

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 540**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/71** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08004513 .1**  
96 Fecha de presentación: **13.10.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1939217**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2008**

54 Título: **PLÁSMIDOS QUE CODIFICAN PARA VARIANTES DE SECUENCIA DE LA PROTEÍNA P185NEU Y SUS USOS TERAPÉUTICOS DE LOS MISMOS.**

30 Prioridad:  
**15.10.2004 IT MI20041965**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**19.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**19.12.2011**

73 Titular/es:  
**AMICI, AUGUSTO  
VIA CONTI DI SAN MAROTO 19  
62032 CAMERINO (MC), IT;  
MARCHINI, CRISTINA;  
QUAGLINO, ELENA;  
CAVALLO, FEDERICA y  
FORNI, GUIDO**

72 Inventor/es:  
**Amici, Augusto;  
Marchini, Cristina;  
Quaglino, Elena;  
Cavallo, Federica y  
Forni, Guido**

74 Agente: **Lazcano Gainza, Jesús**

ES 2 370 540 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

Plásmidos que codifican para variantes de secuencia de la proteína p185<sup>neu</sup> y usos terapéuticos de los mismos

5 La presente invención se refiere a vectores de plásmidos que contienen secuencias de ADN que codifican para formas truncadas y quiméricas de la proteína p185<sup>neu</sup>, y al uso de los mismos en la vacunación con ADN contra tumores positivos para Her-2/neu (ErbB-2) que expresan la proteína p185<sup>neu</sup>. Los plásmidos según la invención pueden provocar una respuesta inmunitaria protectora que se basa en la inducción de anticuerpos y/o linfocitos T contra tumores que expresan la proteína p185<sup>neu</sup>. La invención se refiere además a composiciones farmacéuticas  
10 que contienen tales plásmidos y al uso de los mismos en el tratamiento preventivo o terapéutico de tumores positivos para p185<sup>neu</sup>.

**Antecedentes de la invención**

15 Las células neoplásicas a menudo difieren de las células normales porque expresan varias proteínas de manera anómala. Debido a esta expresión anómala, algunas proteínas pueden actuar como antígenos asociados a tumores (TAA). Esto es por lo que el sistema inmunitario del huésped puede reconocer estas anomalías y provocar una respuesta inmunitaria que podría proteger al huésped de la aparición y el desarrollo del tumor. Para ser una diana de la inmunoterapia antitumoral, un TAA debe:

- tener un papel patogénico en un determinado estadio de crecimiento neoplásico;
- poder detectarse por el sistema inmunitario incluso cuando el tumor da lugar a variantes clonales que ya no expresan glicoproteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA);
- reconocerse tanto por anticuerpos como por linfocitos T.

20 Se han descubierto varios TAA en carcinomas humanos en los últimos años. Entre ellos, p185<sup>neu</sup>, el producto proteico del oncogén Her-2/neu (ErbB2), es una diana particularmente adecuada para la inmunoterapia (Lollini y Forni, 2003, Trends Immunol. 24: 62). p185<sup>neu</sup> es un receptor de membrana de la familia de tirosina cinasa de receptor de clase I, que también abarca el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R o ErbB-1) y otros receptores relacionados (ErbB-3, ErbB-4) que desempeñan un papel clave en la diferenciación y proliferación celular (Hynes y Stern, 1994, BBA 1198: 165).

30 La proteína receptora p185<sup>neu</sup> puede subdividirse en tres dominios: el dominio extracelular (dominio EC), el dominio transmembrana (dominio TM) y el dominio intracitoplasmático (dominio IC). Recientemente, se ha publicado la estructura cristalográfica del dominio EC de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata y ser humano. Se ha descrito que este dominio está compuesto por cuatro subdominios (I/L1, II/CR1, III/L2 y IV/CR2) para aproximadamente 630 aminoácidos en total. Se ha mostrado además que la proteína p185<sup>neu</sup> tiene una conformación rígida, que le permite interactuar con otros receptores ErbB, dimerizarse e inducir la transducción de la señal de proliferación incluso si esta proteína no se une directamente a los ligandos (Cho *et al.*, 2003, Nature 421: 756).

45 El oncogén Her-2/neu (ErbB2) está implicado en procesos normales de organogénesis embrionaria y crecimiento epitelial, mientras que en adultos se expresa sólo a escasos niveles (Press *et al.*, 1990, Oncogene 5: 953). En seres humanos, la sobreexpresión de este oncogén está provocada principalmente por amplificación génica. El oncogén Her-2/neu (ErbB2) se sobreexpresa en aproximadamente el 30% de los carcinomas de mama, y una sobreexpresión de este tipo está relacionada con una evolución del tumor más rápida (Slamon *et al.*, 1989, Science 244: 707). Entre las diferentes estrategias que se han propuesto, la vacunación con ADN parece ser un método eficaz para provocar una respuesta inmunitaria frente a tumores positivos para Her-2/neu. Aún cuando la proteína p185<sup>neu</sup> es un "auto" antígeno, es decir, una proteína que está presente normalmente en el organismo, los pacientes con carcinomas de mama positivos para p185<sup>neu</sup> a menudo presentan una respuesta inmunitaria, tanto celular como humoral (Signoretti *et al.*, 2000, J. Natl. Cancer Inst. 23: 1918; Disis *et al.*, 1994, Cancer Res. 54: 16; Peoples *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 432). Uno de los objetivos de las inmunoterapias antitumorales dirigidas hacia la proteína p185<sup>neu</sup> es aumentar la intensidad de la respuesta en pacientes con una respuesta inmunitaria preexistente, o  
50 generar una respuesta inmunitaria en pacientes en los que esta respuesta es indetectable. El hecho de que una proteína p185<sup>neu</sup> sea un "auto" antígeno conlleva que la vacuna debe poder superar un estado inmunotolerante.

Los inventores de la presente solicitud de patente fueron los primeros en usar y validar la eficacia de la vacunación con ADN para provocar una protección inmunitaria frente a tanto carcinomas de mama espontáneos como tumores positivos para Her-2/neu trasplantables. Estos estudios han comprobado que la prevención y el tratamiento de lesiones preneoplásicas es un objetivo accesible. En particular, en experimentos dirigidos a prevenir el desarrollo de tumores de mama espontáneos que surgen en ratones transgénicos debido al oncogén Her-2/neu de rata (ratones FVB/neuT y ratones BALB-neu), se ha mostrado que el plásmido que codifica para los dominios EC y TM de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata puede provocar una protección más eficaz en comparación con el plásmido que codifica para la proteína p185<sup>neu</sup> de longitud completa o el plásmido que codifica para su dominio EC sólo (antígeno secretado) (Amici *et al.*, 2000, Gene Ther. 7: 703; Rovero *et al.*, 2000, J. Immunol. 165: 5133). Se han notificado  
65

datos similares por Chen *et al.*, (1998, Cancer Res. 58: 1965). Además, se ha mostrado que la eficacia de la vacunación con plásmidos de ADN aumenta fuertemente si va seguida de un pulso eléctrico muy corto cuando se inoculan los plásmidos por vía intramuscular (Quaglino *et al.*, 2004, Cancer Res. 64: 2858). Otros autores han mostrado que los plásmidos que codifican para la proteína p185<sup>neu</sup> de longitud completa, si es necesario mutada de manera que no tenga actividad tirosina cinasa, son eficaces en la prevención de la aparición de tumores tras el trasplante de células cancerosas positivas para p185<sup>neu</sup> (Wei-Zen *et al.*, 1999, Int. J. Cancer 81: 748). Los mismos plásmidos han demostrado ser tan eficaces incluso cuando, privados de la señal líder responsable del procesamiento de la proteína en el retículo endoplasmático, provocan la localización citoplásmica del antígeno de p185<sup>neu</sup>. Cuando se usan plásmidos que codifican para la proteína p185<sup>neu</sup> que se localiza en la membrana gracias a la presencia de una señal líder, las protecciones dependen de una respuesta inmunitaria que se basa en anticuerpos. Por el contrario, se observa una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T si la vacuna no contiene una señal líder, y por tanto la proteína p185<sup>neu</sup> se localiza en el citoplasma de células transfectadas en vez de en su membrana plasmática (Pilon *et al.*, 2001, J. Immunol. 167: 3201). Además, una vacunación combinada obtenida usando tanto plásmidos con una señal líder como aquellos en los que esta señal líder se ha delecionado, es más eficaz en la protección contra el crecimiento tumoral (Piechocki *et al.*, 2001, J. Immunol. 167: 3367). Esto demuestra que existe un efecto sinérgico entre las respuestas humoral y celular en la prevención de carcinomas positivos para p185<sup>neu</sup> (Reilly *et al.*, 2001, Cancer Res. 61: 880).

