- Figura 5A:* representa un esquema de la delección del exón 2 de *Xbp1*.
- Figura 5B:* representa gráficamente la eficacia de delección de XBP1, que se determinó mediante RT-qPCR utilizando cebadores que amplifican selectivamente el exón 2 de *Xbp1* (véase métodos).
- Figura 5C:* representa la inducción de los genes diana canónicos de XBP1, *ERdj4* (izquierda) y *Sec61* (derecha) tras la estimulación (determinada a través de RT-qPCR). Los datos se normalizaron para la expresión endógena de *Actb* en cada muestra. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes con resultados similares.
- FIGURAS 6A-I: muestran la evaluación de la población de células inmunitarias en ratones deficientes condicionales
- Figuras 6A-C:* representan análisis de FACS representativos de poblaciones de DC en el bazo.
- Figuras 6D-E:* representan análisis de FACS representativos de poblaciones de DC en tumores de ovario p53/K-ras infiltrantes.
- Figuras 6F-G:* representan análisis de FACS representativos de poblaciones de DC en ascitis de cáncer de ovario ID8-*Defb29/Vegf-A* maligno de ratones XBP1^{fl/fl} (parte superior) o XBP1^{fl/fl} CD11c-cre (parte inferior).
- Figuras 6H-I:* representan las proporciones (figura 6H) y los números absolutos (figura 6I) de poblaciones de células inmunitarias representadas en el bazo de ratones silvestres o deficientes condicionales. pDC, DC plasmacitoides. Los datos son representativos de 3 ratones por grupo. * $P < 0,05$.
- FIGURAS 7A-I: muestran la progresión del cáncer de ovario en huéspedes que carecen de XBP1 en DC.
- Figura 7A:* representa tumores de ovario activados por p53/K-ras generados en huéspedes reconstituidos con médula ósea de ratones donantes o bien XBP1^{fl/fl} (parte superior) o bien XBP1^{fl/fl} CD11c-Cre (parte inferior) tal como se describe en los métodos y los tumores primarios se resecaron 48 días después de la inyección intrabursal de adenovirus que expresan Cre (ADV-Cre).
- Figura 7B:* representa gráficamente la cinética de crecimiento de tumores de ovario activados por p53/K-ras en huéspedes reconstituidos con médula ósea de los genotipos indicados.
- Figura 7C:* representa gráficamente la proporción de huéspedes que presentan lesiones metastásicas derivadas de p53/K-ras en la cavidad peritoneal 48 días después de la inducción del tumor.
- Figura 7D:* representa ratones de los genotipos indicados a los que se implantaron células de cáncer de ovario ID8-*Defb29-VegfA* a través de inyección intraperitoneal (i.p.).
- Figura 7E:* representa gráficamente metástasis peritoneales evaluadas 3-4 semanas después de la implantación del tumor (n = 3 ratones por grupo). ** $P < 0,001$.
- Figura 7F:* representa gráficamente la generación de ascitis malignas en ratones que portan tumores como la ganancia de peso en porcentaje debido a la acumulación progresiva de líquido peritoneal. * $P < 0,05$.

Figura 7G: representa la esplenomegalia reducida en ratones que portan tumores deficientes para XBP1 en DC CD11c⁺.

5 *Figura 7H:* representa las tasas de supervivencia global en ratones que portan tumores ID8-*Defb29-VegfA* agresivos. Los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes con resultados similares utilizando 4-6 ratones por grupo. ***P*<0,001.

Figura 7I: representa las tasas de supervivencia global en ratones que portan tumores ID8 parentales. Los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes con resultados similares utilizando 4-6 ratones por grupo. ***P*<0,001.

FIGURAS 8A-D: muestran el análisis transcripcional de DC asociadas a cáncer de ovario desprovistas de XBP1.

10 *Figura 8A:* representa los principales reguladores transcripcionales asociados con firmas génicas expresadas de manera diferencial en DC silvestres frente a deficientes en XBP1 aisladas de ratones que portan tumores de ovario ID8-*Defb29/Vegf-A* durante 3 semanas.

Figura 8B: representa la principal red de genes relacionados con el estrés del RE controlados por XBP1 en tDC basándose en el programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA).

15 *Figura 8C:* representa los niveles de expresión de dianas de RIDD notificadas previamente en tDC deficientes en XBP1.

Figura 8D: representa los procesos biológicos afectados significativamente identificados en tDC desprovistas de XBP1 (véase métodos).

FIGURAS 9A-G: muestran que XBP1 altera la homeostasis de lípidos en DC asociadas a cáncer de ovario.

20 *Figura 9A:* representa la regulación por disminución de genes implicados en la respuesta de estrés por UPR/RE en tDC desprovistas de XBP1. WT, tDC XBP1^{fl/fl}, XBP1^{def}, tDC XBP1^{fl/fl} CD11c-Cre (n = 3/grupo). FDR, tasa de falso descubrimiento. RPKM, abundancia de transcrito expresada como lecturas por kilobase por millón de lecturas.

25 *Figura 9B:* representa la regulación por disminución de los genes implicados en el metabolismo de lípidos en tDC desprovistas de XBP1. WT, tDC XBP1^{fl/fl}, XBP1^{def}, tDC XBP1^{fl/fl} CD11c-Cre (n = 3/grupo). FDR, tasa de falso descubrimiento. RPKM, abundancia de transcrito expresada como lecturas por kilobase por millón de lecturas.

Figura 9C: representa la disminución del contenido de lípidos intracelulares en tDC XBP1^{fl/fl}CD11c-Cre (n = 3 ratones por grupo) de ratones que portan tumores ID8-*Defb29-VegfA* durante 3 semanas evidenciados por la tinción con Bodipy 493/503.

30 *Figura 9D:* representa micrografías electrónicas (12.000X) que demuestran grandes cuerpos lipídicos intracelulares en tDC con suficiente XBP1, pero no con deficiencia de XBP1.

Figura 9E: representa gráficamente la cuantificación de cuerpos lipídicos en tDC clasificadas de ratones que portan tumores de ovario ID8-*Defb29-VegfA* durante 3-4 semanas.

Figura 9F: representa gráficamente la cuantificación de triglicéridos intracelulares (TAG) en tDC clasificadas de ratones que portan tumores de ovario ID8-*Defb29-VegfA* durante 3-4 semanas.

35 *Figura 9G:* representa gráficamente el contenido de lípidos intracelulares de tDC incubadas *in vitro* con un 25% de sobrenadantes de ascitis de cáncer de ovario libre de células en presencia de los inhibidores indicados. El contenido de lípidos intracelulares se evaluó 24 h más tarde mediante tinción con Bodipy 493/503. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes con resultados similares. #*P*<0,05 en comparación con tDC de control incubadas en ausencia de sobrenadantes de ascitis libre de células. **P*<0,05 en comparación con tDC expuestas a ascitis, pero que se dejaron sin tratar.

40 FIGURAS 10A-F: muestran el estrés del RE y la acumulación de lípidos en tDC.

Figura 10A: representa la expresión aumentada de genes biosintéticos de lípidos controlados por XBP1 (*Agpat6*, *Fasn*, *Lpar1*) en tDC aisladas de ratones que portan tumores de ovario ID8-*Defb29-Vegf-A* durante 4-5 semanas en comparación con los sDC de control indicados.

45 *Figura 10B:* representa gráficamente la rápida regulación por incremento de genes biosintéticos de lípidos controlados por XBP1, ERdj4 y XBP1 (*Agpat6*, *Fasn*, *Lpar1*) en sDC indiferenciadas estimuladas durante 3 h con concentraciones crecientes de 4-HNE purificado. Los datos se normalizan para niveles endógenos de β-actina en cada muestra y son representativos de tres experimentos independientes con resultados similares.

50 *Figura 10C:* representa gráficamente el perfil lipídómico de tDC obtenidas de ratones que portan tumores de ovario ID8-*Defb29/Vegf-A* durante 4 semanas.

Figura 10D: representa gráficamente el perfil lipidómico de sobrenadantes de ascitis libres de células obtenidos de ratones que portan tumores de ovario ID8-*Defb29/Vegf-A* durante 4 semanas.

Figura 10E: representa gráficamente la expresión relativa de genes que codifican para receptores eliminadores (Cd36, Cd68, Msr1) en tDC deficientes en XBP1 frente a silvestres.

5 *Figura 10F:* representa un análisis de FACS representativo de la tinción con Bodipy 493/503 en tDC expuestas a ascitis de cáncer de ovario libre de células en presencia o ausencia de compuestos inhibidores.

FIGURAS 11A-F: muestran que XBP1 promueve la tolerancia inmunitaria por DC en el microentorno del cáncer de ovario.

10 *Figura 11A:* muestra un análisis de histograma representativo de la expresión de moléculas de superficie en tDC de muestras de lavado peritoneal de ratones XBP1^{fl/fl} (rayado) o XBP1^{fl/fl} CD11c-Cre (negro) que portan tumores con ID8-*Defb29-VegfA* durante 3-4 semanas. Los histogramas punteados indican tinción de control de isotipo.

Figura 11B: representa gráficamente la cuantificación de los datos mostrados en la figura 5A expresados como intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI) de la tinción (n = 3 ratones por grupo).

15 *Figura 11C:* representa el análisis de dilución con CFSE de células T OT-1 cocultivadas con tDC pulsadas con OVA de longitud completa aisladas de la cavidad peritoneal de ratones XBP1^{fl/fl} o XBP1^{fl/fl} CD11c-Cre que portan tumores de ovario ID8-*Dejb29-VegfA* durante 4 semanas (véase métodos para detalles).

Figura 11D: representa gráficamente la proporción de células T OT-1 en proliferación descritas en la figura 5C.

20 *Figuras 11E y 11F:* representan la activación de células T endógenas potenciada en sitios tumorales en ratones desprovistos de XBP1 en tDC CD11c⁺. Se recogieron muestras de lavado peritoneal de ratones silvestres (XBP1^{fl/fl}, barras negras) o deficientes en XBP1 (XBP1^{fl/fl} CD11c-Cre, barras grises) 2-3 semanas después de la implantación peritoneal de células cancerosas ID8-*Defb29-VegfA*. Se analizaron la expresión en superficie de CD44 y los niveles intracelulares de IFN- γ tumoricida en células T infiltrantes de tumor (TIL) CD3⁺CD4⁺ (figura 11E) o CD3⁺CD8⁺ (figura 11F). En todos los casos, los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes utilizando el grupo de 3-4 ratones.

25 FIGURAS 12A-B: muestran la presentación de antígenos por sDC deficientes en XBP1

Figura 12A: representa el análisis de dilución con CFSE de células T OT-1 cocultivadas con DC CD11c⁺MHC-II⁺CD11b⁺CD8 α ⁻ pulsadas con OVA de longitud completa aisladas del bazo (sDC) de ratones XBP1^{fl/fl} o XBP1^{fl/fl} CD11c-Cre.

30 *Figura 12B:* representa gráficamente la proporción de células T OT-1 en proliferación descritas en la figura 12A. Los datos son representativos de dos experimentos independientes con resultados similares.

FIGURAS 13A-C: muestran la actividad de biodistribución y silenciamiento de nanopartículas de ARNip-PEI inyectadas por vía intraperitoneal

35 *Figura 13A:* representa la captación selectiva de nanopartículas marcadas con rodamina por tDC CD11c⁺ en la cavidad peritoneal. Parte superior, ratones no tratados de control. Parte inferior, datos representativos de ratones que recibieron nanocomplejos de ARNip-PEI marcados con rodamina.

40 *Figuras 13B-C:* representa gráficamente la actividad de biodistribución y silenciamiento de nanopartículas de ARNip-PEI inyectadas por vía intraperitoneal. Las tDC CD45⁺CD11c⁺Rodamina⁺ se clasificaron mediante FACS a partir de muestras de lavado peritoneal 3 días después de la inyección de nanopartículas y los niveles de expresión génica se determinaron mediante RT-qPCR. Los datos son representativos de tres experimentos de silenciamiento independientes con 2-3 ratones por grupo y todos los datos se normalizaron para la expresión de *Actb* endógena.

FIGURAS 14A-J: muestran que el silenciamiento terapéutico de XBP1 mejora la función de tDC y desencadena inmunidad antitumoral protectora.

45 *Figura 14A:* muestra una dilución con CFSE representativa de células T OT-1 en proliferación *in vivo* en sitios tumorales en ratones no tratados pulsados con OVA de longitud completa o después de la administración de nanocomplejos inmunoestimuladores que portan el ARNip correspondiente a la luciferasa (siLuc-PEI) o específico de XBP1 (siXBP1-PEI) (véase métodos para obtener más información).

Figura 14B: representa gráficamente la proporción de células T OT-1 en la ascitis de ratones tratados (n = 3/grupo) tres días después de la transferencia.

50 *Figura 14C:* representa gráficamente el índice de división (izquierda) y proliferación (derecha) de células T OT-1 transferidas mostrado en la figura 6B.

Figuras 14D-H: muestran respuestas inmunitarias antitumorales potenciadas en ratones tratados con nanocomplejos de silenciamiento de XBP1, que seleccionan como diana DC. Se trataron ratones que portan tumores ID8-*Dejb29/Vegf-A* (n = 3/grupo) los días 8, 13, 18 y 23 después de la inyección tumoral y se analizaron muestras de lavado peritoneal el día 27. La figura 14D representa gráficamente la proporción de células tumorales esferoides metastásicas (CD45^{SSC^{hi}}) encontradas en la cavidad peritoneal de ratones tratados. La figura 14E muestra imágenes representativas de lavados peritoneales obtenidos de ratones tratados. La figura 14F representa gráficamente la proporción de ubicaciones de tumor infiltrante de células T con experiencia antigénica (CD44⁺), activadas (CD69⁺) CD4⁺ (izquierda) y CD8⁺ (derecha) determinadas por análisis de FACS (separadas en células CD3⁺). La figura 14G-H muestra un análisis basado en ELISA representativo que muestra la secreción aumentada de IFN- γ y granzima B por células T peritoneales (figura 14G) y esplénicas (figura 14H) aisladas de ratones tratados con nanopartículas de silenciamiento de XBP1.

Figuras 14I-J: representan las tasas de supervivencia global en ratones que portan cáncer de ovario silvestres (figura 14I) o deficientes en *Rag2* (figura 14J) (n = 6/grupo) tratados con nanocomplejos en los días 12, 16, 20, 24, 28 y 32 después de la implantación de células cancerosas ID8-*Dejb29/Vegf-A*. En todos los casos, los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes con resultados similares. *** $P < 0,001$, prueba de rangos logarítmicos.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los términos utilizados en las reivindicaciones y en la memoria descriptiva se definen tal como se expone a continuación, a menos que se especifique lo contrario.

“Polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente que se produce de manera natural, así como a polímeros de aminoácidos que se producen de manera natural y polímeros de aminoácidos que no se producen de manera natural.

“Ácido nucleico” se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma o bien monocatenaria o bien bicatenaria. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos que se producen de manera natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas de manera conservativa de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada de manera explícita. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados pueden lograrse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye por residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19: 5081, 1991; Ohtsuka *et al.* *Biol. Chem.* 260: 2605-2608, 1985); y Cassol *et al.*, 1992; Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98, 1994). Para la arginina y la leucina, las modificaciones en la segunda base también pueden ser conservativas. El término ácido nucleico se usa de manera intercambiable con gen, ADNc y ARNm codificado por un gen. Los polinucleótidos utilizados en el presente documento pueden estar compuestos por cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden estar compuestos por ADN monocatenario y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, ARN monocatenario y bicatenario y ARN que es mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más normalmente, bicatenarias o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, el polinucleótido puede estar compuesto por regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Un polinucleótido también puede contener una o más bases modificadas o estructuras principales de ADN o ARN modificadas por motivos de estabilidad u otros. Las bases “modificadas” incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Pueden realizarse una variedad de modificaciones al ADN y al ARN; por tanto, “polinucleótido” abarca formas modificadas química, enzimática o metabólicamente.

Tal como se usa en el presente documento, el término “estrés del RE” se refiere a una perturbación en la función del RE y a la desregulación de la homeostasis del RE debido a un ataque celular interno o externo. El estrés del RE provoca una cascada de señalización (es decir, la respuesta de proteínas desplegadas) para mitigar el estrés.

El término “respuesta de proteínas desplegadas” (UPR) o “ruta de respuesta de proteínas desplegadas” se refiere a una respuesta adaptativa a la acumulación de proteínas desplegadas en el RE e incluye la activación transcripcional de genes que codifican para chaperonas y catalizadores de plegamiento y complejos de degradación de proteínas, así como atenuación de la traducción para limitar la acumulación adicional de proteínas desplegadas. Tanto las proteínas de superficie como las secretadas se sintetizan en el retículo endoplasmático (RE), donde es necesario que se plieguen y se ensamblen antes de transportarse.

Tal como se usa en el presente documento, el término “célula dendrítica” se refiere a un tipo de célula presentadora

de antígenos (APC) implicada en inmunidad innata y adaptativa. También se denomina “DC”. Las células dendríticas pueden estar presentes en el microentorno tumoral y se denominan “células dendríticas asociadas a tumor” o “tDC”.

Tal como se usa en el presente documento, el término “inmunidad antitumoral” se refiere a una respuesta inmunitaria inducida por el reconocimiento de antígenos cancerosos por células inmunitarias.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, el término “activación de células T” se refiere a la activación celular de células T en reposo que manifiestan una variedad de respuestas (por ejemplo, proliferación de células T, secreción de citoquinas y/o función efectora). La activación de células T puede inducirse por la estimulación del receptor de células T (TCR) con el complejo antígeno/MHC.

- 10 Tal como se usa en el presente documento, el término “capacidad de presentación de antígenos” se refiere a la capacidad de las células presentadoras de antígeno (APC) para presentar antígeno a los linfocitos T para provocar una respuesta inmunitaria. En determinadas realizaciones, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria de tipo I. En determinadas realizaciones, la capacidad de presentación del antígenos se determina midiendo la infiltración y activación de las células T en las ubicaciones tumorales y/o la secreción de IFN- γ y granzima B *ex vivo* por APC (es decir, células dendríticas).

- 15 Tal como se usa en el presente documento, el término “células T antitumorales” se refiere a linfocitos T que se han activado por APC, en las que el antígeno es un antígeno asociado a tumor. Estos linfocitos T inducirán posteriormente la eliminación de células malignas.

- 20 Tal como se usa en el presente documento, el término “respuesta antitumoral” se refiere a al menos una de los siguientes: necrosis tumoral, regresión tumoral, inflamación tumoral, infiltración tumoral por linfocitos T activados o activación de linfocitos infiltrantes de tumor. En determinadas realizaciones, la activación de linfocitos se debe a la presentación de un antígeno asociado a tumor por las APC.

Tal como se usa en el presente documento, el término “supervivencia prolongada” se refiere al aumento de la supervivencia global o libre de progresión en un sujeto tratado en relación con un control no tratado.

- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término “muestra de prueba” es una muestra aislada, obtenida o derivada de un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano. El término “sujeto” o “huésped” está destinado a incluir organismos vivos, pero los sujetos o huéspedes preferidos son mamíferos, y en particular, seres humanos o murinos. El término “sujeto” o “huésped” también incluye células, tales como células procariotas o eucariotas. En realizaciones particularmente preferidas, la “muestra de prueba” es una muestra aislada, obtenida o derivada de un sujeto, por ejemplo, una mujer.

- 30 El término “cantidad suficiente” o “cantidad suficiente para” significa una cantidad suficiente para producir un efecto deseado, por ejemplo, una cantidad suficiente para reducir el tamaño de un tumor.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” es una cantidad que es eficaz para mejorar un síntoma de una enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una “cantidad profilácticamente eficaz”, ya que la profilaxis puede considerarse terapia.

- 35 Tal como se usa en el presente documento, “terapia de combinación” abarca la administración de cada agente o terapia de manera secuencial en un régimen que proporcionará efectos beneficiosos de la combinación y la administración conjunta de estos agentes o terapias de manera sustancialmente simultánea. La terapia de combinación también incluye combinaciones en las que pueden administrarse elementos individuales en diferentes momentos y/o por diferentes vías, pero que actúan en combinación para proporcionar un efecto beneficioso mediante la acción conjunta o el efecto farmacocinético y farmacodinámico de cada agente o enfoques de tratamiento antitumoral de la terapia de combinación. Por ejemplo, los agentes o terapias pueden administrarse de manera simultánea, secuencial o en un régimen de tratamiento en un orden predeterminado.

- 45 Tal como se usa en el presente documento, “aproximadamente” se entenderá por los expertos habituales y variará en cierta medida dependiendo del contexto en el que se usa. Si hay usos del término que no están claros para los expertos habituales dado el contexto en el que se usan, “aproximadamente” significará hasta más o menos el 10% del valor particular.

Debe observarse que, tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

- 50 Diversos aspectos descritos en el presente documento se describen en detalle adicional en las siguientes subsecciones.

Estrés del RE y UPR

La “respuesta de proteínas desplegadas” (UPR) o la “ruta de respuesta de proteínas desplegadas” se inicia cuando hay una acumulación de proteínas desplegadas en el RE. Esto da como resultado la activación transcripcional de los genes que codifican para chaperonas, catalizadores de plegamiento y complejos de degradación de proteínas, así

como la atenuación de la traducción para limitar la acumulación adicional de proteínas desplegadas.

5 Dado que el RE y el núcleo están ubicados en compartimentos separados de la célula, la señal de la proteína desplegada debe detectarse en la luz del RE y transferirse a través de la membrana del RE y recibirse por la maquinaria de transcripción en el núcleo. La UPR realiza esta función para la célula. La activación de la UPR puede
 10 provocarse por el tratamiento de las células con agentes reductores como DTT, por inhibidores de la glicosilación central como la tunicamicina o por ionóforos de Ca que agotan las reservas de calcio en el RE. Descubierta primero en levaduras, la UPR se ha descrito ahora en *C. elegans* así como en células de mamífero. En mamíferos, la cascada de señales de UPR está mediada por tres proteínas transmembrana del RE: la proteína-cinasa y la endorribonucleasa específica de sitio, IRE-1 alfa; el factor 2 cinasa de iniciación de la traducción eucariota, PERK/PEK; y el activador de la transcripción ATF6. Si la UPR no puede adaptarse a la presencia de proteínas
 15 desplegadas en el RE, se inicia una respuesta apoptótica que conduce a la activación de la proteína cinasa JNK y las caspasas 7, 12 y 3. La señal más proximal procedente de la luz del RE se recibe por una endorribonucleasa y cinasa transmembrana denominada IRE-1. Después del estrés del RE, IRE-1 es esencial para la supervivencia porque inicia el corte y empalme del ARNm de XBP1, cuya versión sometida a corte y empalme activa la UPR.

20 La respuesta de proteínas desplegadas (UPR) es una ruta de respuesta de estrés celular principal activada en tumores que les permite adaptarse al estrés del microentorno tumoral. De manera similar, se ha demostrado que la respuesta de estrés del RE opera en células malignas para respaldar el crecimiento tumoral. La presente invención proporciona el novedoso descubrimiento de que la activación constitutiva del sensor de estrés del RE, XBP1, en DC asociadas a cáncer activa la progresión de cáncer (por ejemplo, la progresión de cáncer de ovario). En determinadas realizaciones, la respuesta de estrés del RE está desregulada en células presentes en el microentorno tumoral. En determinadas realizaciones, la respuesta de estrés del RE se activa a través de la señalización de la ruta IRE-1/XBP1. En determinadas realizaciones, la ruta IRE-1/XBP1 es constitutivamente activa en células presentes en el microentorno tumoral.

25 Por consiguiente, en un aspecto, la invención se refiere a un inhibidor directo o indirecto de XBP1 o un inhibidor directo o indirecto de IRE-1 α para su uso en el tratamiento o la reducción de la progresión del cáncer de ovario en un sujeto. Los ejemplos no limitativos de inhibidores directos de XBP1 incluyen una molécula de ácido nucleico que es antisentido con respecto a una molécula de ácido nucleico que codifica para XBP1, un ARNhc de XBP1, un ARNip de XBP, un ARNip de XBP1 encapsulado con nanopartículas (por ejemplo, ARNip de encapsulación en nanopartículas basadas en polietilenimina (PEI)), un microARN que selecciona como diana XBP1, una molécula de XBP1 negativa dominante, un anticuerpo específico para XBP1 e inhibidores de molécula pequeña de XBP1. Los ejemplos no limitativos de inhibidores indirectos de XBP1 incluyen agentes que seleccionan como objetivo IRE-1, una endonucleasa esencial para el correcto corte y empalme y la activación de XBP1, de manera que la inhibición de IRE-1 conduce a la inhibición de la producción de la forma activa, sometida a corte y empalme, de XBP1. Los ejemplos no limitativos de los inhibidores de IRE-1 incluyen una molécula de ácido nucleico que es antisentido con respecto a una molécula de ácido nucleico que codifica para IRE-1, un ARNhc de IRE-1, un ARNip de IRE-1, un ARNip de IRE-1 encapsulado en nanopartículas, un microARN que selecciona como diana IRE-1, una molécula de IRE-1 negativa dominante, un anticuerpo específico para IRE-1 e inhibidores de molécula pequeña de IRE-1.

XBP1

40 La proteína 1 de unión a caja X (XBP1) es un factor de transcripción que actúa como un sensor de estrés del RE al promover la expresión de chaperonas del RE y regular conjuntos distintos de genes diana de una manera específica de tipo celular (Acosta-Alvear *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2001). En determinadas realizaciones, XBP1 se somete a corte y empalme mediante la activación de IRE-1. En determinadas realizaciones, XBP1 sometido a corte y empalme potencia la transcripción de chaperonas del RE.

45 La proteína humana de unión a caja X ("XBP1") es una proteína de unión a ADN y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se describe en, por ejemplo, Liou, H.C., *et al.* 1990. Science 247, 1581-1584 y Yoshimura, T., *et al.* 1990. EMBO J. 9, 2537-2542, y otros homólogos de mamífero de la misma, tales como los descritos en Kishimoto T., *et al.* 1996. Biochem. Biofis Res. Comun. 223, 746-751 (homólogo de rata). Las proteínas a modo destinadas a abarcarse en el término "XBP1" incluyen las que tienen secuencias de aminoácidos dadas a conocer en GenBank con los números de registro A36299 [gi: 105867], NP_005071 [gi: 4827058], P17861 [gi: 139787], CAA39149 [gi: 287645] y BAA82600 [gi: 5596360] o, por ejemplo, codificadas por moléculas de ácido nucleico tal como las dadas a conocer en GenBank con números de registro AF027963 [gi: 13752783]; NM_013842 [gi: 13775155]; o M31627 [gi: 184485]. XBP1 también se conoce en la técnica como TREB5 o HTF (Yoshimura, T., *et al.* 1990. EMBO Journal. 9, 2537; Matsuzaki, Y., *et al.* 1995. J. Biochem. 117, 303). Al igual que otros miembros de la familia b-zip, XBP1 tiene una región básica que media la unión al ADN y una estructura de cremallera de leucina adyacente que media la dimerización de proteínas.

55 Hay dos formas de la proteína XBP-1, no sometida a corte y empalme y sometida a corte y empalme, que difieren en su secuencia y actividad. A menos que se haga referencia explícitamente a la forma en el presente documento, el término "XBP1" tal como se usa en el presente documento incluye tanto formas sometidas a corte y empalme como no sometidas a corte y empalme. XBP1 sometido a corte y empalme ("XBP1s") controla directamente la activación de la UPR, mientras que XBP1 no sometido a corte y empalme funciona para regular negativamente XBP1 sometido
 60

a corte y empalme.

“XBP1 sometido a corte y empalme” (“XBPIs”) se refiere a la forma procesada y sometida a corte y empalme del ARNm de XBP1 de mamífero o la proteína correspondiente. El ARNm de XBP1 humano y murino contiene un marco de lectura abierto (ORF1) que codifica para proteínas bZIP de 261 y 267 aminoácidos, respectivamente. Ambos ARNm también contienen otro ORF, ORF2, que solapa parcialmente pero no está en marco con ORF1. ORF2 codifica para 222 aminoácidos tanto en células humanas y como murinas. ORF1 y ORF2 humano y murino en el ARNm de XBP1 comparten el 75% y el 89% de identidad, respectivamente. En la respuesta de estrés del RE, el ARNm de XBP1 se procesa por la endorribonucleasa y cinasa transmembrana del RE, IRE-1, que escinde un intrón del ARNm de XBP1. En células murinas y humanas, se escinde un intrón de 26 nucleótidos. Los límites de los intrones escindidos se abarcan en una estructura de ARN que incluye dos bucles de siete residuos mantenidos en su sitio por tallos cortos. Las secuencias de ARN de 5' a 3' hasta los límites de los intrones escindidos forman amplias interacciones de pares de bases. El corte y empalme de 26 nucleótidos en células murinas y humanas da como resultado un cambio de marco en el aminoácido 165 (la numeración de los aminoácidos de XBP1 en el presente documento se basa en el número de registro de GenBank NM.sub.-- 013842 [gi: 13775155] y un experto en la técnica puede determinar los números de aminoácidos correspondientes para XBP1 de otros organismos, por ejemplo, realizando una alineación sencilla). Esto provoca la eliminación de los 97 aminoácidos del extremo C-terminal del primer marco de lectura abierto (ORF1) y la adición de los 212 aminoácidos de ORF2 a los 164 aminoácidos del extremo N-terminal de ORF1 que contienen el dominio b-ZIP. En células de mamífero, este evento de corte y empalme da como resultado la conversión de una proteína XBP1 no sometida a corte y empalme de 267 aminoácidos en una proteína XBP1 sometida a corte y empalme de 371 aminoácidos. El XBP1 sometido a corte y empalme se transloca entonces al núcleo donde se une a sus secuencias seleccionadas como diana para inducir su transcripción.

“XBP1 no sometido a corte y empalme” (“XBP1u”) se refiere al ARNm de XBP1 sin procesar o a la proteína correspondiente. Tal como se expuso anteriormente, el XBP1 murino no sometido a corte y empalme tiene una longitud de 267 aminoácidos y el XBP1 murino sometido a corte y empalme tiene una longitud de 371 aminoácidos. La secuencia de XBP1 no sometido a corte y empalme se conoce en la técnica y puede encontrarse, por ejemplo, en Liou, H.C., *et al.* 1990. *Science* 247,1581-1584 y Yoshimura, T., *et al.* 1990. *EMBO J.* 9, 2537-2542, o en los números de registro de GenBank NM_005080 [gi: 14110394] o NM_013842 [gi: 13775155].

Tal como se usa en el presente documento, el término “XBP1 funcional” se refiere a la forma sometida a corte y empalme de XBP1, que actúa como factor de transcripción para activar la UPR.

Tal como se usa en el presente documento, el término “razón de XBP1 sometido a corte y empalme con respecto a no sometido a corte y empalme” se refiere a la cantidad de XBP1 sometido a corte y empalme presente en una célula o un sistema libre de células, en relación con la cantidad de XBP1 no sometido a corte y empalme presente en la célula o el sistema libre de células. “La razón de XBP1 no sometido a corte y empalme con respecto a la cantidad de XBP1 sometido a corte y empalme” se refiere a la cantidad de XBP1 no sometido a corte y empalme en comparación con la cantidad de XBP1 no sometido a corte y empalme. “Aumentar la razón de XBP1 sometido a corte y empalme con respecto a XBP1 no sometido a corte y empalme” abarca aumentar la cantidad de XBP1 sometido a corte y empalme o disminuir la cantidad de XBP1 no sometido a corte y empalme, por ejemplo, promoviendo la degradación de XBP1 no sometido a corte y empalme. El aumento de la razón de XBP1 no sometido a corte y empalme con respecto a XBP1 sometido a corte y empalme puede lograrse, por ejemplo, disminuyendo la cantidad de XBP1 sometido a corte y empalme o aumentando la cantidad de XBP1 no sometido a corte y empalme. Los niveles de XBP1 sometido a corte y empalme y no sometido a corte y empalme pueden determinarse tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, comparando las cantidades de cada una de las proteínas que pueden distinguirse basándose en sus pesos moleculares o basándose en su capacidad para reconocerse por un anticuerpo. En otra realización descrita en más detalle a continuación, la PCR puede realizarse empleando cebadores que abarcan la unión de corte y empalme para identificar XBP1 no sometido a corte y empalme y XBP1 sometido a corte y empalme y la razón de estos niveles puede calcularse fácilmente.

La presente invención se refiere al novedoso descubrimiento de que XBP1 es constitutivamente activo en las DC asociadas a cáncer, tales como las DC asociadas a cáncer de ovario. En una realización, la presente invención se refiere al novedoso descubrimiento de que la inmunidad antitumoral se potencia o aumenta en un sujeto mediante la inhibición directa o indirecta de XBP1. En otra realización, la presente invención se refiere al descubrimiento de que el cáncer de ovario puede tratarse o reducirse en un sujeto administrando una cantidad eficaz de un inhibidor directo o indirecto de XBP1 al sujeto.

IRE-1 α

El término “IRE-1” o “IRE-1 α ” se refiere a una endorribonucleasa y cinasa transmembrana de RE denominada “serina/treonina-proteína cinasa/endorribonucleasa” o, alternativamente, “proteína 1 que requiere inositol”, que se oligomeriza y se activa mediante autofosforilación al detectar la presencia de proteínas desplegadas, véase, por ejemplo, Shamu *et al.*, (1996) *EMBO J.* 15: 3028-3039. En *Saccharomyces cerevisiae*, la UPR está controlada por IREp. En el genoma de mamíferos, hay dos homólogos de IRE-1, IRE-1 α e IRE-1 β . IRE-1 α se expresa en todas las células y tejidos, mientras que IRE-1 β se expresa principalmente en el tejido intestinal. Las endorribonucleasas de

IRE-1 α e IRE-1 β son suficientes para activar la UPR. Por consiguiente, tal como se usa en el presente documento, el término “IRE-1” incluye, por ejemplo, IRE-1 α , IRE-1 β e IREp. En una realización preferida, IRE-1 se refiere a IRE-1 α .

5 IRE-1 es una proteína grande que tiene un segmento transmembrana que ancla la proteína a la membrana del RE. Un segmento de la proteína IRE-1 tiene homología con las proteínas cinasas y el extremo C-terminal tiene alguna homología con las ARNasas. La sobreexpresión del gen de IRE-1 conduce a la activación constitutiva de la UPR. La fosforilación de la proteína IRE-1 se produce en los residuos específicos de serina o treonina en la proteína.

10 IRE-1 detecta la sobreabundancia de proteínas desplegadas en la luz del RE. La oligomerización de esta cinasa conduce a la activación de una endorribonucleasa C-terminal mediante la trans-autofosforilación de sus dominios citoplasmáticos. IRE-1 usa su actividad endorribonucleasa para escindir un intrón del ARNm de XBP1. La escisión y la eliminación de un pequeño intrón van seguidas por una nueva unión de los fragmentos en 5' y 3' para producir un ARNm procesado que se traduce más eficazmente y codifica para una proteína más estable (Calfon *et al.* (2002) Nature 415 (3): 92-95). La especificidad de nucleótidos de la reacción de escisión para someter a corte y empalme XBP1 está bien documentada y se asemeja mucho a la escisión mediada por IRE-p del ARNm de HAC1 (Yoshida *et al.* (2001) Cell 107: 881-891). En particular, la escisión mediada por IRE-1 del ADNc de XBP1 murino se produce en los nucleótidos 506 y 532 y da como resultado la escisión de un fragmento de 26 pares de bases. La escisión mediada por IRE-1 de XBP1 derivada de otras especies, incluyendo los seres humanos, se produce en los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos 506 y 532 del ADNc de XBP1 murino, por ejemplo, entre los nucleótidos 502 y 503 y 528 y 529 de XBP1 humano.

20 Tal como se usa de manera intercambiable en el presente documento, “actividad de IRE-1”, “actividad biológica de IRE-1” o “actividad funcional de IRE-1” incluye una actividad ejercida por IRE-1 sobre una diana o sustrato que responde a IRE-1, tal como se determina *in vivo*, o *in vitro*, según técnicas convencionales (Tirasophon *et al.* 2000. Genes and Development Genes Dev. 2000 14: 2725-2736). La actividad de IRE-1 puede ser una actividad directa, tal como la fosforilación de un sustrato (por ejemplo, la actividad autocinasa) o la actividad endorribonucleasa en un sustrato, por ejemplo, el ARNm de XBP1. En otra realización, la actividad de IRE-1 es una actividad indirecta, tal como un acontecimiento posterior producido por la interacción de la proteína IRE-1 con una diana o sustrato de IRE-1. Como IRE-1 está en una ruta de transducción de señales que implica a XBP1, la modulación de IRE-1 modula una molécula en una ruta de transducción de señales que implica a XBP1. Los moduladores que modulan una actividad biológica de XBP1 modulan indirectamente la expresión y/o la actividad de una molécula en una ruta de transducción de señales que implica a XBP1, por ejemplo, IRE-1, PERK, eIF2 α o ATF6 α .

La presente invención proporciona el novedoso descubrimiento de que la selección como diana de la rama de IRE-1 α /XBP1 de la respuesta de estrés del RE en DC asociadas a tumor induce respuestas inmunitarias protectoras contra el cáncer (por ejemplo, cáncer de ovario). En alguna realización, la invención proporciona que la inhibición de IRE-1 α en DC asociadas a tumor prolonga la supervivencia del huésped al potenciar la inmunidad antitumoral.

35 Inmunidad antitumoral

El sistema inmunitario desempeña un papel crítico en la protección del huésped contra el cáncer. En particular, el microentorno tumoral es un aspecto importante de la biología del cáncer que contribuye al inicio del tumor, la progresión del tumor y las respuestas a la terapia. Las células y las moléculas del sistema inmunitario son un componente fundamental del microentorno tumoral.

40 Dado que el tejido tumoral se caracteriza por una variedad de antígenos que no se encuentran normalmente en el tejido normal, el sistema inmunitario puede dar lugar a una respuesta protectora. En determinadas realizaciones, estos antígenos se denominan “antígenos asociados a tumor (TAA)”. La inmunidad innata contra el tumor actúa muy rápidamente. Los macrófagos, que están programados para atacar y destruir las células tumorales de la misma manera que eliminan los patógenos invasores, son atraídos hacia el tumor (Mantovani *et al.*, Nature Reviews Immunology 2011; 11, 519-531). Con el tiempo, se desarrollan respuestas inmunitarias antitumorales adaptativas. Las células dendríticas migran hacia el tumor como parte de la respuesta inmunitaria innata y sirven como enlace entre la inmunidad innata y la adaptativa. En determinadas realizaciones, las células dendríticas procesan antígenos tumorales y luego interactúan directamente con las células T y B, estimulando posteriormente las respuestas inmunitarias específicas. La respuesta inicial del sistema inmunitario a un tumor es reclutar linfocitos en un intento por eliminar el tumor. Los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) incluyen linfocitos T citotóxicos (CTL), células T cooperadoras y linfocitos citolíticos naturales (NK). Las proteínas asociadas con tumorigénesis o el crecimiento maligno también pueden estimular inmunidad humoral (Suckow, The Veterinary Journal 2013; 198, 28-33).

55 La coordinación de la respuesta inmunitaria antitumoral requiere la comunicación entre las células del sistema inmunitario, llevada a cabo en su mayor parte por citoquinas (Dranoff, Nature Reviews Cancer 2004; 4, 11-22). Por ejemplo, la interleucina (IL)-6 producida por linfocitos T y macrófagos potencia la proliferación de linfocitos tanto T como B. Asimismo, el interferón-gamma (IFN γ) se produce por células NK, linfocitos T, macrófagos y linfocitos B y potencia la presentación de antígenos tumorales junto con la citotoxicidad mediada por células.

El tipo de célula predominante dentro del estroma tumoral es el fibroblasto. Los fibroblastos asociados a cáncer

producen una variedad de factores que promueven la proliferación y progresión del cáncer, incluyendo osteonectina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y metaloproteinasas de la matriz (MMP). Muchos de estos factores se producen ampliamente por células normales y, por tanto, el sistema inmunitario se restringe a sí mismo para no atacar estos objetivos (Rasanen y Vaheri, *Experimental Cell Research* 2010; 316, 2713-2722).

5 En determinadas realizaciones, la presencia de un tumor sirve como evidencia de que células cancerosas han evitado satisfactoriamente la eliminación inmunitaria. Esto puede producirse debido a la presión de selección inmunitaria que favorece el crecimiento de tumores que son menos inmunogénicos (Dunn *et al.*, *Nature Immunology* 2002; 3, 991-998). Los tumores también pueden escapar a través de la expresión de moléculas antiapoptóticas (Reed, *Current Opinion in Oncology* 1999; 11, 68-75). Factores tales como VEGF, Fas soluble y factor de crecimiento transformante (TGF)- β , que se producen por células tumorales y el estroma tumoral, pueden suprimir la respuesta inmunitaria antitumoral (Ben-Baruch, *Seminars in Cancer Biology* 2006; 16, 38-52; Whiteside, *Seminars in Cancer Biology* 2006; 16, 3-15). Las células del estroma tumoral crean un entorno en el que las células cancerosas están expuestas a factores de crecimiento y evitan el reconocimiento inmunitario. Por ejemplo, las células del estroma producen trombospondina-1 y esto conduce a la supresión inmunitaria a través de la activación de TGF- β (Silze *et al.*, *International Journal of Cancer* 2004; 108, 173-180).

El aprovechamiento de la capacidad inherente de las células T para eliminar células tumorales representa la estrategia anticancerígena más prometedora desde el desarrollo de la quimioterapia, tal como se demostró más recientemente por la notable reducción del melanoma en respuesta a bloqueantes de punto de control anti-CTLA4 y anti-PD 1. Además, informes recientes demuestran que las células T antitumorales transferidas de manera adoptiva (expandidas a partir de muestras de tumores resecados o manipuladas genéticamente) pueden provocar respuestas antitumorales robustas y duraderas (Bollard *et al.*, 2007; Dudley *et al.*, 2002; Leen *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2006). Sin embargo, en la mayoría de los casos, la actividad citotóxica óptima de tales células T reactivas al tumor se reduce notablemente porque las DC asociadas a cáncer no pueden soportar la función de las células T. (Barnett *et al.*, 2005; Conejo-García *et al.*, 2004; Cubillos-Ruiz *et al.*, 2009; Curiel *et al.*, 2003; Huarte *et al.*, 2008). La presente invención revela por primera vez que la delección específica de DC de XBP1 puede prolongar la supervivencia del huésped al convertir las tDC inmunosupresoras en activadores potentes de la inmunidad de tipo 1 en células T infiltrantes de cáncer de ovario. De hecho, el silenciamiento terapéutico de XBP1 en tDC utilizando nanoportadores que encapsulan ARNiP revirtió su fenotipo inmunosupresor y prolongó significativamente la supervivencia del huésped al inducir respuestas inmunitarias antitumorales protectoras. Se necesitan estrategias terapéuticas novedosas y más eficaces para mejorar el sombrío pronóstico de las pacientes con cáncer de ovario metastásico. La presente invención demuestra por primera vez la viabilidad y el potencial inmunoterápico significativo de seleccionar como diana XBP1 activado por estrés del RE en tDC usando un sistema seguro y eficaz basado en nanotecnología que puede retardar o prevenir la recurrencia habitualmente inevitable observada en pacientes con cáncer de ovario metastásico que se han sometido a extirpación quirúrgica incompleta "de manera óptima". La presente invención también proporciona que la selección como diana de la respuesta de estrés del RE aberrante en células inmunitarias innatas del microentorno tumoral también puede representar una estrategia terapéutica viable para hacer frente a otros cánceres mortales que normalmente se aprovechan de la respuesta inmunitaria para promover la progresión maligna. Por tanto, la presente invención proporciona por primera vez que la selección como diana de la rama IRE-1 α /XBP1 de la respuesta de estrés del RE en huéspedes que portan cáncer podría usarse para inhibir el crecimiento del tumor a la vez que induce simultáneamente una inmunidad antitumoral robusta.