La vacunación con el plásmido que codifica para los dominios EC y TM (plásmido EC-TM) ha demostrado ser eficaz no sólo en la prevención del desarrollo de carcinomas positivos para p185<sup>neu</sup> espontáneos, sino también en el tratamiento de masas tumorales de 2 mm de diámetro implicando una gama de mecanismos del sistema inmunitario efector (células T cooperadoras y células T citotóxicas, anticuerpos, macrófagos, neutrófilos, células citotóxicas naturales, receptores de Fc, IFN-gamma y perforinas), que contribuyen de manera coordinada al rechazo del tumor (Curcio *et al.*, 2003, J. Clin. Invest. 111: 1161).

El documento WO 00/44899 A da a conocer proteínas de fusión de ser humano-rata de HER2/Neu que contienen diversas combinaciones de dominios EC y IC de HER2/Neu de ser-humano y rata, incluyendo el dominio de fosforilación que está dentro del dominio IC. Se indica que las proteínas de fusión son útiles para la inmunización de animales de sangre caliente contra tumores malignos asociados con el oncogén HER-2/neu.

### Descripción de la invención

Se han construido varios plásmidos que codifican para el dominio TM de longitud completa y partes decrecientes del dominio EC de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata. Se usaron los plásmidos truncados, obtenidos mediante la deleción de los 240 pares de bases (pb) NH<sub>2</sub>-terminales, o múltiplos de esta longitud, en experimentos dirigidos a prevenir el crecimiento de células tumorales que sobreexpresan la proteína p185<sup>neu</sup> de rata trasplantables (células TUBO). Además, se creó una serie de plásmidos que codifican para formas de proteína p185<sup>neu</sup> quimérica mediante la adición de partes NH<sub>2</sub>-terminales de ADNc de ErbB2 humano a secuencias que codifican para las formas truncadas de proteína de rata para reconstituir la secuencia de proteína completa.

La protección lograda tras la vacunación con plásmido que codifica para los dominios EC y TM de longitud completa se debe principalmente a la producción de anticuerpos, mientras que la protección alcanzada usando plásmidos que codifican para las formas truncadas de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata no está asociada con una producción de anticuerpos significativa en muchos casos.

Basándose en los resultados de los experimentos *in vivo*, se seleccionaron plásmidos que pueden inducir una fuerte respuesta inmunitaria, mediada tanto por anticuerpos como por linfocitos T.

En un primer aspecto, la invención se refiere a plásmidos que contienen una secuencia que codifica para una proteína p185<sup>neu</sup> quimérica y que tiene la SEQ ID NO:10 (las secuencias de referencia para los genes que codifican para proteínas p185<sup>neu</sup> de ser humano y rata están depositadas en Gene Bank con el n.º de acceso M11730 y X03362, respectivamente).

La secuencia de ADN que codifica para la forma quimérica y trucada de la proteína p185<sup>neu</sup> según la invención puede insertarse en cualquier vector de plásmido adecuado para su uso en mamíferos, particularmente en seres humanos. Además de la secuencia codificante anterior, los plásmidos pueden incluir elementos funcionales para controlar la transcripción, en particular promotores, preferiblemente el promotor de CMV, ubicado en el sentido de 5' de la secuencia codificante, secuencias de terminación e iniciación de la transcripción; un marcador de selección, preferiblemente los genes con resistencia a ampicilina o kanamicina; motivos CpG; un sitio de poliadenilación; y en el caso potenciadores o activadores de la transcripción. Los elementos para controlar la transcripción deben ser adecuados para el uso de vectores en mamíferos, particularmente en seres humanos.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene un plásmido de ADN tal como se definió anteriormente, junto con excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas en una forma adecuada para la administración parenteral, preferiblemente en forma de una disolución inyectable, se usan preferiblemente para la vacunación con ADN. Los principios y métodos para la vacunación con

ADN los conocen los expertos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Liu, 2003; J. Int. Med. 253: 402.

La utilización de plásmidos que codifican para las formas truncadas y quiméricas de p185<sup>neu</sup> según la invención para vacunar preventiva y terapéuticamente contra tumores positivos para p185<sup>neu</sup> (positivos para Her-2/neu, ErbB-2) tiene una variedad de ventajas que mejoran su eficacia.

El uso de plásmidos quiméricos generados mediante una combinación de formas truncadas de p185<sup>neu</sup> de una especie animal diferente permite:

a) vacunar con plásmidos que codifican para determinantes de proteína de la misma especie que va a inmunizarse, por ejemplo seres humanos, lo que puede provocar una respuesta de alta afinidad específica;

b) combinar plásmidos que codifican para determinantes antigénicos de la misma especie que va a inmunizarse con secuencias de ADNc que codifican para determinantes antigénicos de otras especies, mostrando los determinantes antigénicos una similitud sustancial pero que difiere en que los de otras especies provocan una respuesta inmunitaria más intensa, superando así el estado de tolerancia. Estos determinantes alogénicos, que se reconocen como parcialmente exógenos, actúan como determinantes colaboradores que facilitan la inducción de una liberación de citocinas y respuesta más intensa;

c) combinar plásmidos que codifican para determinantes antigénicos de la misma especie con secuencias de ADNc que, codificando para determinantes de otras especies, en algunos individuos pueden dar lugar a determinantes heteroclíticos que se unen con afinidad superior a moléculas de HLA e inducen respuestas inmunitarias más intensas que tienen una afinidad superior;

d) tener una vacuna que combina las ventajas de a) con las de b) y c).

Se usan plásmidos de ADN correctamente formulados según la invención en el tratamiento preventivo o terapéutico de seres humanos o animales que muestran un alto riesgo de desarrollar carcinomas positivos para p185<sup>neu</sup>, o pacientes que portan tumores primarios positivos para p185<sup>neu</sup>, sus recidivas o metástasis. La prevención puede ser primaria, cuando el tumor aún no es evidente; secundaria, cuando el tumor está en su estadio inicial como una lesión preneoplásica; o terciaria, si se observa una recidiva de tumor o proceso metastásico.

Los tumores que pueden tratarse con plásmidos o composiciones de la invención son principalmente los de origen epitelial, particularmente adenocarcinomas pulmonar, de ovario y de mama; carcinomas escamosos de cabeza y cuello, y más generalmente tumores que expresan la proteína p185<sup>neu</sup>.

### Descripción detallada de la invención

Construcción de plásmidos que codifican para formas truncadas de proteína p185<sup>neu</sup> de rata

Se usó la estructura principal del plásmido pCMV3.1 (obtenida en el laboratorio partiendo de pcDNA3.1 de Invitrogen, Milán, Italia) para producir los plásmidos de ADN que codifican para el dominio TM de longitud completa y partes decrecientes del dominio EC de proteína p185<sup>neu</sup> de rata. pCMV3.1 contiene la secuencia de nucleótidos de UTR en 5' de Her-2/neu de rata (que se transcribe pero no se traduce) y la secuencia líder (neuL). Se obtuvo el fragmento de ADN de la señal de secreción de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata mediante amplificación enzimática de ADN usando el vector pCMV-EC-TM (Amici *et al.*, 2000, Gene Ther., 7: 703; Rovero *et al.*, 2000, J. Immunol., 165: 5133) como molde, cebador de T7 como oligonucleótido sentido (oligonucleótido n.º 1) y un oligonucleótido (oligonucleótido n.º 2) que tiene un sitio EcoRI terminal como oligonucleótido antisentido. Tras la purificación y digestión con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI, se clonó el fragmento amplificado en el plásmido pCMV3.1 que se ha digerido con las mismas enzimas, obteniendo así pCMV3.1-neuL. Posteriormente, se han insertado siete diferentes secuencias que codifican para los fragmentos delecionados del dominio EC y dominio TM de longitud completa de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata en marco en el vector pCMV3.1-neuL digerido con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI. Se designaron los nuevos plásmidos así obtenidos pCMV3.1-neuL-rEC1-TM (-70 aminoácidos) (figura 1), pCMV3.1-neuL-rEC2-TM (-150 aminoácidos) (figura 2), pCMV3.1-neuL-rEC3-TM (-230 aminoácidos) (figura 3), pCMV3.1-neuL-rEC4-TM (-310 aminoácidos) (figura 4), pCMV3.1-neuL-rEC5-TM (-390 aminoácidos) (figura 5), pCMV3.1-neuL-rEC6-TM (-470 aminoácidos) (figura 6) y pCMV3.1-neuL-rEC7-TM (-550 aminoácidos) (figura 7). El fragmento codificado por el primero de estos plásmidos es 70 aminoácidos más corto, incluyendo la secuencia de aminoácidos de la señal de secreción. Todos los demás fragmentos son progresivamente más cortos en 80 aminoácidos.