En una realización, la presente invención se refiere al novedoso descubrimiento de que la activación constitutiva de XBP1 en células dendríticas asociadas a tumor permite que los tumores manipulen la función de DC y eludan el control inmunitario. En otra realización, la presente invención se refiere al descubrimiento de que eliminar la expresión de XBP1 en células dendríticas asociadas a tumor potencia o induce la inmunidad antitumoral y prolonga la supervivencia del huésped. En determinadas realizaciones, la inhibición de XBP1 potencia la infiltración de células T activadas en ubicaciones tumorales. En determinadas realizaciones, la inhibición de XBP1 aumenta la capacidad de las células T infiltrantes para responder a antígenos tumorales.

Células dendríticas

Las células dendríticas (DC) son reguladores clave de la inmunidad tanto innata como adaptativa, y la serie de funciones inmunorreguladoras mostradas por estas células viene dictada por su diferenciación, maduración y estado de activación. Un papel importante de estas células es la inducción de la inmunidad a los patógenos; sin embargo, datos recientes demuestran que las DC también son agentes reguladores críticos de las respuestas inmunitarias antitumorales. En determinadas realizaciones, la generación de inmunidad antitumoral protectora depende de la presentación de antígenos tumorales por las DC a las células T. El control de la supervivencia de las DC desempeña un papel importante en la regulación de la activación y función de las células T.

Las DC inician una respuesta inmunitaria presentando un antígeno capturado, en forma de complejos de moléculas de péptido-complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), a células T indiferenciadas en tejidos linfoides. Tras la interacción con las DC, las células T CD4 + y CD8 + indiferenciadas pueden diferenciarse para dar células efectoras específicas de antígeno. Las DC también desempeñan un papel directo en la inmunidad humoral al interactuar con células B e indirectamente al inducir la expansión y diferenciación de las células T cooperadoras CD4 +.

La presentación de antígenos para dar lugar a una respuesta inmunitaria es una de las funciones principales de las células dendríticas. Las DC asociadas a tumor tienen la misma función, pero los antígenos normalmente están asociados a tumor (TAA). Los tumores pueden impedir la presentación de antígenos y el establecimiento de respuestas inmunitarias específicas de tumor a través de una variedad de mecanismos. Por ejemplo, los tumores cambian la diferenciación de monocitos para dar macrófagos y no DC, o impiden la sensibilización de células T específicas de tumor mediante DC, a través de la mediación de IL-2 y el factor estimulante de colonias de macrófagos. En determinadas realizaciones, los tumores pueden interferir con la maduración de DC. Por ejemplo, las células tumorales pueden secretar IL-10, lo que conduce a anergia específica de antígeno de las DC. En determinadas realizaciones, las DC son DC asociadas a tumor (tDC). Estos tDC están presentes en el microentorno tumoral. La presente invención proporciona el novedoso descubrimiento de que los tumores se basan en XBP1 intrínseca de DC para eludir el control inmunitario. La presente invención también proporciona el novedoso descubrimiento de que la inhibición de XBP1 en DC asociadas a tumor prolonga la supervivencia del huésped al aumentar la inmunidad antitumoral.

En una realización, la presente invención se refiere al novedoso descubrimiento de que el sensor de estrés del RE, XBP1, es constitutivamente activo en DC asociadas a cáncer, tales como DC asociadas a cáncer de ovario. En otra realización, la presente invención se refiere al descubrimiento de que el subproducto de la peroxidación de lípidos, 4-HNE, desencadena el estrés del RE y la activación de XBP1 en DC. En otra realización, la presente invención se refiere al descubrimiento de que XBP1 regula el metabolismo de lípidos y la presentación de antígenos por las DC asociadas a tumor.

XBP1 y células dendríticas

XBP1 es un factor de transcripción expresado en células dendríticas y activado por IRE-1 α , una cinasa y endorribonucleasa transmembrana del RE. XBP1 funciona para regular la respuesta de estrés del RE al mantener la homeostasis del RE e impedir la activación de las rutas de muerte celular provocadas por el estrés del RE sostenido. La respuesta de estrés del RE, o respuesta de proteínas desplegadas (UPR) se activa cuando las proteínas desplegadas se acumulan en el RE y funciona para regular el equilibrio entre la homeostasis y la apoptosis. En determinadas realizaciones, XBP1 desempeña un papel en la diferenciación y supervivencia de las DC. Por ejemplo, las células deficientes en XBP1 son más sensibles a la apoptosis (Iwakoshi 2007).

Los presentes inventores han descubierto que XBP1 es constitutivamente activo en células dendríticas asociadas a tumor.

En una realización, la presente invención proporciona el novedoso descubrimiento de que XBP1 es un activador de la disfunción de las células dendríticas en el microentorno tumoral. En otra realización, la presente invención proporciona que XBP1 es constitutivamente activo en células dendríticas asociadas a cáncer, tales como células dendríticas asociadas a cáncer de ovario. En determinadas realizaciones, las tDC deficientes en XBP1 demuestran una capacidad potenciada de presentación de antígenos. En determinadas realizaciones, silenciar o inhibir XBP1 mejora la supervivencia del huésped e induce inmunidad antitumoral. En determinadas realizaciones, la inducción de inmunidad antitumoral se lleva a cabo por células T infiltrantes activadas que responden a antígenos tumorales.

XBP1 y cáncer de ovario

Durante el desarrollo y la progresión del tumor, las células cancerosas se encuentran con estados citotóxicos tales como hipoxia, privación de nutrientes y pH bajo debido a una vascularización inadecuada (Hanahan, D., *et al.* 2011. Cell 144, 646-74.). Para mantener la supervivencia y el crecimiento frente a estos factores de estrés fisiológicos, se induce un conjunto de rutas de respuesta adaptativa. Una ruta adaptativa bien estudiada en otros contextos es la respuesta de proteínas desplegadas (UPR), que se induce por factores que afectan el retículo endoplasmático (RE), tales como cambios en la glicosilación, estado redox, disponibilidad de glucosa, homeostasis del calcio o acumulación de proteínas desplegadas o incorrectamente plegadas (Hetz, C., *et al.* 2011. Physiol Rev 91, 1219-43). En particular, las características del microentorno tumoral, como la hipoxia y la privación de nutrientes, pueden alterar la homeostasis del RE por la perturbación de procesos aerobios tales la modificación de oligosacáridos, la formación de enlaces disulfuro, la isomerización y el control de calidad y la exportación de proteínas (Wouters, B. G., *et al.* 2008. Nat Rev Cancer 8, 851-64). En células de mamíferos, la UPR está mediada por tres sensores proteicos transmembrana localizados en el RE: cinasa/endonucleasa 1 (IRE-1) transmembrana que requiere inositol, cinasa del RE similar a PKR (PERK) y factor de transcripción activante 6 (ATF6) (Walter, P., *et al.* 2011. Science 334, 1081-6). De estos, IRE-1 es la rama más conservada evolutivamente. Un aumento en la carga de proteínas de plegamiento en el RE activa IRE-1, una cinasa y endorribonucleasa residente en el RE que actúa como sensor de estrés del RE. La IRE-1 activada elimina un intrón de 26 pb del ARNm de XBP1 y da como resultado un cambio de marco en la secuencia codificante, codificando la forma sometida a corte y empalme para un dominio de activación transcripcional de 226 aminoácidos (Calfon, M., *et al.* 2002. Nature 415, 92-6; Yoshida, H., *et al.* 2001. Cell 107, 881-91.). En contraposición a XBP1 no sometido a corte y empalme (XBPlu), que es inestable y se degrada rápidamente, XBP1 sometido a corte y empalme (XBPIs) es estable y es un potente inductor de genes diana que orquestan la respuesta celular al estrés del RE (Hetz, C., *et al.* 2011. Physiol Rev 91, 1219-43).

Como se describió en detalle anteriormente, la UPR es una importante ruta de respuesta de estrés celular activada

en tumores que les permite adaptarse al estrés del microentorno tumoral. Varios estudios han informado sobre la activación de la UPR en diversos tumores humanos y su relevancia para la terapia combinatoria (Carrasco, D.R., *et al.* 2007. *Cancer Cell* 11, 349-36.; De Raedt, T., *et al.* 2011. *Cancer Cell* 20, 400-413.; Healy, S.J., *et al.* 2009. *Eur J Pharmacol* 625, 234-246; Ma, Y., *et al.* 2004. *Nat Rev Cancer* 4, 966-977; Mahoney, D.J., *et al.* 2011. *Cancer Cell* 20, 443-456). Sin embargo, el papel de la UPR y XBP1 en la inmunidad antitumoral es en gran parte desconocido. En el presente documento, los presentes inventores han identificado una función previamente desconocida de XBP1 en la inmunidad antitumoral y el cáncer de ovario. En el presente documento, se demuestra que la activación constitutiva de XBP1, un componente clave de la rama más conservada evolutivamente de la UPR, permite que los tumores evadan el control inmunitario al paralizar la función normal de las DC. Además, la delección y/o el silenciamiento de XBP1 inhibe el crecimiento y/o la progresión del tumor e induce una inmunidad antitumoral robusta.

Los tumores progresan cuando el huésped no proporciona una respuesta inmunitaria antitumoral eficaz. Antes del descubrimiento de la presente invención, se desconocía el papel de XBP1 en la inmunidad antitumoral. En el presente documento, los presentes inventores han identificado un papel para XBP1 para eludir el control inmunitario y por tanto, para inducir la progresión del desarrollo del tumor, tal como el desarrollo del tumor de ovario. En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona que XBP1 es constitutivamente activo en células dendríticas asociadas a tumor presentes en tumores de ovario en comparación con células dendríticas normales. En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona que la activación constitutiva de XBP1 es crítica para el inicio y la rápida progresión de los tumores de ovario. En particular, las tDC deficientes en XBP1 no logran iniciar ni hacer progresar el desarrollo del tumor (por ejemplo, tumores de ovario). En determinadas realizaciones, la rápida progresión de los tumores de ovario es un resultado de XBP1 constitutivamente activo en células dendríticas asociadas a tumor. En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona que la progresión tumoral y/o la carga tumoral se reduce en tDC deficientes en XBP1, lo que indica un papel importante para XBP1 en el desarrollo y la progresión de tumores de ovario.

Metabolismo y peroxidación de lípidos

Las DC asociadas a cáncer acumulan cantidades sustanciales de lípidos oxidados, y este proceso anómalo regula negativamente su capacidad de presentación de antígenos (Herber *et al.*, 2010; Ramakrishnan *et al.*, 2014). Tal como se proporciona en la presente invención, los análisis transcripcionales y funcionales de las tDC desprovistas de XBP1 sugieren que este sensor de estrés del RE conservado facilita la acumulación aberrante de lípidos comúnmente observada en las DC disfuncionales asociadas a cáncer.

La oxidación de lípidos por especies reactivas de oxígeno (ROS) genera subproductos reactivos como el aldehído insaturado 4-hidroxi-*trans*-2-nonenal (4-HNE), que se ha demostrado que induce el estrés de plegamiento de proteínas mediante la formación de aductos estables con chaperonas residentes en el RE (Vladykovskaya *et al.*, 2012). Por primera vez, la presente invención proporciona que el 4-HNE, un subproducto de la peroxidación de lípidos disponible en el microentorno del cáncer de ovario humano y de ratón, puede desencadenar rápidamente un estrés del RE robusto y la activación de XBP1 en DC indiferenciadas. Resulta interesante que se ha demostrado que 4-HNE induce la respuesta de proteínas desplegadas en células endoteliales mediante la formación de aductos covalentes con chaperonas residentes en el RE, un proceso que promueve la inflamación vascular (Vladykovskaya *et al.*, 2012). La respuesta de estrés del RE se ha asociado con la biosíntesis de lípidos (Lee *et al.*, 2008; Sriburi *et al.*, 2004). Sin embargo, la presente invención indica que la acumulación potenciada de lípidos intracelulares por tDC requiere la generación de ROS y la activación de IRE-1 α /XBP1. Resulta interesante que se ha demostrado que la exposición a 4-HNE que activa XBP1 promueve la acumulación de grasa en gusanos y ratones (Singh *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2009). Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona que subproductos metabólicos reactivos en el microentorno tumoral, como 4-HNE, pueden perpetuar el estrés del RE en células inmunitarias infiltrantes, como las tDC. La activación constitutiva de la rama IRE-1 α /XBP1 a través de este proceso promueve posteriormente la acumulación anómala de lípidos intracelulares en las tDC a través de la regulación por incremento de genes biosintéticos de lípidos, que en última instancia inhiben su capacidad natural para respaldar las respuestas antitumorales mediadas por células T.

En una realización, la presente invención proporciona que las tDC deficientes en XBP1 muestran una marcada regulación por disminución de los genes implicados en las rutas metabólicas de los lípidos. Estos genes biosintéticos de lípidos se regulan por incremento rápidamente en las DC indiferenciadas expuestas a 4-HNE, un subproducto de la peroxidación de lípidos de activación de XBP1. Esta acumulación aberrante de lípidos por tDC obstruye su capacidad normal de procesamiento y presentación de antígenos (Herber *et al.*, 2010; Ramakrishnan *et al.*, 2014).

En una realización, la presente invención proporciona que el subproducto de la peroxidación de lípidos, 4-HNE, desencadena el estrés del RE y la activación de XBP1 en DC. En otra realización, la presente invención proporciona que XBP1 regula el metabolismo de lípidos y la presentación de antígenos por DC asociadas a tumor. En una realización, la presente invención proporciona que las tDC deficientes en XBP1 tienen una acumulación de lípidos intracelular reducida y una capacidad de presentación de antígenos mejorada, lo que conduce a una activación de células T intratumorales potenciada y una supervivencia del huésped aumentada.

Selección como diana terapéutica de la UPR

En la presente invención, se ha descubierto un papel inesperado para el sensor de estrés del RE, XBP1, como activador principal del mal funcionamiento de las DC en el microentorno tumoral. Estos hallazgos revelan un nuevo paradigma mecanicista mediante el cual un cáncer mortal se aprovecha de la rama más conservada de la respuesta de estrés del RE en las DC residentes en el tumor para afectar a su homeostasis lipídica, alterar su capacidad local de presentación de antígenos y finalmente evadir el control inmunitario mediado por células T. Si bien se ha demostrado previamente que la respuesta de estrés del RE, y especialmente la activación de XBP1, opera en las células cancerosas para promover la tumorigénesis, la presente invención revela ahora que esta ruta celular integrada respalda aún más la progresión maligna al inhibir el desarrollo de inmunidad antitumoral protectora a través de la manipulación de la función normal de las DC.

La cinasa y endorribonucleasa en el sentido de 5', IRE-1, que activa el corte y empalme del ARNm de XBP1, es una diana farmacológica viable. Recientemente, dos grupos han identificado inhibidores específicos de la endorribonucleasa IRE-1 (Papandreou, I., *et al.* 2011. *Blood* 117, 1311-1314.; Volkmann, K., *et al.* 2011. *J Biol Chem* 286, 12743-12755). Resulta sorprendente que estos compuestos inhiben eficazmente el corte y empalme de XBP1 *in vivo* y deterioran notablemente el crecimiento del tumor en un modelo de xenoinjerto (Mahoney, D.J., *et al.* 2011. *Cancer Cell* 20, 443-456.; Papandreou, I., *et al.* 2011. *Blood* 117, 1311-1314.; Volkmann, K., *et al.* 2011. *J Biol Chem* 286, 12743-12755). Aunque los tamices moleculares pequeños a gran escala han proporcionado candidatos potencialmente prometedores que tienen como objetivo la ruta IRE-1/XBP1, es necesario prestar atención a la especificidad y la citotoxicidad de estos compuestos *in vivo*. Los avances recientes en la resolución de la estructura cristalina de IRE-1 (Korennykh, A.V., *et al.* 2009. *Nature* 457, 687-693.; Lee, K.P., *et al.* 2008. *Cell* 132, 89-100.; Zhou, J., *et al.* 2006. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14343-14348) deberían acelerar el diseño de inhibidores de IRE-1 más potentes y específicos. El uso de inhibidores de la UPR en combinación con quimioterapia convencional puede potenciar enormemente la eficacia de las terapias antitumorales.

Los métodos de la invención que utilizan compuestos inhibidores que inhiben la expresión, el procesamiento, la modificación postraduccional o la actividad de XBP1 o una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1, tal como IRE-1 α , pueden usarse para inducir inmunidad antitumoral o en el tratamiento del cáncer (por ejemplo, cáncer de ovario). En una realización de la invención, puede usarse un compuesto inhibidor para inhibir (por ejemplo, inhibir específicamente) la expresión, el procesamiento, la modificación postraduccional o la actividad de XBP1 sometido a corte y empalme. En otra realización, puede usarse un compuesto inhibidor para inhibir (por ejemplo, inhibir específicamente) la expresión, el procesamiento, la modificación postraduccional o la actividad de XBP1 no sometido a corte y empalme.

Los compuestos inhibidores de la invención pueden ser, por ejemplo, moléculas de unión intracelular que actúan para inhibir directa o indirectamente la expresión, el procesamiento, la modificación postraduccional o la actividad de XBP1 o una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1, por ejemplo, IRE-1 α . Tal como se usa en el presente documento, el término "molécula de unión intracelular" pretende incluir moléculas que actúan intracelularmente para inhibir el procesamiento, la expresión o la actividad de una proteína mediante la unión a la proteína o a un ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARNm) que codifica para la proteína. Los ejemplos de moléculas de unión intracelular, descritas con más detalle a continuación, incluyen ácidos nucleicos antisentido, anticuerpos intracelulares, compuestos peptídicos que inhiben la interacción de XBP1 o una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α) y una molécula diana y agentes químicos que inhiben específica o directamente la actividad de XBP1 o la actividad de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α).

En una realización, un compuesto inhibidor de la invención es una molécula de ácido nucleico antisentido que es complementaria a un gen que codifica para XBP1 o una molécula en una ruta de transducción de señales que implica a XBP1, (por ejemplo, IRE-1 α o una molécula con la que interacciona XBP1), o a una parte de dicho gen, o un vector de expresión recombinante que codifica para dicha molécula de ácido nucleico antisentido. Se conoce bien en la técnica el uso de ácidos nucleicos antisentido para regular por disminución la expresión de una proteína particular en una célula (véase, por ejemplo, Weintraub, H. *et al.*, *Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis*, *Reviews - Trends in Genetics*, vol. 1 (1) 1986; Askari, F.K. y McDonnell, W.M. (1996) *N. Eng. J. Med.* 334: 316-318; Bennett, M.R. y Schwartz, S.M. (1995) *Circulation* 92: 1981-1993; Mercola, D. y Cohen, J.S. (1995) *Cancer Gene Ther.* 2: 47-59; Rossi, J.J. (1995) *Br. Med. Bull.* 51: 217-225; Wagner, R.W. (1994) *Nature* 372: 333-335). Una molécula de ácido nucleico antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la cadena codificante de otra molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ARNm) y, por consiguiente, puede formar enlaces de hidrógeno con la cadena codificante de la otra molécula de ácido nucleico. Las secuencias antisentido complementarias a una secuencia de un ARNm pueden ser complementarias a una secuencia encontrada en la región codificante del ARNm, la región no traducida en 5' o 3' del ARNm o una región que une la región codificante y una región no traducida (por ejemplo, en la unión de la región no traducida en 5' y la región codificante). Además, un ácido nucleico antisentido puede ser complementario en secuencia a una región reguladora del gen que codifica para el ARNm, por ejemplo una secuencia de iniciación de la transcripción o un elemento regulador. Preferiblemente, un ácido nucleico antisentido está diseñado para ser complementario a una región que precede o abarca el codón de iniciación en la cadena codificante o en la región no traducida en 3' de un ARNm. Dada la secuencia de nucleótidos conocida para la cadena codificante del gen XBP1 y por tanto, la secuencia conocida del ARNm de XBP1, los ácidos nucleicos antisentido de la invención pueden diseñarse según las reglas de

emparejamiento de bases de Watson y Crick. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementario a la región que rodea el sitio de inicio de la traducción de un XBP1. Un oligonucleótido antisentido puede tener, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 nucleótidos de longitud. De manera similar, los ácidos nucleicos antisentido que seleccionan como diana IRE-1 α también pueden diseñarse según las reglas de emparejamiento de bases de Watson y Crick. Un ácido nucleico antisentido de la invención puede construirse usando síntesis química y reacciones de unión enzimática usando procedimientos conocidos en la técnica. Para inhibir la expresión en células, pueden usarse uno o más oligonucleótidos antisentido.

Alternativamente, un ácido nucleico antisentido puede producirse biológicamente usando un vector de expresión en el que todo o una parte de un ADNc se ha subclonado en una orientación antisentido (es decir, el ácido nucleico transcrito a partir del ácido nucleico insertado será de una orientación antisentido con respecto a un ácido nucleico diana de interés). El vector de expresión antisentido puede estar en forma de, por ejemplo, un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado. El vector de expresión antisentido puede introducirse en células usando una técnica de transfección convencional.

Las moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención se administran normalmente a un sujeto o se generan *in situ* de modo que se hibriden con o se unan a ARNm celular y/o ADN genómico que codifica para una proteína para inhibir de ese modo la expresión de la proteína, por ejemplo, al inhibir la transcripción y/o traducción. Un ejemplo de una vía de administración de una molécula de ácido nucleico antisentido de la invención incluye la inyección directa en un sitio de tejido (por ejemplo, un sitio tumoral). Alternativamente, una molécula de ácido nucleico antisentido puede modificarse para seleccionarse como diana en células seleccionadas (por ejemplo, células dendríticas asociadas a tumor) y luego administrarse por vía sistémica. Por ejemplo, para la administración sistémica, una molécula antisentido puede modificarse de modo que se una específicamente a un receptor o un antígeno expresado en una superficie celular seleccionada, por ejemplo, al unir la molécula de ácido nucleico antisentido a un péptido o un anticuerpo que se une a un receptor o antígeno de la superficie celular. La molécula de ácido nucleico antisentido también puede administrarse a células usando los vectores descritos en el presente documento.

Aún en otra realización, una molécula de ácido nucleico antisentido de la invención es una molécula de ácido nucleico α -anomérico. Una molécula de ácido nucleico α -anomérico forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en el que, a diferencia de las unidades β habituales, las cadenas discurren paralelas entre sí (Gaultier *et al.* (1987) *Nucleic Acids Res.* 15: 6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido también puede comprender un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue *et al.* (1987) *Nucleic Acids Res.* 15: 6131-6148) o un análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue *et al.* (1987) *FEBS Lett.* 215: 327-330).

En determinadas realizaciones, una molécula de ácido nucleico antisentido de la invención es una ribozima. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas con actividad ribonucleasa que pueden escindir un ácido nucleico monocatenario, tal como un ARNm, con el que tienen una región complementaria. Por tanto, las ribozimas (por ejemplo, las ribozimas de cabeza de martillo (descritas en Haselhoff y Gerlach (1988) *Nature* 334: 585-591)) pueden utilizarse para escindir catalíticamente transcritos de ARNm para inhibir de ese modo la traducción de los ARNm. Alternativamente, la expresión génica puede inhibirse seleccionando como diana secuencias de nucleótidos complementarias a la región reguladora de un gen (por ejemplo, un promotor y/o potenciador de XBP1) para formar estructuras de triple hélice que impiden la transcripción de un gen en células diana. Véase en general, Helene, C. (1991) *Anticancer Drug Des.* 6 (6): 569-84; Helene, C. *et al.* (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660: 27-36; y Maher, L.J. (1992) *Bioassays* 14 (12): 807-15.

En otra realización, un compuesto que promueve la iARN puede usarse para inhibir la expresión de XBP1 o una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1. El término "interferencia de ARN" o "iARN", tal como se usa en el presente documento, se refiere en general a un proceso selectivo o específico de secuencia mediante el cual se regula por disminución una molécula diana (por ejemplo, un gen, proteína o ARN diana). En determinadas realizaciones, el proceso de "interferencia de ARN" o "iARN" caracteriza la degradación de moléculas de ARN, por ejemplo, moléculas de ARN dentro de una célula, desencadenándose dicha degradación por un agente de ARN. La degradación se cataliza por un complejo de silenciamiento enzimático, inducido por ARN (RISC). La iARN se produce en células de manera natural para eliminar los ARN extraños (por ejemplo, ARN virales). La iARN natural avanza a través de fragmentos escindidos del ARNbc libre que dirigen el mecanismo de degradación a otras secuencias de ARN similares. Alternativamente, la iARN puede iniciarse artificialmente, por ejemplo, para silenciar la expresión de genes diana. La interferencia de ARN (iARN) es una técnica postranscripcional de silenciamiento génico dirigido que utiliza ARN bicatenario (ARNbc) para degradar el ARN mensajero (ARNm) que contiene la misma secuencia que el ARNbc (Sharp, PA y Zamore, PD 287, 2431-2432 (2000); Zamore, P.D., *et al.* *Cell* 101, 25-33 (2000). Tuschl, T. *et al.* *Genes Dev.* 13, 3191-3197 (1999); Cottrell TR, y Doering TL. 2003. *Trends Microbiol.* 11: 37-43; Bushman F.2003. *Mol Therapy* 7: 9-10; McManus MT y Sharp PA. 2002. *Nat Rev Genet.* 3: 737-47). El proceso se produce cuando una ribonucleasa endógena escinde el ARNbc más largo para dar ARN más cortos, por ejemplo, ARN de 21-23 nucleótidos de longitud, denominados ARN de interferencia pequeños o ARNip. Tal como se usa en el presente documento, el término "ARN de interferencia pequeño" ("ARNip") (también denominado en la técnica "ARN de interferencia corto") se refiere a un agente de ARN, preferiblemente un agente bicatenario, de aproximadamente 10-50 nucleótidos de longitud (incluyendo el término "nucleótidos", análogos de nucleótidos), de manera preferible entre aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud, de manera más preferible aproximadamente 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos de longitud, teniendo las cadenas opcionalmente

extremos sobresalientes que comprenden, por ejemplo, 1, 2 ó 3 nucleótidos sobresalientes (o análogos de nucleótidos), que puede dirigir o mediar la interferencia de ARN. Los ARNip que se producen de manera natural se generan a partir de moléculas de ARNbc más largas (por ejemplo, > 25 nucleótidos de longitud) por la maquinaria de iARN de una célula (por ejemplo, Dicer o un homólogo de la misma). Los segmentos de ARN más pequeños median entonces la degradación del ARNm diana. El ARNip encapsulado en nanopartículas también puede usarse para regular por disminución una molécula diana. Los kits para la síntesis de iARN están disponibles comercialmente en, por ejemplo New England Biolabs o Ambion. En una realización, pueden emplearse uno o más de los procedimientos químicos descritos anteriormente para su uso en ARN antisentido en moléculas que median iARN.

Alternativamente, puede expresarse un compuesto que promueve la iARN en una célula, por ejemplo, una célula en un sujeto, para inhibir la expresión de XBP1 o una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1, tal como IRE-1 α . A diferencia de los ARNip, los ARNhc imitan a los precursores naturales de los microARN (miARN) y entran en la parte inicial de la ruta de silenciamiento génico. Por este motivo, se cree que los ARNhc median el silenciamiento génico de manera más eficaz al alimentarse a través de toda la ruta de silenciamiento génico natural. El término "ARNhc", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un agente de ARN que tiene una estructura de tallo-bucle, que comprende una primera y una segunda regiones de secuencia complementaria, siendo suficiente el grado de complementariedad y la orientación de las regiones de tal manera que se produce el emparejamiento de bases entre las regiones, uniéndose las regiones primera y segunda por una región de bucle, resultando el bucle de una falta de emparejamiento de bases entre los nucleótidos (o análogos de nucleótidos) dentro de la región de bucle. Los ARNhc pueden ser sustratos para la enzima Dicer, y los productos de la escisión de Dicer pueden participar en iARN. Los ARNhc pueden derivarse de la transcripción de un gen endógeno que codifica para un ARNhc, o pueden derivarse de la transcripción de un gen exógeno introducido en una célula u organismo en un vector, por ejemplo, un vector de plásmido o un vector viral. Adicionalmente, puede introducirse un gen exógeno que codifica para un ARNhc en una célula u organismo utilizando otros métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, lipofección, nucleofección, etc.

Los elementos necesarios de una molécula de ARNhc incluyen una primera parte y una segunda parte, que tienen suficiente complementariedad para aparearse o hibridarse para formar una parte de tallo dúplex o bicatenario. No es necesario que las dos partes sean total o perfectamente complementarias. Las partes de "tallo" primera y segunda están conectadas por una parte que tiene una secuencia que tiene una complementariedad de secuencia insuficiente para aparearse o hibridarse con otras partes del ARNhc. Esta última parte se denomina una parte de "bucle" en la molécula de ARNhc. Las moléculas de ARNhc se procesan para generar ARNip. Los ARNhc también pueden incluir una o más protuberancias, es decir, nucleótidos adicionales que crean un pequeño "bucle" de nucleótidos en una parte del tallo, por ejemplo, un bucle de uno, dos o tres nucleótidos. Las partes de tallo pueden tener la misma longitud, o una parte puede incluir un saliente de, por ejemplo, 1-5 nucleótidos.

En determinadas realizaciones, los ARNhc de la invención incluyen las secuencias de una molécula de ARNip deseada descrita anteriormente. En tales realizaciones, los precursores de ARNhc incluyen en el tallo dúplex las 21-23 secuencias de nucleótidos del ARNip, que se desean producir *in vivo*.

Otro tipo de compuesto inhibidor que puede usarse para inhibir la expresión y/o la actividad de XBP1 o una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α) es un anticuerpo intracelular específico para dicha proteína. Se conoce en la técnica el uso de anticuerpos intracelulares para inhibir la función de proteínas en una célula (véase por ejemplo, Carlson, J. R. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8: 2638-2646; Biocca, S. *et al.* (1990) *EMBO J.* 9: 101-108; Werge, T.M. *et al.* (1990) *FEBS Letters* 274: 193-198; Carlson, J.R. (1993) *Proc. Natl Acad Sci. USA* 90: 7427-7428; Marasco, W.A. *et al.* (1993) *Proc. Natl Acad Sci. USA* 90: 7889-7893; Biocca, S. *et al.* (1994) *Bio/Technology* 12: 396-399; Chen, S-Y. *et al.* (1994) *Human Gene Therapy* 5: 595-601; Duan, L. *et al.* (1994) *Proc. Natl Acad Sci. USA* 91: 5075-5079; Chen, S-Y. *et al.* (1994) *Proc. Natl Acad Sci. USA* 91: 5932-5936; Beerli, R.R. *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 23931-23936; Beerli, R.R. *et al.* (1994) *Biochem. Biofis Res. Comun.* 204: 666-672; Mhashilkar, A.M. *et al.* (1995) *EMBO J.* 14: 1542-1551; Richardson, J.H. *et al.* (1995) *Proc. Natl Acad Sci. USA* 92: 3137-3141; publicación PCT n.º WO 94/02610 por Marasco *et al.*; y publicación PCT n.º WO 95/03832 por Duan *et al.*).

Para inhibir la actividad de la proteína utilizando un anticuerpo intracelular, se prepara un vector de expresión recombinante que codifica para las cadenas de anticuerpo de forma que, tras la introducción del vector en una célula, las cadenas de anticuerpo se expresan como un anticuerpo funcional en un compartimiento intracelular de la célula.

En otra realización, un compuesto inhibidor de la invención es un compuesto peptídico derivado de la secuencia de aminoácidos de XBP1 o la secuencia de aminoácidos de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1.

Los compuestos peptídicos de la invención pueden prepararse de manera intracelular en células mediante la introducción en las células un vector de expresión que codifica para el péptido. Dichos vectores de expresión pueden obtenerse mediante técnicas convencionales usando oligonucleótidos que codifican para la secuencia de aminoácidos del compuesto peptídico. El péptido puede expresarse intracelularmente como una fusión con otra proteína o péptido (por ejemplo, una fusión con GST). Como alternativa a la síntesis recombinante de los péptidos en las células, los péptidos pueden obtenerse mediante síntesis química utilizando técnicas convencionales de

síntesis de péptidos. Los péptidos sintetizados pueden introducirse entonces en las células mediante una variedad de medios conocidos en la técnica para introducir péptidos en las células (por ejemplo, liposoma y similares).

Además, puede hacerse que las proteínas negativas dominantes (por ejemplo, de XBP1 o IRE-1 α) que incluyen XBP1 o IRE-1 α (por ejemplo, partes o variantes de los mismos) compitan con moléculas nativas (es decir, moléculas silvestres), pero que no tienen la misma actividad biológica. Tales moléculas disminuyen eficazmente, por ejemplo, la actividad de XBP1, IRE-1 α en una célula.

Otros agentes inhibidores que pueden usarse para inhibir específicamente la actividad de XBP1 o una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α) son compuestos químicos que inhiben directamente la expresión, el procesamiento, la modificación postraduccional y/o la actividad de XBP1. Dichos compuestos pueden identificarse utilizando ensayos de examen que se seleccionan para tales compuestos, tal como se describió en detalle anteriormente, así como utilizando otras técnicas reconocidas en la técnica.

En determinadas realizaciones, la selección como diana de XBP1 inhibe el crecimiento del tumor. En determinadas realizaciones, la selección como diana de XBP1 inhibe el crecimiento del tumor de ovario.

La presente invención proporciona que la activación constitutiva de la UPR en células dendríticas impide una respuesta inmunitaria antitumoral apropiada. En determinadas realizaciones, la selección como diana de XBP1 da como resultado una respuesta inmunitaria antitumoral. En determinadas realizaciones, la respuesta inmunitaria antitumoral es la proliferación e infiltración de células T seleccionadas como diana para un antígeno asociado a tumor específico.

Ensayos de examen

En un aspecto, la invención presenta métodos para identificar compuestos útiles en la potenciación o inducción de inmunidad antitumoral en un sujeto, teniendo tales compuestos el potencial de uso terapéutico en el tratamiento del cáncer, tal como el cáncer de ovario. En otros aspectos, la invención presenta métodos para identificar compuestos útiles en la inhibición del crecimiento de células de cáncer de ovario, teniendo tales compuestos un uso terapéutico potencial en el tratamiento del cáncer de ovario. Tal como se describe en el presente documento, la presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de un papel previamente desconocido para XBP1 en la inmunidad antitumoral y el cáncer de ovario, estando asociado tal papel a la inmunidad antitumoral dirigida por células dendríticas asociadas a tumor. En aspectos a modo de ejemplo, la invención presenta métodos para identificar compuestos útiles para inducir o potenciar inmunidad antitumoral e inhibir el crecimiento de células de cáncer de ovario, presentando los métodos examinar o someter a ensayo compuestos que modulan, por ejemplo, activan o aumentan, o inhiben o disminuyen, la activación de IRE-1/XBP1. En aspectos a modo de ejemplo, los métodos comprenden: proporcionar una composición indicadora que comprende XBP1, o partes biológicamente activas del mismo; poner en contacto la composición indicadora con cada miembro de una biblioteca de compuestos de prueba; seleccionar de la biblioteca de compuestos de prueba un compuesto de interés que interacciona con XBP1, o partes biológicamente activas del mismo; y poner en contacto células de cáncer de ovario con el compuesto de interés, en el que la capacidad del compuesto para potenciar o inducir inmunidad antitumoral en el sujeto está indicada por la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento de células de cáncer de ovario en comparación con el crecimiento de células de cáncer de ovario en ausencia del compuesto.

En otro aspecto a modo de ejemplo, los métodos comprenden: proporcionar una composición indicadora que comprende XBP1, o partes biológicamente activas del mismo; poner en contacto la composición indicadora con cada miembro de una biblioteca de compuestos de prueba; y seleccionar de la biblioteca de compuestos de prueba un compuesto de interés que disminuye la actividad de XBP1, o partes biológicamente activas del mismo, en el que la capacidad de un compuesto para inducir inmunidad antitumoral o inhibir el crecimiento de células de cáncer de ovario está indicada por una disminución en la activación en comparación con la cantidad de activación en ausencia del compuesto.

Tal como se usa en el presente documento, el término “poner en contacto” (es decir, poner en contacto una célula, por ejemplo una célula, con un compuesto) incluye incubar el compuesto y la célula juntos *in vitro* (por ejemplo, añadir el compuesto a células en cultivo), así como administrar el compuesto a un sujeto de manera que el compuesto y las células del sujeto se pongan en contacto *in vivo*. El término “poner en contacto” no incluye la exposición de las células a un modulador de XBP1 que puede producirse de manera natural en un sujeto (es decir, la exposición que puede producirse como resultado de un proceso fisiológico natural).

Tal como se usa en el presente documento, el término “compuesto de prueba” se refiere a un compuesto que no se ha identificado previamente, o que se reconoce que es, un modulador de la actividad que está sometiéndose a prueba. El término “biblioteca de compuestos de prueba” se refiere a un panel que comprende una multiplicidad de compuestos de prueba.

Tal como se usa en el presente documento, el término “composición indicadora” se refiere a una composición que incluye una proteína de interés (por ejemplo, XBP1 o una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1, tal como IRE-1 α), por ejemplo, una célula que expresa de manera natural la proteína, una célula que se ha modificado

por ingeniería genética para expresar la proteína mediante la introducción de uno o más de los vectores de expresión que codifican para la(s) proteína(s) en la célula, o una composición libre de células que contiene la(s) proteína(s) (por ejemplo, proteína que se produce de manera natural purificada o proteína(s) modificada(s) por ingeniería genética de manera recombinante).

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “célula” incluye células procariotas y eucariotas. En una realización, una célula de la invención es una célula bacteriana. En otra realización, una célula de la invención es una célula fúngica, tal como una célula de levadura. En otra realización, una célula de la invención es una célula de vertebrado, por ejemplo, una célula de ave o mamífero. En una realización preferida, una célula de la invención es una célula murina o humana. Tal como se usa en el presente documento, el término “modificado por ingeniería genética” (como en una célula modificada por ingeniería genética) se refiere a una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, que codifica para una proteína XBP1 (por ejemplo, una forma de XBP1 sometida a corte y empalme y/o no sometida a corte y empalme).

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “composición libre de células” se refiere a una composición aislada, que no contiene células intactas. Los ejemplos de composiciones libres de células incluyen extractos celulares y composiciones que contienen proteínas aisladas.

15 Las células utilizadas en los presentes ensayos pueden ser de origen eucariota o procariota. Por ejemplo, en una realización, la célula es una célula bacteriana. En otra realización, la célula es una célula fúngica, por ejemplo, una célula de levadura. En otra realización, la célula es una célula de vertebrados, por ejemplo, una célula aviar o de mamífero. En una realización preferida, la célula es una célula humana. Las células de la invención pueden expresar XBP1 endógeno o pueden modificarse por ingeniería genética para que lo hagan. Por ejemplo, una célula que se ha modificado por ingeniería genética para que exprese la proteína XBP1 puede producirse introduciendo en la célula un vector de expresión que codifica para la proteína. Pueden usarse vectores de expresión recombinantes para la expresión de XBP1.

20 En otra realización, la composición indicadora es una composición libre de células. El XBP1 expresado por métodos recombinantes en una célula huésped o un medio de cultivo puede aislarse de las células huésped, o el medio de cultivo celular utilizando métodos convencionales para la purificación de proteínas. Por ejemplo, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de filtración en gel, la ultrafiltración, la electroforesis y la purificación por inmunofinidad con anticuerpos pueden usarse para producir una proteína purificada o semi-purificada que puede usarse en una composición libre de células. Alternativamente, puede prepararse un lisado o un extracto de células que expresan la proteína de interés para su uso como composición libre de células.

25 Composiciones farmacéuticas y modos de administración

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Los agentes incluyen, pero no se limitan a, composiciones, anticuerpos, regiones de unión a antígenos preparados de manera sintética *in vitro*, y combinaciones y conjugados de los mismos. En determinadas realizaciones, un agente puede actuar como agonista, antagonista, modulador alostérico o toxina.