Se han producido estos fragmentos mediante amplificación enzimática de ADN usando siete diferentes oligonucleótidos sentido que tienen todos un sitio de restricción EcoRI terminal (oligonucleótidos n.º 3-n.º 9), y un oligonucleótido antisentido (oligonucleótido n.º 10) que puede reconocer un sitio denominado "sitio de cebado inverso de pcDNA3.1/BGH" (830-850 nt) en el extremo 3' del sitio de clonación múltiple de pCMV3.1. Como molde de ADN para la PCR, se usó el vector pCMV-EC-TM (Amici A. *et al.* 2000, Gene Ther. 7: 703; Rovero *et al.*, 2000, J. Immunol. 165: 5133). Tras la digestión enzimática con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI, se clonaron los

productos de amplificación en el plásmido pCMV3.1-neuL.

La vacunación con el plásmido pCMV3.1-neuL-rEC4-TM así como la vacunación con el plásmido pCMV3.1-neuL-rEC-TM que codifica para los dominios TM y EC de longitud completa protege al 100% de los ratones BALB/c de tumores en desarrollo mediante inoculación de células TUBO. Por otro lado, la vacunación con plásmidos pCMV3.1-neuL-rEC1-TM, pCMV3.1-neuL-rEC2-TM y pCMV3.1-neuL-rEC3-TM que codifican para las primeras tres formas truncadas de la proteína p185<sup>neu</sup> protege al 70-80% de los ratones BALB/c. El plásmido pCMV3.1-neuL-rEC5-TM que codifica para la quinta forma truncada protege al 50% de los ratones BALB/c, mientras que los plásmidos pCMV3.1-neuL-rEC6-TM y pCMV3.1-neuL-rEC7-TM que codifican para las formas truncadas sexta y séptima no inducen protección. Los resultados obtenidos demuestran que la respuesta celular activada por las formas truncadas de la proteína p185<sup>neu</sup> cuya localización es citoplásmica, es suficiente en la prevención antitumoral. Sin embargo, la activación concomitante de respuestas celulares y humorales permite obtener una terapia más eficaz (Rielly *et al.*, 2001, Cancer Res. 61: 880). Para alcanzar la producción de anticuerpos, la vacunación debe llevarse a cabo con el plásmido pCMV3.1-neuL-rEC4-TM que codifica para la cuarta forma de p185<sup>neu</sup> truncada que carece de los aminoácidos 1-310 aún puede conferir una protección completa, pero la respuesta de anticuerpos es 10 veces inferior en comparación con la del plásmido pCMV3.1-neuL-rEC-TM (tabla 1).

**Tabla 1**

Plásmidos	N.º de ratones	Protección	Anticuerpos
pCMV3.1-neuL	5	0%	-
pCMV3.1-neuL-rEC-TM	5	100%	+++
pCMV3.1-neuL-rEC1-TM	5	80%	-
pCMV3.1-neuL-rEC2-TM	5	75%	-
pCMV3.1-neuL-rEC3-TM	5	70%	-
pCMV3.1-neuL-rEC4-TM	5	100%	+
pCMV3.1-neuL-rEC5-TM	5	50%	-
pCMV3.1-neuL-rEC6-TM	5	0%	-
pCMV3.1-neuL-rEC7-TM	5	0%	-

Construcción de plásmidos de ser humano-rata quiméricos que pueden codificar para siete diferentes formas de fusión de la proteína p185<sup>neu</sup> (HuRT1-7)

La mayoría de los epítopos presentados por HLA están ubicados en el primer subdominio (I/L1) de la proteína p185<sup>neu</sup>. Por tanto, se han construido plásmidos quiméricos que codifican para las secuencias de la proteína ErbB2 humana que son cada vez más largas partiendo del extremo NH<sub>2</sub> (la parte más exterior del dominio EC) para inducir una respuesta inmunitaria específica contra estos epítopos. Se crearon estos nuevos plásmidos, designados HuRT (transmembrana de rata-ser humano), añadiendo las partes que faltan de ADNc de ErbB2 humano a las secuencias que codifican para las formas truncadas de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata.

Se digirieron los cinco primeros plásmidos truncados que codifican para el dominio TM de longitud completa y fragmentos decrecientes del dominio EC de proteína p185<sup>neu</sup> de rata con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI. Se clonaron los cinco diferentes fragmentos de ADNc humano obtenidos por PCR y digeridos en sus extremos dentro de estos cinco plásmidos trincados, de manera de se mantuvo el marco de lectura. Se produjeron los fragmentos de ADNc que codifican para las partes de la proteína p185<sup>neu</sup> humana que van a insertarse, incluyendo la región de UTR en 5' y la señal de secreción para pasar a través del retículo endoplasmático, mediante amplificación usando el plásmido pcDNA3.1erbB2 como molde. Se usaron seis oligonucleótidos como cebadores. El oligonucleótido sentido es el mismo para los seis cebadores y corresponde al cebador de T7 (oligonucleótido n.º 1), mientras que se diseñaron los cinco oligonucleótidos antisentido de manera que reconocían el ADNc del oncogén ErbB2 humano en posiciones cada vez más avanzadas de la secuencia y tenían un sitio de restricción EcoRI en sus extremos 3' (oligonucleótidos n.º 11-n.º 15). Tras la purificación y la digestión con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI, se insertaron los fragmentos amplificados en los correspondientes plásmidos (pCMV3.1-rEC1-TM, pCMV3.1-rEC2-TM, pCMV3.1-rEC3-TM, pCMV3.1-rEC4-TM, pCMV3.1-rEC5-TM), que se habían digerido anteriormente con las mismas enzimas de restricción. De este modo, se han obtenido cinco nuevos plásmidos (pCMV3.1-HuRT1-5) que codifican para proteínas quiméricas de 689 aminoácidos de longitud, 2 aminoácidos de los cuales (Glu-Phe) pertenecen al sitio de restricción EcoRI usado para unir los ADN de ser humano y rata. Las proteínas codificadas por estos plásmidos quiméricos difieren entre sí por partes crecientes de la proteína p185<sup>neu</sup> humana y partes decrecientes de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata.

Para obtener los plásmidos quiméricos que codifican para las formas truncadas sexta y séptima de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata, se construyeron dos nuevos plásmidos en los que podían usarse sitios de clonación distintos de EcoRI, puesto que un sitio de restricción EcoRI está presente en la posición 1450 en la secuencia génica ErbB2 humana. Se modificó pCMV3.1 usando una secuencia sintética compuesta por un oligonucleótido sentido (oligonucleótido n.º 16) y un oligonucleótido antisentido (oligonucleótido n.º 17), de manera que se delecionó uno de los dos sitios de restricción para la enzima PmeI y se invirtieron los sitios de restricción para las enzimas de

restricción HindIII y NheI, ubicadas en su sitio de clonación múltiple. Se designó la nueva estructura principal del plásmido así obtenida pCMV3.1H/N. Se produjeron los fragmentos para las formas truncadas sexta y séptima de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata mediante amplificación usando el plásmido pCMV-EC-TM (Amici *et al.*, 2000, *Gene Ther.*, 7: 703; Rovero *et al.*, 2000, *J. Immunol.*, 165: 5133) como molde y dos diferentes oligonucleótidos sentido con un sitio de restricción NheI en sus extremos (oligonucleótidos n.º 18 y n.º 19) y el oligonucleótido antisentido n.º 10.

Tras la digestión enzimática con las enzimas de restricción NheI y PmeI, se clonaron los productos de amplificación en el plásmido pCMV3.1H/N, obteniendo así los nuevos plásmidos pCMV3.1H/N-rEC6-TM y pCMV3.1H/N-rEC7-TM. Se obtuvieron los fragmentos de ADNc que codifican para las partes de la proteína p185<sup>neu</sup> humana que van a insertarse para generar los plásmidos quiméricos pCMV3.1H/N-HuRT6 y pCMV3.1H/N-HuRT7 mediante amplificación usando el plásmido pcDNA3.1erbB2 como molde, cebador de T7 como oligonucleótido sentido (oligonucleótido n.º 1) y dos cebadores diseñados de manera que reconocían el ADNc humano en posiciones adecuadas y tenían un sitio de restricción NheI en sus extremos (oligonucleótidos n.º 20 y n.º 21), como oligonucleótidos antisentido.

Tras la purificación y digestión con las enzimas de restricción HindIII y NheI, se insertaron los fragmentos amplificados en plásmidos correspondientes (pCMV3.1H/N-rEC6-TM; pCMV3.1H/N-rEC7-TM), que se habían digerido anteriormente con las mismas enzimas de restricción. De este modo, se obtuvieron los dos nuevos plásmidos quiméricos pCMV3.1H/N-HuRT6 y pCMV3.1H/N-HuRT7, que codifican para proteínas de 689 aminoácidos de longitud, 2 aminoácidos de los cuales (Val-Ser) pertenecen al sitio de restricción NheI usado para unir los ADN de ser humano y rata.

Estas manipulaciones condujeron a los siguientes plásmidos:

- Plásmido pCMV3.1-HuRT1 (figura 8), que codifica para 70 aminoácidos del dominio EC de la proteína p185<sup>neu</sup> humana, perteneciendo 2 aminoácidos al sitio EcoRI y 618 aminoácidos de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata
- Plásmido pCMV3.1-HuRT2 (figura 9), que codifica para 150 aminoácidos del dominio EC de la proteína p185<sup>neu</sup> humana y 538 aminoácidos de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata
- Plásmido pCMV3.1-HuRT3 (figura 10), que codifica para 230 aminoácidos del dominio EC de la proteína p185<sup>neu</sup> humana y 458 aminoácidos de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata
- Plásmido pCMV3.1-HuRT4 (figura 11), que codifica para 310 aminoácidos del dominio EC de la proteína p185<sup>neu</sup> humana y 378 aminoácidos de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata
- Plásmido pCMV3.1-HuRT5 (figura 12), que codifica para 390 aminoácidos del dominio EC de la proteína p185<sup>neu</sup> humana y 298 aminoácidos de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata
- Plásmido pCMV3.1H/N-HuRT6 (figura 13), que codifica para 470 aminoácidos del dominio EC de la proteína p185<sup>neu</sup> humana y 218 aminoácidos de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata
- Plásmido pCMV3.1H/N-HuRT7 (figura 14), que codifica para 550 aminoácidos del dominio EC de la proteína p185<sup>neu</sup> humana y 138 aminoácidos de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata.

Se han obtenido pruebas indirectas de una expresión de membrana de las proteínas de ser humano-rata quiméricas codificadas por estos plásmidos inmunizando ratones con los siete nuevos plásmidos (pCMV3.1-HuRT1-5 y pCMV3.1H/N-HuRT6-7). Los sueros de todos los ratones vacunados tienen anticuerpos específicos frente a la proteína p185<sup>neu</sup> de rata y ser humano quimérica. Además, los animales vacunados con plásmidos que codifican para las siete diferentes proteínas quiméricas están protegidos de una inoculación letal de células TUBO y/o células tumorales que sobreexpresan la proteína p185<sup>neu</sup> humana (células D2F2-E2).

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Construcción del plásmido pCMV3.1-HuRT5

Se digirió el plásmido pCMV3.1-rEC5-TM, que codifica para la quinta forma truncada de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata, con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI (BioLabs, Beverly, MA) para deletar la región de UTR en 5' y la secuencia neuL.

Se separó la banda de ADN de 4794 pb que corresponde al plásmido pCMV3.1-rEC5-TM que carece de la región de UTR en 5' y la secuencia neuL mediante electroforesis en gel de agarosa y se eluyó usando un kit de extracción de gel Qiaquick (Qiagen, Italia). Se obtuvieron el ADNc para la región de UTR en 5', la secuencia líder y la secuencia que codifica para la parte que falta del gen ErbB2 humano mediante PCR. Se usó el plásmido pcDNA3.1ErbB2 como molde, se usó el cebador de T7 (oligonucleótido n.º 1) como oligonucleótido sentido y se usó un cebador con un sitio de restricción EcoRI en su extremo 5' (oligonucleótido n.º 15) como oligonucleótido antisentido. Para realizar

la reacción de PCR, se emplearon reactivos y una Taq polimerasa de corrección de pruebas de Finnzymes (CELBIO, Milán, Italia). Tras la reacción de PCR, se purificó el ADN amplificado y se precipitó mediante métodos convencionales, se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O y se digirió con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI. Se clonaron el fragmento de ADNc que codifica para la parte relevante de ErbB2 humano y el plásmido pCMV3.1-rEC5-TM linealizado mediante reacción de ligación usando ADN ligasa de T4 (BioLabs, Beverly, MA).

Entonces se usó el producto de ligación para transformar bacterias *E. coli* de la cepa DH5α que se habían hecho competentes mediante la técnica de cloruro de calcio.

Se analizaron los clones así obtenidos mediante lisis alcalina para detectar los clones que contenían el plásmido pCMV3.1-HuRT5 quimérico.

Entonces se analizó pCMV3.1-HuRT5 mediante el método de secuenciación de Sanger usando un secuenciador automatizado ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) para verificar que la inserción de la parte de la secuencia humana que codifica para el gen ErbB2 en el plásmido que codifica para la quinta forma truncada de la proteína p185<sup>neu</sup> de rata ha tenido lugar correctamente y sin alterar el marco de lectura.

Lista de oligonucleótidos:

- n.º 1 cebador de T7 (SEQ ID No: 13)
- n.º 2 líder de neu antisentido EcoRI (SEQ ID No: 14)
- n.º 3 rECD1 sentido EcoRI (SEQ ID No: 15)
- n.º 4 rECD2 sentido EcoRI (SEQ ID No: 16)
- n.º 5 rECD3 sentido EcoRI (SEQ ID No: 17)
- n.º 6 rECD4 sentido EcoRI (SEQ ID No: 18)
- n.º 7 rECD5 sentido EcoRI (SEQ ID No: 19)
- n.º 8 rECD6 sentido EcoRI (SEQ ID No: 20)
- n.º 9 rECD7 sentido EcoRI (SEQ ID No: 21)
- n.º 10 sitio de cebado inverso de pcDNA3.1/BGH (SEQ ID No: 22)
- n.º 11 His-Myc sentido EcoRI mut (SEQ ID No: 23)
- n.º 12 His-Myc antisentido EcoRI (SEQ ID No: 24)
- n.º 13 70 erbB2 antisentido EcoRI (SEQ ID No: 25)
- n.º 14 150 erbB2 antisentido EcoRI (SEQ ID No: 26)
- n.º 15 230.erbB2 antisentido EcoRI (SEQ ID No: 27)
- n.º 16 310 erbB2 antisentido EcoRI (SEQ ID No: 28)
- n.º 17 390 erbB2 antisentido EcoRI (SEQ ID No: 29)
- n.º 18 HindIII-NheI sentido (SEQ ID No: 30)
- n.º 19 HindIII-NheI antisentido (SEQ ID No: 31)
- n.º 20 rECD6 sentido HheI (SEQ ID No: 32)
- n.º 21 rECD7 sentido HheI (SEQ ID No: 33)
- n.º 22 470 erbB2 antisentido HheI (SEQ ID No: 34)
- n.º 23 550 erbB2 antisentido HheI (SEQ ID No: 35)

**Ejemplo 2: Pruebas *in vivo***

Animales

5 Se usaron ratones hembra de la cepa BALB/c de aproximadamente 7 semanas de edad para todos los experimentos. Los animales provenían de Charles River Laboratories (Calco, Milán, Italia), donde se habían criado asépticamente y según las normas establecidas por la Comunidad Europea.

Administración intramuscular seguida de electroporación *in vivo*

10 Para evitar el dolor y las contracciones no deseadas de músculos tibiales, se anestesió cada ratón mediante inyección intraperitoneal de 300 µl de Avertin, una disolución que consistía en 0,58 g de tribromoetanol (Sigma-Aldrich) y 310 µl de alcohol terc-amílico (Aldrich) en 39,5 ml de H<sub>2</sub>O desionizada. Se afeitaron los músculos tibiales de los ratones anestesiados, y se inocularon 20 µl de una disolución que contenía 25 µg de ADN en cada músculo. Se preparó la disolución que contenía ADN justo antes de su uso según las instrucciones del Dr. F. Pericle (Valentis, Inc., The Woodlands, Texas, EE.UU.). Esta disolución contenía ADN de plásmido a una concentración de 1,25 mg/ml, sal de sodio de poli-L-glutamato (Sigma-Aldrich, S.r.l., Milán, Italia) a una concentración de 6 mg/ml, cloruro de sodio a una concentración de 150 mM (Fluka, BioChemika, Buchs, Suiza) y agua destilada libre de endotoxinas (Nucleare Free Water, Promega Corporation) a un volumen final de 1 ml. Tras aproximadamente 5 minutos de inoculación, se aplicaron dos pulsos eléctricos, de 375 V/cm<sup>2</sup> de intensidad y 25 ms de duración cada uno, generados mediante un electroporador Electro Square Porator (T820, BTX, San Diego, CA, EE.UU.) a ambos músculos tibiales de ratones usando dos electrodos de acero ubicados con 3 mm de separación en una disposición cuadrangular lateralmente en la pata. Se realizó la inmunización génica mediante electroporación dos veces en cada animal 21 y 7 días antes de inocular células tumorales.

25 Inoculación de células tumorales

Se inocularon en los lados izquierdos de ratones 0,2 ml de una suspensión que contenía 2 x 10<sup>5</sup> células TUBO.