35 En determinadas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de XBP1 o un inhibidor de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α) con un diluyente, portador, solubilizador, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, los materiales de formulación aceptables preferiblemente no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. En determinadas realizaciones, el/los material(es) de formulación es/son para administración s.c. y/o i.v. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o preservar, por ejemplo, el pH, la osmolalidad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o la penetración de la composición. En determinadas realizaciones, los materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); agentes antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes de carga (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como el ácido etilendiaminetetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como la albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, aromatizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones de formación de sal (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como Pluronic, PEG, ésteres de sorbitano, polisorbato tales como polisorbato 20, polisorbato 80, Triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol, sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes

- farmacéuticos. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1995)). En determinadas realizaciones, la formulación comprende PBS; NaOAC 20 mM, pH 5,2, NaCl 50 mM; y/o NAOAC 10 mM, pH 5,2, 9% de sacarosa. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica óptima se determinará por un experto en la técnica dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración deseada, el formato de administración y la dosis deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, citado anteriormente. En determinadas realizaciones, tales composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación in vivo y la velocidad de aclaramiento in vivo de un inhibidor de XBP1 o un inhibidor de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α).
- En determinadas realizaciones, el vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza o bien acuosa o bien no acuosa. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un vehículo o portador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. En determinadas realizaciones, la solución salina comprende solución salina tamponada con fosfato isotónica. En determinadas realizaciones, la solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina sérica son vehículos a modo de ejemplo adicionales. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón de acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado por tanto. En determinadas realizaciones, puede prepararse una composición que comprende un inhibidor de XBP1 o un inhibidor de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α) para el almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, citado anteriormente) en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, en determinadas realizaciones, una composición que comprende un inhibidor de XBP1 o un inhibidor de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α) puede formularse como un material liofilizado usando excipientes apropiados, tales como sacarosa.
- En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica puede seleccionarse para administración parenteral. En determinadas realizaciones, las composiciones pueden seleccionarse para inhalación o para administración a través del tubo digestivo, tal como por vía oral. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de la capacidad de un experto en la técnica.
- En determinadas realizaciones, los componentes de la formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. En determinadas realizaciones, se usan tampones para mantener la composición a pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, normalmente dentro de un intervalo de pH de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8.
- En determinadas realizaciones, cuando se contempla la administración parenteral, una composición terapéutica puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógenos, que comprende un inhibidor de XBP1 deseado o un inhibidor de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α) en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, un vehículo para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que se formula un inhibidor de XBP1 o un inhibidor de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α) como una solución isotónica estéril, correctamente conservada. En determinadas realizaciones, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico), perlas o liposomas, que pueden proporcionar la liberación controlada o sostenida del producto que entonces puede administrarse a través de una inyección de depósito. En determinadas realizaciones, también puede usarse ácido hialurónico, y puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. En determinadas realizaciones, pueden usarse dispositivos de administración de fármacos implantables para introducir la molécula deseada.
- En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica puede formularse para inhalación. En determinadas realizaciones, un inhibidor de XBP1 o un inhibidor de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α) puede formularse como un polvo seco para inhalación. En determinadas realizaciones, una disolución de inhalación que comprende un inhibidor de XBP1 o un inhibidor de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α) puede formularse con un propelente para la administración en aerosol. En determinadas realizaciones, las soluciones pueden nebulizarse. La administración pulmonar se describe adicionalmente en la solicitud PCT n.º PCT/US94/001875, que describe la administración pulmonar de proteínas modificadas químicamente.
- En determinadas realizaciones, se contempla que las formulaciones pueden administrarse por vía oral. En determinadas realizaciones, un inhibidor de XBP1 o un inhibidor de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α) que se administra de esta manera puede formularse con o sin los portadores utilizados habitualmente en la composición de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. En determinadas realizaciones, puede diseñarse una cápsula para liberar la parte activa de la formulación en el punto del tubo digestivo cuando se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. En determinadas realizaciones, puede incluirse al menos un agente adicional para facilitar la absorción de un inhibidor

de XBP1 o la absorción de un inhibidor de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α). En determinadas realizaciones, también pueden emplearse diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de disgregación de comprimidos y aglutinantes.

5 En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de un inhibidor de XBP1 o un inhibidor de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α) en una mezcla con excipientes no tóxicos, que son adecuados para la fabricación de comprimidos. En determinadas realizaciones, disolviendo los comprimidos en agua estéril u otro vehículo apropiado, las disoluciones pueden prepararse en forma de dosis unitaria. En determinadas realizaciones, los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a,
10 diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio o bicarbonato, lactosa o fosfato de calcio; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Composiciones farmacéuticas adicionales serán evidentes para los expertos en la técnica, incluyendo formulaciones que implican a un inhibidor de XBP1 o un inhibidor de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α) en formulaciones de administración sostenida o controlada. En determinadas realizaciones, las técnicas para formular una variedad de otros medios de administración sostenida o controlada, tales como portadores de liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito, también se conocen por los expertos en la técnica. Véase por ejemplo, la solicitud PCT n.º PCT/US93/00829, que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas. En determinadas realizaciones, las preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices de polímeros semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (patente estadounidense n.º 3.773.919 y documento EP 058.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, Biopolymers, 22: 547-556 (1983)), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981) y Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982)), acetato de etilvinilo (Langer *et al.*, citado anteriormente) o poli(ácido D(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988). En determinadas realizaciones, las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que pueden prepararse mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Eppstein *et al.*, Proc. Natl Acad Sci. USA, 82: 3688-3692 (1985); documentos EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

30 La composición farmacéutica que va a usarse para la administración *in vivo* normalmente es estéril. En determinadas realizaciones, esto puede lograrse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. En determinadas realizaciones, cuando la composición se liofiliza, la esterilización usando este método puede realizarse antes o después de la liofilización y reconstitución. En determinadas realizaciones, la composición para administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en una disolución. En determinadas realizaciones, las composiciones parenterales generalmente se colocan en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de disolución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

En determinadas realizaciones, una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales estériles como una disolución, suspensión, gel, emulsión, sólido o como un polvo deshidratado o liofilizado. En determinadas realizaciones, tales formulaciones pueden almacenarse en una forma lista para su uso o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que se reconstituye antes de la administración.

En determinadas realizaciones, se proporcionan kits para producir una unidad de administración de dosis única. En determinadas realizaciones, el kit puede contener tanto un primer recipiente que tiene una proteína seca como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. En determinadas realizaciones, se incluyen kits que contienen jeringas precargadas de una sola cámara y de múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas líquidas y liojeringas).

En determinadas realizaciones, la cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de XBP1 o un inhibidor de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α), que va a emplearse terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y los objetivos terapéuticos. Un experto en la materia apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento, según determinadas realizaciones, variarán por tanto dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la que está utilizándose un inhibidor de XBP1 o un inhibidor de una molécula en una ruta biológica que implica XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α), la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y/o el estado (la edad y la salud general) del paciente. En determinadas realizaciones, el médico puede ajustar la dosis y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo.

55 En determinadas realizaciones, la frecuencia de la dosificación tendrá en cuenta los parámetros farmacocinéticos de un inhibidor de XBP1 o un inhibidor de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α) en la formulación utilizada. En determinadas realizaciones, un médico administrará la composición hasta que se alcance una dosis que logre el efecto deseado. En determinadas realizaciones, la composición puede administrarse por tanto como una dosis única, o como dos o más dosis (que pueden o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo de implantación o

catéter. El refinamiento adicional de la dosificación apropiada se realiza de forma rutinaria por los expertos en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas que habitualmente realizan. En determinadas realizaciones, las dosificaciones apropiadas pueden determinarse mediante el uso de datos de dosis-respuesta apropiados.

5 En determinadas realizaciones, la vía de administración de la composición farmacéutica es según los métodos conocidos, por ejemplo, vía oral, sistémica, local, mediante inyección intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatosa), intracerebroventricular, intratumoral, intramuscular, subcutánea, intraocular, intraarterial, intraportal o intralesional; mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implantación. En determinadas realizaciones, las composiciones pueden administrarse mediante inyección en bolo o de manera
10 continua mediante infusión, o mediante un dispositivo de implantación. En determinadas realizaciones, los elementos individuales de la terapia de combinación pueden administrarse mediante diferentes rutas.

En determinadas realizaciones, la composición puede administrarse localmente a través de la implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. En determinadas realizaciones, cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de la molécula deseada puede realizarse a través de
15 difusión, bolo de liberación programada o administración continua. En determinadas realizaciones, puede ser deseable usar una composición farmacéutica que comprenda un inhibidor de XBP1 o un inhibidor de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α) de una manera *ex vivo*. En tales casos, las células, tejidos y/u órganos que se han extraído del paciente se exponen a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de XBP1 o un inhibidor de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α),
20 después de lo cual las células, tejidos y/u órganos se implantan posteriormente de nuevo en el paciente.

En determinadas realizaciones, un inhibidor de XBP1 o un inhibidor de una molécula en una ruta biológica que implica a XBP1 (por ejemplo, IRE-1 α) puede administrarse mediante la implantación de determinadas células que se han modificado genéticamente, utilizando métodos tales como los descritos en el presente documento, para
25 expresar y secretar los polipéptidos. En determinadas realizaciones, tales células pueden ser células animales o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. En determinadas realizaciones, las células pueden inmortalizarse. En determinadas realizaciones, para reducir la posibilidad de una respuesta inmunológica, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración de los tejidos circundantes. En determinadas realizaciones, los materiales de encapsulación normalmente son membranas o receptáculos poliméricos semipermeables, biocompatibles que permiten la liberación del/de los producto(s) proteico(s), pero evitan la destrucción de las células
30 por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

En otras realizaciones, el tratamiento *ex vivo* de células dendríticas con un inhibidor de XBP1 (por ejemplo, ARNip) puede usarse para activar, inducir, potenciar o promover la capacidad de presentación de antígenos de células dendríticas. Las células dendríticas activadas pueden administrarse a un sujeto. En algunas realizaciones, las células dendríticas pueden ser células dendríticas asociadas a tumor.

35 Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitativos. El contenido de todas las referencias, patentes y solicitudes de patente publicadas citadas a lo largo de toda esta solicitud, así como las figuras y la lista de secuencias, se incorporan aquí como referencia.

Ejemplos

Procedimientos experimentales

40 Tejidos, ratones y líneas celulares.

Se obtuvieron muestras de carcinoma de ovario humano en estadio III-IV y muestras de ascitis maligna del departamento de Patología Quirúrgica del Weill Cornell Medical College/New York-Presbyterian Hospital según un protocolo aprobado en el que las muestras de investigación permanecieron totalmente sin identificar. Se generaron suspensiones de células tumorales individuales tal como se describió anteriormente (Conejo-Garcia *et al.*, 2005). Se
45 centrifugaron muestras de ascitis peritoneal maligna de pacientes con cáncer de ovario metastásico durante 10 minutos a 1300 rpm y se lisaron los glóbulos rojos antes del análisis de FACS. Se alojaron ratones en las instalaciones para animales de la Harvard School of Public School, Weill Cornell Medical College o The Wistar Institute. El Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales aprobó todos los experimentos con animales descritos en este estudio. Se generaron ratones XBP1^{ff} tal como se describió anteriormente (Lee *et al.*, 2008) y se retrocruzaron al menos 15 generaciones en ratones C57BL/6. Se adquirieron ratones deficientes *Rag2* e *Itgax-Cre* (CD11c-Cre), transgénicos para OT-1, silvestres, todos en un trasfondo de C57BL/6 completo de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME).

Se generaron ratones transgénicos dobles LSL-K-ras^{G12D/+}p53^{loxp/loxp} (p53/K-ras) obteniendo LSL-K-ras^{tm4Tyj} (Jackson *et al.*, 2001) y Trp53^{tm1Bm} (Jonkers *et al.*, 2001) de los modelos de ratón del NCI del consorcio de cáncer humano y criados en un trasfondo completo C57BL/6 tal como se indicó anteriormente (Scarlett *et al.*, 2012). Los ratones p53/K-ras se irradiaron dos días consecutivos con 650 rads, seguido por reconstitución con médula ósea de ratones XBP1^{ff} o XBP1^{ff} CD11c-Cre. Ocho semanas después de la reconstitución de médula ósea, se iniciaron tumores de
55

ovario autóctonos mediante la administración de recombinasa Cre de expresión en adenovirus (ADV-Cre) en la bolsa ovárica tal como se indicó anteriormente (Dinulescu *et al.*, 2005; Flesken-Nikitin *et al.*, 2003; Scarlett *et al.*, 2012). Siete semanas después del inicio del tumor se sacrificó a los ratones. Se resecaron los tumores, de aproximadamente 2-3 cm de diámetro, en condiciones estériles después de sacrificar a los ratones. Las muestras se cortaron entonces en trozos de <3 mm de diámetro y se digirieron durante 1 hora a 37°C en RPMI que contenía colagenasa tipo D 2 mg/ml y ADNasa I 1 mg/ml. Los fragmentos de tejido digeridos se presionaron luego a través de un filtro de 70 µm para crear una suspensión de células individuales. Se lisaron los glóbulos rojos utilizando el tampón de lisis ACK y los sedimentos de suspensiones de células individuales se resuspendieron hasta 50-100 x 10⁶ células/ml en medio de congelación (FBS que contiene DMSO al 10%) y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Entonces se transfirieron los tubos hasta -80°C para el almacenamiento a largo plazo.

Se generaron tumores de ovario intraperitoneales ID8 parentales o ID8-*Defb29/Vegf-A* agresivos tal como se describió anteriormente (Conejo-García *et al.*, 2004; Roby *et al.*, 2000). Brevemente, se inyectaron 1-2x10⁶ células tumorales en ratones C57BL/6 silvestres o ratones deficientes en XBP1 condicionales. Los animales implantados desarrollaron progresivamente múltiples masas peritoneales y finalmente ascitis masiva en ~ 35 días (ID8-*Defb29/Vegf-A*) o en ~ 2 meses (ID8 parental). Los ratones se pesaron semanalmente para monitorizar la acumulación de ascitis maligna y los animales con distensión abdominal grave se sacrificaron.

Aislamiento de DC humanas y de ratón

Se clasificaron DC asociadas a cáncer de ovario en pacientes humanos (CD45⁺CD3⁻CD20⁻CD11c⁺DEC205⁺) a partir de suspensiones de células individuales tumorales o ascitis maligna usando citometría de flujo, siguiendo la estrategia de separación descrita en la figura 1. Durante la clasificación, las células viables se identificaron mediante el kit de tinción de células muertas LIVE/DEAD Fixable Yellow (Life Technologies). Las DC de ratón asociadas a cáncer de ovario (CD45⁺CD11c⁺CD11b⁺MHC-II⁺CD8α⁻) se clasificaron a partir de suspensiones de células individuales de tumores de ovario activados por p53/K-ras o de muestras de lavado peritoneal (10 ml de PBS 1X) o ascitis maligna total de ratones que portaban cáncer de ovario intraperitoneal ID8-*Defb29/Vegf-A* agresivo, siguiendo la estrategia de separación descrita en la figura 1. Todos los anticuerpos marcados con fluorescencia fueron de BioLegend. Se clasificaron sDC de control (CD45⁺CD11c⁺CD11b⁺MHC-II⁺CD8α⁻) mediante FACS de bazo de ratones que portaban cáncer de ovario sin tratamiento previo utilizando el tratamiento con colagenasa D y ADNasa I seguido de incubación con los anticuerpos indicados.

Reactivos y tratamientos celulares *in vitro*

Se adquirieron citoquinas recombinantes murinas de Peprotech. El cloruro de cobalto, la tunicamicina (utilizada a 1 µg/ml), Tiron (utilizado a 100-500 µM) y la vitamina E (α-tocoferol, utilizada a 50-100 µM) fueron de Sigma. Se utilizó tinción con DCFDA para la detección de ROS intracelular (Abcam). La 4-HNE purificada se obtuvo de Cayman Chemical y los aductos de 4-HNE-proteína en muestras de ascitis y las DC se detectaron y cuantificaron mediante ELISA competitivo (Cell Biolabs). Se utilizó TOFA (Cayman Chemical) a una concentración final de 5 µg/ml para inhibir la síntesis de ácidos grasos en las DC mediante el bloqueo de la síntesis de malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa. El inhibidor específico de IRE-1α 4µ8c (Millipore) se usó a una concentración final de 10 µM.

RT-PCR convencional y cuantitativa

El ARN total de muestras humanas se aisló utilizando el kit de aislamiento de miARN miRVANA (Life Technologies). Se aisló ARN de muestras de ratón usando el reactivo Qiazol (Qiagen). Se utilizaron 0,1-1 µg de ARN para generar ADNc utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Life Technologies). Se realizaron ensayos de corte y empalme de *Xbp1* de ser humano y ratón tal como se describe (Lee *et al.*, 2003a; Martinon *et al.*, 2010) utilizando PCR con transcripción inversa convencional (RT-PCR) y los cebadores mostrados en la tabla 1. El análisis de la expresión génica se realizó mediante PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR) utilizando un instrumento Stratagene Mx3005 y SYBR green I (Life Technologies). Se determinó la expresión del transcrito murino *XBP1s* utilizando una sonda que abarca la versión sometida a corte y empalme tal como se demostró anteriormente (Reimold *et al.*, 2001). Todos los cebadores utilizados en este estudio se describen en la tabla 1.

Inmunotransferencia de tipo Western

Se lavaron dos veces 5x10⁶ sDC o tDC en PBS frío 1X y se purificaron las proteínas nucleares utilizando el kit de extracción nuclear (Life Technologies). Las proteínas se cuantificaron utilizando el método de BCA (Pierce) y se separaron 15-20 µg de proteínas nucleares mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa siguiendo procedimientos convencionales. Se produjeron anticuerpos anti-XBP1s de ratón (GL Biochem) en conejo usando un péptido correspondiente al extremo C-terminal de XBP1s, y se usó a una dilución 1:500 para la inmunotransferencia. Se utilizó anticuerpo de cabra anti-lámina B de ratón (Santa Cruz) a 1:2000. Se usaron anticuerpos secundarios conjugados con HRP frente a conejos y ratones (Santa Cruz) a una dilución de 1:2000. Se usó SuperSignal West Femto (Pierce) como sustrato quimioluminiscente y se tomaron imágenes de las transferencias usando un instrumento FluorChemE (ProteinSimple).

Perfil transcripcional de ARN-seq y DC.

Las tDC se clasificaron a partir de muestras de lavado peritoneal de ratones hembra XBP1^{ff} o XBP1^{ff} CD11c-Cre (n = 3/grupo) que portaban tumores de ovario ID8-*Defb29/Vegf-A* agresivos durante 3 semanas. Se aisló el ARN total utilizando el kit de aislamiento de miARN de miRVANA (Life Technologies) y se concentró adicionalmente a través de columnas RNeasy MinElute (Qiagen). La calidad e integridad del ARN se confirmó en un dispositivo Bioanalyzer 2100 de Agilent. En todos los casos, los RIN fueron de 9,50 o mayores. Se generaron bibliotecas de ARNm y se secuenciaron en el Centro de Epigenómica del Weill Cornell Medical College. Las lecturas producidas a partir de la secuenciación de un solo extremo de 51 pb se alinearon con el genoma del ratón (mm9) utilizando el algoritmo Bowtie v0.12.8 (Langmead *et al.*, 2009). La información sobre el transcriptoma mm9 del ratón se obtuvo de UCSC Genome Browser y se utilizó el algoritmo RSEM (Li y Dewey, 2011) para calcular el número de etiquetas alineadas para cada gen. Se sometió a prueba la expresión diferencial entre dos grupos mediante EdgeR (Robinson y Oshlack, 2010) y se definió la significación usando un punto de corte de la tasa de falso descubrimiento (FDR) de 0,15. La información genética más actualizada (símbolo oficial y descripción) se obtuvo de la información de NCBI Entrez el 15 de mayo de 2014. Se generaron valores de RPKM de expresión normalizada (lecturas por kilobase de transcrito por millón de lecturas mapeadas) mediante EdgeR y se usaron para demostrar la expresión génica en las muestras como un cambio de la expresión en veces codificado por color en una muestra frente a la expresión promedio en todas las muestras. El análisis de enriquecimiento funcional se realizó utilizando el programa Ingenuity Pathway Analysis de QIAGEN (IPA®, QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity). Para el análisis de IPA en el sentido de 5', sólo se consideraron los reguladores significativos a $p < 10^{-6}$ con estados de activación/inhibición predichos (puntuación de $Z > 2$). Los procesos biológicos afectados significativamente se sometieron a prueba utilizando el software DAVID de NCBI (Huang da *et al.*, 2009) utilizando el nivel 3 de los procesos biológicos GO y considerando sólo resultados de $FDR < 0,15$ que mostraban al menos 20 genes que constituyen al menos 2/3 de todos los implicados en los genes de proceso regulados específicamente por incremento o por disminución.

Citometría de flujo y tinción de lípidos

El contenido de lípidos intracelulares en las DC se evaluó mediante citometría de flujo utilizando 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (BODIPY 493/503, Life Technologies) tal como se indicó anteriormente (Herber *et al.*, 2010). Brevemente, se tiñeron de manera convencional 5×10^6 células de suspensiones de células individuales de bazo total o muestras de lavado peritoneal maligno para marcadores de superficie usando anticuerpos marcados con fluorescencia que no se solapan con BODIPY 493/503, concretamente, CD11c-APC, CD45-APC-Cy7 y CD11b-Pacific Blue. Las células se lavaron dos veces con 1X PBS y se tiñeron con 500 μ l de BODIPY 493/503 a 0,5 mg/ml en PBS durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células se lavaron dos veces y se analizaron mediante citometría de flujo. Se detectó tinción de BODIPY 493/503 en el canal de PE. Para la tinción intracelular de citocinas, se estimularon 5×10^6 células aisladas de muestras de lavado peritoneal maligno de ratones que portaban cáncer de ovario durante 6 h en RPMI completo con FBS al 10% que contenía PMA (Calbiochem), ionomicina (Calbiochem) y brefeldina A (BioLegend). Se recogieron las células y se tiñeron para detectar marcadores de superficie y citoquinas intracelulares siguiendo el conjunto de tampón de tinción FoxP3/factor de transcripción (eBioscience). Todos los anticuerpos fueron de BioLegend. La citometría de flujo se realizó en un instrumento LSRII (BD Biosciences). Las poblaciones de células se clasificaron a partir de lavados peritoneales (10 ml de PBS 1X) de ratones que portaban carcinoma de ovario o de ascitis humana o suspensiones de células individuales de tumores utilizando un clasificador FACSAria (BD Biosciences). Los datos de la citometría de flujo se analizaron utilizando FlowJo versión 9 ó 10.

Microscopía electrónica de transmisión y lipidómica

Se clasificaron tDC de la cavidad peritoneal de ratones hembra XBP1^{ff} o XBP1^{ff} CD11c-Cre que portaban tumores de ovario ID8-*Defb29/Vegf-A* durante 3 a 4 semanas tal como se muestra en la figura 1. Las células se lavaron dos veces con 1X PBS y los sedimentos se fijaron y se seccionaron para el análisis de microscopía electrónica (realizado en la Instalación de Microscopía Electrónica e Histología del Weill Cornell Medical College) siguiendo métodos convencionales. Alternativamente, se congelaron los sedimentos celulares de $0,5 \times 10^6$ tDC clasificadas y se extrajeron los lípidos intracelulares y se analizaron cuantitativamente a través de CL-EM en el Centro de Lipidómica de la Wayne State University School of Medicine.

Procesamiento y presentación de antígenos

Para los experimentos de presentación de antígenos *in vitro*, se clasificaron tDC o sDC de la cavidad peritoneal o el bazo de ratones hembra XBP1^{ff} o XBP1^{ff} CD11c-Cre que portaban tumores de ovario ID8-*Defb29/Vegf-A* durante 4 semanas (figura 1). Las tDC se pulsaron durante la noche a 50 μ g/ml de OVA libre de endotoxinas de longitud completa (SIGMA, Grado VII) en presencia o ausencia de vitamina E (50 μ g/ml) en medios que contenían un 25% de sobrenadantes de ascitis de cáncer de ovario libre de células. Las DC se lavaron dos veces y se cocultivaron durante 3 días con células T CD8⁺ marcadas con CFSE inmunopurificadas a partir de ratones OT-1 a una razón de 1:10 (DC con respecto a células T), tal como se describió anteriormente (Scarlett *et al.*, 2009).

Para los experimentos de presentación de antígenos *in vivo*, a ratones hembra C57BL/6 silvestres que portaban tumores de ovario ID8-*Defb29/Vegf-A* durante tres semanas se les inyectó por vía intraperitoneal 0,6 mg de OVA libre de endotoxinas de longitud completa (SIGMA, grado VII) y 3 horas más tarde, a los ratones se les dejó sin tratar o se les inyectaron nanopartículas de ARNip-PEI (véase a continuación). Dieciocho horas después, se transfirió a los

ratones por vía intraperitoneal 2×10^6 células T marcadas con CFSE purificadas negativamente a partir de ratones transgénicos OT-1. Las muestras de lavado peritoneal (10 ml) se recogieron después de 72 horas y se analizaron para determinar la dilución de CFSE a través de FACS. Los datos se analizaron usando FlowJo versión 10. El índice de división determina el número promedio de divisiones celulares a las que se ha sometido una célula en la población original. El índice de proliferación muestra el número total de divisiones sólo de las células que responden (proliferan). El índice de replicación es la expansión en veces de las células que responden, lo que indica la capacidad de expansión de las células en replicación.

Preparación de nanopartículas de ARNip-PEI y silenciamiento terapéutico *in vivo*

Se adquirió polietilenimina (PEI) no conjugada y marcada con rodamina libre de endotoxinas para los experimentos *in vivo* "in vivo-jetPEI" de PolyPlus Transfection. Para generar nanocomplejos ARNip-PEI, se combinaron 50 μ g de ARNip con "in vivo-jetPEI" a una razón de N/P de 6, siguiendo las recomendaciones del fabricante y las condiciones optimizadas previamente (Cubillos-Ruiz *et al.*, 2009). Todos los oligonucleótidos del ARNip eran de IDT e incluían nucleótidos modificados en 2'-OMe y enlaces fosforotioato específicos, tal como se indicó anteriormente (Piret *et al.*, 2002). Las secuencias para las cadenas sentido y antisentido son las siguientes: siLuc sentido: 5'-CuUACGcUGAguaCUUcGAdTsdT-3', siLuc antisentido: 5'-UCgAAGUACUCAGCgUAAGdTsdT-3', siXBP1 sentido: 5'-cAcccuGAAuucAuuGucudTsdT-3', siXBP1 antisentido: 5'-AGAcAAUGAAUUCAGGGUGdTsdT-3', siIRE1a sentido: 5'-AuGccGAAGuucAGAuGGAdTsdT-3', siIRE1a antisentido: 5'-UCcAUCUGAACUUCGGcAUdTsdT-3'. Los nucleótidos modificados en 2'-OMe están en minúsculas. Los enlaces fosforotioato están representados por "s" y "d" indica las bases de ADN.

Para los experimentos de biodistribución, fenotípicos y silenciamiento *in vivo*, se inyectó a ratones que portaban tumores ID8-*Defb29/Vegf-A* durante 3-4 semanas por vía intraperitoneal nanopartículas de siXBP1-PEI o siLuc-PEI marcadas con rodamina (50 μ g de ARNip complejo con "in vivo-jetPEI" marcado con rodamina a N/P 6, por ratón).

Se clasificaron tDC rodamina⁺CD45⁺CD11c⁺CD11b⁺MHC-II⁺ después de 3 días para el análisis de biología molecular posterior. Para tratamientos repetidos de ARNip, se inyectó a ratones hembra C57BL/6 silvestres por vía intraperitoneal 1×10^6 células de carcinoma de ovario ID8-*Defb29/Vegf-A* agresivo y los ratones recibieron nanocomplejos (50 μ g de ARNip complejo con "in vivo-jetPEI" a N/P 6, por ratón) en los días 12, 16, 20, 24, 28 y 32 después de la implantación del tumor.

Respuestas inmunitarias antitumorales y ELISA

Se inyectó a ratones por vía intraperitoneal células de cáncer de ovario ID8-*Defb29/Vegf-A* y se trataron con nanopartículas de ARNip-PEI (n = 3/grupo) en los días 8, 13, 18 y 23 después de la exposición. Se obtuvieron células T esplénicas totales o leucocitos enriquecidos con Ficoll ($2-3 \times 10^5$) a partir de muestras de lavado peritoneal 4 días después del último tratamiento (día 27) y se cocultivaron en FBS al 10%-RPMI con $2-3 \times 10^4$ DC derivadas de médula ósea pulsadas previamente durante la noche con células de cáncer de ovario ID8-*Defb29/Vegf-A* irradiadas. Los sobrenadantes se recogieron después de 48-72 h de estimulación. Las células de secreción de IFN- γ y granzima B se determinaron mediante ELISA utilizando el kit Ready-SET-Go (eBioscience).

Análisis estadístico

A menos que se indique lo contrario, todos los experimentos se repitieron al menos dos veces y los resultados fueron similares entre repeticiones. La correlación entre la expresión de CHOP en tDC y la infiltración de células T intratumoral humana se analizó utilizando el coeficiente de rangos de Spearman. Los experimentos con animales utilizaron entre 3 y 6 ratones por grupo. Un valor de $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando Graph Pad Prism 5.0. Las diferencias entre las medias de los grupos experimentales se calcularon utilizando una prueba de la t de Student para datos independientes bilateral. Las barras de error representan el error estándar de la media de muestras independientes sometidas a ensayo dentro de los experimentos representados. Las tasas de supervivencia se compararon utilizando la prueba de rangos logarítmicos. Todos los experimentos de supervivencia utilizaron al menos 6 ratones/grupo. Este número proporciona un nivel de significación del 5% y una potencia del 95% para detectar diferencias en la supervivencia del 20% o más.

Ejemplo 1: activación constitutiva de XBP1 en DC asociadas a cáncer de ovario

Las células mieloides innatas con atributos fenotípicos y funcionales de las DC reguladoras comúnmente se infiltran en los tumores de ovario (Conejo-García *et al.*, 2004; Huarte *et al.*, 2008; Scarlett *et al.*, 2012). En lugar de inducir inmunidad anticancerígena, estas DC disfuncionales facilitan la progresión maligna al prevenir la activación y expansión de las células T reactivas al tumor (Cubillos-Ruiz *et al.*, 2010). Para analizar la activación de XBP1 en DC asociadas a cáncer de ovario de ser humano y ratón, se aislaron tDC CD45⁺CD3⁺CD20⁺CD11c⁺DEC205⁺ a través de FACS de tumores de ovario de pacientes humanos o muestras de ascitis de cáncer de ovario metastásico. Se aislaron tDC CD45⁺CD11c⁺MHC-II⁺CD11b⁺CD8 α ⁻ murinas de tumores de ovario activados por p53/K-ras avanzados o de ascitis maligna de ratones que portaban carcinoma de ovario ID8-*Defb29/Vegf-A* agresivo durante 4-5 semanas y se confirmó su identidad como DC clásicas auténticas cuantificando la expresión de *Clec9A/DNGR-1* y *Zbtb46*

(figura 1). Se evaluó el corte y empalme del ARNm de *Xbp1* usando PCR convencional.

Se centrifugaron muestras de líquido peritoneal maligno de pacientes con cáncer de ovario metastásico durante 10 minutos a 1300 rpm y se usaron células totales para el análisis de FACS. Los tumores de ovario primarios o metastásicos sólidos se disociaron mecánicamente tal como se describió anteriormente. En ambos casos, las tDC CD45⁺CD3⁻CD20⁻CD11c⁺DEC205⁺ se clasificaron mediante FACS para la extracción de ARN y la cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR. El porcentaje de células T CD45⁺CD3⁺ presentes en cada muestra se correlacionó con los niveles de expresión de ARNm de CHOP en las tDC clasificadas de la misma muestra (figura 2F).

En particular, las DC asociadas a tumor (tDC) aisladas de múltiples muestras de cáncer de ovario de paciente humano (figuras 1A y 1B) o de modelos preclínicos de cáncer de ovario primario y metastásico agresivo (figuras 1C-1E) (Conejo-García *et al.*, 2004; Scarlett *et al.*, 2012) mostraron corte y empalme constitutivo del ARNm de *Xbp1* (figura 2A), un acontecimiento molecular esencial para generar XBP1 completamente funcional (Yoshida *et al.*, 2001).

La expresión de los transcritos indicados se determinó mediante RT-qPCR (figura 2B, 2D, 2E) (los datos se normalizan para los niveles endógenos de *Actb* en cada muestra. Se aislaron sDC CD45⁺CD11c⁺MHC-II⁺CD11b⁺CD8 α ⁻ de bazo de ratones sin tratamiento previo o que portaban tumores), y los análisis cuantitativos demostraron un aumento en la expresión del ARNm de *Xbp1* total y sometido a corte y empalme en tDC, en comparación con DC esplénicas CD8 α relacionadas estrechamente (sDC) (figura 1E) aisladas de ratones sin tratamiento previo o que portaban cáncer de ovario (figura 2B).

Se usó análisis de inmunotransferencia de tipo Western para someter a ensayo la forma sometida a corte y empalme de la expresión de la proteína XBP1 (XBP1) en extractos nucleares obtenidos de las DC indicadas. De manera coherente, las tDC mostraron niveles aumentados de proteína XBP1 en el núcleo en comparación con DC de control obtenidas de sitios no tumorales (figura 2C). Confirmando adicionalmente estos hallazgos, el análisis de RT-PCR mostró una marcada regulación por incremento de los genes diana canónicos de XBP1, *ERdj4* y *Sec61a1* (Acosta-Alvear *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2003b) (figura 2D), así como se evidenció una mayor expresión de los marcadores generales de respuesta de estrés del RE, *Hspa5* (BiP) y *Ddit3* (CHOP) solo en tDC (figura 2E).

La expresión de CHOP en tDC clasificados a partir de muestras de cáncer de ovario de pacientes humanos se determinó usando RT-qPCR. Resulta interesante que, los niveles de expresión de CHOP en tDC se correlacionaron negativamente con la infiltración de células T en varias muestras de cáncer de ovario humano analizadas, lo que sugiere un papel potencial para las tDC de estrés del RE en la regulación de las respuestas inmunitarias antitumorales (figura 2F). En conjunto, estos datos indican que las DC en el microentorno del cáncer de ovario muestran un estrés del RE grave y una activación robusta de XBP1.

Ejemplo 2: los subproductos de la peroxidación de lípidos desencadenan el estrés del RE en DC

Un objetivo de la presente invención fue investigar cómo el microentorno tumoral influye en el estado funcional de XBP1 en las DC. En particular, un objetivo de la presente invención fue investigar si los factores derivados del cáncer podrían participar en el desencadenamiento del estrés del RE y la activación de XBP1 en las DC infiltrantes de tumor, y determinar si este proceso podría afectar la función perjudicial de estas células inmunitarias innatas en huéspedes con cáncer de ovario. Resulta interesante que, ni las citoquinas tumorigénicas/inmunosupresoras comúnmente enriquecidas en sitios tumorales ni las condiciones similares a hipoxia produjeron una activación robusta de XBP1 en DC (figura 3). En particular, se aislaron sDC indiferenciadas y se estimularon durante 24 h con citoquinas (por ejemplo, IL-10, TGF- β , VEGF α , KC, CCL3, IL-6) a concentraciones que oscilaron entre 5 ng/ml y 25 ng/ml (figuras 3A-D). Las células también se expusieron durante 24 horas a concentraciones crecientes de cloruro de cobalto (CoCl₂), un inductor químico de la ruta de HIF1 α que imita las condiciones de baja cantidad de oxígeno (Piret *et al.* 2002) (figura 3E-F). El corte y empalme y la regulación por incremento de XBP1 se determinaron mediante análisis de RT-qPCR (figura 3).

Los informes recientes demuestran que la acumulación intracelular anómala de lípidos peroxidados es una característica común de las DC disfuncionales que se infiltran en múltiples cánceres de ser humano y ratón (Herber *et al.*, 2010; Ramakrishnan *et al.*, 2014). Es importante destacar que la oxidación de lípidos por especies reactivas de oxígeno (ROS) genera subproductos reactivos como el aldehído insaturado 4-hidroxi-*trans*-2-nonenal (4-HNE), que se ha demostrado que induce el estrés de plegamiento de proteínas mediante la formación de aductos estables con chaperonas residentes en el RE (Vladykovskaya *et al.*, 2012). Se investigó si estos subproductos reactivos de aldehído podrían desencadenar estrés del RE en las DC. Las DC asociadas a cáncer de ovario demostraron cantidades significativamente más altas de lípidos intracelulares y niveles aumentados de ROS en comparación con sDC no malignas de control aisladas del mismo huésped o de ratones sin tratamiento previo (figuras 4A y 4B). De manera coherente con la peroxidación de lípidos activa que tiene lugar en los sitios tumorales, las ascitis de cáncer de ovario libres de células de origen humano y de ratón mostraron altos niveles de aductos de 4-HNE-proteína (figura 4C). En consecuencia, los aductos de 4-HNE-proteína intracelulares también se encontraron fácilmente en tDC aisladas de estas muestras malignas (figura 4D). La generación de 4-HNE en tDC de ratón expuestos a ascitis de cáncer de ovario libres de células disminuyó con la exposición al antioxidante común vitamina E (figura 4E). La

incubación de sDC indiferenciadas con concentraciones crecientes de 4-HNE purificado formó eficazmente aductos covalentes con proteínas intracelulares (figura 4F) y desencadenó rápidamente corte y empalme del ARNm de *Xbp1* de una manera dependiente de IRE-1 α (figuras 4G y 4H). De manera coherente, la regulación por incremento de la chaperona ERdj4 dependiente de XBP1 y residente en el RE canónica (figura 4I), así como la inducción robusta de los marcadores generales de respuesta al estrés del RE BiP y CHOP (figura 4J) se evidenció rápidamente en las DC tratadas con 4-HNE. Estos datos demuestran que el 4-HNE, un subproducto de la peroxidación de lípidos fácilmente disponible en el microentorno del cáncer de ovario, desencadena un fuerte estrés del RE y la activación de XBP1 en las DC.

Ejemplo 3: XBP1 intrínseco de DC es necesario para la progresión óptima del cáncer de ovario

Para determinar cómo la actividad sostenida de XBP1 en las tDC podría influir en la progresión maligna, se desarrollaron tumores de ovario ortotópicos agresivos en ratones hembras deficientes condicionales que carecían de XBP1 funcional en las DC (figura 5). Para este fin, se cruzaron ratones cuyo exón 2 de *Xbp1* está flanqueado por dos sitios *loxP* (Lee *et al.*, 2008) con ratones que expresan recombinasa Cre bajo el control del promotor de la integrina alfa X (*Itgax*) (en lo sucesivo denominado CD11c-Cre) (figura 5). En este sistema, la recombinación mediada por Cre es predominante en las DC convencionales, mientras que se detectan bajas cantidades de recombinación en linfocitos, células NK y otras células mieloides (Caton *et al.*, 2007).

Las tDC se clasificaron a partir de la cavidad peritoneal de ratones que portaban tumores de ovario ID8-*VegfA-Def29b* metastásicos durante 4-5 semanas tal como se describe en la figura 1. Se inmunopurificaron magnéticamente las DC CD11c⁺ totales a partir de bazos (sDC) o a partir de cultivos de médula ósea polarizados con GM-CSF obtenidos de ratones XBP1^{fl/fl} (silvestres) o XBP1^{fl/fl} CD11c-Cre (deficientes condicionales). También se aislaron células T esplénicas totales y macrófagos CD11b⁺F4/80⁺ (M0) como poblaciones de control. La eficacia de delección se determinó mediante RT-qPCR utilizando cebadores que amplifican selectivamente el exón 2 de *Xbp1* (véase métodos) (figura 5B). Se dejaron sin tratar sDC de ratones XBP1^{fl/fl} o XBP1^{fl/fl} CD11c-Cre o se estimularon durante 12 h con el factor de estrés fisiológico del RE, tunicamicina a 1 μ g/ml. La inducción de genes diana canónicos de XBP1, *ERdj4* y *Sec61*, tras la estimulación se determinó mediante RT-qPCR. En todos los casos, los datos se normalizaron para la expresión endógena de *Actb* en cada muestra. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes con resultados similares (figura 5C).

Anteriormente se había informado de que la supervivencia global de DC se vio comprometida por la amplia ablación de XBP1 en los precursores hematopoyéticos tempranos (Iwakoshi *et al.*, 2007). En contraposición, la delección condicional de XBP1 a través de la expresión de Cre controlada por CD11c solo afectó a la proporción y el número de DC CD8 α^+ esplénicas (figura 6). Otras poblaciones de células inmunitarias en el bazo no se vieron afectadas (figura 6) y la frecuencia de DC infiltrantes de tumor, que son principalmente CD8 α^- (figuras 1 y 6), no se alteró en ratones deficientes condicionales que portaban cánceres de ovario ortotópicos (figura 6). Estos datos sugieren que XBP1 es prescindible para la supervivencia óptima de las DC en el microentorno del cáncer de ovario. Sorprendentemente, el desarrollo y la capacidad metastásica de los tumores de ovario primarios activados por p53/K-ras (Scarlett *et al.*, 2012) se vieron profundamente comprometidos en huéspedes irradiados reconstituidos con médula ósea de donantes deficientes en XBP1 (XBP1^{fl/fl}CD11c-Cre), en comparación con huéspedes de control a los que se trasplantó médula ósea procedente de crías de la misma camada con suficiente XBP1 (XBP1^{fl/fl}) (figuras 7A-7C). Estos datos demuestran que la expresión de XBP1 en DD CD11c⁺ es crucial para el inicio y la rápida progresión de los tumores de ovario.

Dado que la inmensa mayoría de los cánceres de ovario se diagnostican en estadios avanzados, cuando la enfermedad se ha diseminado por toda la cavidad peritoneal, el siguiente objetivo fue definir cómo afecta la XBP1 derivada de DC a la progresión de los tumores ortotópicos que recapitulan estrechamente la fisiopatología del cáncer de ovario metastático humano. (Conejo-García *et al.*, 2004). En particular, ratones hembra que portaban cáncer de ovario que carecían de XBP1 funcional en DC demostraron una carga tumoral peritoneal reducida (figuras 7D y 7E), acumulación de ascitis afectada (figura 7F), y disminución de la esplenomegalia inducida por tumor (figura 7G) en comparación con crías de la misma camada con suficiente gen (XBP1^{fl/fl}) de control. En consecuencia, los ratones que portan tumor deficientes para XBP1 en DC mostraron un marcado aumento en la supervivencia en comparación con crías de la misma camada de control (figura 7H). Se observaron resultados de supervivencia similares en ratones XBP1^{fl/fl} CD11c-Cre que desarrollan tumores de ovario ortotópicos parentales (Roby *et al.*, 2000) que no se expresan ectópicamente *Defb29* y *Vegf-A* (figura 7I). En conjunto, estos resultados demuestran por primera vez que la expresión de XBP1 en DC es necesaria para la progresión agresiva y acelerada de cánceres de ovario primarios y metastásicos en modelos preclínicos de enfermedad.

Ejemplo 4: la activación de XBP1 altera la homeostasis de los lípidos en DC

Para dilucidar cómo XBP1 confiere actividad pro-tumorigénica en las DC asociadas a cáncer de ovario, se realizó una comparación del perfil transcripcional de las DC deficientes en XBP1 con las silvestres, que residen en ascitis de cáncer de ovario malignas. Se identificaron 416 genes que estaban regulados por disminución significativamente, mientras que 237 genes mostraron una expresión significativamente mayor debido a la deficiencia de XBP1 (tabla 2). Se analizaron subconjuntos de genes alterados significativamente para identificar reguladores de la transcripción que pudieran explicar los cambios observados en el ARNm. Se identificaron varios reguladores afectados predichos

(figura 8A) con la XBP1 esperada como resultado positivo superior. Además, XBP1 fue un nodo clave en la red de genes superior encontrada a partir de los datos (figura 8B). Confirmando el estrés del RE sostenido en las DC que se infiltran en el cáncer de ovario, se reprimieron notablemente múltiples genes diana de XBP1 directos y genes implicados en la respuesta de proteínas desplegadas (Acosta-Alvear *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2003b) en las tDC deficientes en XBP1 (figura 9A). La expresión de los ARNm diana de degradación dependiente de IRE-1 α regulada (RIDD) (Hetz *et al.*, 2013; Hollien *et al.*, 2009) fue indistinguible entre las tDC silvestres y las deficientes en XBP1 (figura 8C), lo que indica que IRE-1 α no está activado en exceso artificialmente en este tipo de células debido a la ausencia de XBP1 funcional (So *et al.*, 2012). Entonces, se realizó una búsqueda de cualquier proceso biológico afectado por la deficiencia de XBP1 y se encontraron 4 categorías funcionales significativamente enriquecidas (figura 8D). De particular interés, las tDC desprovistas de XBP1 mostraron una marcada regulación por disminución de múltiples genes implicados en las rutas metabólicas de los lípidos (figura 9B). A la luz de la fuerte asociación entre la acumulación de lípidos potenciada y la disfunción de DC en cáncer (Herber *et al.*, 2010; Ramakrishnan *et al.*, 2014), se investigó el papel de XBP1 como mediador potencial de este proceso. De manera coherente con el estrés del RE sostenido en las ubicaciones tumorales, las DC asociadas a cáncer de ovario mostraron una regulación por incremento grave de múltiples genes del metabolismo de lípidos controlados por XBP1 (figura 9B), incluyendo *Acpat6*, *Fasn* y *Lpar1*, en comparación con las DC de control en el tejido linfóide (figura 10A). Es de destacar que estos genes biosintéticos de lípidos se regulan por incremento rápidamente en sDC sin tratamiento previo expuestas al subproducto de la peroxidación de lípidos de activación de XBP1, 4-HNE (figura 10B). Y lo que es más importante, las DC asociadas a cáncer de ovario que carecen de XBP1 mostraron un contenido de lípidos intracelulares reducido en comparación con sus homólogos silvestres (figura 9C). Respaldando adicionalmente estos hallazgos, el tDC deficiente en XBP1 demostró una disminución marcada en el número de gotitas de lípidos citosólicos (figuras 9D y 9E), así como niveles reducidos intracelulares de triglicéridos totales (figura 9F) en comparación con tDC con XBP1 suficiente. Otras clases de lípidos no se vieron afectadas en tDC que carecen de XBP1 (figura 10C) y estas observaciones se confirmaron mediante el análisis de sobrenadantes de ascitis libres de células (figura 10D). No se produjo disminución del contenido de lípidos intracelulares en tDC deficientes en XBP1 debido a la expresión defectuosa de genes que codifican para receptores eliminadores implicados en la captación de lípidos extracelulares, incluyendo *Cd36*, *Cd68* y *Msr1* (figura 10E). En particular, la exposición a ascitis de cáncer de ovario libres de células aumentó el contenido de lípidos intracelulares de las tDC y este proceso se evitó mediante el tratamiento con TOFA, un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos que bloquea la síntesis de malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa (figuras 9G y 10F). La inhibición farmacológica de la activación de IRE-1 α /XBP1 usando 4 μ 8c también restringió la biogénesis de lípidos inducida por ascitis observada en tDC (figuras 9G y 10F). Además, es coherente con la función de ROS como generador clave de 4-HNE de activación de XBP1 (figura 4), el contenido reducido de lípidos intracelulares también se puso de manifiesto en tDC tratadas con el eliminador de ROS global, vitamina E, pero no con el eliminador específico de superóxido, Tiron (figuras 9G y 10F). En conjunto, los datos transcripcionales y funcionales indican que la activación sostenida del sensor de estrés del RE, XBP1, altera la homeostasis de lípidos intracelulares en las DC asociadas a cáncer de ovario.

Ejemplo 5: las tDC deficientes en XBP1 respaldan la activación de células T

Se ha demostrado que la acumulación aberrante de lípidos por DC asociadas a cáncer obstruye su capacidad normal de procesamiento y presentación de antígenos (Herber *et al.*, 2010; Ramakrishnan *et al.*, 2014). Se investigó si las tDC deficientes en XBP1 con niveles reducidos de lípidos intracelulares podrían respaldar en lugar de reprimir la activación de las células T y la función en los sitios tumorales. Aunque la expresión en superficie de las moléculas MHC y CD80 permaneció sin alteraciones, las tDC desprovistas de XBP1 demostraron niveles más altos de receptores coestimuladores CD40, CD83 y CD86 (figuras 11A y 11B). La deficiencia de XBP1 no alteró la capacidad de presentación de antígenos de las células sDC CD8 α ⁻ de control (figura 12). Sin embargo, las tDC deficientes en XBP1 pulsadas con OVA de longitud completa en presencia de ascitis maligna libre de células indujeron más eficazmente la expansión de las células T OT-1 en comparación con las tDC silvestres (figuras 11C y 11D). De manera coherente con la acumulación de lípidos alterada tras la eliminación de ROS global y la inhibición de IRE-1 α /XBP1 (figura 9G), el tratamiento previo del tDC silvestres reguladoras con vitamina E dio lugar a una fenocopia de la capacidad de presentación de antígenos potenciada mostrada por las tDC deficientes en XBP1 en este ensayo *in vitro* (figuras 11C y 11D). Respaldando adicionalmente estos hallazgos, los ratones deficientes condicionales que desarrollan tumores de ovario ortotópicos agresivos demostraron un aumento notable en la proporción de células T infiltrantes CD8⁺ y CD4⁺ que secretan CD44⁺IFN γ en los sitios tumorales en comparación con crías de la misma camada de control con suficiente XBP1 (figura 11E y 11F). En conjunto, estos datos indican que la activación constitutiva de XBP1 promueve la acumulación de lípidos intracelulares y la tolerancia inmunitaria por las DC asociadas a cáncer de ovario.

Ejemplo 6: el silenciamiento terapéutico de XBP1 en tDC prolonga la supervivencia del huésped al inducir inmunidad antitumoral

Las células T son la única población inmunitaria que se sabe que ejerce presión significativa contra la progresión del cáncer de ovario (Callahan *et al.*, 2008; Curiel *et al.*, 2003; Hamanishi *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003). De hecho, se ha demostrado que la magnitud de la infiltración de células T intratumorales se correlaciona fuertemente con un mejor desenlace en pacientes con cáncer de ovario (Zhang *et al.*, 2003). Para investigar si seleccionar como diana la función XBP1 *in vivo* e *in situ* podría utilizarse para restablecer los atributos

inmunogénicos de las DC asociadas a cáncer de ovario y, por tanto, promover la función de las células T antitumorales, se utilizaron nanopartículas basadas en polietilenimina (PEI) que encapsulaban el ARNip (Cubillos-Ruiz *et al.*, 2012; Cubillos Ruiz *et al.*, 2009). Se inyectó a ratones hembra C57BL/6 silvestres 1-2x10⁶ con 1-2x10⁶ células de cáncer de ovario ID8-*Defb29/Vegf-A* y los ratones recibieron una sola inyección de ARNip de control (específico de luciferasa) o que selecciona como diana XBP1 encapsulado en nanocomplejos basados en PEI marcados con rodamina de 3 a 4 semanas después (figura 13). Estos nanocomplejos se envuelven preferencial y ávidamente por abundantes CDt fagocíticos en la inyección intraperitoneal (i.p.), un proceso que permite el silenciamiento génico *in vivo* en este subconjunto de leucocitos (Cubillos-Ruiz *et al.*, 2009). Es importante destacar que las nanopartículas basadas en PEI activan inherentemente las DC asociadas a cáncer de ovario al desencadenar la señalización de TLR y, por tanto, muestran una potente actividad inmunoadyuvante contra los tumores (Cubillos-Ruiz *et al.*, 2009). Confirmando nuestros hallazgos anteriores (Cubillos-Ruiz *et al.*, 2012; Cubillos-Ruiz *et al.*, 2009), las nanopartículas se captaron selectivamente por tDC presentes en ascitis malignas de ratones que portaban cáncer de ovario metastático (figura 13A). Nanocomplejos basados en PEI que administran ARNip específico de *Xbp1* indujeron un silenciamiento génico del 50-60% en el tDC diana en comparación con nanopartículas de control que encapsulan ARNip que selecciona como diana luciferasa (figura 13B). Los efectos funcionales del silenciamiento génico se confirmaron por la disminución de la expresión de la diana canónica de XBP1, *ERdj4*, así como por *Fasn* y *Scd2*, relacionados con la biosíntesis de lípidos en tDC que envuelven nanocomplejos específicos de *Xbp1* (figura 13C). Debido a la selección como diana selectiva de tDC *in vivo*, los niveles de ARNm de *Xbp1* permanecieron inalterados en leucocitos distintos de DC o en células cancerosas del microentorno tumoral después de la inyección de nanopartículas (no mostrado). Respaldando los hallazgos usando tDC de ratones deficientes en XBP1 condicionales, la proliferación *in vivo* de células T OT-1 marcadas con CFSE transferidas de forma adoptiva en el microentorno del cáncer de ovario se mejoró significativamente en ratones pulsados i.p. con OVA de longitud completa cuando se silenció específicamente la expresión XBP1 en tDC (figuras 14A-14C). La administración terapéutica de nanocomplejos de ARNip-PEI que seleccionan como objetivo selectivamente XBP1 derivado de tDC redujo adicionalmente el número total de células cancerosas metastásicas en la cavidad peritoneal (figura 14D) y en consecuencia disminuyó la acumulación de ascitis malignas (figura 14E). Es importante destacar que estos efectos se produjeron concomitantemente con la infiltración potenciada de células T activadas/experimentadas con antígeno endógeno en las ubicaciones tumorales en comparación con tratamientos que utilizan nanopartículas de control (figura 14F). De hecho, el silenciamiento de la expresión de XBP1 en las DC asociadas a cáncer de ovario potenció notablemente la capacidad de las células T infiltrantes para responder a antígenos tumorales, tal como se pone de manifiesto por ensayos de secreción de IFN- γ y granzima B *ex vivo* utilizando DC derivadas de médula ósea pulsadas con antígenos tumorales (figura 14G). Estos datos refuerzan el concepto de que la anulación de la función XBP1 en tDC impulsa la activación y expansión de las células T antitumorales endógenas en los sitios tumorales. Las células T esplénicas aisladas de ratones tratados con nanocomplejos que silencian XBP1 también demostraron mejores respuestas tras la exposición a antígenos tumorales en ensayos de recuerdo similares (figura 14H), lo que indica el desarrollo de respuestas de memoria antitumorales potenciadas después de seleccionar como diana un XBP1 en tDC. En conjunto, estos resultados demuestran que el silenciamiento terapéutico de XBP1 en las DC asociadas a cáncer de ovario puede reforzar las respuestas inmunitarias antitumorales endógenas *in vivo*.

Para determinar si la anulación selectiva de la ruta de IRE-1 α /XBP1 en las tDC tuvo efectos terapéuticos significativos, se trataron ratones que portaban tumores de ovario ortotópicos agresivos i.p. con solución salina, nanocomplejos de ARNip-PEI específicos de gen o no dirigidos. Los tratamientos comenzaron 12 días después de la implantación del tumor y las inyecciones se administraron cada 4 días durante un período de 3 semanas. Sorprendentemente, los ratones silvestres tratados con nanopartículas de silenciamiento o bien de XBP1 o bien de IRE-1 α demostraron un aumento notable en la supervivencia en comparación con los grupos de control (figura 14I). Y lo que es más importante, los huéspedes deficientes en *Rag2* que portaban tumores de ovario fueron totalmente incapaces de responder a este tratamiento, lo que demuestra que es necesario un sistema inmunitario adaptativo intacto para el beneficio terapéutico observado (figura 14J). Juntos, estos datos demuestran que la selección como diana de la rama IRE-1 α /XBP1 de la respuesta de estrés del RE en las tDC induce respuestas inmunitarias antitumorales protectoras contra el cáncer de ovario, por lo demás mortal.

TABLA 1 - Cebadores

Especie	Gen	Nombre del oligo	Secuencia 5'-3'	Propósito
SER HUMANO	ACTB	hAct-F	GCGAGAAGATGACCCAGATC	RT-qPCR
		hAct-R	CCAGTGGTACGGCCAGAGG	
SER HUMANO	DDIT3/CHOP	hCHOP-F	CTGCTTCTCTGGCTTGGCTG	RT-qPCR
		hCHOP-R	GCTCTGGAGGTGCTTGTGA	

ES 2 724 300 T3

SER HUMANO	XBP1	hXBP1-SA-F	CCTGGTTGCTGAAGAGGAGG	Corte y empalme
		hXBP1-SA-R	CCATGGGGAGTTCTGGAG	
Ratón	Xbp1	Xbp1-SA-F	ACACGTTTGGGAATGGACAC	Corte y empalme
		Xbp1-SA-F	CCATGGGAAGATGTTCTGGG	
Ratón	Actb	actb1083	CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT	RT-qPCR
		Actb987	TACCACCATGTACCCAGGCA	
Ratón	Xbp1	Xbp1.total-F	GACAGAGAGTCAAACCTAACGTGG	RT-qPCR
		Xbp1.total-R	GTCCAGCAGGCAAGAAGGT	
Ratón	Xbp1s	XBPsa406F	AAGAACACGCTTGGGAATGG	RT-qPCR
		XBPsa518R	CTGCACCTGCTGCGGAC	
Ratón	Xbp1 (exón 2)	XBP1WT205-F	CCTGAGCCCGGAGGAGAA	RT-qPCR
		XBP1WT272-R	CTCGAGCAGTCTGCGCTG	(no se elimina el exón)
Ratón	Dnajb9/Erdj4	ERdj4-F	TAAAAGCCCTGATGCTGAAGC	RT-qPCR
		ERdj4-R	TCCGACTATTGGCATCCGA	
Ratón	Sec61a1	Sec61a1-f	CTATTTCCAGGGCTTCCGAGT	RT-qPCR
		Sec61a1-R	AGGTGTTGTACTGGCCTCGGT	
Ratón	Hspa5/BiP	Grp78-F	TCATCGGACGCACTTGAA	RT-qPCR
		Grp78-R	CAACCACCTTGAATGGCAAGA	
Ratón	Ddit3/CHOP	CHOP-F	GTCCCTAGCTTGGCTGACAGA	RT-qPCR
		CHOP-R	TGGAGAGCGAGGGCTTTG	
Ratón	Agpat6	Agpat6-F	AGCTTGATTGTCAACCTCCTG	RT-qPCR
		Agpat6-R	CCGTTGGTGTAGGGCTTGT	
Ratón	Scd2	Scd2-f	GCATTTGGGAGCCTTGTACG	RT-qPCR
		Scd2-r	AGCCGTGCCTTGTATGTTCTG	
Ratón	Fasn	Fasn-F	GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT	RT-qPCR
		Fasn-R	TGGGTAATCCATAGAGCCAG	
Ratón	Lpar1	Lpar1.f	GACCTAGCAGGCTTACAGTTCC	RT-qPCR
		Lpar1.R	GCTGTAGTTTGGGGCGATGA	
Ratón	Clec9a	Clec9a.F	GAGCATGGTGTGTTGTGACG	RT-qPCR

ES 2 724 300 T3

		Clec9a.R	TACCTGGAAGAAGACTTGATGCCC	
Ratón	Zbtb46	Zbtb46.f	CTCACATACTGGAGAGCGGC	RT-qPCR
		Zbtb46.R	TGCTGTGGACCAGAGTATGTC	

TABLA 2

Símbolo	Descripción	Deficiente/silvestre
		Número de veces
Fut7	fucosiltransferasa 7	-2,32
Slc5a3	portador de soluto familia 5 (transportadores de inositol), miembro 3	-2,22
Gm2a	Proteína activadora del gangliósido GM2	-1,99
Stt3a	STT3, subunidad del complejo oligosacariltransferasa, homólogo A (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,94
Uggt1	UDP-glucosa glucoproteína glucosiltransferasa 1	-1,81
Gfpt1	glutamina fructosa-6-fosfatotransaminasa 1	-1,77
Mlec	malectina	-1,73
Glce	glucuronil C5-epimerasa	-1,68
HK1	hexocinasa 1	-1,59
Aldoc	fructosa-bifosfato aldolasa C	-1,58
Rpn1	riboforina I	-1,58
Mgat1	manósido-acetilglucosaminiltransferasa 1	-1,56
Pfkip	fosfofructocinasa plaquetaria	-1,56
Gaa	alfaglucosidasa ácida	-1,55
Phkb	fosforilasa beta cinasa	-1,55
Ogdh	oxoglutarato (alfa-cetoglutarato) deshidrogenasa (lipoamida)	-1,52
Ptafr	receptor del factor activador de plaquetas	-1,52
Pgm3	fosfoglucomutasa 3	-1,52
Pygb	glucógeno fosforilasa del cerebro	-1,51
Idua	alfa-L-iduronidasa	-1,49
Acly	ATP citrato liasa	-1,48
Ppip5k2	difosfoinositol-pentakisfosfato cinasa 2	-1,47
Cpt1a	carnitina palmitoiltransferasa 1a, hígado	-1,47
Pkm	piruvato cinasa, músculo	-1,46
St3gal4	ST3 beta-galactosido alfa-2,3-sialiltransferasa 4	-1,45
Ganab	subunidad alfa neutra de alfa glucosidasa 2	-1,45
Man2b1	alfa manosidasa 2, B1	-1,43
Rpn2	riboforina II	-1,40
Tram2	proteína de membrana asociada a la cadena de translocación 2	-6,39
Zfp781	proteína de dedo de cinc 781	-4,18
Apol9b	apolipoproteína L 9b	-4,08
Tlr12	receptor de tipo toll 12	-4,06
Zfp791	proteína de dedo de cinc 791	-3,93

ES 2 724 300 T3

9530036M11 Rik	gen 9530036M11 de ADNc de RIKEN	-3,71
Leprel1	tipo lepricano 1	-3,29
Il12b	interleucina 12b	-3,12
Scn4b	canal de sodio, tipo IV, beta	-3,08
Tuba1c	tubulina alfa 1C	-3,00
Dkk3	homólogo de Dickkopf 3 (<i>Xenopus laevis</i>)	-2,98
Sardh	sarcosina deshidrogenasa	-2,96
CD226	antígeno CD226	-2,90
Synpo2	sinaptopodina 2	-2,87
Fbxo10	Proteína de caja F 10	-2,79
Rtkn	rotequina	-2,75
Fam13c	Familia con similitud de secuencia 13, miembro C	-2,72
Itgb2	integrina beta 2	-2,62
Ptgir	receptor de prostaglandina I (IP)	-2,61
Bcor1	correpresor BCL6 co-represor tipo 1	-2,54
Rnase2a	#N/A	-2,53
Fcrls	receptor eliminador de receptores Fc tipo S	-2,47
Hyou1	hipoxia regulada por incremento 1	-2,47
Pdia5	proteína disulfuro isomerasa asociada 5	-2,45
Sdc1	sindecano 1	-2,42
Tmem25	proteína transmembrana 25	-2,40
Ctnna2	alfa catenina (proteína asociada a la cadherina) 2	-2,39
F7	factor de coagulación VII	-2,37
Itgae	integrina alfa E, asociada a células epiteliales	-2,35
Extl1	exostosis tipo (múltiple) 1	-2,28
Spryd3	Dominio SPRY que contiene 3	-2,26
Rps6kc1	proteína ribosomal S6 cinasa polipéptido 1	-2,26
Ear2	familia de la ribonucleasa A, miembro 2, asociada a eosinófilos,	-2,24
Fn1	fibronectina 1	-2,23
Tenm4	proteína transmembrana teneurina 4	-2,22
Gfra2	receptor alfa 2 de la familia del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial	-2,21
Plekhn1	miembro 1 de la familia N que contiene dominio de homología a pleckstrina	-2,21
Lrrc18	repetición rica en leucina que contiene 18	-2,20
Nucb2	nucleobindina 2	-2,20
Cacna1d	subunidad alfa 1D del canal de calcio, dependiente de voltaje, tipo L	-2,16
Kctd12b	dominio de tetramerización del canal de potasio que contiene 12b	-2,16
Hspa14	proteína de choque térmico 14	-2,16
Galnt9	UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 9	-2,13
Hdlbp	proteína de unión a lipoproteínas de alta densidad (HDL)	-2,11

ES 2 724 300 T3

Snx22	nexina de clasificación 22	-2,10
Dnmbp	proteína de unión a dinamina	-2,05
Gm8221	pseudogen de apolipoproteína L 7c	-2,04
Lpar1	receptor de ácido lisofosfatídico 1	-2,04
Sec61a1	subunidad alfa 1 de Sec61 (<i>S. cerevisiae</i>)	-2,03
Nlr1	miembro X1 de la familia NLR	-2,03
Capn5	calpaína 5	-2,03
Retnla	Resistina tipo alfa	-2,02
Sec24D	familia de genes relacionados con Sec24, miembro D (<i>S. cerevisiae</i>)	-2,02
Atg9b	9B relacionada con autofagia	-2,00
Mpzl2	proteína de mielina de tipo cero 2	-1,97
Slc13a3	familia de portadores de soluto 13 (transportador de dicarboxilato dependiente de sodio), miembro 3	-1,97
Plce1	fosfolipasa C, épsilon 1	-1,97
Otof	otoferlina	-1,96
F10	factor de coagulación X	-1,96
Unc45b	Homólogo B de unc-45 (<i>C. elegans</i>)	-1,96
Hspa13	familia de proteínas de choque térmico 70, miembro 13	-1,93
Madd	dominio de la muerte de la activación de MAP-cinasa	-1,92
Nbas	secuencia amplificada de neuroblastoma	-1,92
Sec24c	Familia de genes relacionados con Sec24, miembro C (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,91
Ercc6l	tipo grupo de complementación 6 de deficiencia de reparación en roedores que complementa transversalmente la reparación por escisión	-1,90
1700021K19Rik	gen 1700021K19 de ADNc de RIKEN	-1,88
Abca3	Casete de unión a ATP, subfamilia A (ABC1), miembro 3	-1,88
Kctd 11	dominio de tetramerización del canal de potasio que contiene 11	-1,88
Agpat4	1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa 4 (ácido lisofosfatídico aciltransferasa, delta)	-1,87
Ambra1	regulador 1 de autofagia/beclina 1	-1,87
Xdh	xantina deshidrogenasa	-1,86
Surf4	gen surfait 4	-1,86
Pltp	proteína de transferencia de fosfolípidos	-1,86
Itgam	integrina alfa M	-1,86
Cldn1	claudina 1	-1,85
Atg13	13 relacionada con autofagia	-1,84
Xbp1	proteína de unión a caja X 1	-1,83
P4hb	proil 4-hidroxilasa, polipéptido beta	-1,83
Cdk5rap3	proteína asociada a la subunidad reguladora CDK5 3	-1,83
Gmppb	GDP-manosa pirofosforilasa B	-1,83
Zfp872	proteína de dedo de cinc 872	-1,82
Zfp949	proteína de dedo de cinc 949	-1,82

ES 2 724 300 T3

Psd4	dominio de pleckstrina y Sec7 que contiene 4	-1,81
Pidd1	#N/A	-1,80
Dock2	dedicador de la citocinesia 2	-1,80
Sidt2	familia transmembrana SID1, miembro 2	-1,80
4931406H21 Rik	gen 4931406H21 de ADNc de RIKEN	-1,79
Abca9	casete de unión a ATP, subfamilia A (ABC1), miembro 9	-1,79
Ppm1f	proteína fosfatasa 1F (que contiene el dominio PP2C)	-1,79
Abcg3	casete de unión a ATP, subfamilia G (WHITE), miembro 3	-1,79
Crat	carnitina acetiltransferasa	-1,78
Gpr56	receptor 56 acoplado a proteína G	-1,78
Bub1b	homólogo de gemación no inhibida por benzimidazoles 1, beta (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,77
Ticam1	molécula adaptadora de receptor tipo toll 1	-1,77
Il27ra	receptor de interleucina 27, alfa	-1,77
Fam129a	familia con similitud de secuencia 129, miembro A	-1,77
Dnase1l3	tipo 3 de desoxirribonucleasa 1	-1,76
Ptger2	receptor 2 de prostaglandina E (subtipo EP2)	-1,75
Gm1966	gen predicho 1966	-1,75
Tmem167b	proteína transmembrana 167B	-1,75
Nup188	nucleoporina 188	-1,75
Tyk2	tirosina cinasa 2	-1,75
Asb4	repetición de anquirina y caja SOCS que contiene 4	-1,74
Tom1l2	diana de tipo myb1 2 (pollo)	-1,74
Ascc2	subunidad 2 del complejo 1 cointegrador de la señal de activación	-1,74
Clec4a2	dominio de lectina tipo C 4, miembro a2	-1,73
Polr3b	polipéptido B de polimerasa (ARN) III (ADN dirigido)	-1,73
IG J	cadena de unión de inmunoglobulina	-1,73
Acot11	acil-CoA tioesterasa 11	-1,73
Ankrd23	dominio de repetición anquirina 23	-1,73
Mis12	homólogo de MIS12 (levadura)	-1,73
Rfwd3	Dominio de repetición y dedo RING 3	-1,73
Ccpg 1	progresión del ciclo celular 1	-1,72
F2rl2	receptor tipo 2 del factor de coagulación II (trombina)	-1,71
Arfgap3	proteína activadora de GTPasa del factor de ribosilación-ADP 3	-1,71
Mmp25	matriz de metalopeptidasa 25	-1,71
Ap1g1	subunidad gamma 1 del complejo proteico adaptador AP-1	-1,70
Cenpi	proteína centrómera I	-1,70
Tlr8	receptor tipo toll 8	-1,70
Pdcd1	muerte celular programada 1	-1,69
Tmem127	proteína transmembrana 127	-1,69

ES 2 724 300 T3

Plau	activador del plasminógeno urocinasa	-1,69
Tut1	uridilil transferasa terminal 1 específica de U6 snARN	-1,69
Mical1	microtúbulos asociados a monooxigenasa, calponina y dominio LIM que contienen 1	-1,69
Mrc1	receptor de manosa, tipo C 1	-1,69
Pdia4	proteína disulfuro isomerasa asociada 4	-1,69
Zfp738	proteína de dedo de cinc 738	-1,69
Kat6a	K (lisina) acetiltransferasa 6A	-1,69
Mela	antígeno de melanoma	-1,69
Mettl14	metiltransferasa tipo 14	-1,68
Copg1	subunidad gamma 1 del complejo proteico coatómero	-1,68
Rassf4	miembro de la familia de dominios de asociación de Ras (RalGDS/AF-6) 4	-1,68
Klhl18	tipo kelch 18	-1,68
Gorab	Golgin que interactúa con RAB6	-1,68
Rab8b	RAB8B, miembro de la familia de oncogenes RAS	-1,67
Spcs3	homólogo de la subunidad 3 del complejo de señal peptidasa complejo subunidad 3 homólogo (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,67
Btd	biotinidasa	-1,67
Pias3	inhibidor de proteínas del STAT 3 activado	-1,67
Lysmd3	LysM, dominio de unión a peptidoglucano posible, que contiene 3	-1,67
Vps8	homólogo de proteína vacuolar clasificadora 8 (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,67
Calu	calumenina	-1,67
Sdccag8	antígeno de cáncer de colon definido serológicamente 8	-1,66
Gpr68	receptor 68 acoplado a proteína G	-1,66
Kcnab2	canal controlado por voltaje de potasio, subfamilia relacionada con el agitador, miembro beta 2	-1,66
Tlr11	receptor tipo toll 11	-1,66
Slc39a7	familia de portadores de soluto 39 (transportador de cinc), miembro 7	-1,66
Fasn	ácido graso sintasa	-1,65
E2f1	factor de transcripción E2F 1	-1,65
Zc3h12c	Dedo de cinc tipo CCCH que contiene 12C	-1,65
Fosl2	antígeno tipo Fos 2	-1,65
McpH1	autosómica primaria recesiva 1 de microcefalia	-1,64
Tgoln2	proteína de la red trans Golgi 2	-1,64
Dpp7	dipeptidilpeptidasa 7	-1,64
Golga3	autoantígeno de Golgi, subfamilia golgin a, 3	-1,63
Far1	acilo graso CoA reductasa 1	-1,63
Pank4	pantotenato cinasa 4	-1,63
Ncapd3	subunidad D3 del complejo de condensina II no SMC	-1,63
Ddb1	proteína de unión a ADN específica de daño 1	-1,62

ES 2 724 300 T3

Mapa3k14	proteína cinasa cinasa cinasa activada por mitógenos 14	-1,62
Surf6	gen surf6 6	-1,62
Sulf1	sulfatasa 1	-1,62
Samd9l	tipo dominio de motivo alfa estéril que contiene 9	-1,62
Slc41a2	familia de portadores de soluto 41, miembro 2	-1,62
Tnip2	proteína que interactúa con TNFAIP3 2	-1,62
Klhl28	tipo kelch 28	-1,62
Lclat1	lisocardiolipina aciltransferasa 1	-1,62
Peg13	13 expresado paternalmente	-1,61
Creml	modulador de elemento de respuesta a AMPc	-1,61
Mmp19	matriz de metalopeptidasa 19	-1,61
Copa	subunidad alfa del complejo proteico coatómero	-1,61
Rin3	interactor Ras y Rab 3	-1,61
Ldlr	receptor de lipoproteínas de baja densidad	-1,61
Nxpe4	familia de dominios neurexofilina y PC-esterasa, miembro 4	-1,61
Dock10	dedicador de la citocinesis 10.	-1,61
Leprot	transcripción solapante del receptor de leptina	-1,61
Sept9	septina 9	-1,61
Fbxo38	proteína de caja F 38	-1,61
Myo1f	miosina IF	-1,60
Znfx1	dedo de cinc, tipo NFX1 que contiene 1	-1,60
Ddi2	Proteína inducible por daño en el ADN 2	-1,60
Anpep	alanil aminopeptidasa de (membrana)	-1,60
Lifr	receptor del factor inhibidor de la leucemia	-1,60
Utp20	homólogo de UTP20, componente de proceso de subunidad pequeña (SSU), (levadura)	-1,60
Lpin1	lipina 1	-1,60
Eps8	sustrato de la ruta del receptor del factor de crecimiento epidérmico 8	-1,60
Zfyve16	dedo de cinc, dominio FYVE que contiene 16	-1,60
Arhgap18	proteína que activa la Rho GTPasa 18	-1,60
Elmo2	envolvimiento y motilidad celular 2	-1,60
Daglb	diacilglicerol lipasa, beta	-1,59
Elmod2	dominio ELMO/CED-12 que contiene 2	-1,59
Abcd 1	casete de unión a ATP, subfamilia D (ALD), miembro 1	-1,59
Alpk1	alfa-cinasa 1	-1,59
Ncs1	sensor de calcio neuronal 1	-1,59
Ticam2	molécula adaptadora de receptor tipo toll 2	-1,59
Clasp1	proteína de asociación a CLIP 1	-1,59
Atxn3	ataxina 3	-1,59
Depdc5	dominio DEP que contiene 5	-1,58
Cnmn4	ciclina M4	-1,58
Steap3	miembro de la familia STEAP 3	-1,58

ES 2 724 300 T3

Kit	oncogén kit	-1,58
1110037F02Rik	gen 1110037F02 de ADNc de RIKEN	-1,58
Supt5	supresor de Ty 5	-1,58
Socs6	supresor de señalización de citocinas 6.	-1,58
Gm5431	gen predicho 5431	-1,57
Nup160	nucleoporina 160	-1,57
Atf6	factor de transcripción de activación 6	-1,57
Net1	gen que transforma de células neuroepiteliales 1	-1,57
Dhdh	dihidrodiool deshidrogenasa (dimérica)	-1,57
Dapk1	proteína cinasa asociada a la muerte celular 1	-1,57
Taf1	ARN polimerasa II TAF1, factores asociados a proteína de unión a caja TATA (TBP)	-1,57
Arhgap11a	proteína que activa la Rho GTPasa 11A	-1,57
Supt16	supresor de Ty 16	-1,57
Dnajc3	homólogo de DnaJ (Hsp40), subfamilia C, miembro 3	-1,57
Ddx10	Polipéptido 10 de la caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)	-1,56
Gm8995	gen predicho 8995	-1,56
Bsd1	dominio BSD que contiene 1	-1,56
Gpr108	receptor 108 acoplado a proteína G	-1,56
Inpp5d	inositol polifosfato-5-fosfatasa D	-1,56
Snrnp200	ribonucleoproteína nuclear pequeña 200 (U5)	-1,56
Asb6	repetición de anquirina y caja SOCS que contiene 6	-1,56
Mfn2	mitofusina 2	-1,56
Ccr2	receptor 2 de quimiocina (motivo C-C)	-1,56
Cbl	linfoma de linaje B de Casitas	-1,56
Mrv1	Sitio de integración MRV 1	-1,56
Tap2	transportador 2, casete de unión a ATP, subfamilia B (MDR/TAP)	-1,56
McM3	mantenimiento de minicromosoma deficiente 3 (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,56
Nol8	proteína nucleolar 8	-1,56
Gltpd1	dominio de proteína de transferencia de glucolípido que contiene 1	-1,56
Plekho2	miembro 2 de familia O que contiene dominio de homología a pleckstrina	-1,56
Il1 r1	receptor tipo 1 de interleucina 1	-1,56
Ankfy1	dominio de repetición de anquirina y FYVE que contiene 1	-1,56
Gpatch8	dominio de parche G que contiene 8	-1,55
Nap1l4	proteína de ensamblaje del nucleosoma 1 tipo 4	-1,55
Tmed9	dominio de transporte de proteína emp24 transmembrana que contiene 9	-1,55
Arhgap26	proteína que activa la Rho GTPasa 26	-1,55
Usp1	peptidasa específica de ubiquitina tipo 1	-1,55
Pdia6	proteína disulfuro isomerasa asociada 6	-1,55

ES 2 724 300 T3

Arrb1	arrestina, beta 1	-1,55
Mkl1	MKL (leucemia megacarioblástica)/miocardina tipo 1	-1,55
Zfml	dedo de cinc, tipo matriz	-1,55
Fchsd2	dominios FCH y doble SH3 2	-1,54
Cnr2	receptor cannabinoide 2 (macrófagos)	-1,54
Ccdc47	dominio de bobina enrollada que contiene 47	-1,54
Dok2	proteína de acoplamiento 2	-1,54
Taok3	TAO cinasa 3	-1,54
Tti1	proteína 1 que interactúa con TELO2	-1,54
Smc5	Mantenimiento estructural de los cromosomas 5.	-1,54
Pbxip1	proteína que interactúa con el factor de transcripción de leucemia de células pre B 1	-1,54
Prr5l	tipo prolina rica 5	-1,54
Stat6	transductor de señal y activador de transcripción 6	-1,54
Hepacam2	familia HEPACAM miembro 2	-1,54
2700049A03Rik	gen 2700049A03 de ADNc de RIKEN	-1,54
Pkd1	homólogo de enfermedad renal poliquistica 1	-1,54
Lrrk1	cinasa de repetición rica en leucina 1	-1,54
Pan2	homólogo de la subunidad de ribonucleasa específico de PAN2 poliA (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,54
Magt1	transportador de magnesio 1	-1,53
Armxc3	repetidor de armadillo que contiene, ligado a X 3	-1,53
Cd1d1	antígeno CD1d1	-1,53
Plekhb2	familia B (evectinas) miembro 2 que contiene dominio de homología a pleckstrina	-1,53
Bcl2l14	tipo BCL2 14 (facilitador de la apoptosis)	-1,53
Lmf2	factor de maduración de la lipasa 2	-1,53
Nhs12	NHS de tipo 2	-1,53
Timp3	inhibidor tisular de la metaloproteínasa 3	-1,53
Casp3	caspa 3	-1,53
Naaa	N-aciletanolamina ácido amidasa	-1,52
Nfam1	molécula activadora nfat con motivo ITAM 1	-1,52
Dcp1a	homólogo A de enzima de desencapuchado DCP1 (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,52
Eif3a	subunidad A del factor de iniciación de la traducción eucariótica 3,	-1,52
Mtmr6	proteína relacionada con miotubularina 6	-1,52
Top2a	topoisomerasa (ADN) II alfa	-1,52
Dnajc14	homólogo de DnaJ (Hsp40), subfamilia C, miembro 14	-1,52
Pde4dip	proteína que interactúa con fosfodiesterasa 4D (miomegalina)	-1,52
Evi2a	sitio de integración viral ecotrópica 2a	-1,52
Npat	proteína nuclear en la región AT	-1,51
Sil1	homólogo de chaperona de retículo endoplasmático SIL1 (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,51

ES 2 724 300 T3

Hlrf	factor de transcripción de tipo helicasa	-1,51
Stim2	molécula de interacción estromal 2	-1,51
Baz2a	bromodominio adyacente al dominio de dedo de cinc, 2A	-1,51
EII	factor de elongación ARN polimerasa II	-1,51
R3hcc1	tipo dominio R3H y bobina enrollada que contiene 1	-1,51
Mybbp1a	proteína de unión a MYB (P160) 1a	-1,51
Myo1c	miosina IC	-1,50
Zfp260	proteína de dedo de cinc 260	-1,50
Adan 19	dominio de a desintegrina y metalopeptidasa 19 (meltrina beta)	-1,50
Tkt	transcetolasa	-1,50
Exoc2	componente de complejo de exocistos 2	-1,50
Sft2d2	dominio SFT2 que contiene 2	-1,50
Tuba1a	tubulina, alfa 1A	-1,50
Oat	ornitina aminotransferasa	-1,50
Baz2b	bromodominio adyacente al dominio de dedo de cinc, 2B	-1,50
Ltn1	ubiquitina proteína ligasa 1 de listerina E3	-1,50
Copb2	subunidad beta 2 del complejo proteico coatómero (cebador beta)	-1,50
Cyp51	citocromo P450, familia 51	-1,50
Acin1	inductor de condensación de la cromatina apoptótica 1	-1,50
Hivep2	proteína 2 de unión al potenciador del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo I	-1,50
Tmem170b	proteína transmembrana 170B	-1,49
Stom	estomatina	-1,49
Sec16a	homólogo A de SEC16 (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,49
Krt80	queratina 80	-1,49
Malat1	transcrito 1 de adenocarcinoma de pulmón asociado a metástasis (ARN no codificante)	-1,49
Rabgap1	proteína 1 activadora de RAB GTPasa	-1,49
Pja2	praja 2, que contiene motivo RING-H2	-1,49
Slamf8	miembro 8 de la familia SLAM	-1,49
Tnpo3	transportina 3	-1,48
Tmx3	proteína transmembrana 3 relacionada con tiorredoxina	-1,48
Rbbp6	proteína 6 de unión a retinoblastoma	-1,48
Ilf3	factor 3 de unión al potenciador de interleucina	-1,48
Ctr9	Ctr9, componente del complejo Paf1/ARN polimerasa II, homólogo (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,48
Anapc1	subunidad 1 del complejo que promueve la anafase	-1,48
Svil	supervilina	-1,48
Ptrf	polimerasa I y factor de liberación de transcrito	-1,48
Tox4	miembro 4 de la familia del grupo box de alta movilidad TOX	-1,48
Abi2	miembro de interacción 2 de abi	-1,48
Atp7a	ATPasa, transporte de Cu ⁺⁺ , polipéptido alfa	-1,48

ES 2 724 300 T3

Cnppd1	que contiene el dominio de ciclina Pas1/PH080, 1	-1,48
Zc3h7a	que contiene el dedo de cinc tipo CCCH, 1 a	-1,48
Zfp263	proteína 263 de tipo dedo de cinc	-1,48
Ipo5	importina 5	-1,48
Pggt1 b	proteína geranil geranil transferasa tipo I, subunidad beta	-1,48
Ptplad2	que contiene el dominio A de tipo proteína tirosina fosfatasa, 2	-1,48
Usp8	peptidasa específica de ubiquitina, 8	-1,48
Coro7	coronina 7	-1,47
Sept3	septina 3	-1,47
Spop	proteína POZ del tipo moteado	-1,47
Aco1	aconitasa 1	-1,47
Nucb1	nucleobindina 1	-1,47
Prpf6	homólogo de factor 6 de corte y empalme del pre-ARNm de PRP6 (levadura)	-1,47
Mavs	proteína de señalización antiviral mitocondrial	-1,47
Cd209c	antígeno CD209c	-1,47
Atp8b4	ATPasa, clase I, tipo 8B, miembro 4	-1,47
Myof	mioferlina	-1,47
Sec23b	SEC23B (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,46
Nckap1l	similar a proteína 1 asociada a NCK	-1,46
Pum1	miembro 1 de la familia de unión a ARN de pumilio	-1,46
Fgl2	proteína 2 similar a fibrinógeno	-1,46
Sec31a	homólogo A de Sec31 A (<i>S. cerevisiae</i>)	-1,46
Txndc16	que contiene el dominio de tiorredoxina, 16	-1,46
Pdxk	piridoxal (piridoxina, vitamina B6) cinasa	-1,46
Gga3	asociado a Golgi, que contiene apéndice de gamma adaptina, proteína 3 de unión a ARF	-1,46
Kitl	ligando de kit	-1,46
Tmcc3	dominios de hélice helicoidal y transmembrana, 3	-1,46
Gmppa	GDP-manosa pirofosforilasa A	-1,46
Ppp1 r21	proteína fosfatasa 1, subunidad reguladora 21	-1,46
Os9	amplificado en osteosarcoma	-1,46
4930506M07Rik	gen 4930506M07 de ADNC de RIKEN	-1,45
Smc1a	mantenimiento estructural de cromosomas 1A	-1,45
Kansl3	subunidad del complejo NSL regulador de KAT8, 3	-1,45
2900097C17Rik	gen 2900097C17 de ADNc de RIKEN	-1,45
Tmem181b-ps	proteína transmembrana 181B, pseudogén	-1,45
Nup210	nucleoporina 210	-1,45
Entpd7	ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 7	-1,45
Stag2	antígeno estromal 2	-1,45
Narf	factor de reconocimiento de prelamina nuclear A	-1,45
Tmem39a	proteína transmembrana 39a	-1,45
Rnf41	proteína 41 de dedo anular	-1,45