Evaluación del crecimiento tumoral *in vivo*

30 Se evaluó el crecimiento tumoral mediante palpación semanalmente, y se midió el tamaño del tumor a lo largo de dos diámetros perpendiculares con un calibre. Se consideraron masas neoplásicas de un tamaño mayor de 1 milímetro como tumores. Se monitorizó el crecimiento tumoral durante 100 días a partir de la inoculación del tumor o hasta que el tamaño del tumor superaba 10 milímetros de diámetro, tiempo en el que se sacrificaron los animales. Los resultados obtenidos demuestran que el plásmido pCMV3.1-HuRT5 quimérico puede proteger al 100% de los ratones BALB/c vacunados de una inoculación letal de células TUBO (tabla 2).

Tabla 2

Plásmidos	N.º de ratones	Protección	Supervivencia (días)
pCMV3.1-neuL	5	0%	+ 35
pCMV3.1-neuL-rEC-TM	5	100%	+ 100
pCMV3.1-HuRT5	5	100%	+ 100

40 Evaluación de la presencia de anticuerpo anti-p185<sup>neu</sup> en sueros de animales vacunados

El día anterior a la inoculación de las células tumorales, se extrajo sangre de los animales vacunados con plásmido pCMV3.1-HuRT5 quimérico. Se analizaron los sueros para evaluar la presencia de anticuerpos anti-p185<sup>neu</sup> de rata. Se incubaron los sueros durante 45 minutos a 4°C con células que sobreexpresaban p185<sup>neu</sup> de rata. Tras lavar con una disolución denominada tampón de lavado, que consiste en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene albúmina sérica bovina al 0,2% (BSA, Sigma, Milán, Italia) y azida de sodio al 0,1% (NaN<sub>3</sub>, Sigma, Milán, Italia), se incubaron las muestras durante 20 minutos a 4°C con un anticuerpo conjugado con FITC anti-inmunoglobulina de ratón, se lavaron con tampón de lavado y se analizaron mediante un citofluorímetro FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, California, EE.UU.). Simultáneamente, se incubaron las mismas células con concentraciones decrecientes de anticuerpo anti-c-ErbB2/c-neu monoclonal (Ab4, Oncogene), de manera que pudo deducirse una relación entre las intensidades de fluorescencia obtenidas a través del análisis con citofluorímetro y la concentración de anticuerpos anti-p185<sup>neu</sup> en sueros animales. Los datos obtenidos muestran que todos los animales vacunados presentan altos niveles de anticuerpos anti-p185<sup>neu</sup> de rata, y por tanto que el plásmido pCMV3.1-HuRT5 quimérico es eficaz en la inducción de rechazo de tumores positivos para p185<sup>neu</sup> trasplantables y en la provocación de una respuesta de anticuerpos específica.

<210> 10

60 <211> 2092



ES 2 370 540 T3

<212> ADN

<213> Desconocido

5 <220>

<223> quimera de *Homo sapiens/Rattus norvegicus*

<400> 10

```

cggagccgca gtgagcacca tggagctggc ggccttgtgc cgctgggggc tcctcctcgc      60
cctcttgccc cccggagccg cgagcaccca agtgtgcacc ggcacagaca tgaagctgcg      120
gctccctgcc agtcccgaga cccacctgga catgctccgc cacctctacc agggctgcca      180
ggtggtgcag ggaaacctgg aactcaccta cctgccacc aatgccagcc tgtccttcct      240
gcaggatata caggaggtgc agggctacgt gctcatcgct cacaaccaag tgaggcaggt      300
cccactgcag aggctgcgga ttgtgcgagg caccagctc tttgaggaca actatgcctt      360
ggccgtgcta gacaatggag acccgctgaa caataccacc cctgtcacag gggcctcccc      420
aggaggcctg cgggagctgc agcttcgaag cctcacagag atcttgaaag gagggggtctt      480
gatccagcgg aacccccagc tctgctacca ggacacgatt ttgtggaagg acatcttcca      540
caagaacaac cagctggctc tcacactgat agacaccaac cgctctcggg cctgccaccc      600
ctgttctccg atgtgtaagg gctcccgtg ctggggagag agttctgagg attgtcagag      660
cctgacgcgc actgtctgtg ccggtggctg tggccgctgc aaggggccac tgcccactga      720
ctgctgccat gagcagtgtg ctgccggctg cacgggcccc aagcactctg actgcttggc      780
ctgcctccac ttcaaccaca gtggcatctg tgagctgcac tgcccagccc tggtcaccta      840
caacacagac acgtttgagt ccatgccc aa tcccaggggc cggtatacat tggcgccag      900
ctgtgtgact gcctgtccct acaactacct ttctacggac gtgggatcct gcaccctcgt      960
ctgccccctg cacaaccaag aggtgacagc agaggatgga acacagcggg gtgagaagtg     1020
cagcaagccc tgtgcccagag tgtgctatgg tctgggcatg gagcacttgc gagaggtgag     1080
ggcagttacc agtgccaata tccaggagtt tgctggctgc aagaagatct ttgggagcct     1140
ggcatttctg ccggagagct ttgatgggga cccagcctcc aacctgccg aattcgtctc     1200
gctgaggcct gagcagctcc aagtgttcca aacctggag gagatcacag gttacctgta     1260
catctcagca tggccagaca gtctccgtga cctcagtgtc ttccagaacc ttcgaatcat     1320
tcggggacgg attctccacg atggcgcgta ctattgaca ctgcaaggcc tggggatcca     1380
ctcgtggggg ctgcgctcac tgcgggagct gggcagtgga ttggctctga ttcaccgcaa     1440
cgcccatctc tgctttgtac aactgtacc ttgggaccag ctcttccgga acccacatca     1500
ggccctgctc cacagtggga accggccgga agaggattgt ggtctcgagg gcttggctctg     1560
taactcactg tgtgcccacg ggcactgctg ggggccaggg cccaccaggt gtgtcaactg     1620

```

10

ES 2 370 540 T3

cagtcatttc cttcggggcc aggagtgtgt ggaggagtgc cgagtatgga aggggctccc 1680  
 ccgggagtat gtgagtgaca agcgcctgtct gccgtgtcac cccgagtgtc agcctcaaaa 1740  
 cagctcagag acctgctttg gatcggagge tgatcagtgt gcagcctgcg cccactacaa 1800  
 ggactcgtcc tctgtgtgg ctgctgccc cagtgggtgtg aaaccggacc tctcctacat 1860  
 gcccatctgg aagtaccgg atgaggaggg catatgccag ccgtgccccca tcaactgcac 1920  
 ccactcctgt gtggatctgg atgaacgagg ctgcccagca gagcagagag ccagcccgg 1980  
 gacattcatc attgcaactg tagagggcgt cctgctgttc ctgatcttag tgggtggtcgt 2040  
 tggaatccta atcaaacgaa ggagacagaa gatccggaag tatacgatgt aa 2092

<210> 13

5 <211> 20

<212> ADN

<213> Desconocido

10

<220>

<223> oligonucleótido sintético

15 <400> 13

taatacgact cactataggg

20

<210> 14

20

<211> 30

<212> ADN

25 <213> Desconocido

<220>

<223> oligonucleótido sintético

30

<400> 14

catggaattc cgcgattccg gggggcagga

30

35 <210> 15

<211> 30

<212> ADN

40

<213> Desconocido

<220>

45 <223> oligonucleótido sintético

<400> 15

catggaattc ctctcattcc tgcaggacat

30

50

<210> 16

	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Desconocido	
	<220>	
10	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 16	
15	catggaattc aaggaggag tttgatccg	30
	<210> 17	
	<211> 30	
20	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
	<220>	
25	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 17	
30	catggaattc cggctgccca ctgactgctg	30
	<210> 18	
	<211> 30	
35	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
40	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 18	
45	catggaattc tcctgcactc tgggtgtcc	30
	<210> 19	
50	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
55	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
60	<400> 19	
	catggaattc gctccgctga ggcctgagca	30
	<210> 20	
65	<211> 30	

# ES 2 370 540 T3

<212> ADN  
 <213> Desconocido  
 5 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 10 <400> 20  
 catggaattc cgcaacgccc atctctgctt 30  
 <210> 21  
 15 <211> 30  
 <212> ADN  
 20 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 25 <400> 21  
 catggaattc gggctcccc gggagtatgt 30  
 30 <210> 22  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Desconocido  
 <220>  
 40 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 22  
 tagaaggcac cagtcgaggc t 21  
 45 <210> 23  
 <211> 69  
 50 <212> ADN  
 <213> Desconocido  
 <220>  
 55 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 23  
 aattgcatca tcatcatcat cataatggtc ataccggtga acaaaaactc atctcagaag 60  
 aggatctgg 69  
 60 <210> 24