ES 2 724 300 T3

Agpat6	1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa 6 (ácido lisofosfatídico aciltransferasa, zeta)	-1,44
Zfp445	proteína de dedo de cinc 445	-1,44
lkbkg	inhibidor de kappaB cinasa gamma	-1,44
Gripap1	proteína asociada a GRIP1, 1	-1,44
Chd2	Proteína de unión a ADN, helicasa con cromodominio, 2	-1,44
Ankrd27	dominio de repetición de anquirina 27 (dominio VPS9)	-1,44
Ppp1r15b	proteína fosfatasa 1, subunidad reguladora (inhibidor) 15b	-1,44
Golgb1	autoantígeno de Golgi, subfamilia B de golgina, macrogolgina 1	-1,44
Tmed3	que contiene el dominio transmembrana emp24, 3	-1,44
Psap	prosaposina	-1,44
Ctnna1	catenina (proteína asociada a cadherina), alfa 1	-1,44
Ptbp1	proteína de unión al tracto de polipirimidina 1	-1,43
Csf2rb	receptor del factor 2 estimulante de colonias, beta, de baja afinidad (granulocitos-macrófagos)	-1,43
Ssrp1	proteína de reconocimiento específica de estructura, 1	-1,43
Cyth4	citohesina 4	-1,43
Tug1	gen regulado por incremento de taurina,	-1,43
Scd2	estearoil-coenzima A desaturasa 2	-1,43
Arhgef6	factor de intercambio de nucleótidos de guanina Rac/Cdc42 (GEF) 6	-1,43
Tbc1d15	familia de dominios TBC1, miembro 15	-1,42
Mbn1	similar a muscleblind 1 (<i>Drosophila</i>)	-1,42
Eif4g2	factor de inicio de la traducción eucariota 4, gamma 2	-1,42
Rp2h	homólogo de la retinitis pigmentosa 2 (humano)	-1,42
Adam8	un dominio de desintegrina y metalopeptidasa 8	-1,41
Neat1	transcrito 1 de ensamblaje de paraspeckle nuclear (no codificante de proteínas)	-1,41
Themis2	miembro 2 de la familia asociada a selección de timocitos	-1,41
Gosr2	miembro 2 del complejo receptor de SNAP de Golgi	-1,40
Idi1	isopentenil-difosfato delta isomerasa	-1,40
Psm2	subunidad 26S de proteasoma (prosome, macropaina), no ATPasa, 2	-1,40
Hmgcr	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa	-1,40
Eef2	factor de elongación de la traducción eucariota 2	-1,40
Myo1g	miosina IG	-1,40
Msn	Moesina	-1,39
Cfh	factor h de componente del complemento h	-1,38
C1qc	componente del complemento 1, subcomponente q, cadena C	1,42
A630089N07Rik	gen A630089N07 del ADNc de RIKEN	1,43
Traf5	factor 5 asociado a receptor de TNF	1,44
Zfp353-ps	proteína 352 dedo de cinc	1,45

ES 2 724 300 T3

Fam110b	familia con similitud de secuencia 110, miembro B	1,48
Wfdc17	dominio central de cuatro disulfuros WAP 17	1,48
Fam213b	familia con similitud de secuencia 213, miembro B	1,48
Trem2	receptor desencadenante expresado en células mieloides 2	1,50
Snx18	nexina de clasificación 18	1,51
1500012F01 Rik	gen 1500012F01 de ADN de RIKEN	1,51
Tctex1d2	que contiene dominio Tctex1, 2	1,52
Icam2	molécula de adhesión intercelular 2	1,53
Gngt2	proteína de unión a nucleótido de guanina (proteína G), polipéptido 2 de actividad de transducción gamma	1,53
Lst1	transcrito específico de leucocitos 1	1,54
Itn1	intersectina 1 (proteína del dominio SH3 1A)	1,54
Ltbp1	proteína de unión beta al factor de crecimiento transformante latente, 1	1,55
Blvrb	biliverdina reductasa B (flavina reductasa (NADPH))	1,57
Hscb	homólogo de co-chaperona de agrupamiento de hierro-azufre HscB (<i>E. coli</i>)	1,57
Acot2	acil-CoA tioesterasa 2	1,57
Gimap8	GTPasa, miembro de la familia IMAP 8	1,59
Sept1	septina 1	1,60
C5ar2	receptor 2 del componente del complemento 5a	1,60
Itga6	integrina alfa 6	1,61
Dcxr	dicarbonil L-xilulosa reductasa	1,61
Mmp12	metalo peptidasa de la matriz, 12	1,61
Tmem243	proteína transmembrana 243, mitocondrial	1,63
Pou2f2	dominio POU, clase 2, factor de transcripción 2	1,63
Ly6c2	complejo de antígeno 6 de linfocitos, locus C2	1,63
Hnmt	histamina N-metiltransferasa	1,64
Asns	asparagina sintetasa	1,64
Emp1	proteína de la membrana epitelial 1	1,65
Ets1	oncogén 1 de la leucemia aviar E26, dominio en 5'	1,65
Cirbp	proteína de unión al ARN inducible en frío	1,65
Cbr2	carbonil reductasa 2	1,68
Serpinb10	inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado B (ovalbumina), miembro 10	1,68
Vsig4	que contiene el conjunto V y dominio de inmunoglobulina, 4	1,69
Fam20c	familia con similitud de secuencia 20, miembro C	1,69
Irf2bpl	similar a proteína de unión a factor regulador de interferón 2	1,71
Cd93	Antígeno CD93	1,71
Med17	subunidad 17 de complejo mediador	1,71
Apoe	apolipoproteína E	1,72
Cd28	antígeno CD28	1,72

ES 2 724 300 T3

Ms4a1	4 dominios transmembrana, subfamilia A, miembro 1	1,73
Lpcat2	lisofosfatidilcolina aciltransferasa 2	1,73
Plac8	específico de placenta 8	1,73
Rab28	RAB28, miembro de la familia de oncogenes RAS	1,74
Mzb1	proteína específica de zona marginal de células B y B1, 1	1,74
Dok3	proteína de acoplamiento 3	1,75
Arg1	arginasa, hígado	1,76
Cd19	antígeno CD19	1,76
Fcna	ficolina A	1,77
Cd79b	antígeno CD79B	1,77
Tspan4	tetraspanina 4	1,78
Mmp9	metalopeptidasa de la matriz 9	1,80
Itk	cinasa de células T inducible por IL2	1,81
Dppa3	asociada a pluripotencia del desarrollo, 3	1,81
Ninj1	ninjurina 1	1,81
Cxcr5	receptor 5 de quimiocina (motivo C-X-C)	1,82
Spry2	homólogo de sprouty 2 (<i>Drosophila</i>)	1,82
Prtn3	proteínasa 3	1,82
Snx24	nexina de clasificación 24	1,83
Ccl3	ligando de quimiocina (motivo C-C) 3	1,83
Gdf3	factor de diferenciación de crecimiento 3	1,86
Ly6d	complejo de antígeno 6 de linfocitos, locus D	1,86
Cd69	Antígeno CD69	1,86
Selp	selectina, plaquetas	1,86
Apoc2	apolipoproteína C-II	1,86
Gimap3	GTPasa, miembro de la familia IMAP 3	1,88
Speer7-ps1	Proteína 7 rica en glutamato (E) asociada a espermatogénesis, pseudogén 1	1,89
Dusp1	Fosfatasa 1 de especificidad dual	1,89
Clec4d	Familia de dominios de lectina tipo C 4, miembro d	1,90
Cd27	Antígeno CD27	1,90
Sh2d2a	Proteína 2A de dominio SH2	1,91
Ly6a	Complejo de antígeno 6 de linfocíticos, locus A	1,92
Nt5e	5' nucleotidasa, ecto	1,94
Txk	TXK tirosina cinasa	1,96
Saa3	suero amiloide A 3	1,96
Gimap9	GTPasa, miembro de la familia IMAP 9	1,98
Ndufb2	subcomplejo beta 1 de NADH deshidrogenasa (ubiquinona), 2	1,99
Tfec	factor de transcripción EC	2,02
Cxcl13	Ligando 13 de quimiocina (motivo C-X-C)	2,03
Igfbp4	proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 4	2,04

ES 2 724 300 T3

Asb1	que contiene la caja SOCS y de repetición de anquirina, 1	2,07
Pf4	factor de plaquetas 4	2,07
Xkrx	Unido a X relacionado con el precursor del grupo sanguíneo de Kell X	2,09
Ypel3	Similar a yippee, 3 (<i>Drosophila</i>)	2,09
Ppp3cc	proteína fosfatasa 3, subunidad catalítica, isoforma gamma	2,10
Fam101b	Familia con similitud de secuencia 101, miembro B	2,10
Slc40a1	Familia de portador de soluto 40 (transportador regulado por hierro), miembro 1	2,10
Samd3	Que contiene el dominio con motivo alfa estéril, 3	2,11
Il2rb	receptor de interleucina 2, cadena beta	2,12
Fam169b	Familia con similitud de secuencia 169, miembro B	2,12
Mri1	Homólogo de metiltiorribosa-1-fosfato isomerasa (<i>S. cerevisiae</i>)	2,15
Gimap6	GTPasa, miembro de la familia IMAP 6	2,15
Alox15	araquidonato 15-lipoxigenasa	2,17
Tpsb2	triptasa beta 2	2,18
Lef1	factor de unión de potenciador linfoide 1	2,18
Tcf7	factor de transcripción 7, específico de células T	2,21
Skap1	fosfoproteína 1 asociada a familia src	2,22
Tmprss13	proteasa transmembrana, serina 13	2,22
Marco	Receptor de macrófagos con estructura colagenosa	2,23
Cd79a	Antígeno CD79A (alfa asociada a inmunoglobulina)	2,26
Apoc1	apolipoproteína C-I	2,26
Ikzf3	Dedo de cinc de familia IKAROS 3	2,27
Cd3d	Antígeno CD3, polipéptido delta	2,29
Id1	inhibidor de la unión al ADN 1	2,29
Gzmb	granzima B	2,29
Satb1	proteína de unión a secuencia especial rica en AT especial 1	2,29
Lax1	Adaptador transmembrana de linfocitos 1	2,32
Gimap4	GTPasa, miembro de la familia IMAP 4	2,34
Cpa3	carboxipeptidasa A3, mastocitos	2,36
Ccr3	Receptor 3 de quimiocina (motivo C-C)	2,37
Fam189b	Familia con similitud de secuencia 189, miembro B	2,38
Wnt2	Sitio de integración de MMTV relacionado con tipo wingless 2	2,38
Vmn2r26	vomer nasal 2, receptor 26	2,39
Ppbbp	proteína básica pro-plaquetaria	2,40
Pou2af1	Dominio POU, clase 2, factor de asociación 1	2,41
Lck	proteína tirosina cinasa de linfocitos	2,42
Gm11346	Pseudogén regulado por linfocitos ligados a X, 5	2,42
Cma1	Quimasa 1, mastocitos	2,42

ES 2 724 300 T3

Ctsw	catepsina W	2,43
Gm684	gen pronosticado 684	2,45
Serpinb2	inhibidor de serina (o cisteína) peptidasa, clado B, miembro 2	2,47
Trav3n-3	Receptor de células T alfa variable 3N-3	2,48
Prg4	proteoglicano 4 (factor estimulante de megacariocitos, proteína de la zona articular superficial)	2,48
Slpi	inhibidor de la peptidasa leucocitaria secretora	2,49
Tmem51os1	Cadena opuesta de Tmem51 1	2,50
Ccl4	Quimiocina (motivo C-C) ligando 4	2,50
Klre1	Miembro 1 de la familia E de receptores de tipo lectina de linfocitos citolíticos naturales	2,51
Pear1	receptor de agregación endotelial plaquetaria 1	2,52
Lat	Ligador para activación de células T	2,53
Ptchd4	Que contiene dominio parcheado, 4	2,53
Pard6g	regulador de polaridad celular de la familia par-6 gamma	2,55
Prf1	Perforina 1 (proteína formadora de poros)	2,57
Stc1	estaniocalcina 1	2,59
Scn1a	Canal de sodio, regulado por voltaje, tipo I, alfa	2,60
Plcb4	fosfolipasa C, beta 4	2,63
Cd3g	Antígeno CD3, polipéptido gamma	2,67
Gpr174	Receptor acoplado a proteína G 174	2,69
Pik3c2b	fosfoinosítido-3-cinasa, clase 2, polipéptido beta	2,71
Crtam	Molécula citotóxica y reguladora de células T	2,71
Eomes	Homólogo de eomesodermina (<i>Xenopus laevis</i>)	2,72
Ebf1	factor 1 de células B temprano	2,72
Tnfsf15	Superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 15	2,77
Gimap7	GTPasa, miembro de la familia IMAP 7	2,81
Ifitm 10	proteína transmembrana inducida por interferón 10	2,82
Trem3	receptor desencadenante expresado en células mieloides 3	2,83
Fasl	Ligando de Fas (Superfamilia de TNF, miembro 6)	2,83
Epha2	receptor A2 de Eph	2,83
Sh2d1a	Proteína de dominio SH2 1A	2,85
Tdgf1	factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma 1	2,86
Ncr1	receptor desencadenante de la citotoxicidad natural 1	2,88
Fbxl21	Proteína de repetición rica en leucina y F-box, 21	2,88
Zdhhc15	Que contiene dominio DHHC, dedo de cinc, 15	2,89
Gimap5	GTPasa, miembro de la familia IMAP 5	2,91
Gzma	granzima A	2,94
A630023P12Rik	Gen de ADNc A630023P12 de RIKEN	2,96
Ms4a4b	4 dominios que abarcan la membrana, subfamilia A, miembro 4B	2,99
Mgst2	glutación S-transferasa 2 microsomal	2,99

ES 2 724 300 T3

Thy1	antígeno de células del timo 1, theta	2,99
2900011O08Rik	Gen 2900011008 de ADNc de RIKEN	3,01
Cd3e	Antígeno CD3, polipéptido épsilon	3,02
A730060N03Rik	Gen A730060N03 de ADNc de RIKEN	3,03
Klrc2	subfamilia C del receptor similar a lectina de linfocitos citolíticos naturales, miembro 2	3,04
Phactr3	Fosfatasa y regulador de actina 3	3,10
Retnlg	Resistina de tipo gamma	3,11
Tsix	Transcrito específico de X (inactivo), cadena opuesta	3,12
Rgcc	regulador del ciclo celular	3,13
Dapl1	Proteína asociada a muerte, de tipo 1	3,14
Slitrk4	Familia similar a SLIT y NTRK, miembro 4	3,20
Cyp26a1	citocromo P450, familia 26, subfamilia a, polipéptido 1	3,20
Cd96	Antígeno CD96	3,21
Mrgpra2b	GPR relacionado con MAS, miembro A2B	3,25
Lynx 1	Ly6/neurotoxina 1	3,25
Pou1f1	Dominio POU, clase 1, factor de transcripción 1	3,25
Klrg1	subfamilia G del receptor similar a lectina de linfocitos citolíticos naturales, miembro 1	3,25
S100a9	proteína A9 de unión al calcio S100 (calgranulina B)	3,25
Tlr5	receptor de tipo toll 5	3,26
Klra21	subfamilia A del receptor similar a lectina de linfocitos citolíticos naturales, miembro 21	3,27
Mrgpra2a	GPR relacionado con MAS, miembro A2A	3,28
Ptprcap	proteína tirosina fosfatasa, tipo de receptor, proteína asociada al polipéptido C	3,29
1830127L07Rik	Gen 1830127L07 de ADNc de RIKEN	3,30
9530053A07Rik	Gen 9530053A07 de ADNc de RIKEN	3,31
Olf288	receptor olfativo 288	3,37
Ly6c1	Complejo de antígeno 6 de linfocitos 6, locus C1	3,40
Nkg7	secuencia del grupo 7 de linfocitos citolíticos naturales	3,41
Folr4	receptor de folato 4 (delta)	3,44
Ctsk	catepsina K	3,46
Gpr83	Receptor 83 acoplado a proteínas G	3,47
Unc5cl	Similar a homólogo C de Unc-5 (<i>C. elegans</i>)	3,47
Fcer1 a	Receptor Fc, IgE, alta afinidad I, polipéptido alfa	3,58
Klra7	Receptor similar a lectina de linfocitos citolíticos naturales, subfamilia A, miembro 7	3,60
1810041L15Rik	Gen 1810041L15 de ADNc de RIKEN	3,62
Nsg2	Miembro 2 de la familia de genes específicos de neurona	3,62
G0s2	Gen interruptor de G0/G1, 2	3,68
Sall3	Similar a sal 3 (<i>Drosophila</i>)	3,68
S100a8	proteína A8 de unión a calcio (calgranulina A)	3,70
Klrc1	subfamilia C del receptor similar a lectina de linfocitos citolíticos naturales, miembro 1	3,71

ES 2 724 300 T3

Gm13363	Gen predicho 13363	3,77
Slc2a13	Familia de portadores de soluto 2 (transportador de glucosa facilitado), miembro 13	3,77
Upp1	uridina fosforilasa 1	3,78
Tnik	Cinasa que interacciona con TRAF2 y NCK	3,82
Klra1	Receptor similar a lectina de linfocitos citolíticos naturales, subfamilia A, miembro 1	3,85
Tcrd-V1	Receptor de células T delta, variable 1	3,86
Lrrn4	repetición neuronal rica en leucina 4	3,89
Mycn	oncogén relacionado con el virus de la mielocitomatosis v-myc, derivado de neuroblastoma (aviar)	3,92
Fam155a	Familia con similitud de secuencia 155, miembro A	3,93
Myo16	miosina XVI	3,96
Xcl1	Quimiocina (motivo C) ligando 1	4,01
Lcn2	lipocalina 2	4,10
Gzmk	granzima k	4,11
A530013C23Rik	Gen A530013C23 de ADNc de RIKEN	4,20
Krt75	queratina 75	4,23
1100001G20Rik	Gen 1100001G20 de ADNc de RIKEN	4,24
Efna2	efrina A2	4,24
C330013E15Rik	gen C330013E15 de ADNc de RIKEN	4,27
Hecw2	HECT, Proteína ubiquitina E3 ligasa 2 que contiene dominio C2 y WW	4,31
March11	dedo anular asociado a membrana (C3HC4) 11	4,35
4930588J15Rik	Gen 4930588J15 de ADNc de RIKEN	4,37
Sucnr1	Receptor de succinato 1	4,64
Smok4a	Cinasa 4A de movilidad de esperma	4,85
1730030J21 Rik	Gen 1730030J21 de ADNc de RIKEN	5,14
Slc15a2	Familia de portadores de soluto 15 (transportador de H ⁺ / péptidos), miembro 2	5,21
Penk	Preproencefalina	5,25
1700034I23Rik	Pseudogén que contiene el dominio FUN14, 2	5,30
Tnfsf18	Superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 18	5,64
Cox6a2	Polipéptido 2 de subunidad VI1 de citocromo c oxidasa	5,68
Csf2	Factor estimulante de colonias 2 (granulocitos-macrófagos)	5,81
Actg1	actina, gamma, citoplasmática 1	5,85
Apold1	Que contiene dominio L de apolipoproteína, 1	6,06
Ip6k2	inositol hexafosfato cinasa 2	7,27
Baiap3	Proteína 3 asociada a BAI1	7,29
Hsd3b1	Hidroxi-delta-5-esteroide deshidrogenasa, 3 beta y esteroide-delta-isomerasa 1	9,34
Sec14l4	Similar a SEC14, 4 (<i>S. cerevisiae</i>)	10,28
Itgad	integrina, alfa D	10,29

Realizaciones particulares

1. Un inhibidor directo o indirecto de XBP1 o IRE-1 α para su uso en la potenciación o inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral en un sujeto.
- 5 2. Un inhibidor directo o indirecto de XBP1, en el que el inhibidor de XBP1 selecciona como diana las células dendríticas asociadas a tumor (tDC), para su uso en el tratamiento o la reducción de la progresión del cáncer de ovario en un sujeto.
3. Un inhibidor directo o indirecto de XBP1 para su uso en la potenciación o inducción de la respuesta inmunitaria de células dendríticas asociadas a cáncer en un sujeto.
4. El inhibidor para su uso en la realización 1 o la realización 3, en el que el sujeto tiene cáncer de ovario.
- 10 5. El inhibidor para su uso en una cualquiera de las realizaciones 1-3, en el que el inhibidor de XBP1 es un inhibidor directo; en el que el inhibidor de XBP1 se selecciona del grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico que es antisentido con respecto a una molécula de ácido nucleico que codifica para XBP1, un ARNhc de XBP1 y un ARNip de XBP1, un microARN que selecciona como diana XBP1, un ARNip de XBP1 encapsulado en nanopartículas, una molécula de XBP1 negativa dominante y un anticuerpo específico para XBP1; o en el que el inhibidor de XBP1 es un ARNip específico de XBP1 encapsulado en nanopartículas.
- 15 6. El inhibidor para su uso en una cualquiera de las realizaciones 1-3, en el que el inhibidor de XBP1 es un inhibidor indirecto, preferiblemente en el que el inhibidor de XBP1 es un agente que inhibe IRE-1 α o un agente que inhibe la generación de XBP1 funcional, preferiblemente en el que el inhibidor de IRE-1 α es un ARNhc de IRE-1 α o un ARNip de IRE-1 α .
- 20 7. El inhibidor para su uso en la realización 6, en el que el agente que inhibe IRE-1 α es un ARNip específico para IRE-1 α encapsulado en nanopartículas.
8. El inhibidor para su uso en una cualquiera de las realizaciones 1-3, en el que el inhibidor de XBP1 se administra por vía sistémica o en ubicaciones tumorales en el sujeto, preferiblemente en el que el tumor es un cáncer de ovario.
9. El inhibidor para su uso en una cualquiera de las realizaciones 1 ó 3, en el que el inhibidor de XBP1 selecciona como diana células dendríticas asociadas a tumor (tDC).
- 25 10. El inhibidor para su uso en una cualquiera de las realizaciones 1-3, en el que el inhibidor de XBP1 se administra en combinación con un segundo agente terapéutico contra el cáncer, preferiblemente en el que el inhibidor de XBP1 se administra en combinación con un agente quimioterápico.
11. El inhibidor para su uso en una cualquiera de las realizaciones 1-3, en el que el tratamiento induce la supervivencia prolongada del sujeto.
- 30 12. El inhibidor para su uso en la realización 1, en el que el inhibidor de IRE-1 α es un inhibidor directo o en el que el inhibidor de IRE-1 α se selecciona del grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico que es antisentido con respecto a una molécula de ácido nucleico que codifica para IRE-1 α , un ARNhc de IRE-1 α y un ARNip de IRE-1 α , un microARN que selecciona como diana IRE-1 α , un ARNip de IRE-1 α encapsulado en nanopartículas, una molécula de IRE-1 α negativa dominante y un anticuerpo específico para IRE-1 α , preferiblemente en el que el inhibidor de IRE-1 α es un ARNhc de IRE-1 α o un ARNip de IRE-1 α o en el que el inhibidor de IRE-1 α es un ARNip específico para IRE-1 α encapsulado en nanopartículas.
- 35 13. El inhibidor para su uso en la realización 1, en el que el inhibidor de IRE-1 α es un inhibidor indirecto.
14. El inhibidor para su uso en la realización 1, en el que el inhibidor de IRE-1 α se administra por vía sistémica o en ubicaciones tumorales en el sujeto, preferiblemente en el que el tumor es un cáncer de ovario.
- 40 15. El inhibidor para su uso en la realización 1, en el que el inhibidor de IRE-1 α selecciona como diana células dendríticas asociadas a tumor (tDC).
16. El inhibidor para su uso en la realización 1, en el que el inhibidor de IRE-1 α se administra en combinación con un segundo agente terapéutico contra el cáncer, preferiblemente en el que el inhibidor de IRE-1 α se administra en combinación con un agente quimioterápico.
- 45 **Realizaciones preferidas**
17. Un inhibidor para su uso en la potenciación o inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral en un sujeto, en el que el inhibidor es un inhibidor directo de XBP1 o IRE-1 α , o un agente que inhibe la generación de XBP1 o IRE-1 α funcional.
- 50 18. Un inhibidor, en el que el inhibidor es un inhibidor directo de XBP1 o un agente que inhibe la generación de XBP1 funcional, y en el que el inhibidor selecciona como diana células dendríticas asociadas a tumor (tDC), para su

uso en el tratamiento o la reducción de la progresión del cáncer de ovario en un sujeto.

19. Un inhibidor para su uso en la potenciación o inducción de la respuesta inmunitaria de células dendríticas asociadas a cáncer en un sujeto, en el que el inhibidor es un inhibidor directo de XBP1 o un agente que inhibe la generación de XBP1 funcional.

5 20. El inhibidor para su uso en la realización 17 o la realización 19, en el que el sujeto tiene cáncer de ovario.

21. El inhibidor para su uso en una cualquiera de las realizaciones 17-19, en el que el inhibidor es el agente que inhibe la generación de XBP1 funcional y se selecciona del grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico que es antisentido con respecto a una molécula de ácido nucleico que codifica para XBP1, un ARNhc de XBP1 y un ARNip de XBP1, un microARN que selecciona como diana XBP1, un ARNip de XBP1 encapsulado en nanopartículas, o un ARNip específico de XBP1 encapsulado en nanopartículas; o en el que el inhibidor es un inhibidor directo de XBP1 y se selecciona del grupo que consiste en una molécula de XBP1 negativa dominante y un anticuerpo específico para XBP1.

15 22. El inhibidor para su uso en una cualquiera de las realizaciones 18-19, en el que el agente que inhibe la generación de XBP1 funcional es un agente que inhibe la generación de IRE-1 α funcional, preferiblemente en el que el inhibidor de IRE-1 α es un ARNhc de IRE-1 α o un ARNip de IRE-1 α .

23. El inhibidor para su uso en la realización 22, en el que el agente que inhibe la generación de IRE-1 α funcional es un ARNip específico para IRE-1 α encapsulado en nanopartículas.

20 24. El inhibidor para su uso en una cualquiera de las realizaciones 17-19, en el que el inhibidor es el inhibidor directo de XBP1 o el agente que inhibe la generación de XBP1 funcional, y en el que el inhibidor se administra por vía sistémica o en ubicaciones de tumores en el sujeto, preferiblemente en el que el tumor es un cáncer de ovario.

25 25. El inhibidor para su uso en una cualquiera de las realizaciones 17 ó 19, en el que el inhibidor es el inhibidor directo de XBP1 o el agente que inhibe la generación de XBP1 funcional, y en el que el inhibidor selecciona como diana células dendríticas asociadas a tumor (tDC).

26. El inhibidor para su uso en una cualquiera de las realizaciones 17-19, en el que el inhibidor es el inhibidor directo de XBP1 o el agente que inhibe la generación de XBP1 funcional, y en el que el inhibidor se administra en combinación con un segundo agente terapéutico contra el cáncer, preferiblemente en el que el inhibidor de XBP1 se administra en combinación con un agente quimioterápico.

27. El inhibidor para su uso en una cualquiera de las realizaciones 17-19, en el que el tratamiento induce la supervivencia prolongada del sujeto.

30 28. El inhibidor para su uso en la realización 17, en el que el inhibidor es el agente que inhibe la generación de IRE-1 α funcional y se selecciona del grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico que es antisentido con respecto a una molécula de ácido nucleico que codifica para IRE-1 α , un ARNhc de IRE-1 α y un ARNip de IRE-1 α , un microARN que selecciona como diana IRE-1 α , un ARNip de IRE-1 α encapsulado en nanopartículas; o en el que el inhibidor es el inhibidor directo de IRE-1 α y se selecciona de una molécula de IRE-1 α negativa dominante y un anticuerpo específico para IRE-1 α .

29. El inhibidor para su uso en la realización 17, en el que el inhibidor es el agente que inhibe la generación de IRE-1 α funcional.

40 30. El inhibidor para su uso en la realización 17, en el que el inhibidor es el inhibidor directo de IRE-1 α o el agente que inhibe la generación de IRE-1 α funcional, en el que el inhibidor se administra por vía sistémica o en ubicaciones tumorales en el sujeto, preferiblemente en el que el tumor es un cáncer de ovario.

31. El inhibidor para su uso en la realización 17, en el que el inhibidor es el inhibidor directo de IRE-1 α o el agente que inhibe la generación de IRE-1 α funcional, y en el que el inhibidor selecciona como diana células dendríticas asociadas a tumor (tDC).

45 32. El inhibidor para su uso en la realización 17, en el que el inhibidor es el inhibidor directo de IRE-1 α o el agente que inhibe la generación de IRE-1 α funcional, y en el que el inhibidor se administra en combinación con un segundo agente terapéutico contra el cáncer, preferiblemente en el que el inhibidor se administra en combinación con un agente quimioterápico.

Bibliografía

50 Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N.H., Arias, C., Lennon, C.J., Kluger, Y., y Dynlacht, B.D. (2007). XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell* 27, 53-66.

Barnett, B., Kryczek, I., Cheng, P., Zou, W., y Curiel, T.J. (2005). Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and

- therapeutic potential. *Am J Reprod Immunol* 54, 369-377.
- Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., y Moses, H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332-337.
- 5 Bollard, C.M., Gottschalk, S., Leen, A.M., Weiss, H., Straathof, K.C., Carrum, G., Khalil, M., Wu, M.F., Huls, M.H., Chang, C.C., *et al.* (2007). Complete responses of relapsed lymphoma following genetic modification of tumorantigen presenting cells and T-lymphocyte transfer. *Blood* 110, 2838-2845.
- 10 Callahan, M.J., Nagymanyoki, Z., Bonome, T., Johnson, M.E., Litkouhi, B., Sullivan, E.H., Hirsch, M.S., Matulonis, U.A., Liu, J., Birrer, M.J., *et al.* (2008). Increased HLA-DMB expression in the tumor epithelium is associated with increased CTL infiltration and improved prognosis in advanced-stage serous ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 14, 7667-7673.
- Carrasco, D.R., Sukhdeo, K., Protopopova, M., Sinha, R., Enos, M., Carrasco, D.E., Zheng, M., Mani, M., Henderson, J., Pinkus, G.S., *et al.* (2007). The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell* 11, 349-360.
- 15 Caton, M.L., Smith-Raska, M.R., y Reizis, B. (2007). Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8-dendritic cells in the spleen. *J Exp Med* 204, 1653-1664.
- Chen, X., Iliopoulos, D., Zhang, Q., Tang, Q., Greenblatt, M.B., Hatziapostolou, M., Lim, E., Tam, W.L., Ni, M., Chen, Y., *et al.* (2014). XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 alpha pathway. *Nature* 508, 103-107.
- 20 Conejo-Garcia, J.R., Benencia, F., Courreges, M.C., Kang, E., Mohamed-Hadley, A., Buckanovich, R.J., Holtz, D.O., Jenkins, A., Na, H., Zhang, L., *et al.* (2004). Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nat Med* 10, 950-958.
- Conejo-Garcia, J.R., Buckanovich, R.J., Benencia, F., Courreges, M.C., Rubin, S.C., Carroll, R.G., y Coukos, G. (2005). Vascular leukocytes contribute to tumor vascularization. *Blood* 105, 679-681.
- 25 Coussens, L.M., Tinkle, C.L., Hanahan, D., y Werb, Z. (2000). MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103, 481-490.
- Coussens, L.M., y Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860-867.
- Cubillos-Ruiz, J.R., Baird, J.R., Tesone, A.J., Rutkowski, M.R., Scarlett, U.K., Camposeco-Jacobs, A.L., Anadon-Arnillas, J., Harwood, N.M., Korc, M., Fiering, S.N., *et al.* (2012). Reprogramming tumor-associated dendritic cells in vivo using microRNA mimetics triggers protective immunity against ovarian cancer. *Cancer Res* (publicado primero electrónicamente el 3 de febrero).
- 30 Cubillos-Ruiz, J.R., Engle, X., Scarlett, U.K., Martinez, D., Barber, A., Elgueta, R., Wang, L., Nesbeth, Y., Durant, Y., Gewirtz, A.T., *et al.* (2009). Polyethylenimine-based siRNA nanocomplexes reprogram tumor-associated dendritic cells via TLR5 to elicit therapeutic antitumor immunity. *J Clin Invest* 119, 2231-2244.
- Cubillos-Ruiz, J.R., Rutkowski, M., y Conejo-Garcia, J.R. (2010). Blocking ovarian cancer progression by targeting tumor microenvironmental leukocytes. *Cell Cycle* 9, 260-268.
- 35 Curiel, T.J., Wei, S., Dong, H., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Krzysiek, R., Knutson, K.L., Daniel, B., Zimmermann, M.C., *et al.* (2003). Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med* 9, 562-567.
- 40 De Palma, M., Murdoch, C., Venneri, M.A., Naldini, L., y Lewis, C.E. (2007). Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. *Trends Immunol* 28, 519-524.
- Dinulescu, D.M., Ince, T.A., Quade, B.J., Shafer, S.A., Crowley, D., y Jacks, T. (2005). Role of K-ras and Pten in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer. *Nat Med* 11, 63-70.
- 45 Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Robbins, P.F., Yang, J.C., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Sherry, R., Restifo, N.P., Hubicki, A.M., *et al.* (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854.
- Flesken-Nikitin, A., Choi, K.C., Eng, J.P., Shmidt, E.N., y Nikitin, A.Y. (2003). Induction of carcinogenesis by concurrent inactivation of p53 and Rb1 in the mouse ovarian surface epithelium. *Cancer Res* 63, 3459-3463.
- 50 Gomez, B.P., Riggins, R.B., Shajahan, A.N., Klimach, U., Wang, A., Crawford, A.C., Zhu, Y., Zwart, A., Wang, M., y Clarke, R. (2007). Human X-box binding protein-1 confers both estrogen independence and antiestrogen resistance in breast cancer cell lines. *FASEB J* 21, 4013-4027.

- Hamanishi, J., Mandai, M., Iwasaki, M., Okazaki, T., Tanaka, Y., Yamaguchi, K., Higuchi, T., Yagi, H., Takakura, K., Minato, N., *et al.* (2007). Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3360-3365.
- 5 Han, L.Y., Fletcher, M.S., Urbauer, D.L., Mueller, P., Landen, C.N., Kamat, A.A., Lin, Y.G., Merritt, W.M., Spannuth, W.A., Deavers, M.T., *et al.* (2008). HLA class I antigen processing machinery component expression and intratumoral T-Cell infiltrate as independent prognostic markers in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 14, 3372-3379.
- Herber, D.L., Cao, W., Nefedova, Y., Novitskiy, S.V., Nagaraj, S., Tyurin, V.A., Corzo, A., Cho, H.I., Celis, E., Lennox, B., *et al.* (2010). Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Nat Med* 16, 880-886.
- 10 Hetz, C., Chevet, E., y Harding, H.P. (2013). Targeting the unfolded protein response in disease. *Nature reviews Drug discovery* 12, 703-719.
- Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., y Weissman, J.S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol* 186, 323-331.
- Huang da, W., Sherman, B.T., y Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* 4, 44-57.
- 15 Huarte, E., Cubillos-Ruiz, J.R., Nesbeth, Y.C., Scarlett, U.K., Martinez, D.G., Buckanovich, R.J., Benencia, F., Stan, R.V., Keler, T., Sarobe, P., *et al.* (2008). Depletion of dendritic cells delays ovarian cancer progression by boosting antitumor immunity. *Cancer Res* 68, 7684-7691.
- Iwakoshi, N.N., Pypaert, M., y Glimcher, L.H. (2007). The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J Exp Med* 204, 2267-2275.
- 20 Jackson, E.L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R.T., Crowley, D., Montoya, R., Jacks, T., y Tuveson, D.A. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* 15, 3243-3248.
- Jonkers, J., Meuwissen, R., van der Gulden, H., Peterse, H., van der Valk, M., y Bems, A. (2001). Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet* 29, 418-425.
- 25 Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., y Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology* 10, R25.
- Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Anderson, K.C., y Glimcher, L.H. (2003a). Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9946-9951.
- 30 Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., y Glimcher, L.H. (2003b). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 23, 7448-7459.
- Lee, A.H., Scapa, E.F., Cohen, D.E., y Glimcher, L.H. (2008). Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 320, 1492-1496.
- 35 Leen, A.M., Myers, G.D., Sili, U., Huls, M.H., Weiss, H., Leung, K.S., Carrum, G., Krance, R.A., Chang, C.C., Mouldrem, J.J., *et al.* (2006). Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med* 12, 1160-1166.
- Li, B., y Dewey, C.N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics* 12, 323.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., y Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436-444.
- 40 Martinon, F., Chen, X., Lee, A.H., y Glimcher, L.H. (2010). TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat Immunol* 11, 411-418.
- Morgan, R.A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Hughes, M.S., Yang, J.C., Sherry, R.M., Royal, R.E., Topalian, S.L., Kammula, U.S., Restifo, N.P., *et al.* (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314, 126-129.
- 45 Nesbeth, Y., Scarlett, U., Cubillos-Ruiz, J., Martinez, D., Engle, X., Turk, M.J., y Conejo-Garcia, J.R. (2009). CCL5-mediated endogenous antitumor immunity elicited by adoptively transferred lymphocytes and dendritic cell depletion. *Cancer Res* 69, 6331-6338.
- Nesbeth, Y.C., Martinez, D.G., Toraya, S., Scarlett, U.K., Cubillos-Ruiz, J.R., Rutkowski, M.R., y Conejo-Garcia, J.R. (2010). CD4+ T cells elicit host immune responses to MHC class II-negative ovarian cancer through CCL5 secretion and CD40-mediated licensing of dendritic cells. *J Immunol* 184, 5654-5662.

- Piret, J.P., Mottet, D., Raes, M., y Michiels, C. (2002). CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. *Ann N Y Acad Sci* 973, 443-447.
- 5 Ramakrishnan, R., Tyurin, V.A., Veglia, F., Condamine, T., Amoscato, A., Mohammadyani, D., Johnson, J.J., Zhang, L.M., Klein-Seetharaman, J., Celis, E., *et al.* (2014). Oxidized lipids block antigen cross-presentation by dendritic cells in cancer. *J Immunol* 192, 2920-2931.
- Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F., y Glimcher, L.H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412, 300-307.
- 10 Robinson, M.D., y Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNAseq data. *Genome biology* 11, R25.
- Roby, K.F., Taylor, C.C., Sweetwood, J.P., Cheng, Y., Pace, J.L., Tawfik, O., Persons, D.L., Smith, P.G., y Terranova, P.F. (2000). Development of a syngeneic mouse model for events related to ovarian cancer. *Carcinogenesis* 21, 585-591.
- 15 Sato, E., Olson, S.H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A.A., Frosina, D., Gnjatic, S., Ambrosone, C., *et al.* (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 18538-18543.
- Scarlett, U.K., Cubillos-Ruiz, J.R., Nesbeth, Y.C., Martinez, D.G., Engle, X., Gewirtz, A.T., Ahonen, C.L., y Conejo-Garcia, J.R. (2009). In situ stimulation of CD40 and Toll-like receptor 3 transforms ovarian cancer-infiltrating dendritic cells from immunosuppressive to immunostimulatory cells. *Cancer Res* 69, 7329-7337.
- 20 Scarlett, U.K., Rutkowski, M.R., Rauwerdink, A.M., Fields, J., Escovar-Fadul, X., Baird, J., Cubillos-Ruiz, J.R., Jacobs, A.C., Gonzalez, J.L., Weaver, J., *et al.* (2012). Ovarian cancer progression is controlled by phenotypic changes in dendritic cells. *J Exp Med*.
- Singh, S.P., Niemczyk, M., Saini, D., Awasthi, Y.C., Zimniak, L., y Zimniak, P. (2008). Role of the electrophilic lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the development and maintenance of obesity in mice. *Biochemistry* 47, 3900-3911.
- 25 Singh, S.P., Niemczyk, M., Zimniak, L., y Zimniak, P. (2009). Fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* triggered by the electrophilic lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal (4-HNE). *Aging* 1, 68-80.
- So, J.S., Hur, K.Y., Tarrio, M., Ruda, V., Frank-Kamenetsky, M., Fitzgerald, K., Koteliensky, V., Lichtman, A.H., Iwawaki, T., Glimcher, L.H., *et al.* (2012). Silencing of lipid metabolism genes through IRE1 α -mediated mRNA decay lowers plasma lipids in mice. *Cell Metab* 16, 487-499.
- 30 Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., y Brewer, J.W. (2004). XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 167, 35-41.
- Vladykovskaya, E., Sithu, S.D., Habertzettl, P., Wickramasinghe, N.S., Merchant, M.L., Hill, B.G., McCracken, J., Agarwal, A., Dougherty, S., Gordon, S.A., *et al.* (2012). Lipid peroxidation product 4-hydroxy-trans-2-nonenal causes endothelial activation by inducing endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 287, 11398-11409.
- 35 Whiteside, T.L. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 27, 5904-5912.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., y Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881-891.
- 40 Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M.N., *et al.* (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348, 203-213.
- Zou, W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 5, 263-274.
- 45 Meredith, M.M., Liu, K., Darrasse-Jeze, G., Kamphorst, A.O., Schreiber, H.A., Guermonprez, P., Idoyaga, J., Cheong, C., Yao, K.H., Niec, R.E., *et al.* (2012). Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. *J Exp Med* 209, 1153-1165.
- Piret, J.P., Mottet, D., Raes, M., y Michiels, C. (2002). CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. *Ann N Y Acad Sci* 973, 443-447.
- 50 Satpathy, A.T., Kc, W., Albring, J.C., Edelson, B.T., Kretzer, N.M., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., y Murphy, K.M.

(2012). Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J Exp Med* 209, 1135-1152.

Schraml, B.U., van Blijswijk, J., Zelenay, S., Whitney, P.G., Filby, A., Acton, S.E., Rogers, N.C., Moncaut, N., Carvajal, J.J., y Reis e Sousa, C. (2013). Genetic tracing via DNGR-1 expression history defines dendritic cells as a hematopoietic lineage. *Cell* 154, 843-858.