ES 2 370 540 T3

<211> 69  
 <212> ADN  
 5 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 10 <400> 24  
     aattccagat cctcttctga gatgagtttt tgttcaccgg tatgaccatt atgatgatga 60  
     tgatgatgc 69  
 15 <210> 25  
     <211> 30  
     <212> ADN  
 20 <213> Desconocido  
     <220>  
 25 <223> oligonucleótido sintético  
     <400> 25  
 30 ccggaattc gctggcattg gtggcaggt 30  
     <210> 26  
     <211> 30  
 35 <212> ADN  
     <213> Desconocido  
     <220>  
 40 <223> oligonucleótido sintético  
     <400> 26  
 45 ccggaattc ttcaagatc tctgtgaggc 30  
     <210> 27  
     <211> 30  
 50 <212> ADN  
     <213> Desconocido  
 55 <220>  
     <223> oligonucleótido sintético  
     <400> 27  
 60 ccggaattc tgccccttg cagcgggcac 30  
     <210> 28

	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Desconocido	
	<220>	
10	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 28	
	ccggaattc ggatcccacg tccgtagaaa	30
15	<210> 29	
	<211> 30	
20	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
	<220>	
25	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 29	
30	ccggaattc ggcagtggtg gaggctgggt	30
	<210> 30	
	<211> 27	
35	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
40	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
	<400> 30	
45	ctaggaagct tgttaactt gctagct	27
	<210> 31	
50	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
55	<220>	
	<223> oligonucleótido sintético	
60	<400> 31	
	agctagctag caagttaaac aagcttc	27
	<210> 32	
65	<211> 30	

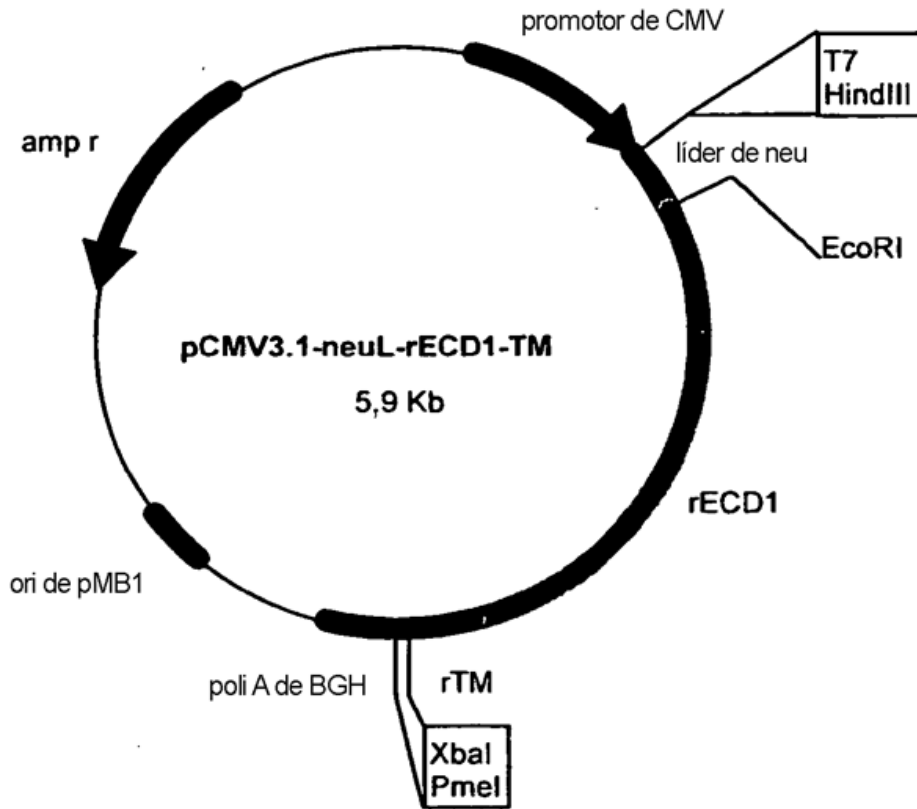
<212> ADN  
 <213> Desconocido  
 5 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 10 <400> 32  
 catggctagc cgcaacgccc atctctgctt 30  
 <210> 33  
 15 <211> 30  
 <212> ADN  
 20 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético  
 25 <400> 33  
 catggctagc ctccccggg agtatgtgag 30  
 30 <210> 34  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 35 <213> Desconocido  
 <220>  
 40 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 34  
 45 catggctagc atggtggata gggccagtcc 30  
 <210> 35  
 <211> 30  
 50 <212> ADN  
 <213> Desconocido  
 <220>  
 55 <223> oligonucleótido sintético  
 <400> 35  
 60 catggctagc agaccctgc agtactcggc 30

**REIVINDICACIONES**

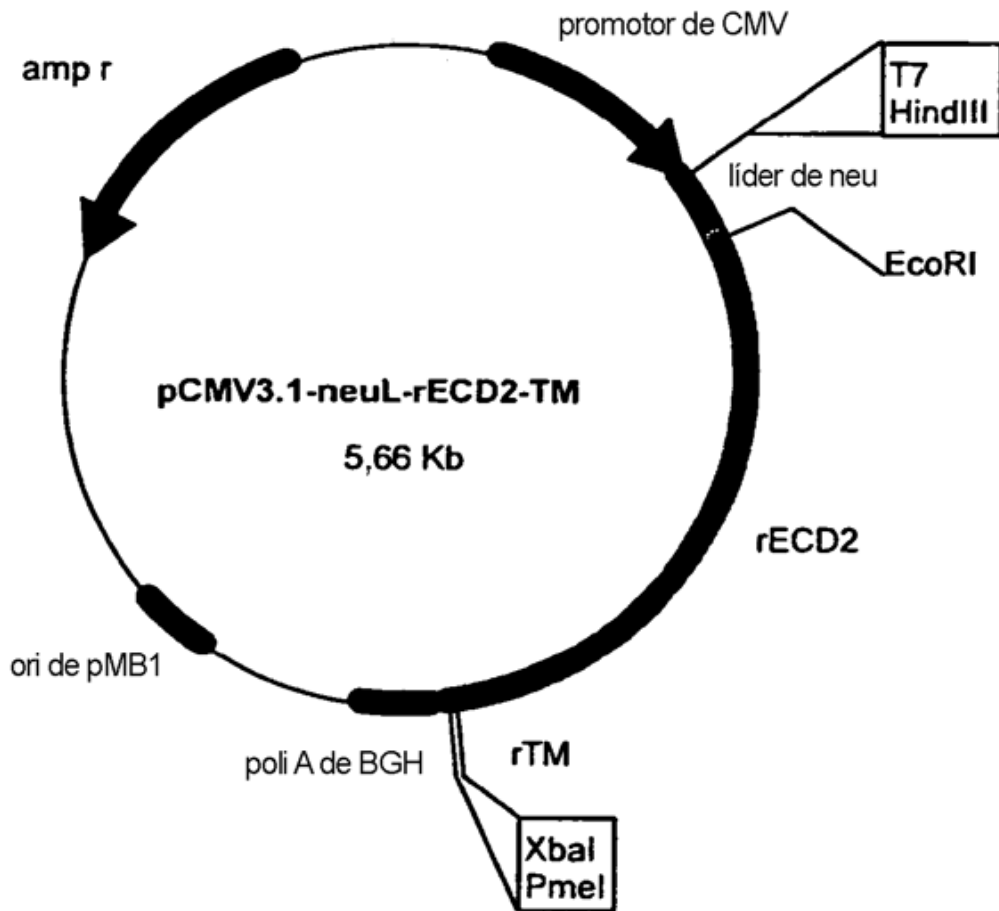
- 5 1. Vector de plásmido para la transferencia de ADN, plásmido que contiene una secuencia que consiste en SEQ ID N: 10 que codifica para una proteína p185<sup>neu</sup> quimérica.
2. Vector de plásmido según la reivindicación 1, que contiene además un promotor de la transcripción.
3. Vector de plásmido según la reivindicación 2, en el que dicho promotor es el promotor de CMV.
- 10 4. Vector de plásmido según las reivindicaciones 1-2, que es adecuado para su uso en mamíferos, particularmente en seres humanos.
- 5 15 5. Composición farmacéutica que contiene un vector de plásmido según las reivindicaciones 1-3, junto con excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables.
6. Composición según la reivindicación 5, que es adecuada para la administración parenteral.
7. Composición según la reivindicación 6 en forma de una disolución inyectable.
- 20 8. Composición según la reivindicación 5 en forma de una vacuna de ADN.
9. Uso de un vector de plásmido según las reivindicaciones 1-4 para la preparación de un agente terapéutico que va a usarse en la prevención o el tratamiento de sujetos en riesgo de desarrollar tumores positivos para p185<sup>neu</sup>, o pacientes que portan tumores primarios, metástasis o recidivas de tumores positivos para p185<sup>neu</sup>.
- 25 10. Uso según la reivindicación 9 para la preparación de una vacuna de ADN.