5

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor para su uso en la potenciación o inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral en un sujeto, en el que el inhibidor es un inhibidor directo de XBP1 o IRE-1 α , o un agente que inhibe la generación de XBP1 o IRE-1 α funcional.
- 5 2. Inhibidor, en el que el inhibidor es un inhibidor directo de XBP1 o un agente que inhibe la generación de XBP1 funcional, y en el que el inhibidor selecciona como diana células dendríticas asociadas a tumor (tDC), para su uso en el tratamiento o la reducción de la progresión del cáncer de ovario en un sujeto.
3. Inhibidor para su uso en la potenciación o inducción de la respuesta inmunitaria de células dendríticas asociadas a cáncer en un sujeto, en el que el inhibidor es un inhibidor directo de XBP1 o un agente que inhibe la generación de XBP1 funcional.
- 10 4. Inhibidor para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que el sujeto tiene cáncer de ovario.
5. Inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el inhibidor es el agente que inhibe la generación de XBP1 funcional y se selecciona del grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico que es antisentido con respecto a una molécula de ácido nucleico que codifica para XBP1, un ARNhc de XBP1 y un ARNip de XBP1, un microARN que selecciona como diana XBP1, un ARNip de XBP1 encapsulado en nanopartículas, o un ARNip específico de XBP1 encapsulado en nanopartículas; o en el que el inhibidor es un inhibidor directo de XBP1 y se selecciona del grupo que consiste en una molécula de XBP1 negativa dominante y un anticuerpo específico para XBP1.
- 15 6. Inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en el que el agente que inhibe la generación de XBP1 funcional es un agente que inhibe la generación de IRE-1 α funcional, preferiblemente en el que el inhibidor de IRE-1 α es un ARNhc de IRE-1 α o un ARNip de IRE-1 α .
7. Inhibidor para su uso según la reivindicación 6, en el que el agente que inhibe la generación de IRE1 α funcional es un ARNip específico para IRE-1 α encapsulado en nanopartículas.
- 20 8. Inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el inhibidor es el inhibidor directo de XBP1 o el agente que inhibe la generación de XBP1 funcional, y en el que el inhibidor se administra por vía sistémica o en ubicaciones tumorales en el sujeto, preferiblemente en el que el tumor es un cáncer de ovario.
9. Inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3, en el que el inhibidor es el inhibidor directo de XBP1 o el agente que inhibe la generación de XBP1 funcional, y en el que el inhibidor selecciona como diana células dendríticas asociadas a tumor (tDC).
- 30 10. Inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el inhibidor es el inhibidor directo de XBP1 o el agente que inhibe la generación de XBP1 funcional, y en el que el inhibidor se administra en combinación con un segundo agente terapéutico contra el cáncer, preferiblemente en el que el inhibidor de XBP1 se administra en combinación con un agente quimioterápico.
- 35 11. Inhibidor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el tratamiento induce la supervivencia prolongada del sujeto.
12. Inhibidor para su uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor es el agente que inhibe la generación de IRE-1 α funcional y se selecciona del grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico que es antisentido con respecto a una molécula de ácido nucleico que codifica para IRE-1 α , un ARNhc de IRE-1 α y un ARNip de IRE-1 α , un microARN que selecciona como diana IRE-1 α , un ARNip de IRE-1 α encapsulado en nanopartículas; o en el que el inhibidor es el inhibidor directo de IRE-1 α y se selecciona de una molécula de IRE-1 α negativa dominante y un anticuerpo específico para IRE-1 α .
- 40 13. Inhibidor para su uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor es el agente que inhibe la generación de IRE-1 α funcional.
14. Inhibidor para su uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor es el inhibidor directo de IRE-1 α o el agente que inhibe la generación de IRE-1 α funcional, en el que el inhibidor se administra por vía sistémica o en ubicaciones tumorales en el sujeto, preferiblemente en el que el tumor es un cáncer de ovario.
15. Inhibidor para su uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor es el inhibidor directo de IRE-1 α o el agente que inhibe la generación de IRE-1 α funcional, y en el que el inhibidor selecciona como diana células dendríticas asociadas a tumor (tDC).
- 50 16. Inhibidor para su uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor es el inhibidor directo de IRE-1 α o el

agente que inhibe la generación de IRE-1 α funcional, y en el que el inhibidor se administra en combinación con un segundo agente terapéutico contra el cáncer, preferiblemente en el que el inhibidor se administra en combinación con un agente quimioterápico.

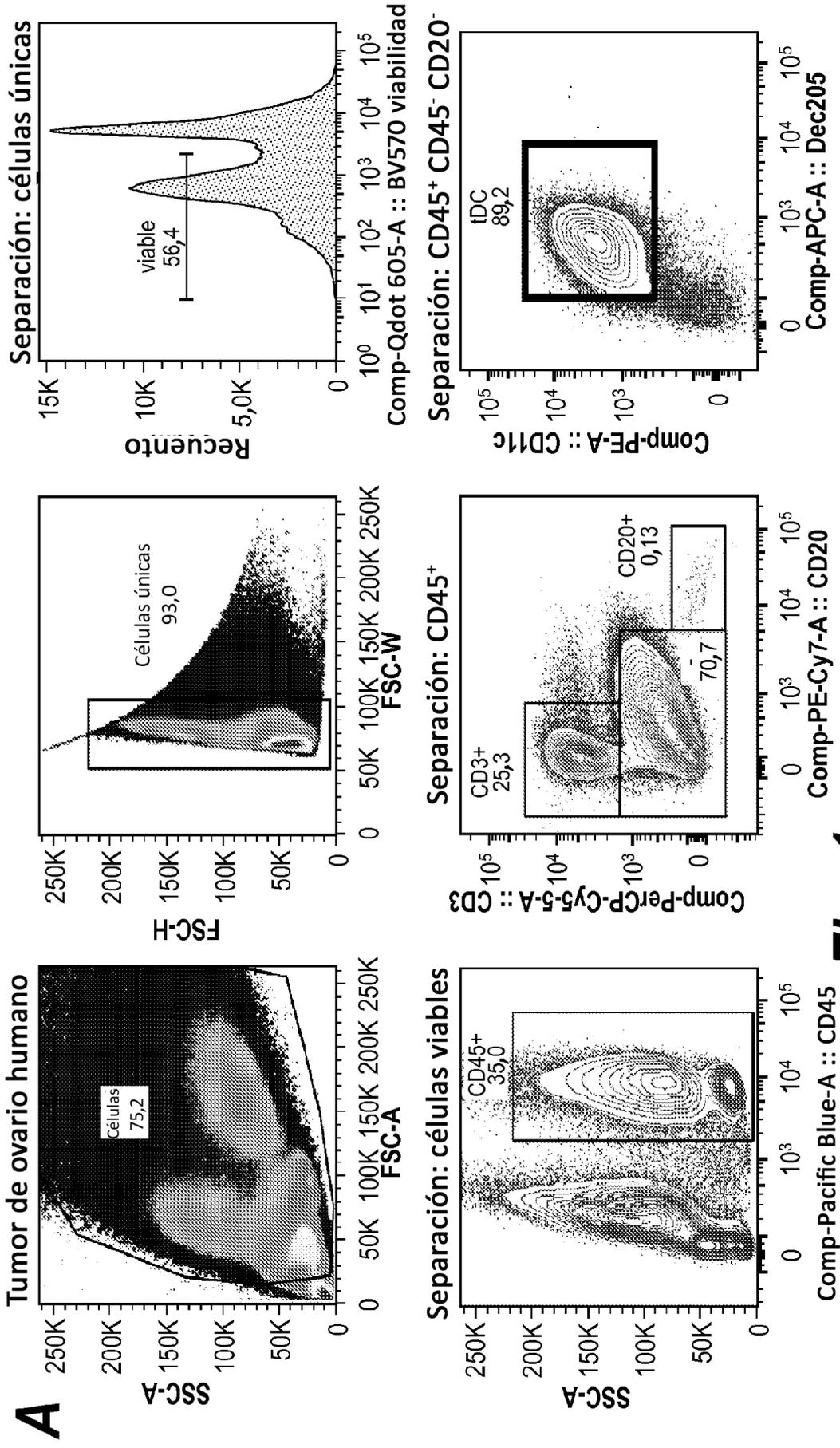


Fig. 1

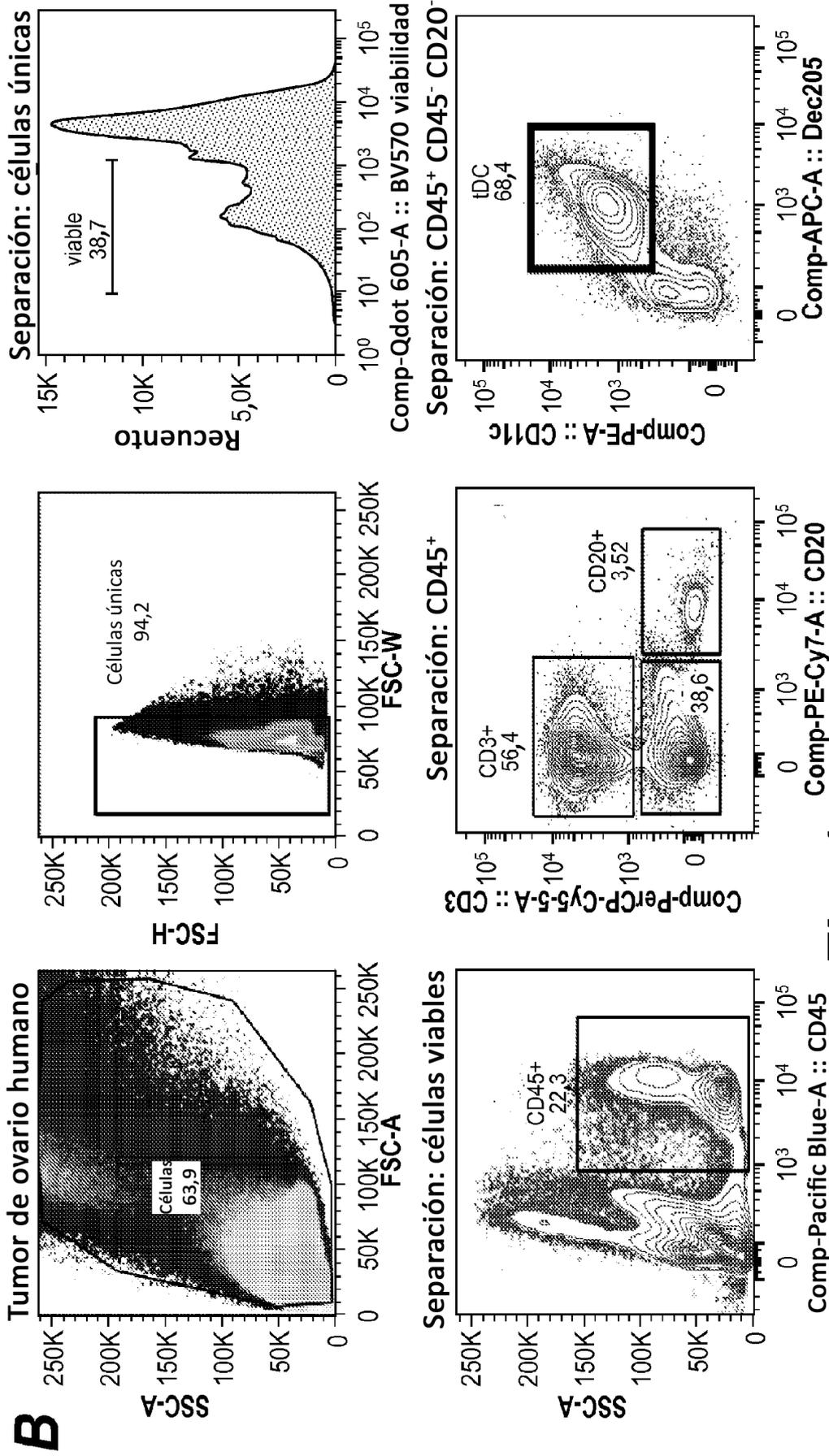
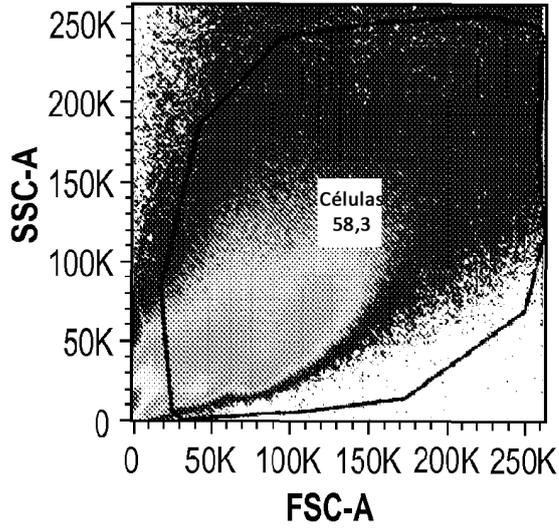


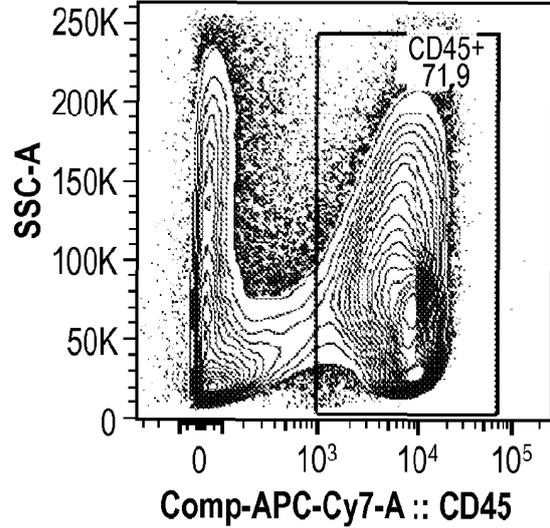
Fig. 1

C

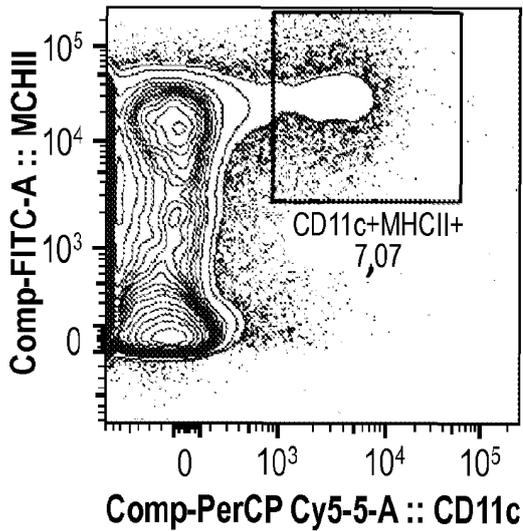
p53/K-ras de ratones
que portan
tumores de ovario



Separación: células
únicas viables



Separación: CD45+



Separación: CD45+
CD11c+ MHC-II+

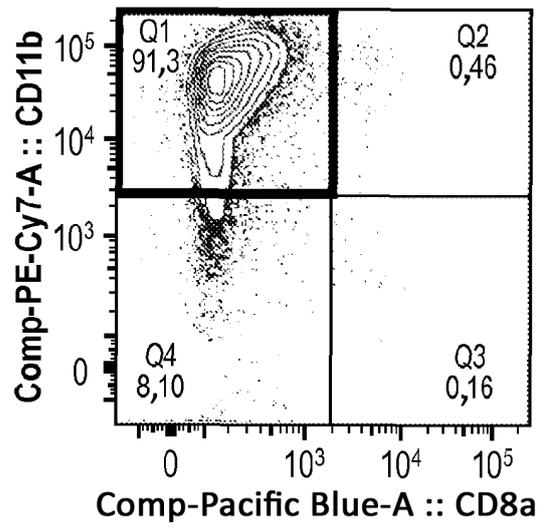


Fig. 1

D

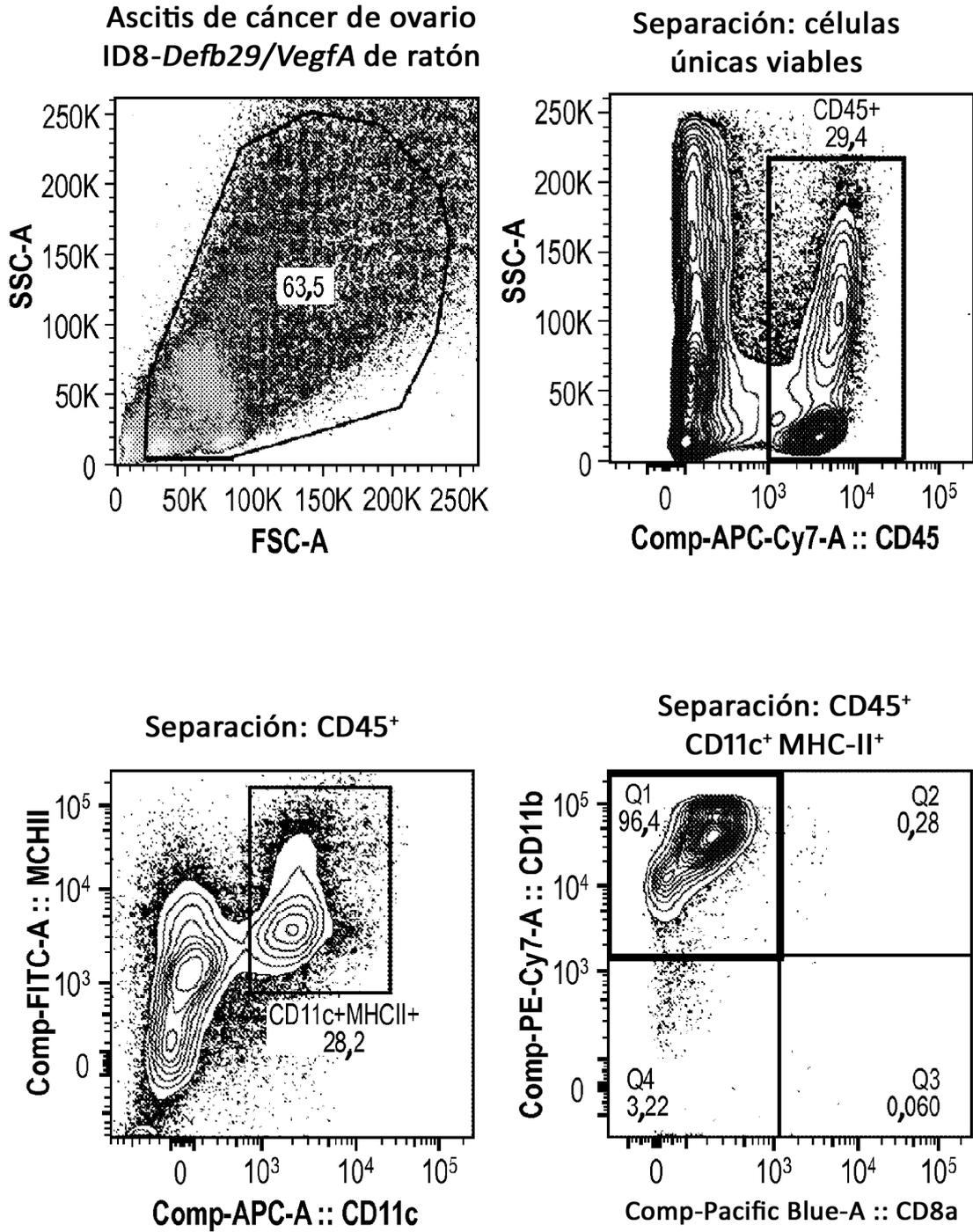


Fig. 1

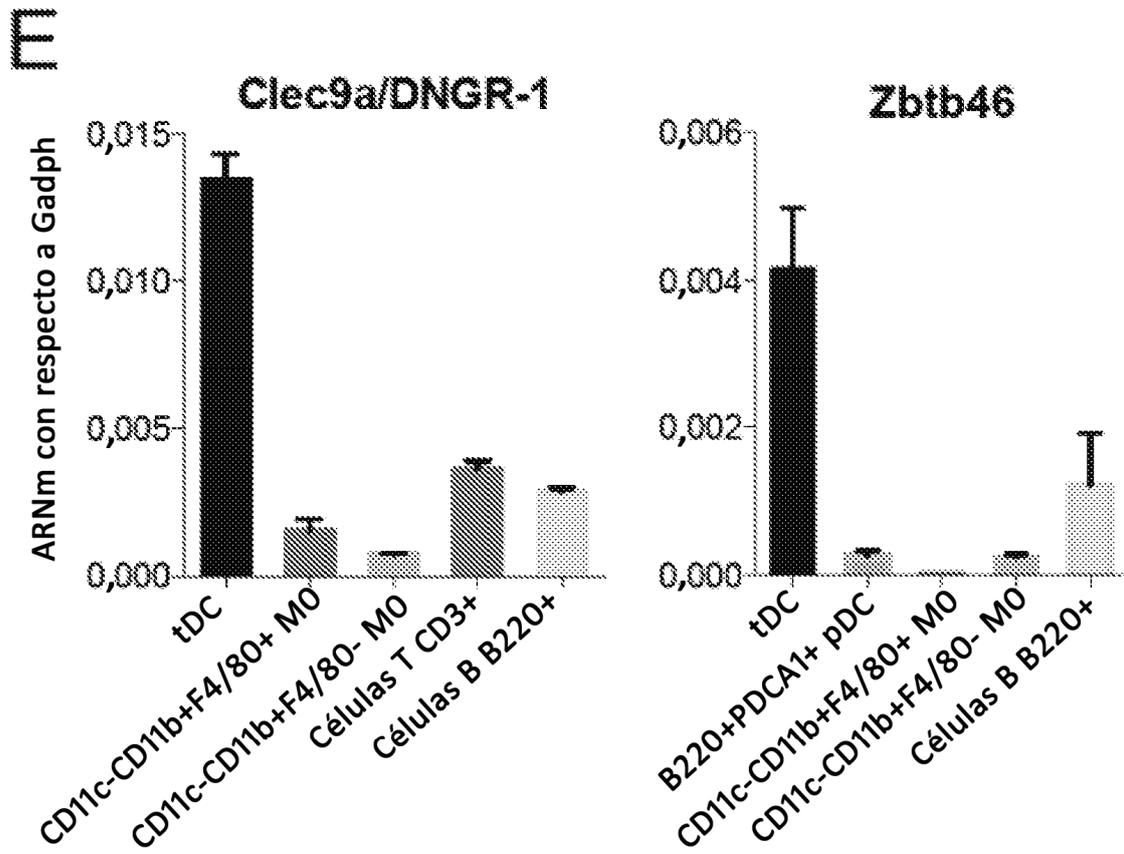


Figura 1

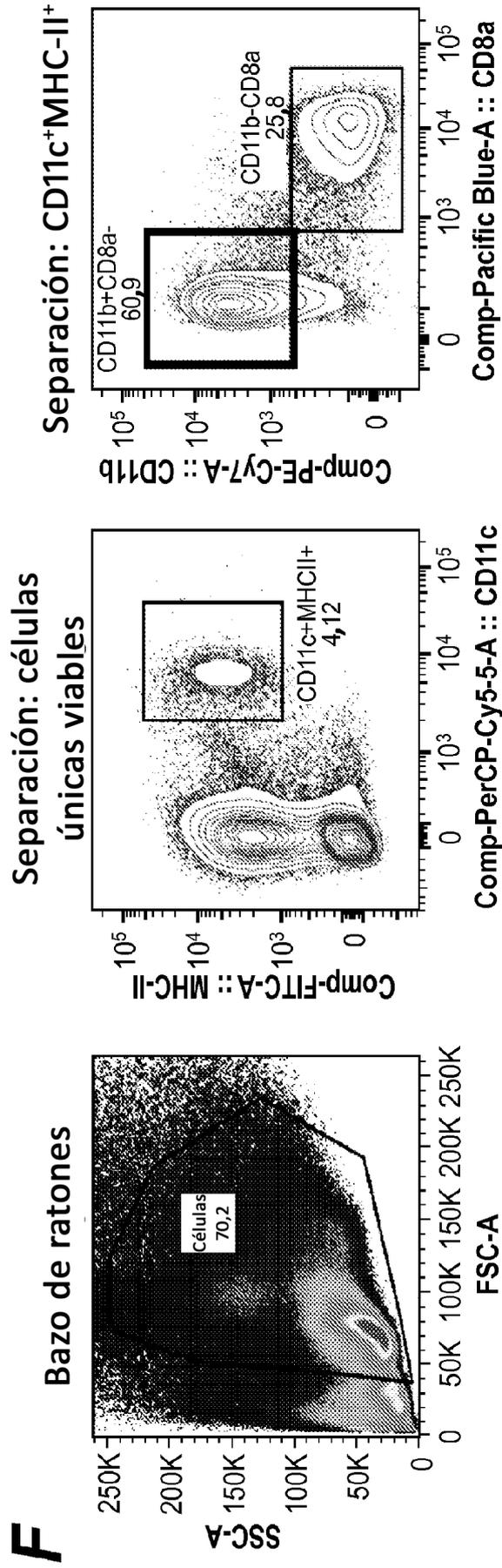
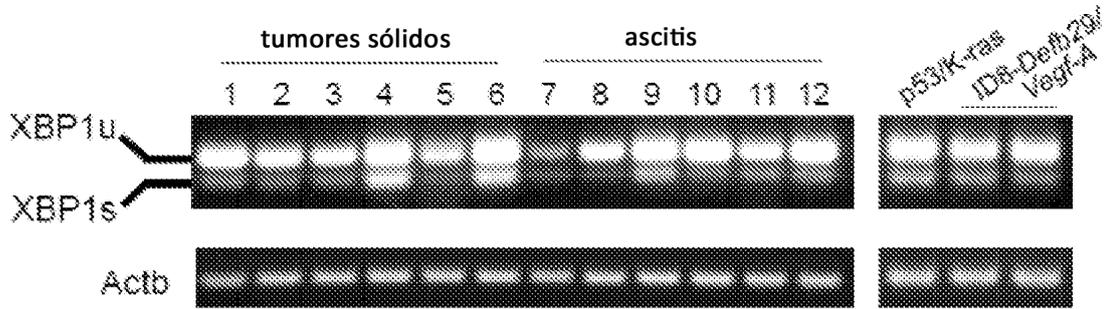
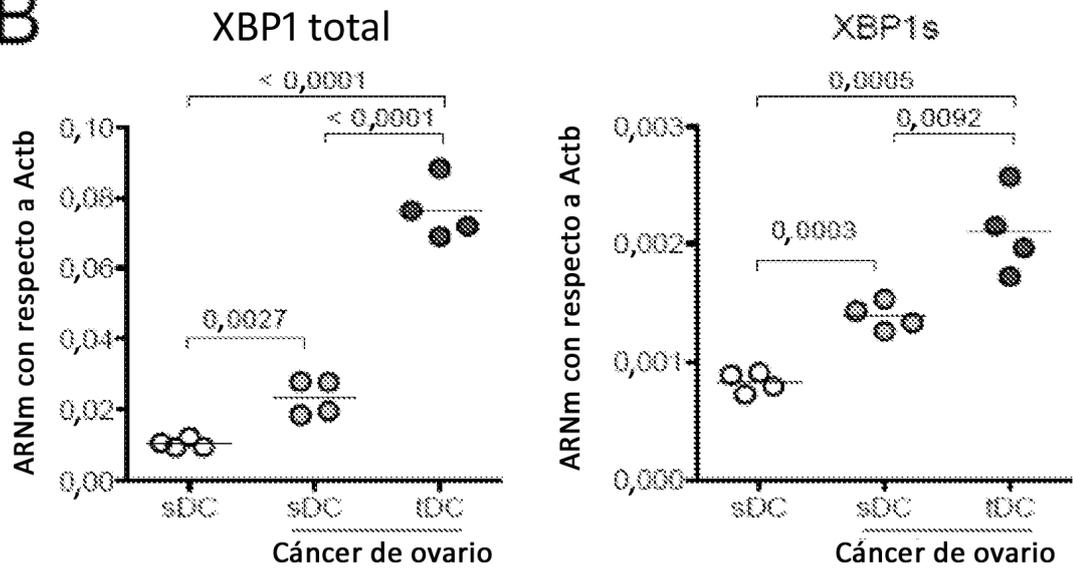


Fig. 1

A



B



C

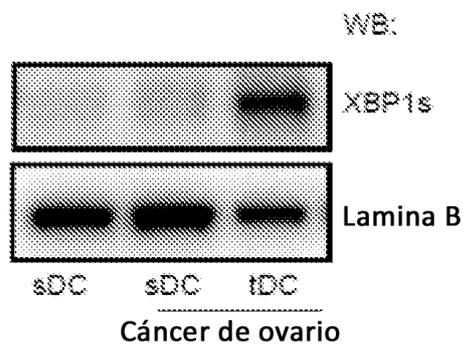


Figura 2

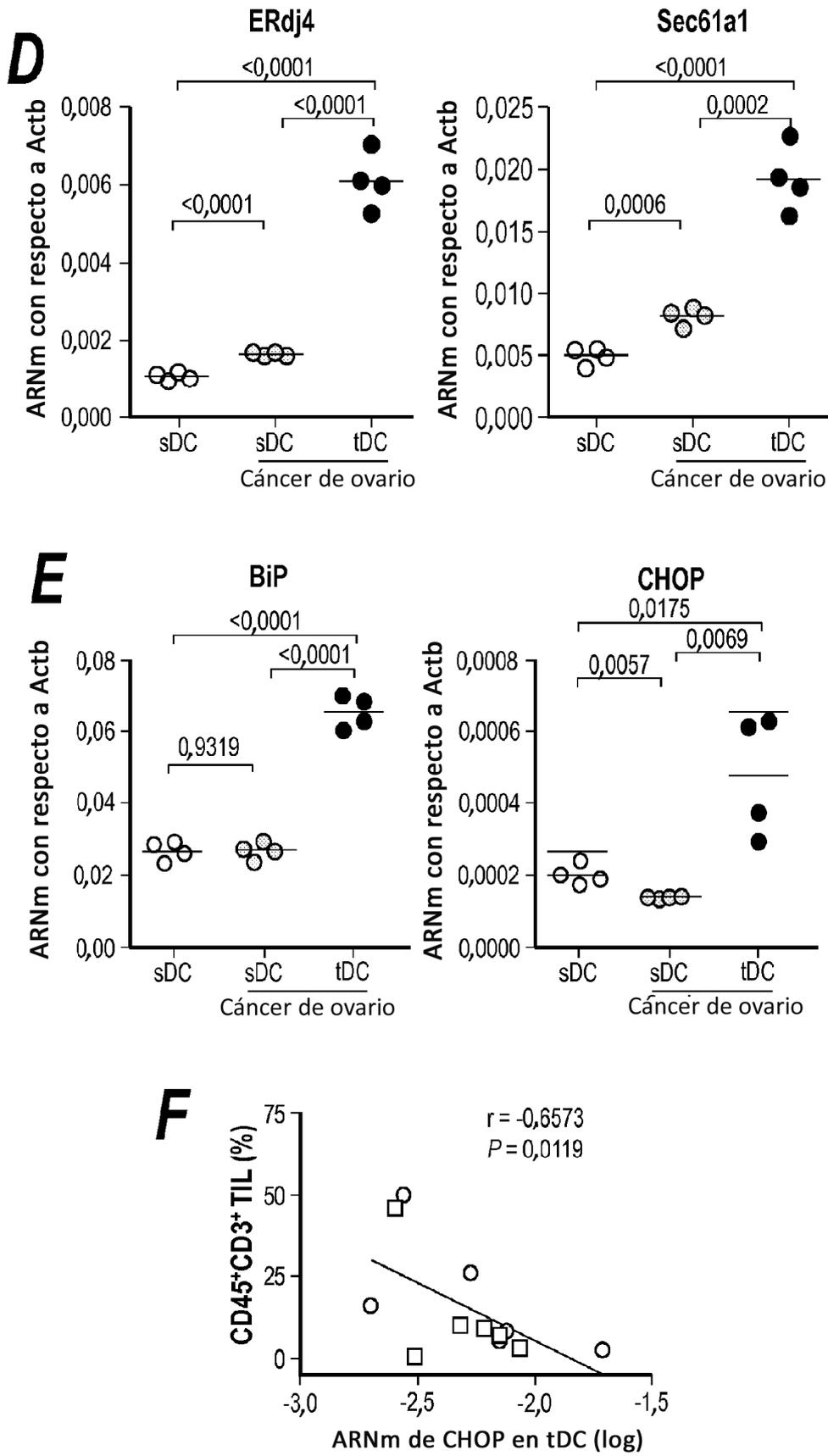


Fig. 2

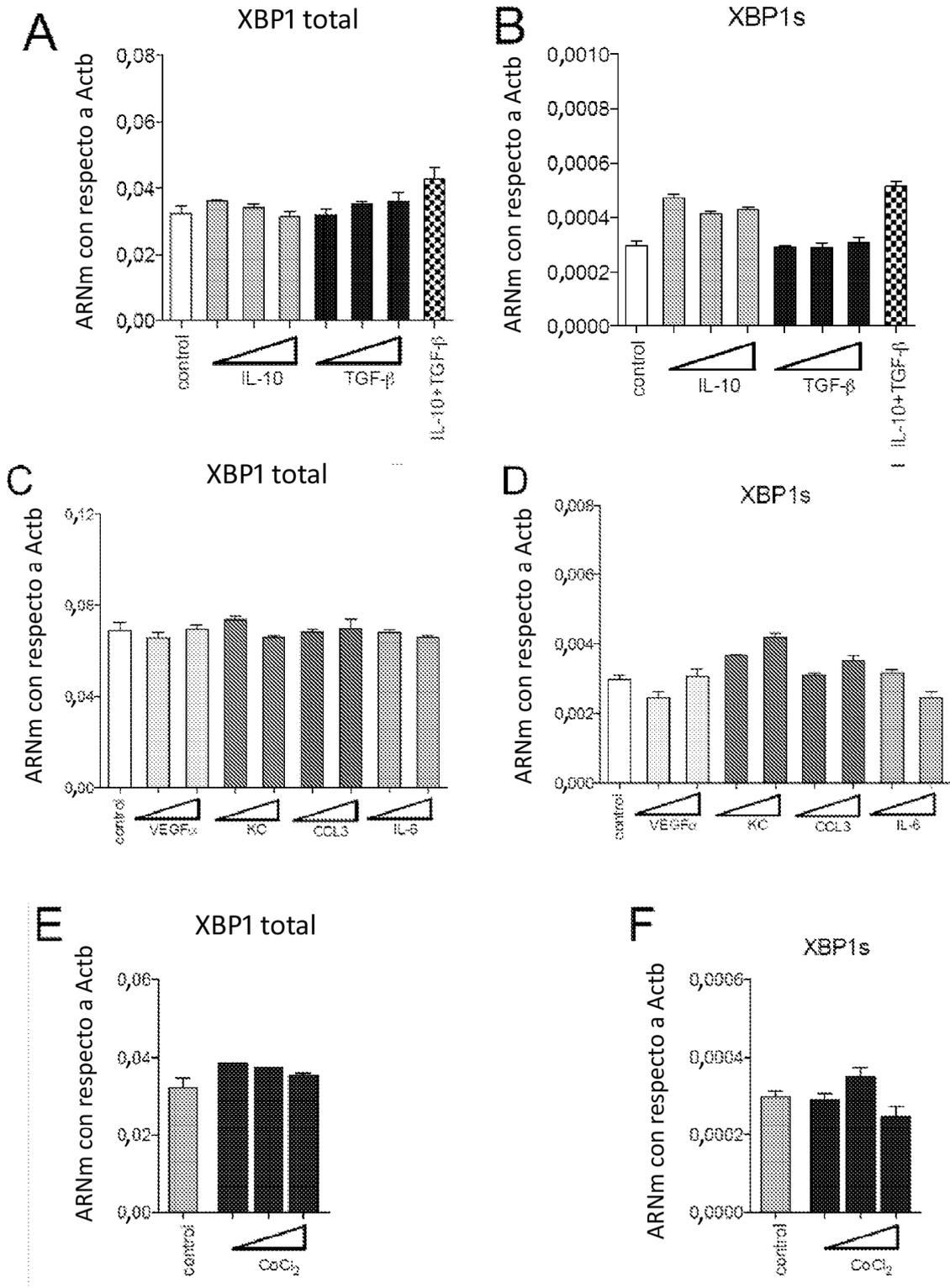


Figura 3

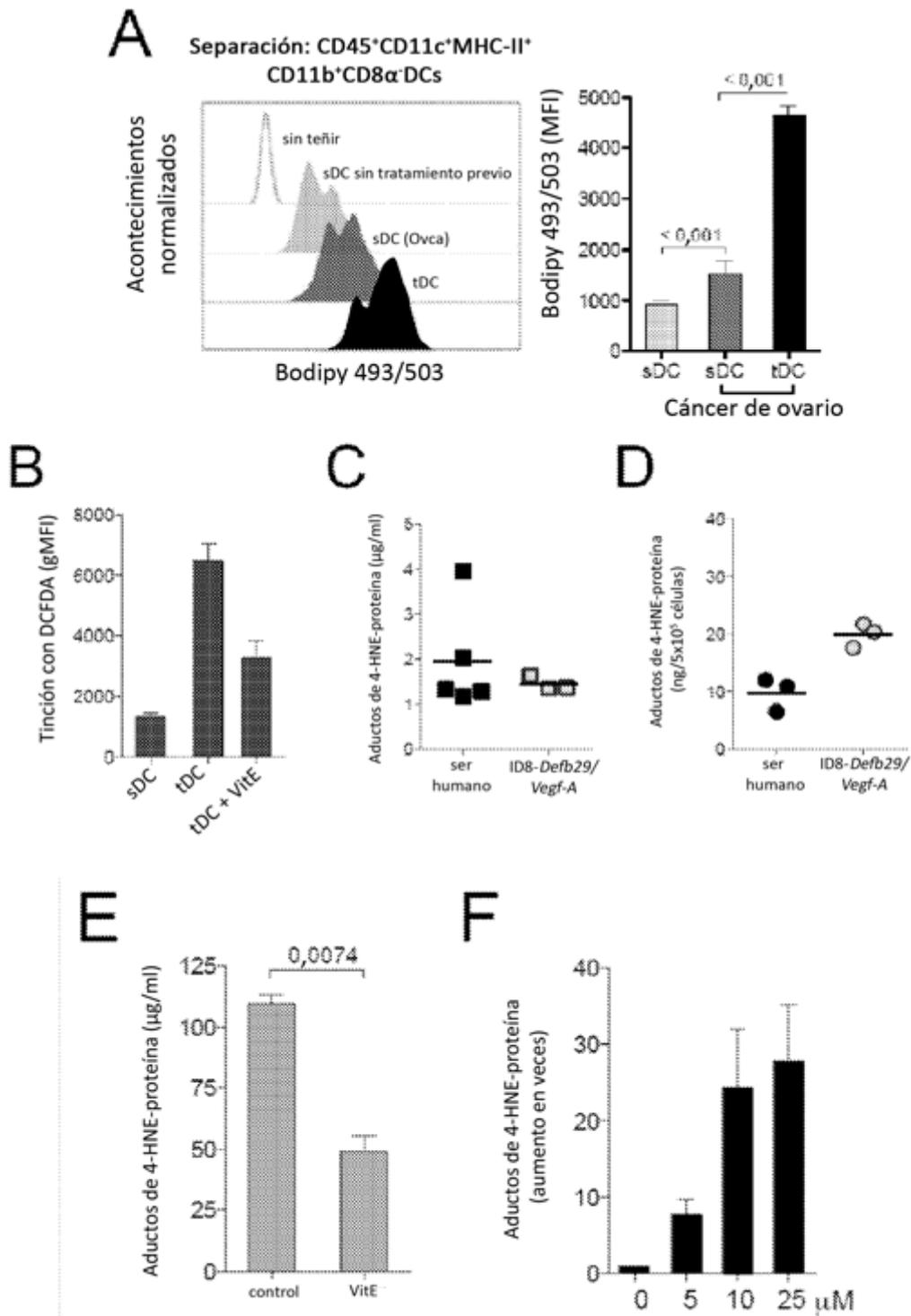


Figura 4

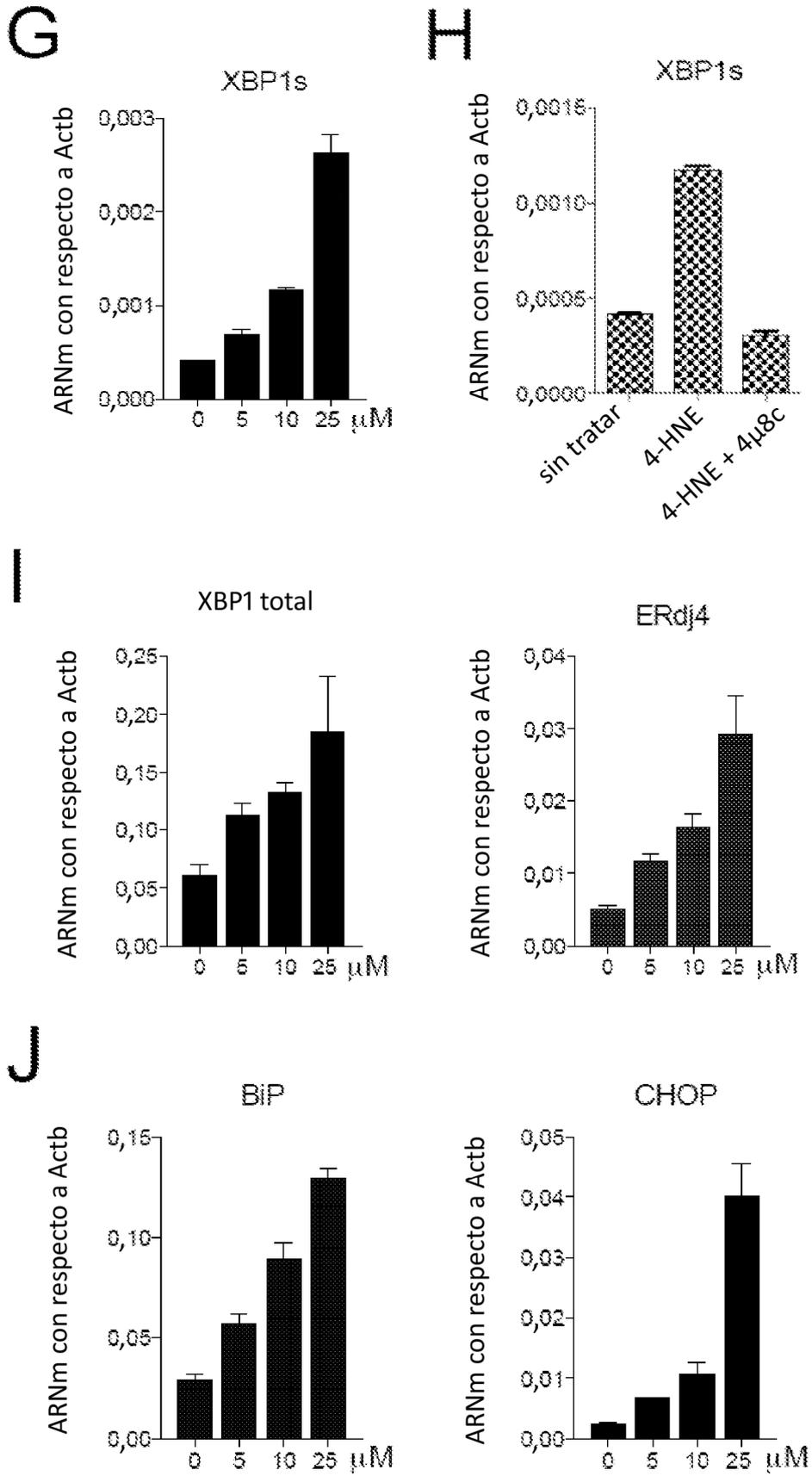


Figura 4

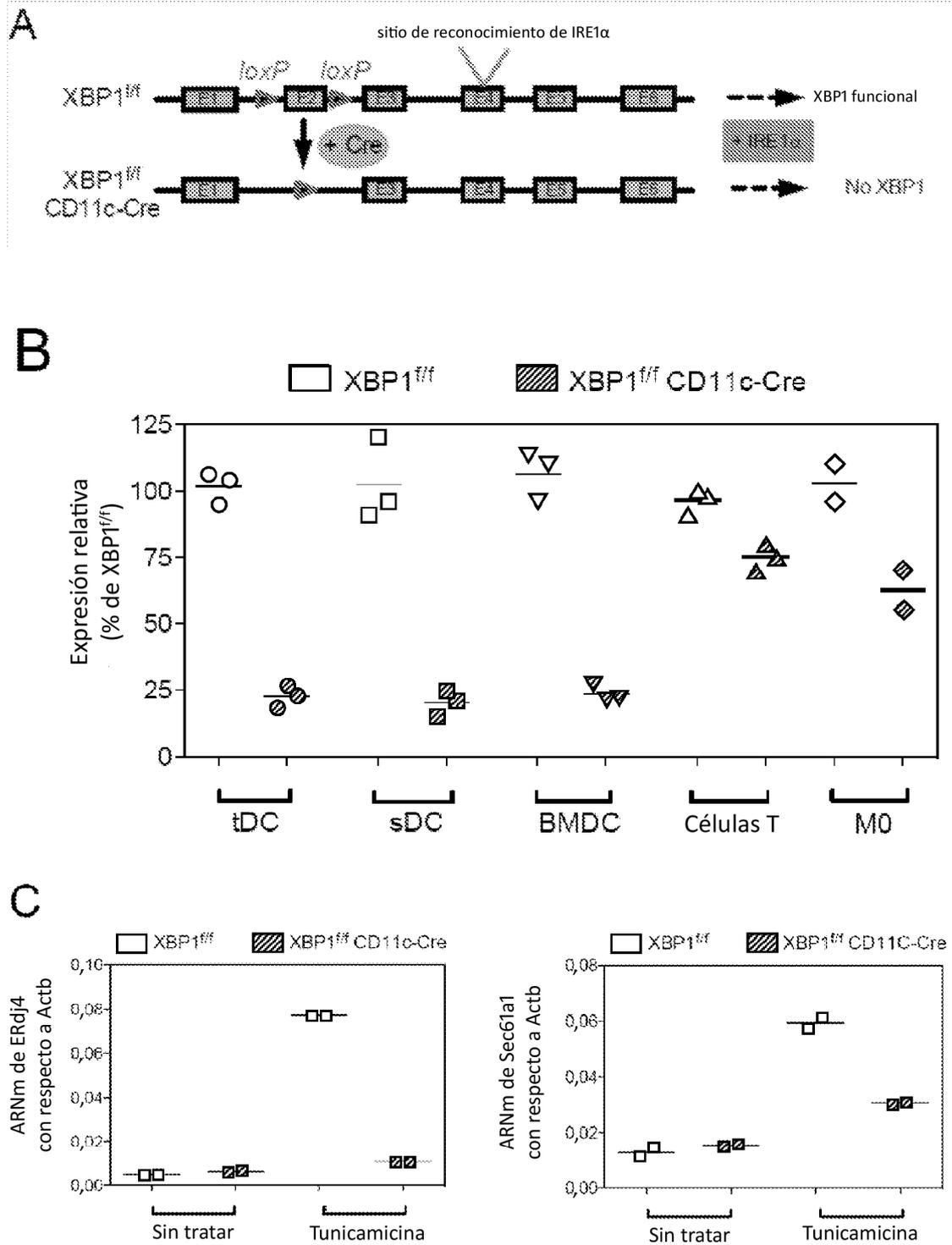


Figura 5

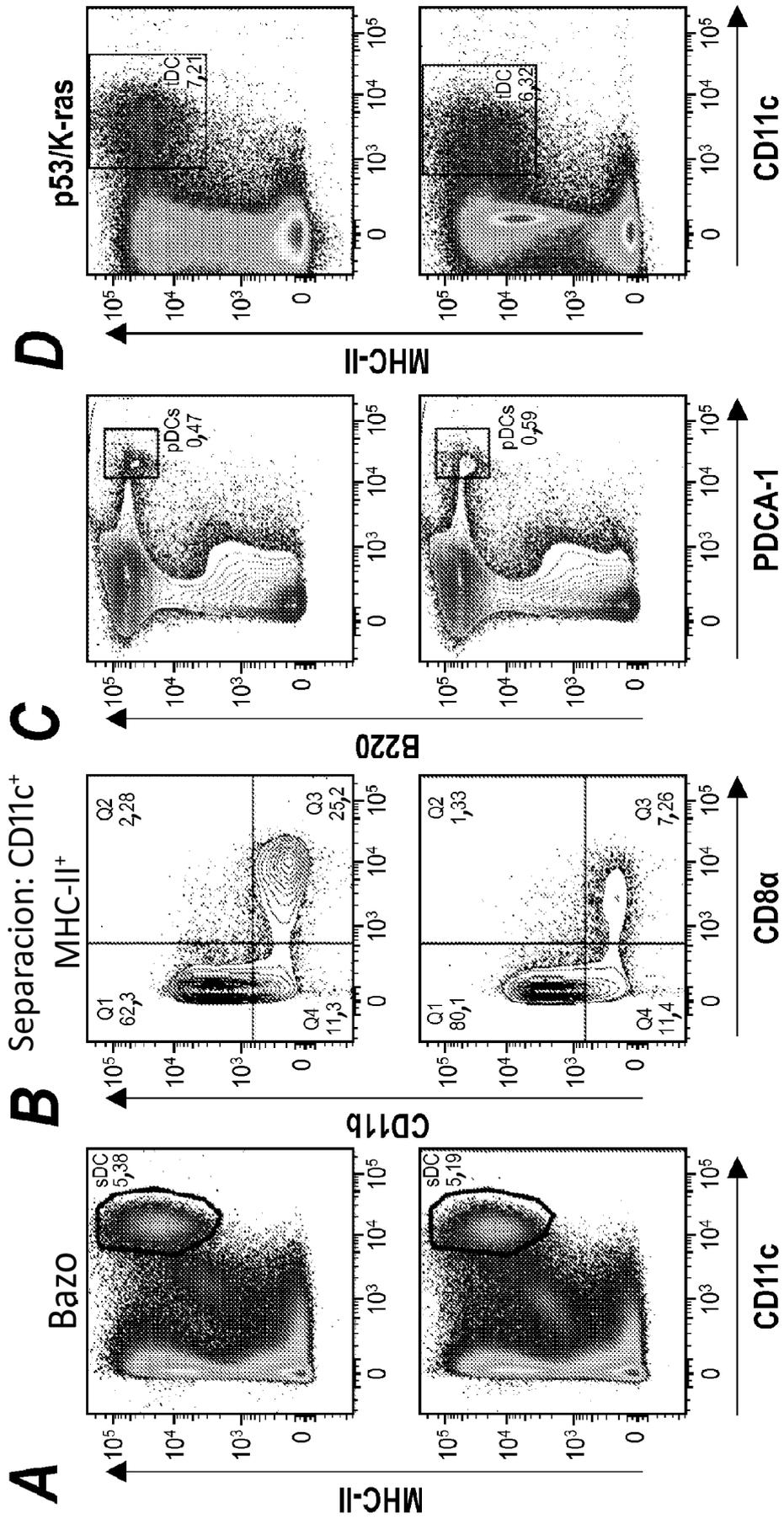


Fig. 6

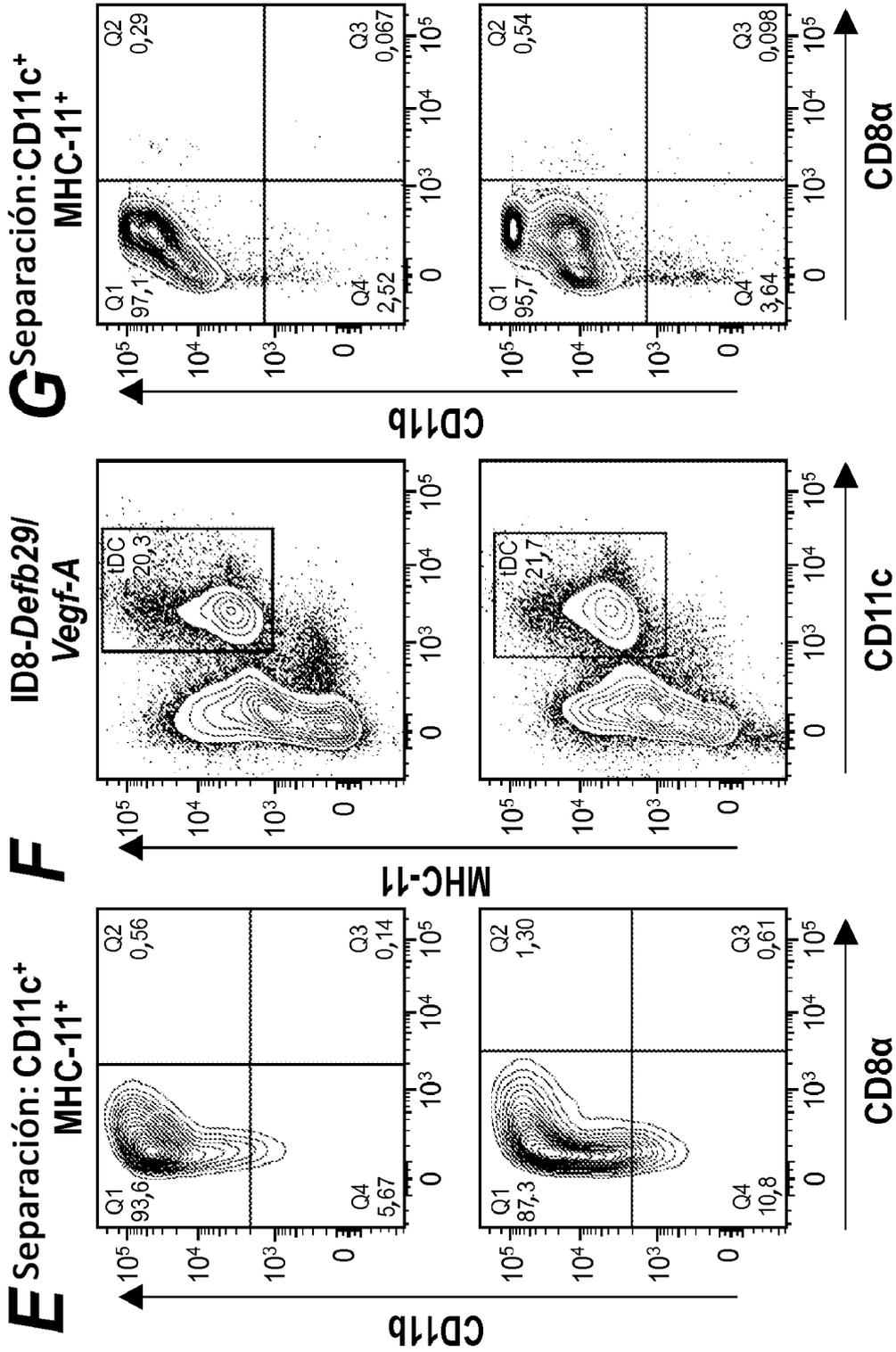


Fig. 6

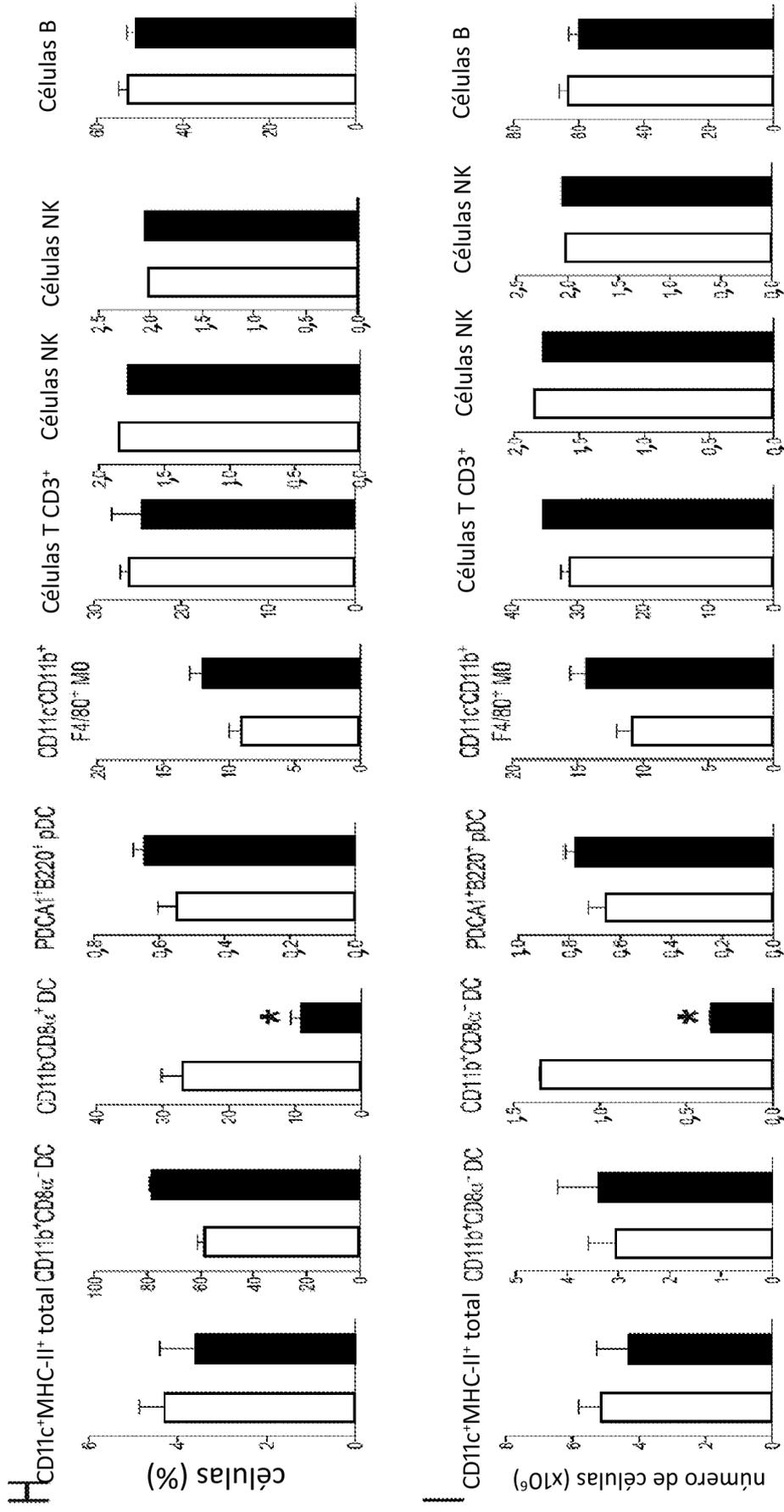
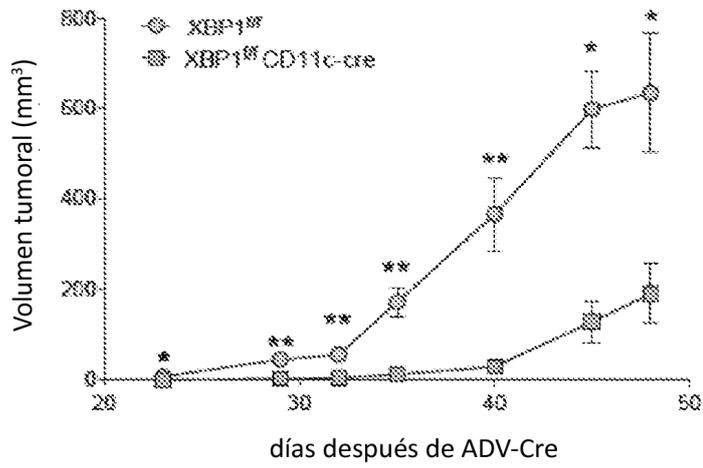


Figura 6

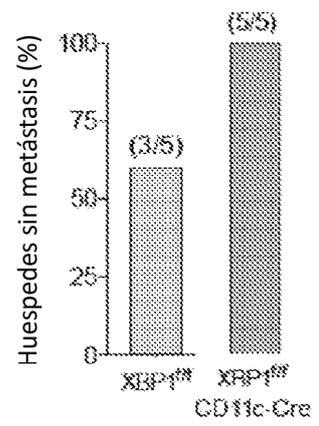
A



B



C



D

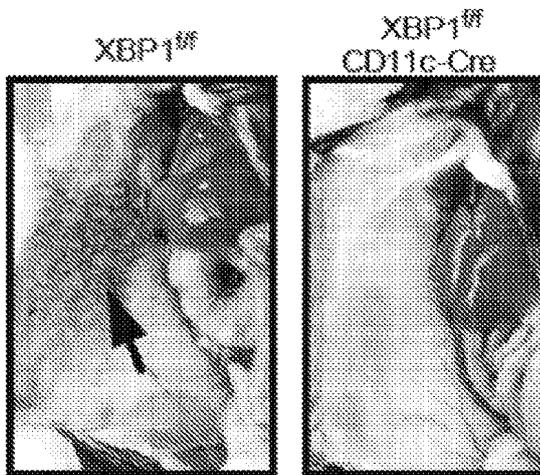


Figura 7

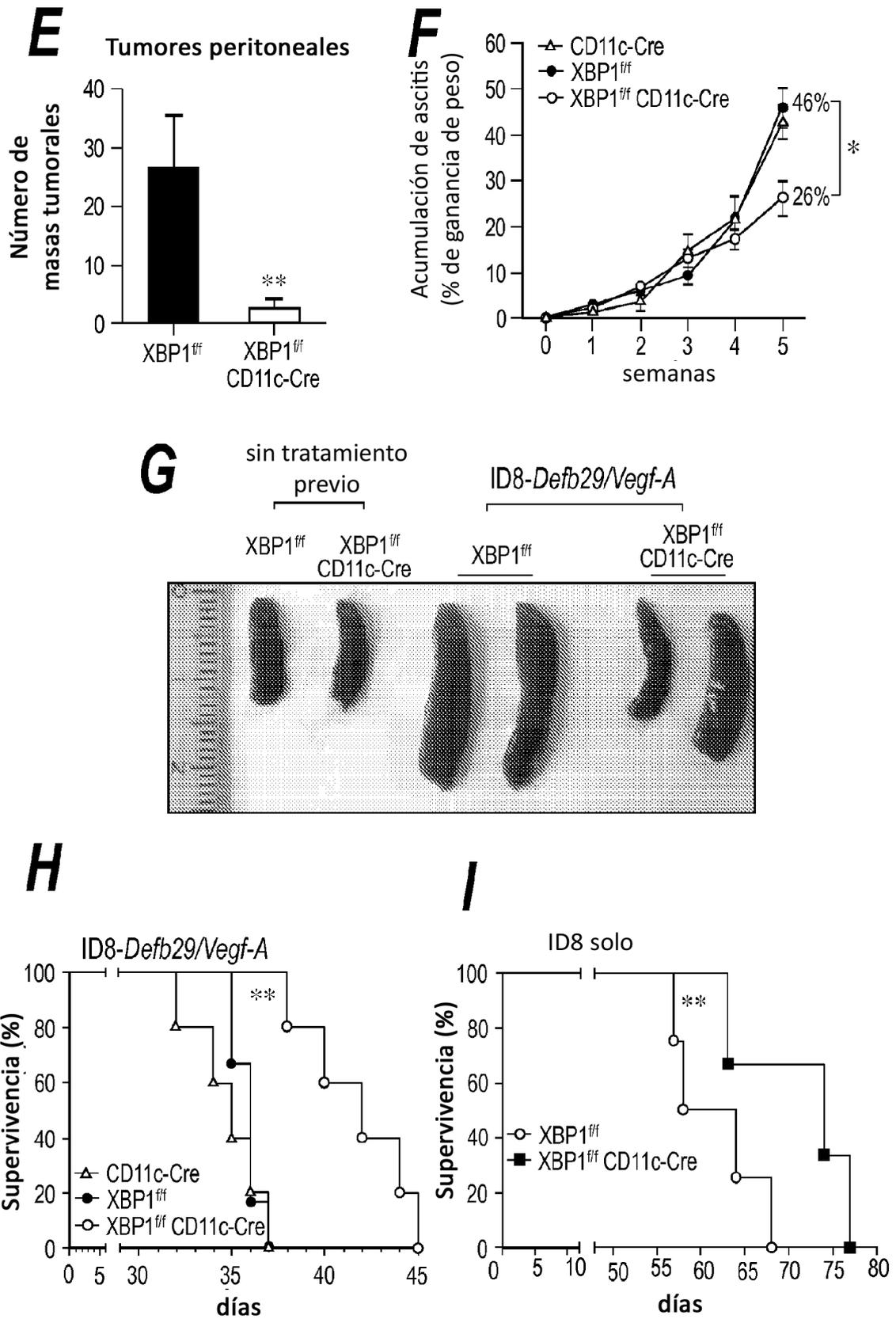


Fig. 7

A

Regulador	Tipo	Veces	Dianas	p	Predicción	Z
XBP1	TF	-1,84	24	1x10 ⁻⁹	Sin inhibición	-3,17
MKL2	TF		15	2x10 ⁻⁹	Sin inhibición	-3,16
TGFB1	GF		95	3x10 ⁻¹³	Sin inhibición	-2,73
SRF	TF		26	2x10 ⁻⁷	Sin inhibición	-2,71
CD38	enzima		18	2x10 ⁻⁷	Sin inhibición	-2,35
MKL1	TF	-1,55	16	7x10 ⁻⁸	Sin inhibición	-2,33
ITK	cinasa	1,80	13	1x10 ⁻⁷	Activada	2,02
NCR1	receptor	2,87	6	7x10 ⁻⁸	Activado	2,22
IL2	citocina		48	1x10 ⁻¹⁴	Activada	2,77

TF=factor de transcripción, GF=factor de crecimiento, Z=predicción de puntuación Z

Figura 8

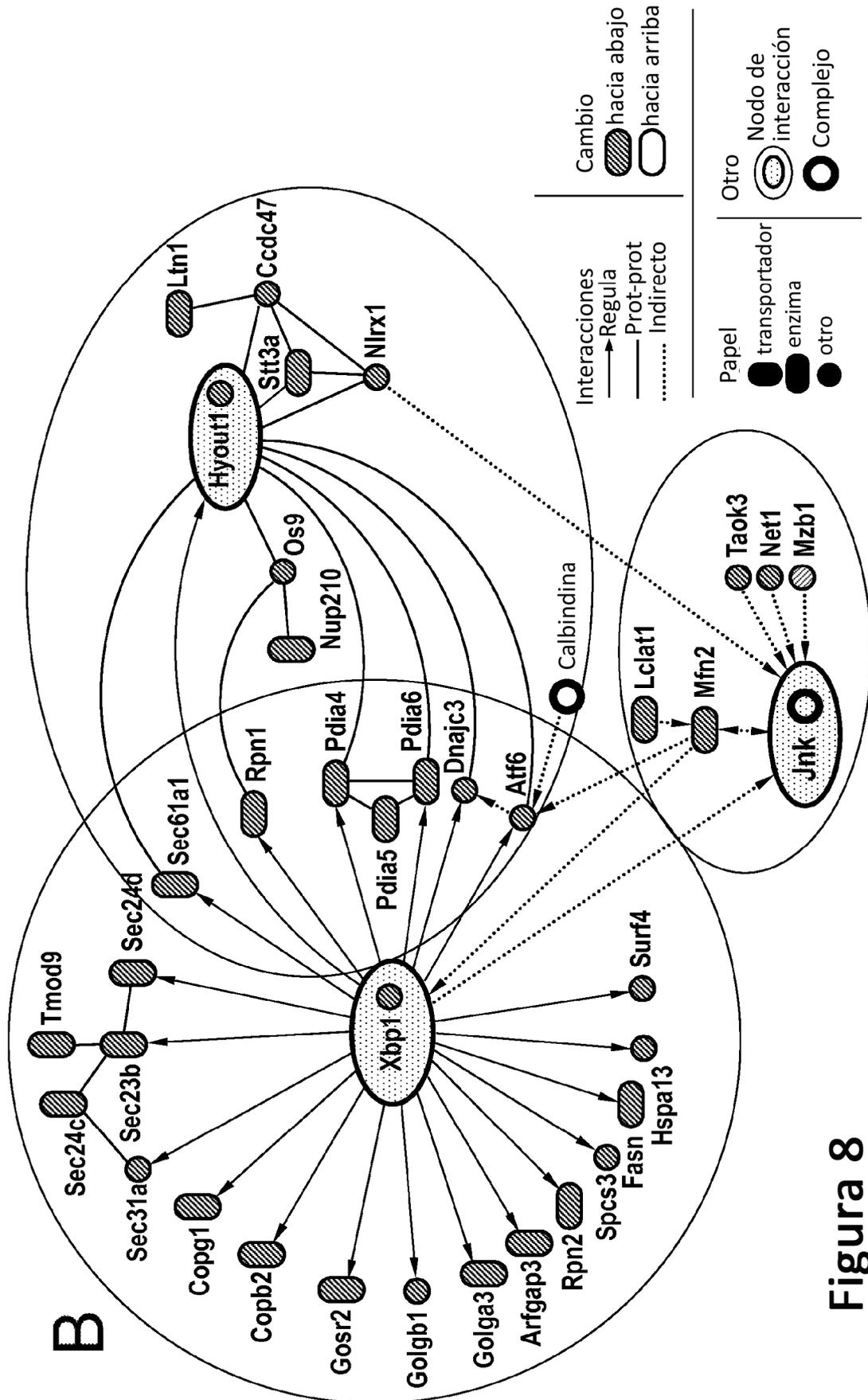


Figura 8

C

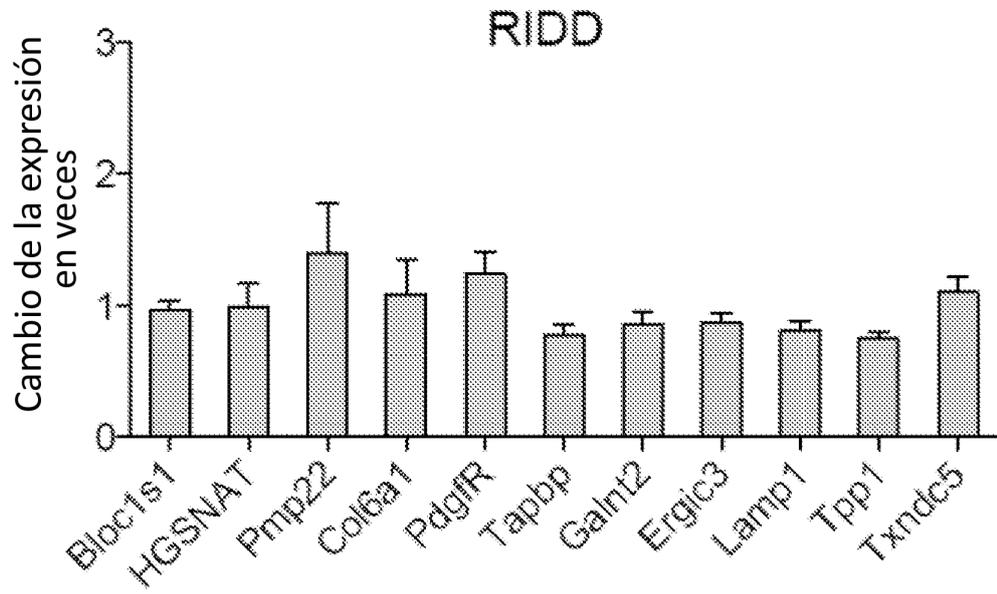


Figura 8

D

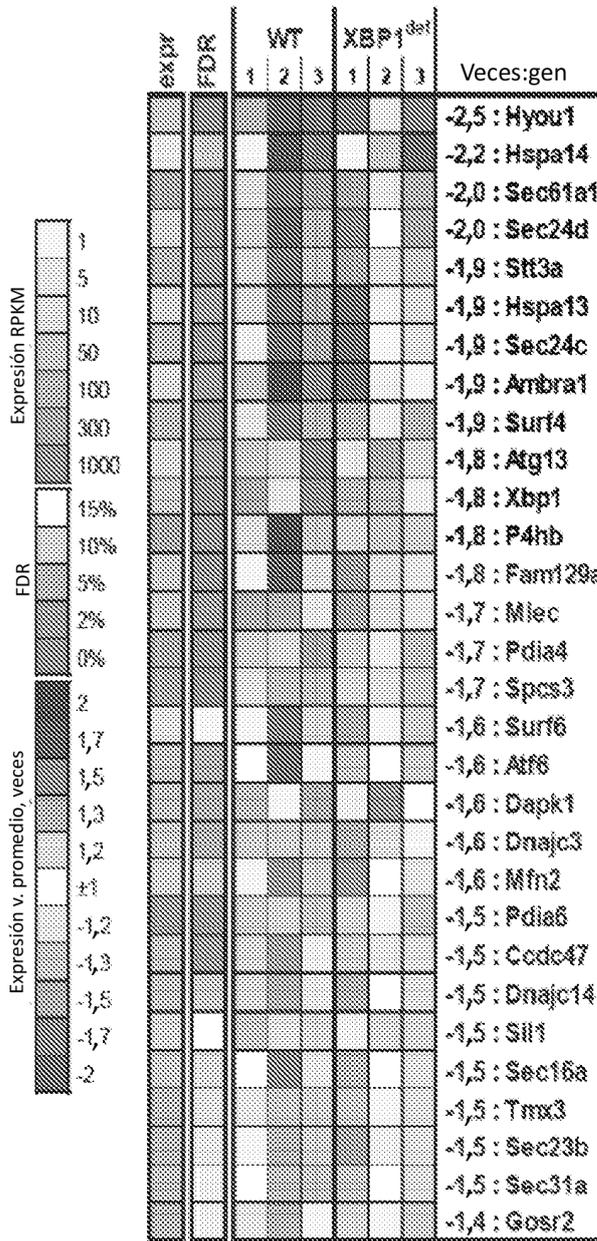
Agrupación funcional	Términos GO	Descripción	Enr	P	FDR	N	%↓
Proceso metabólico de hidratos de carbono	GO:0044262	Proceso metabólico de hidratos de carbono celulares	2,2	0,0006	1%	24	96%
	GO:0005975	Proceso metabólico de hidratos de carbono	1,9	0,0013	2%	29	97%
Localización y transporte de proteínas	GO:0045184	Establecimiento de localización de proteínas	1,7	0,0022	3%	37	78%
	GO:0015031	Transporte de proteínas	1,7	0,0034	5%	36	81%
Regulación de comunicación celular	GO:0008104	Localización de proteínas	1,6	0,0067	9%	39	77%
	GO:0010646	Regulación de comunicación celular	1,6	0,0034	5%	41	68%
Proceso metabólico de lípidos	GO:0006629	Proceso metabólico de lípidos	1,6	0,0094	13%	36	67%

Enr=veces de enriquecimiento, N=número de genes implicados, %↓=% de genes implicados regulados por disminución