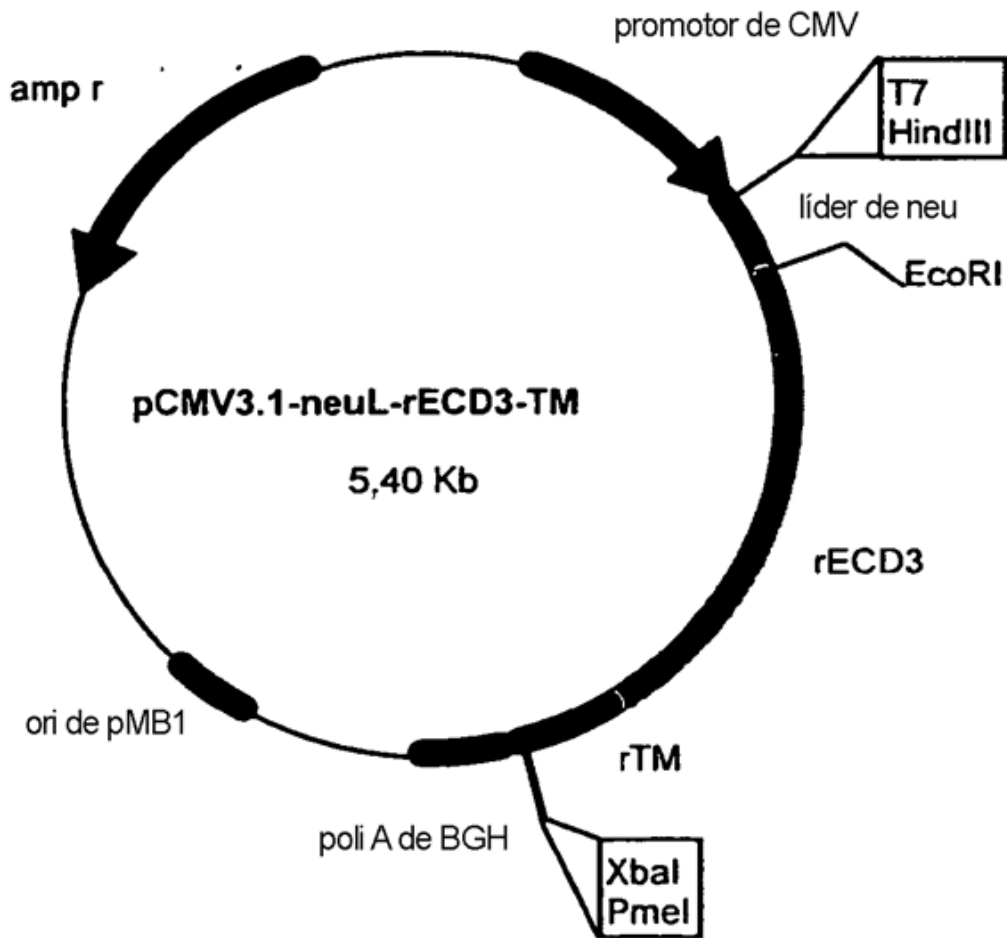
**Fig. 1**



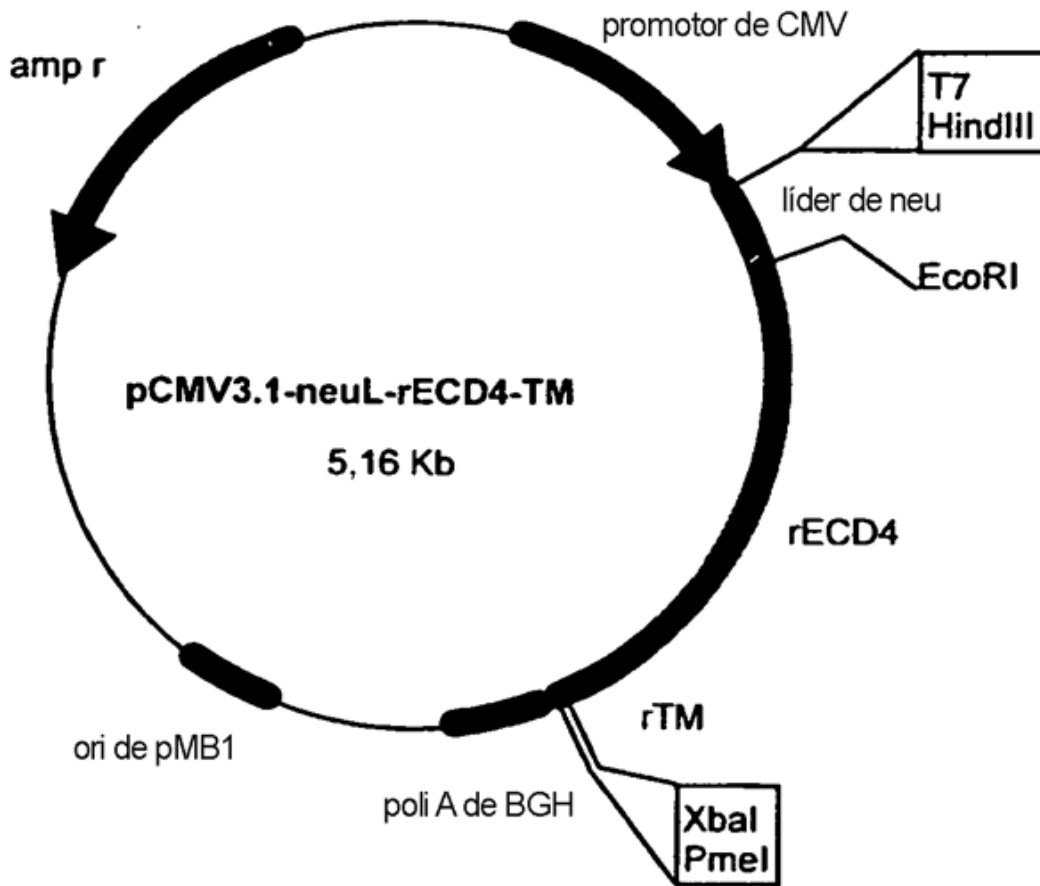
**Fig. 2**



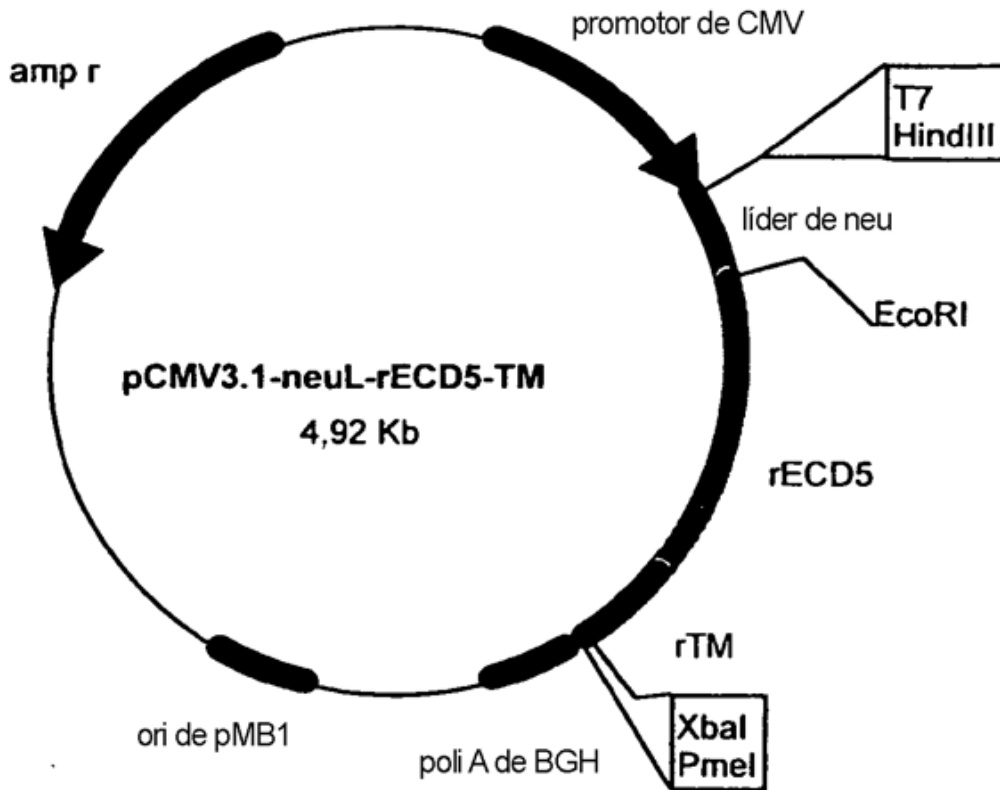