Figura 8

A

Estrés por UPR/RE



B

Metabolismo de lípidos

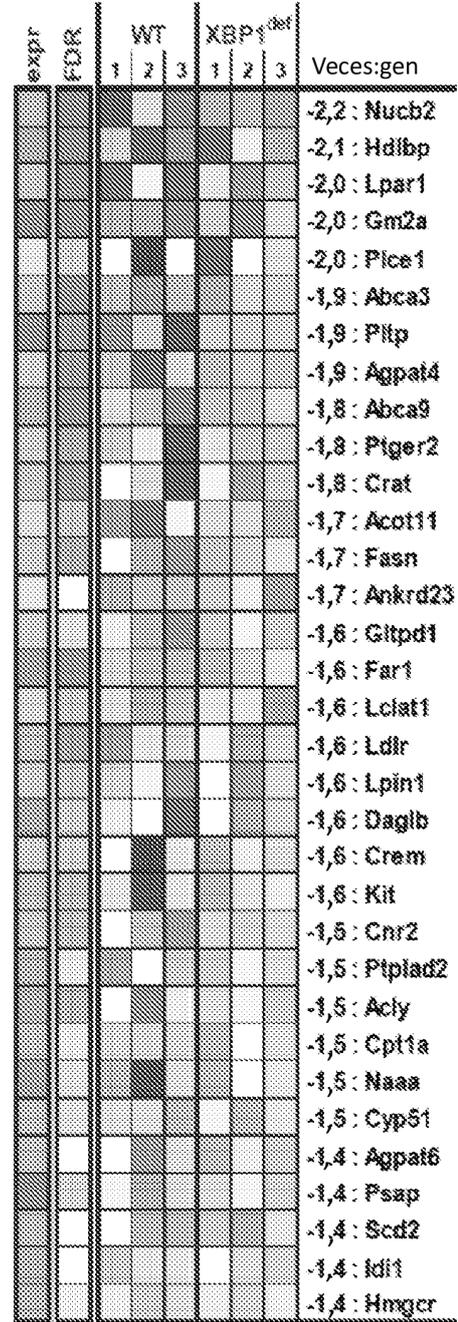


FIGURA 9

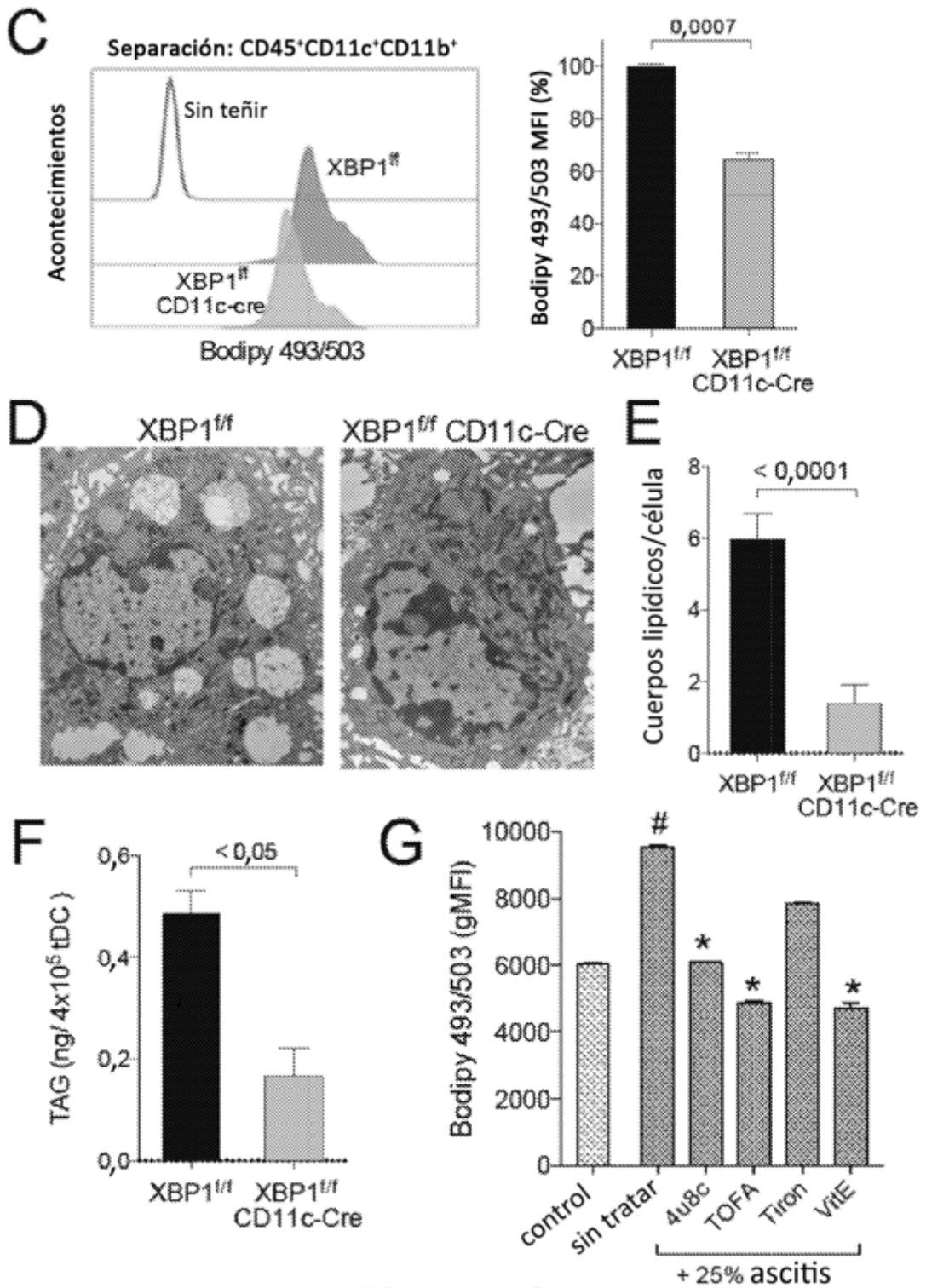


Figura 9

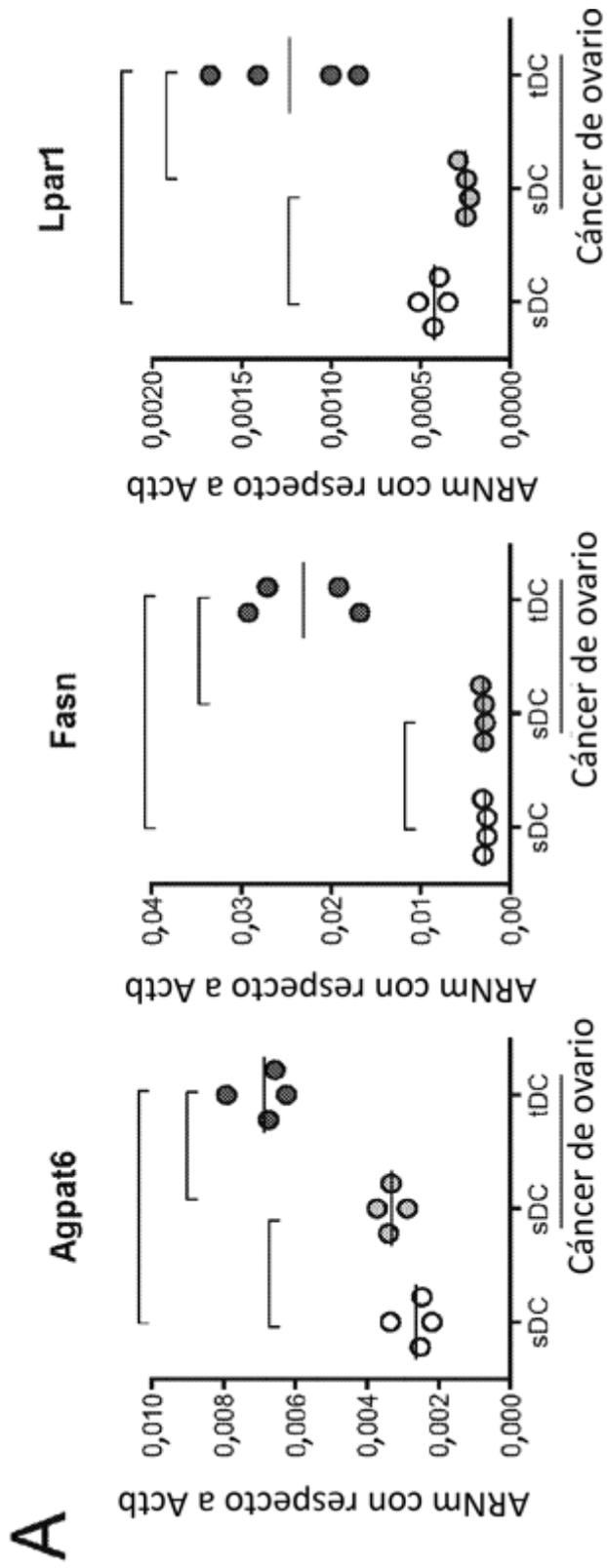


Figura 10

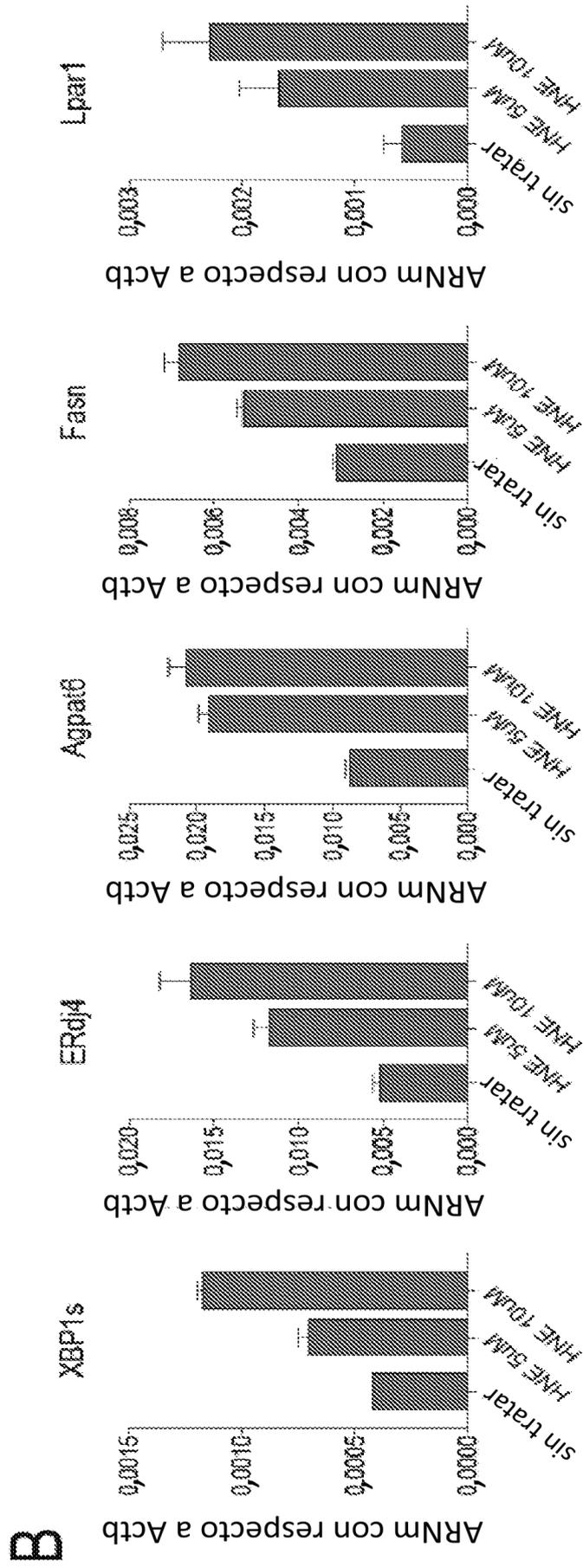


Figura 10

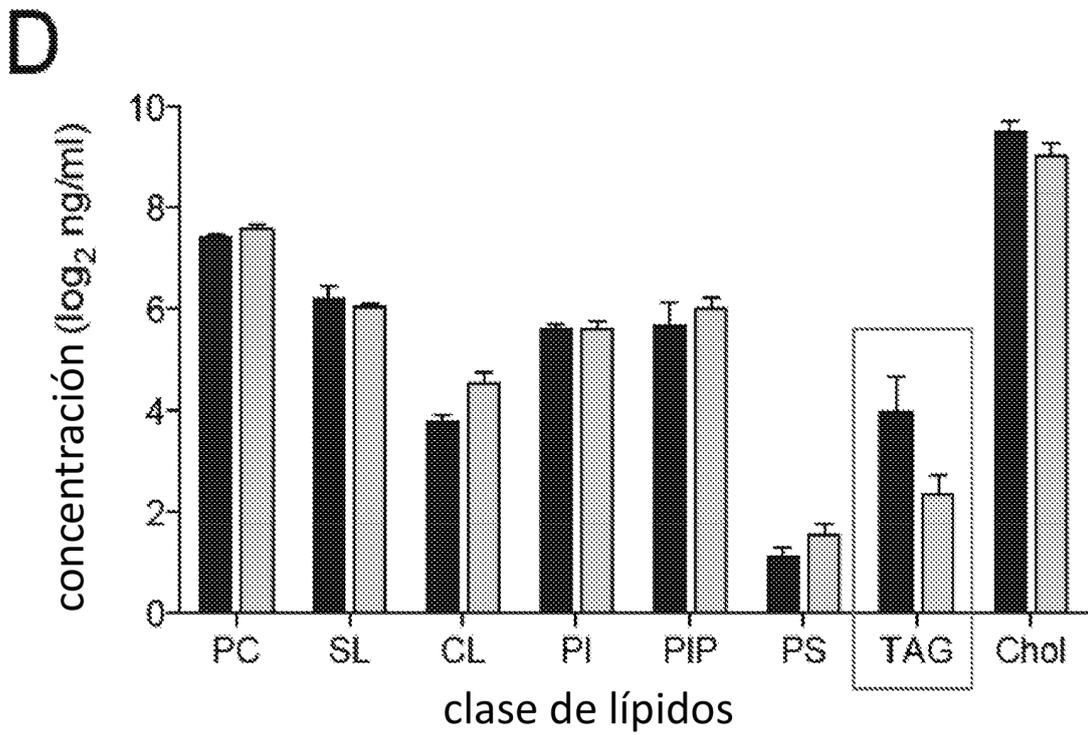
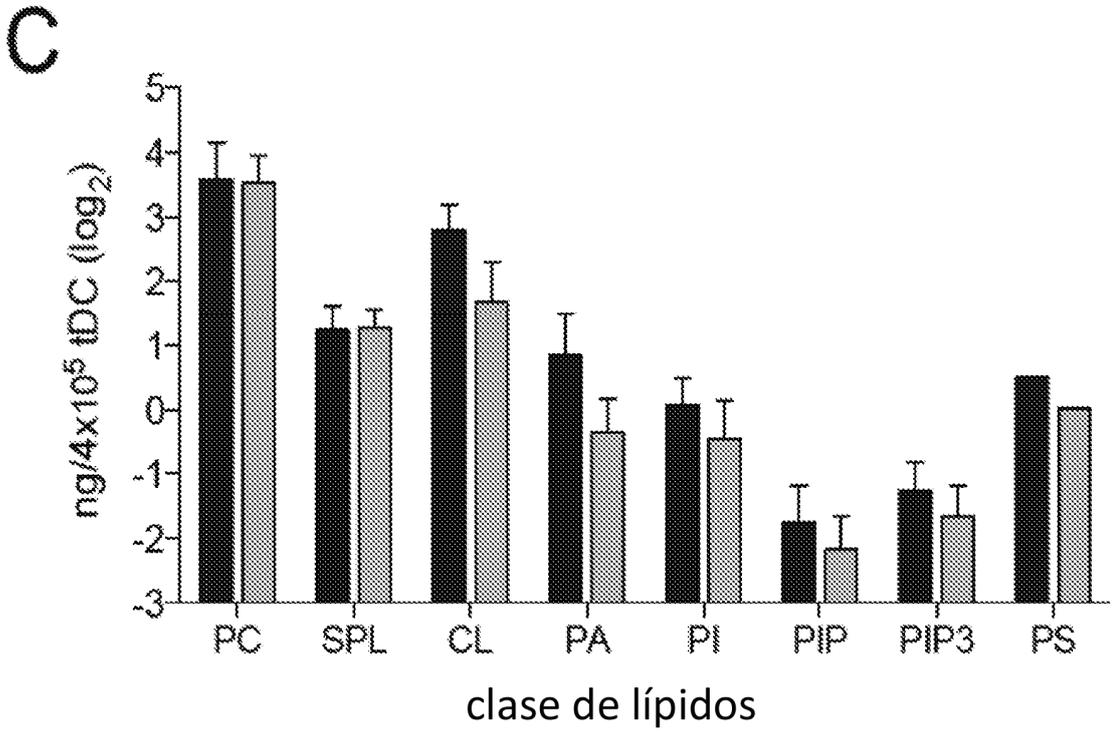
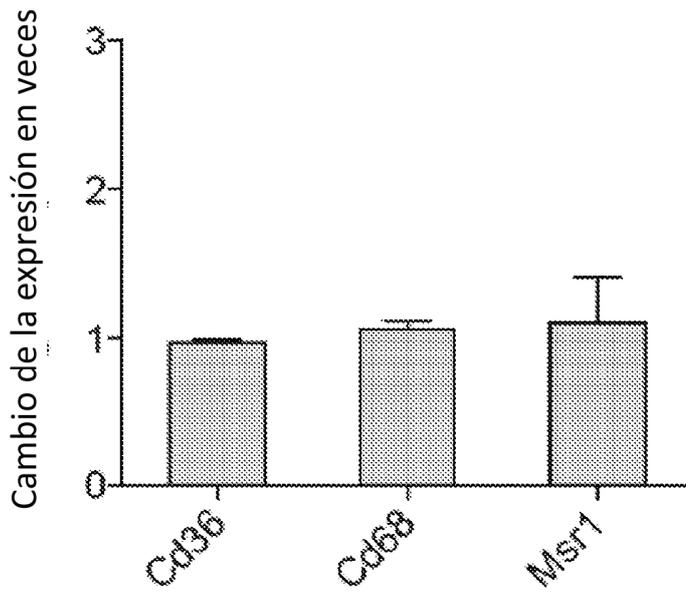


Figura 10

E



F

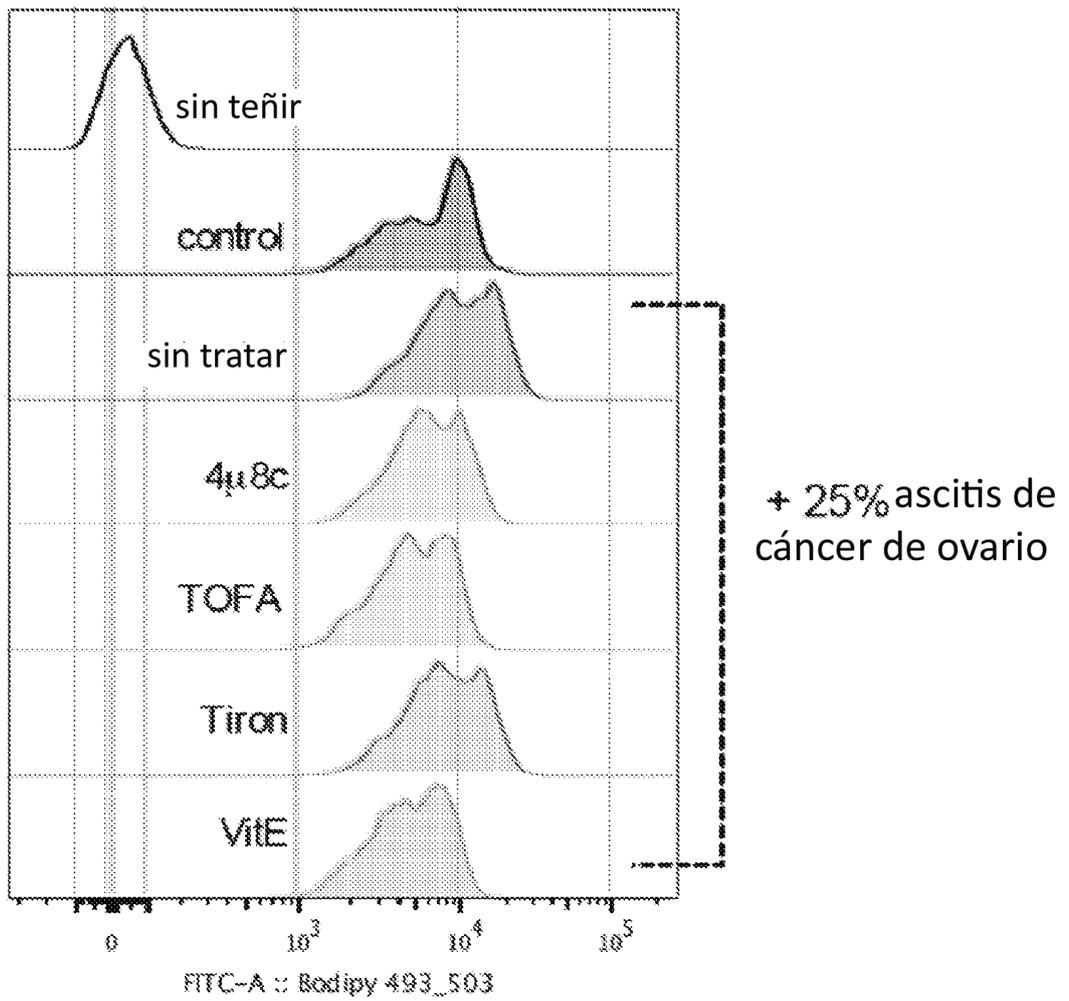


Figura 10

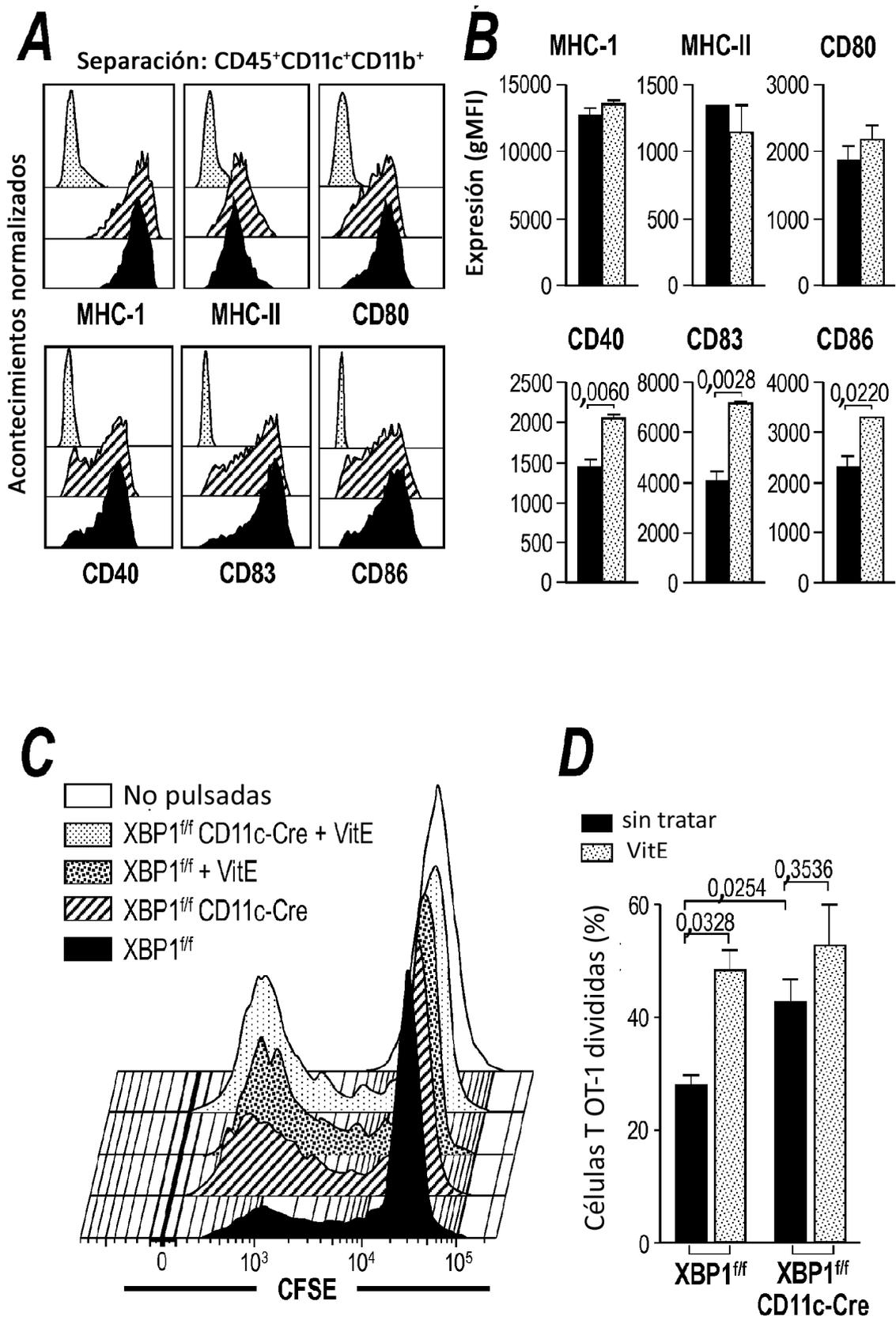


Fig. 11

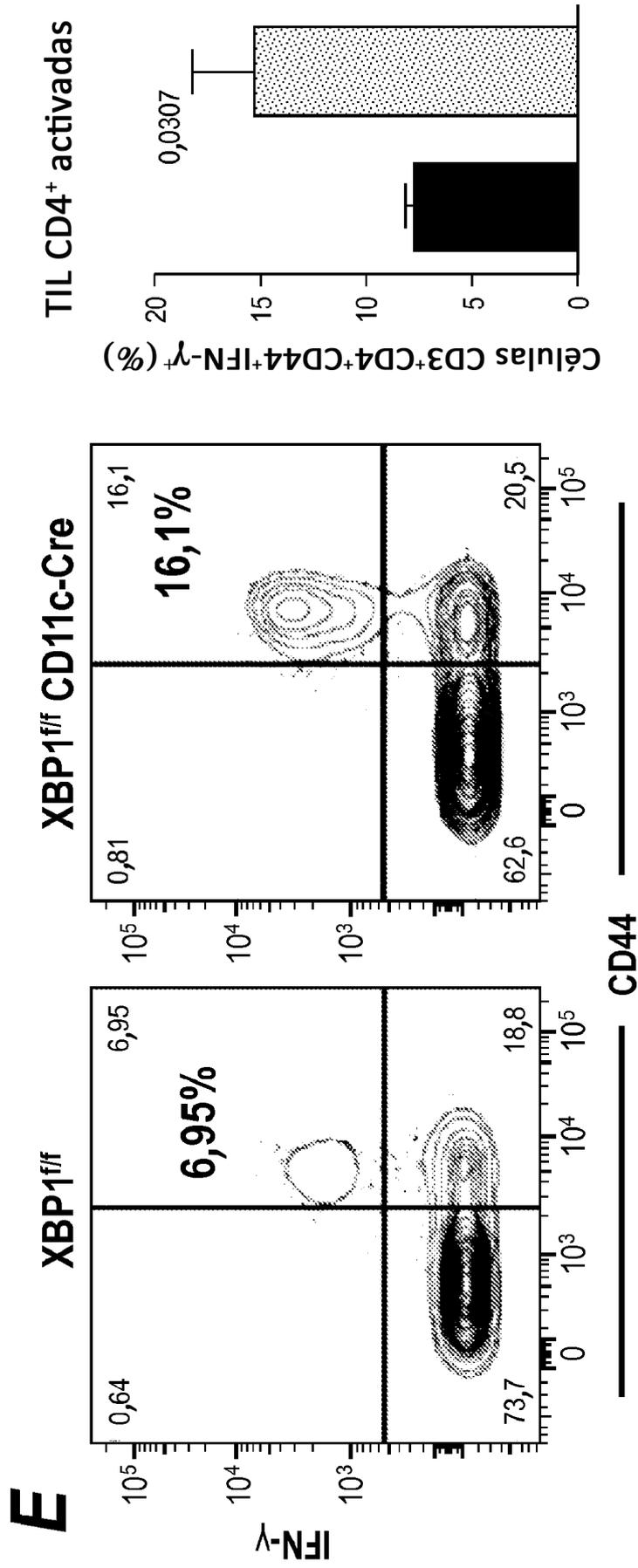


Fig. 11

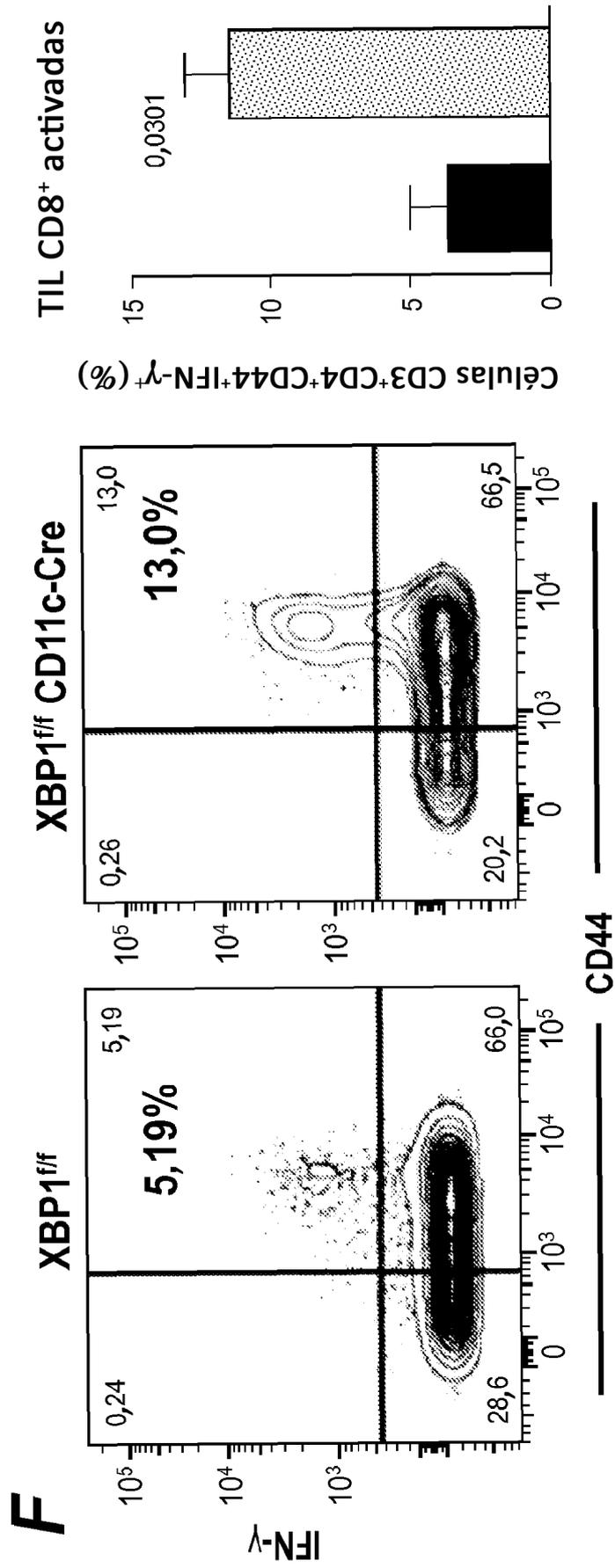


Fig. 11

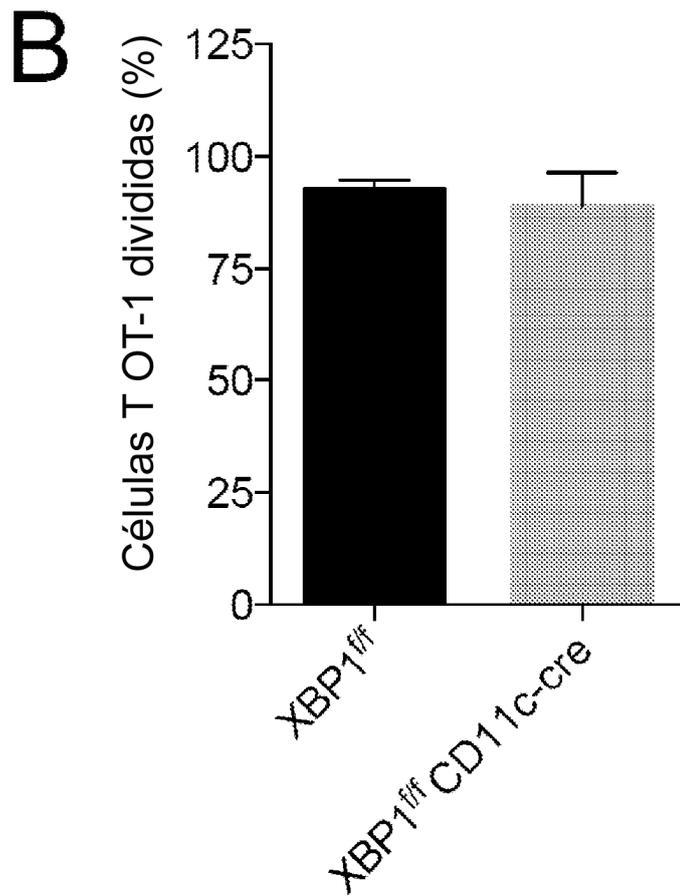
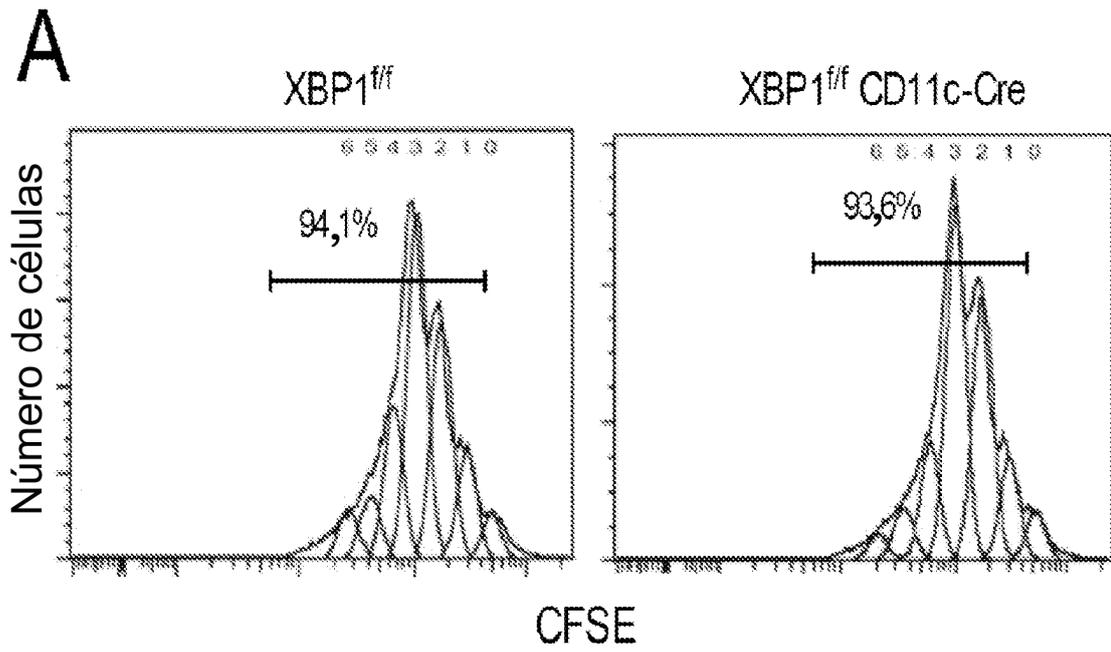


Figura 12

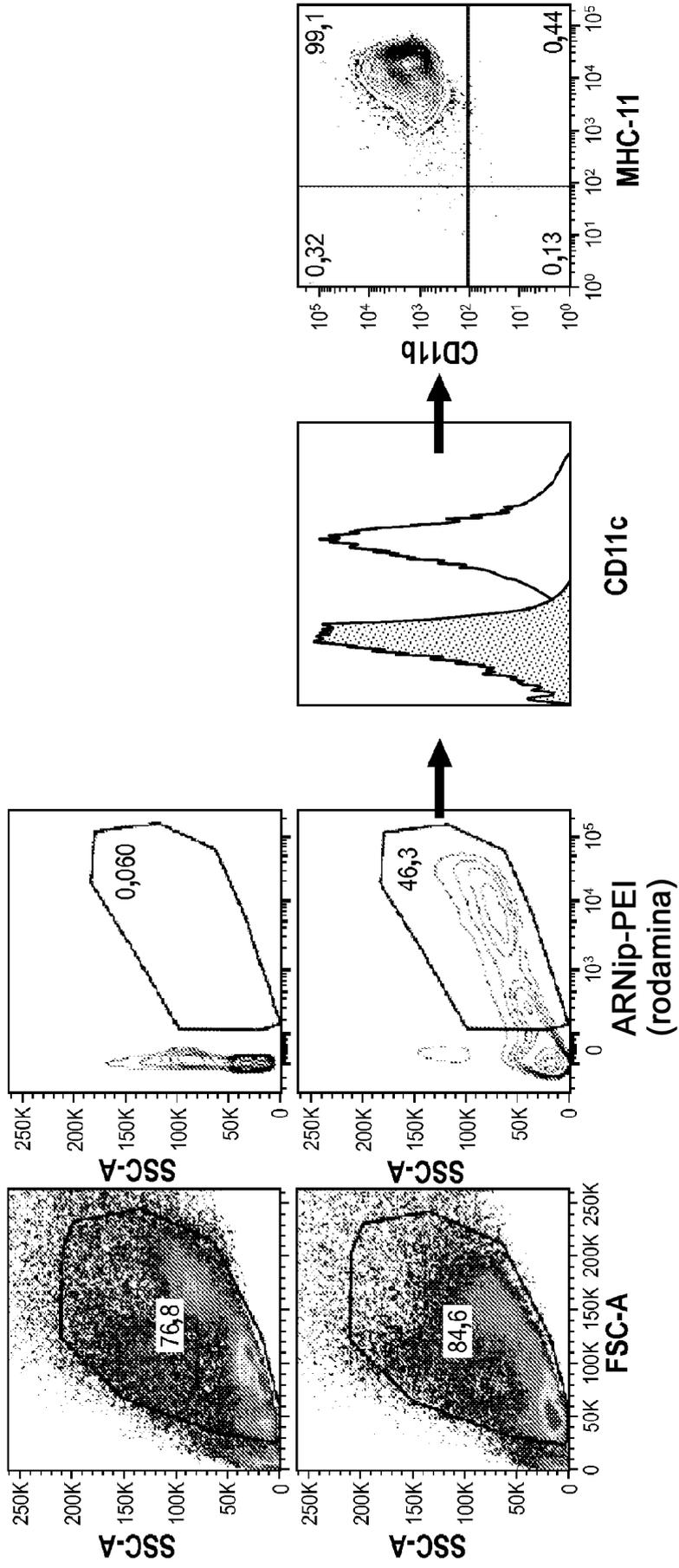
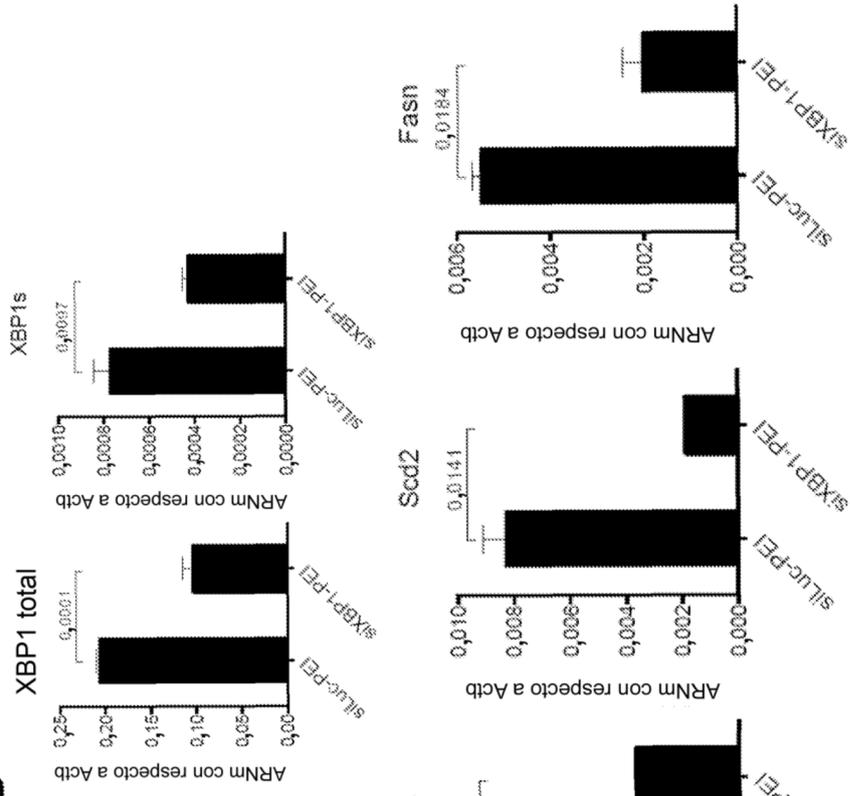
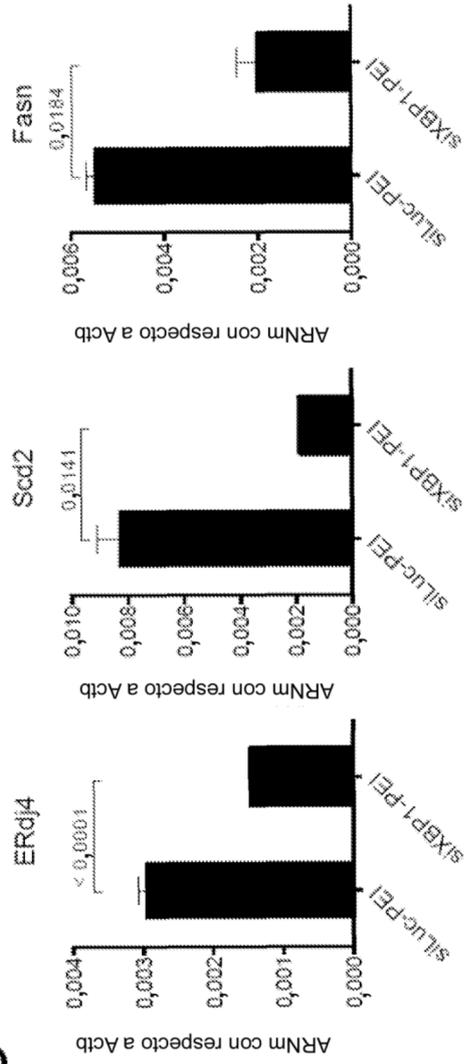


Fig. 13A

Figura 13 B



C



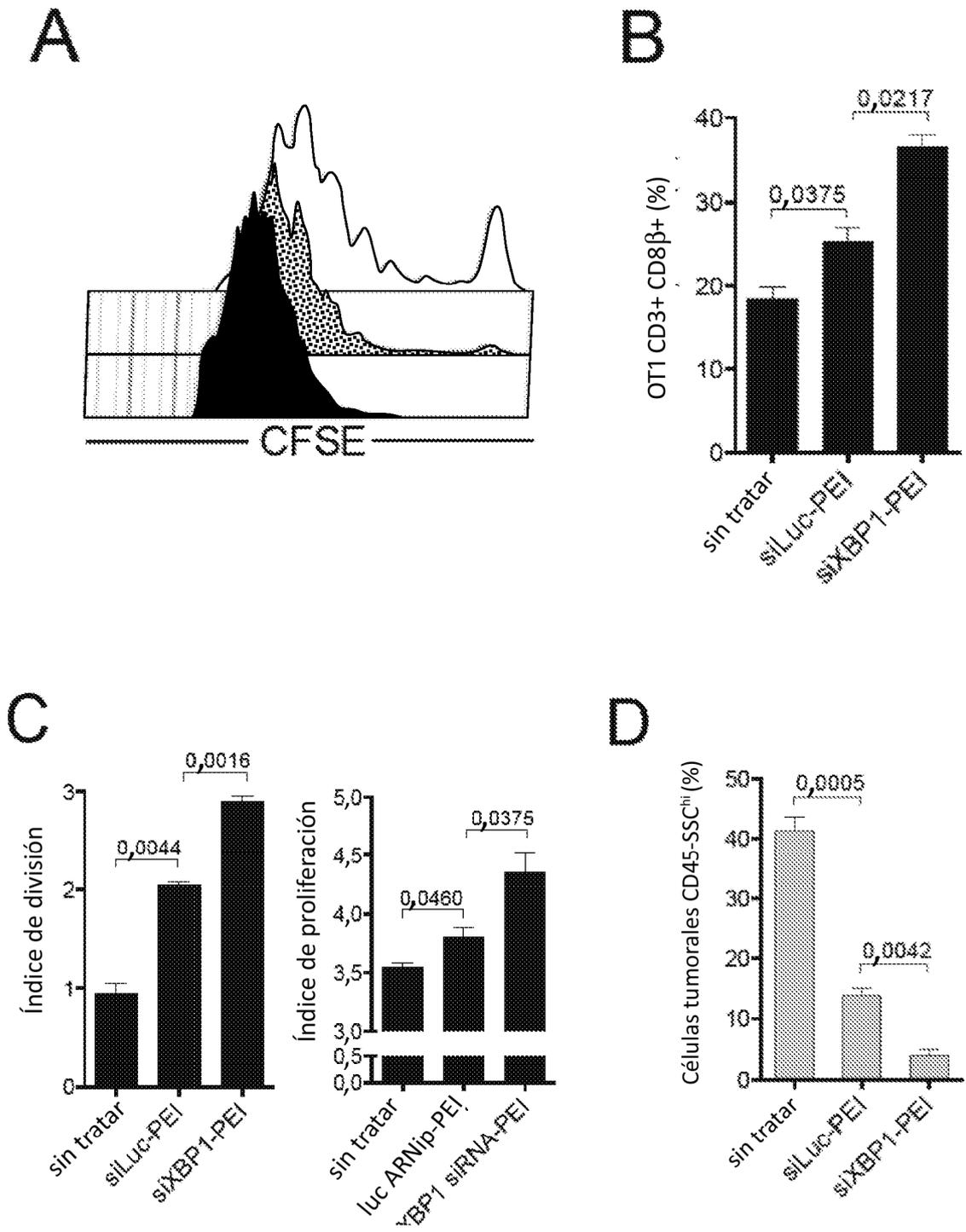
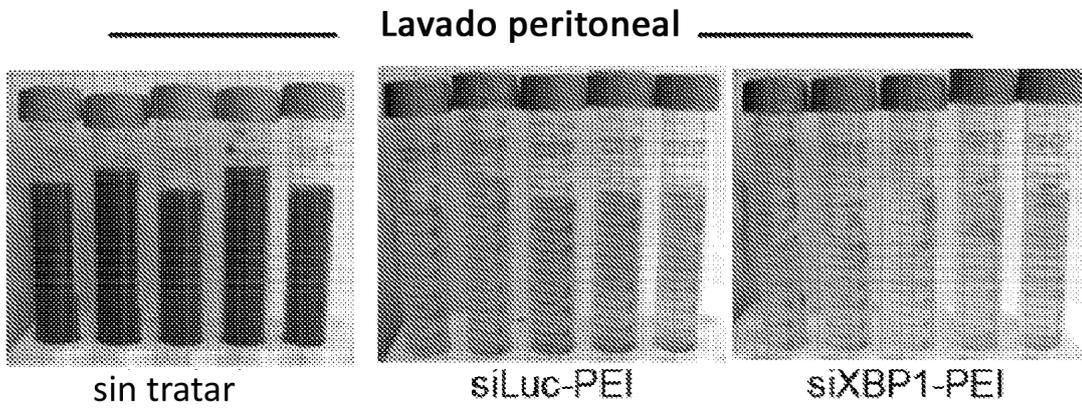
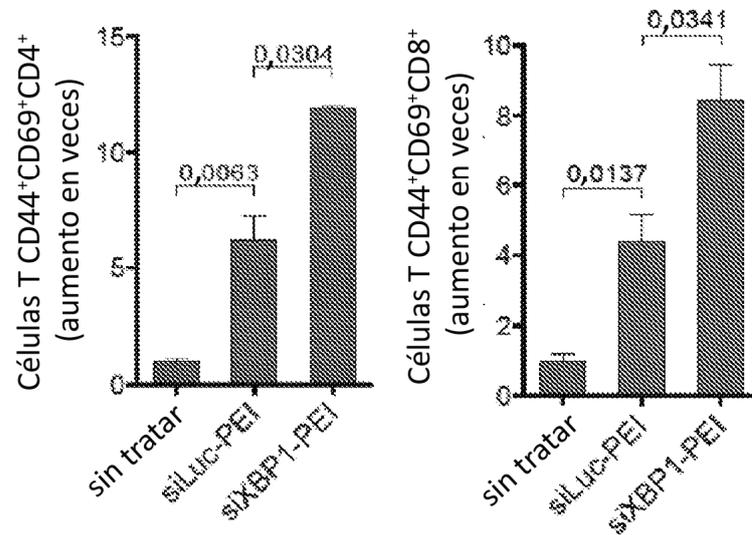


Figura 14

E



F



G

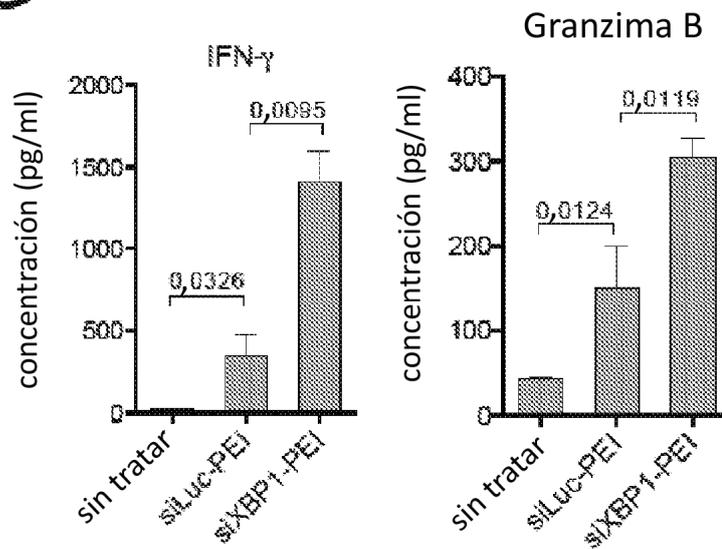
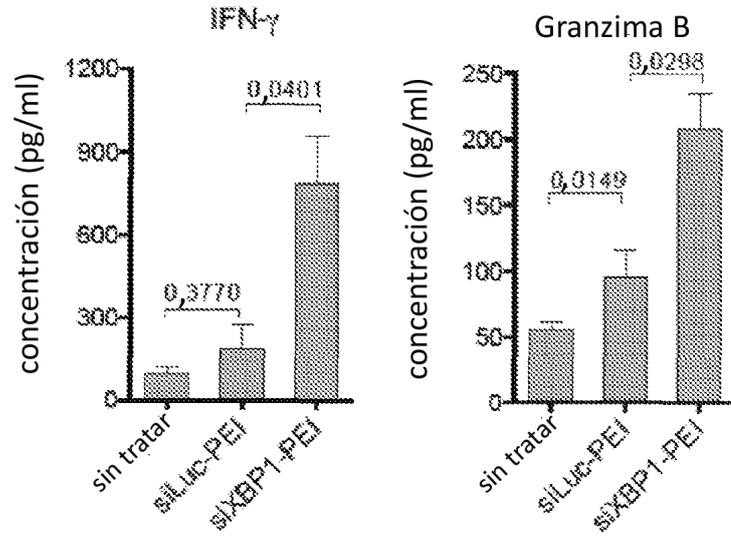
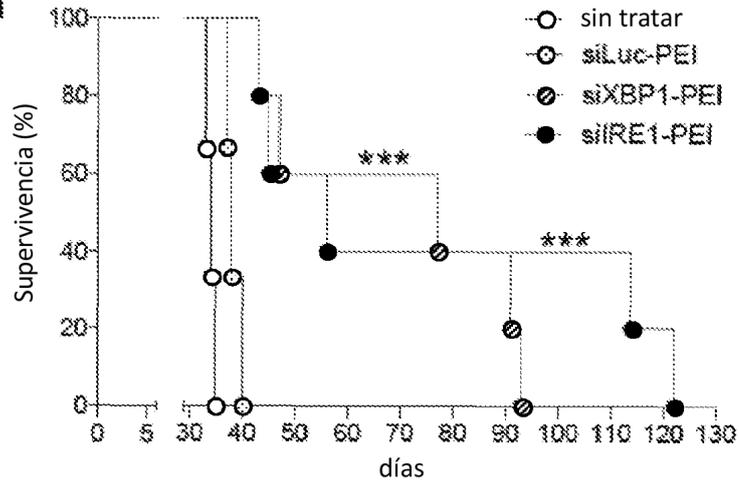


Figura 14

H



I



J

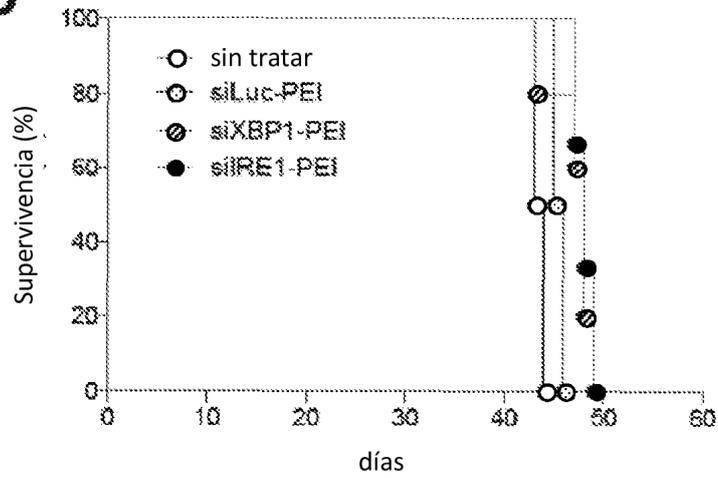


Figura 14