**Fig. 3**



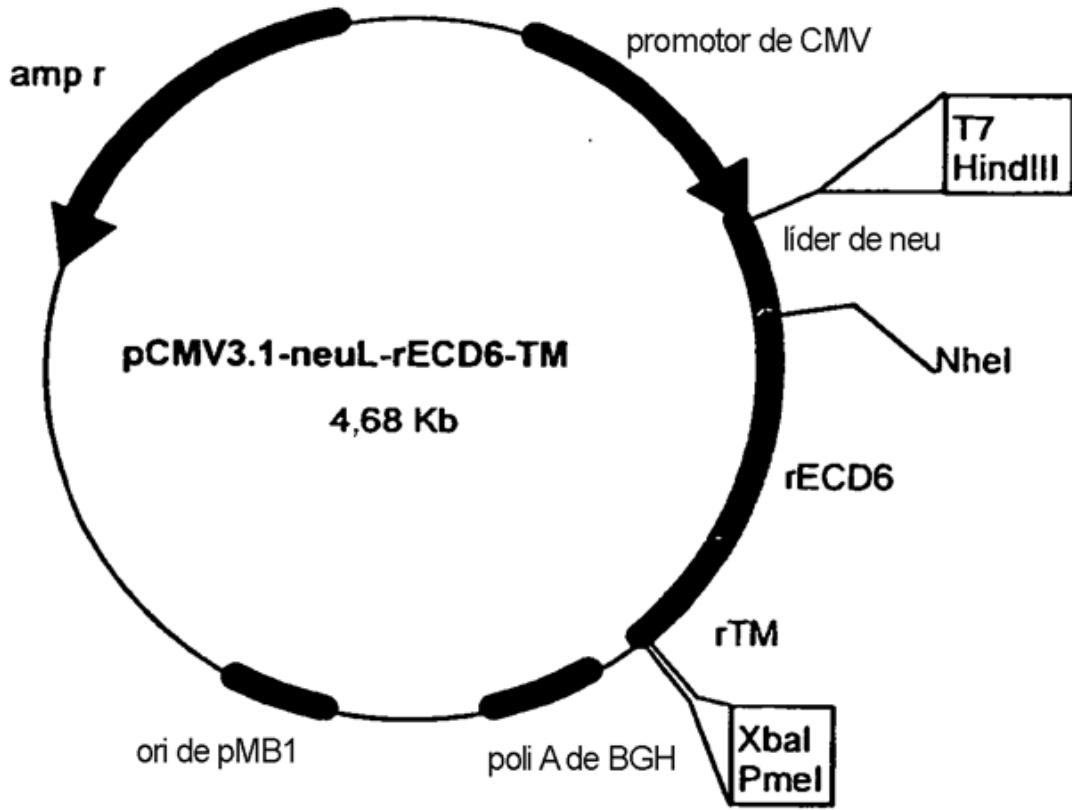
**Fig. 4**



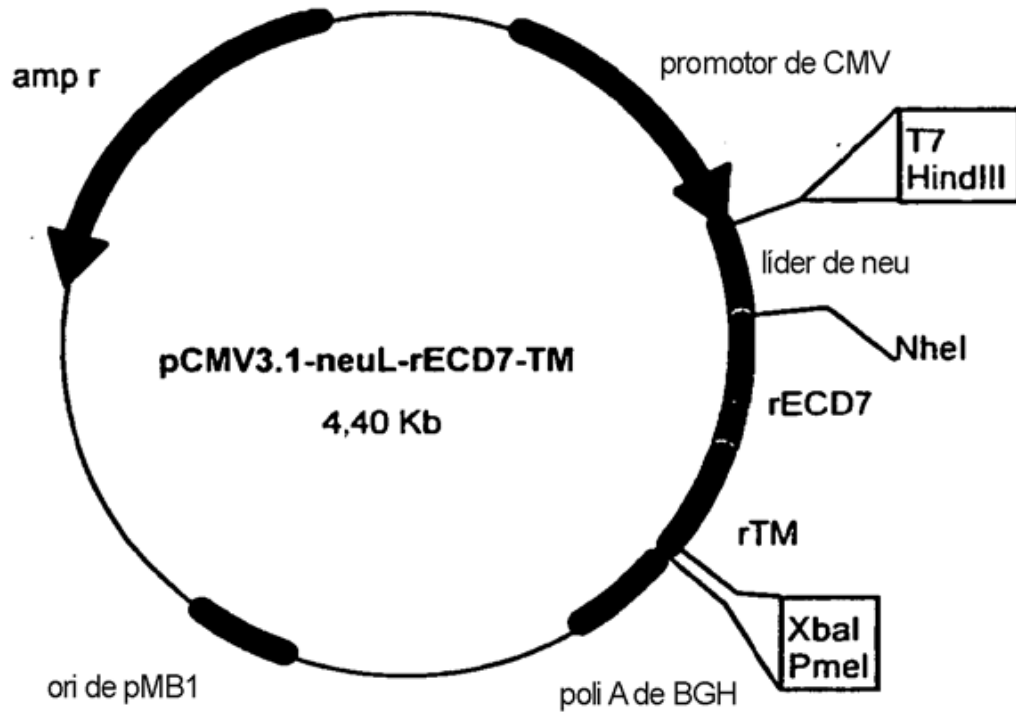
**Fig. 5**



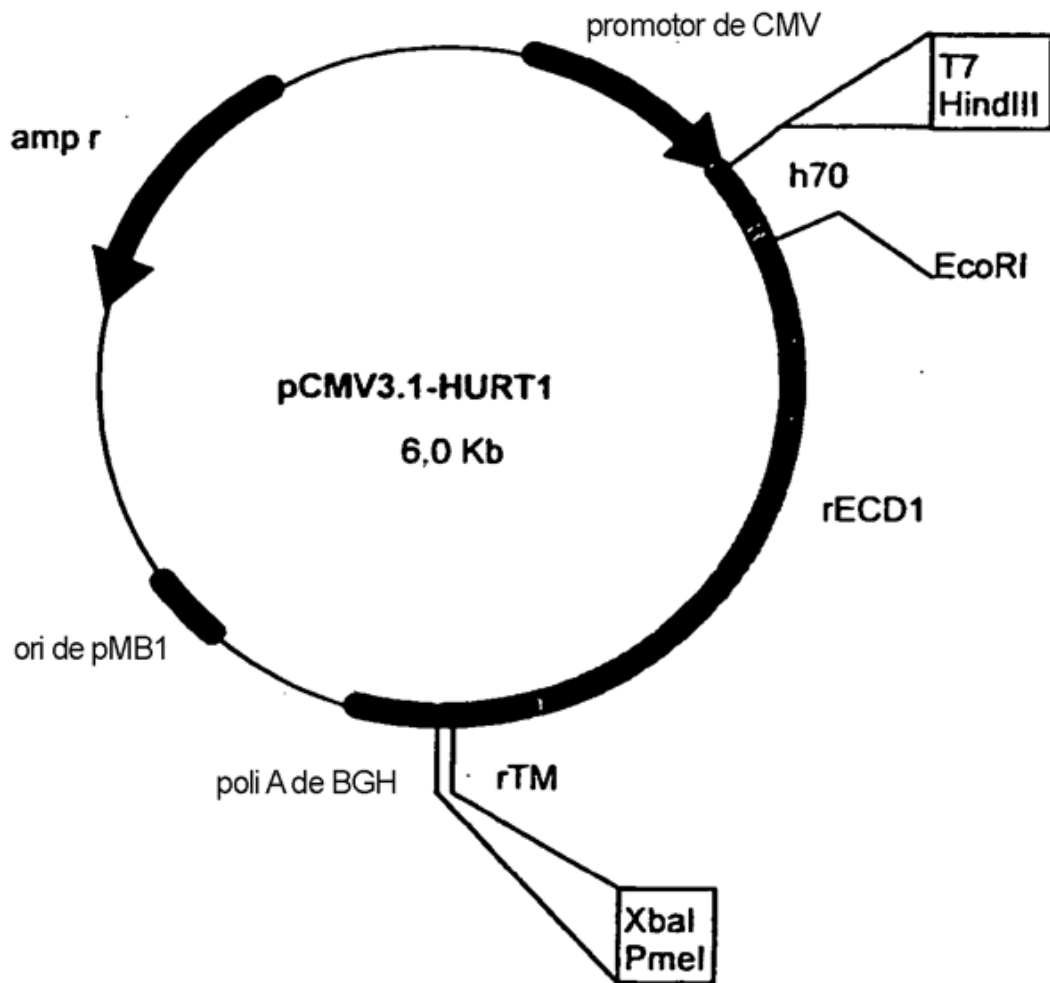
**Fig. 6**



**Fig. 7**

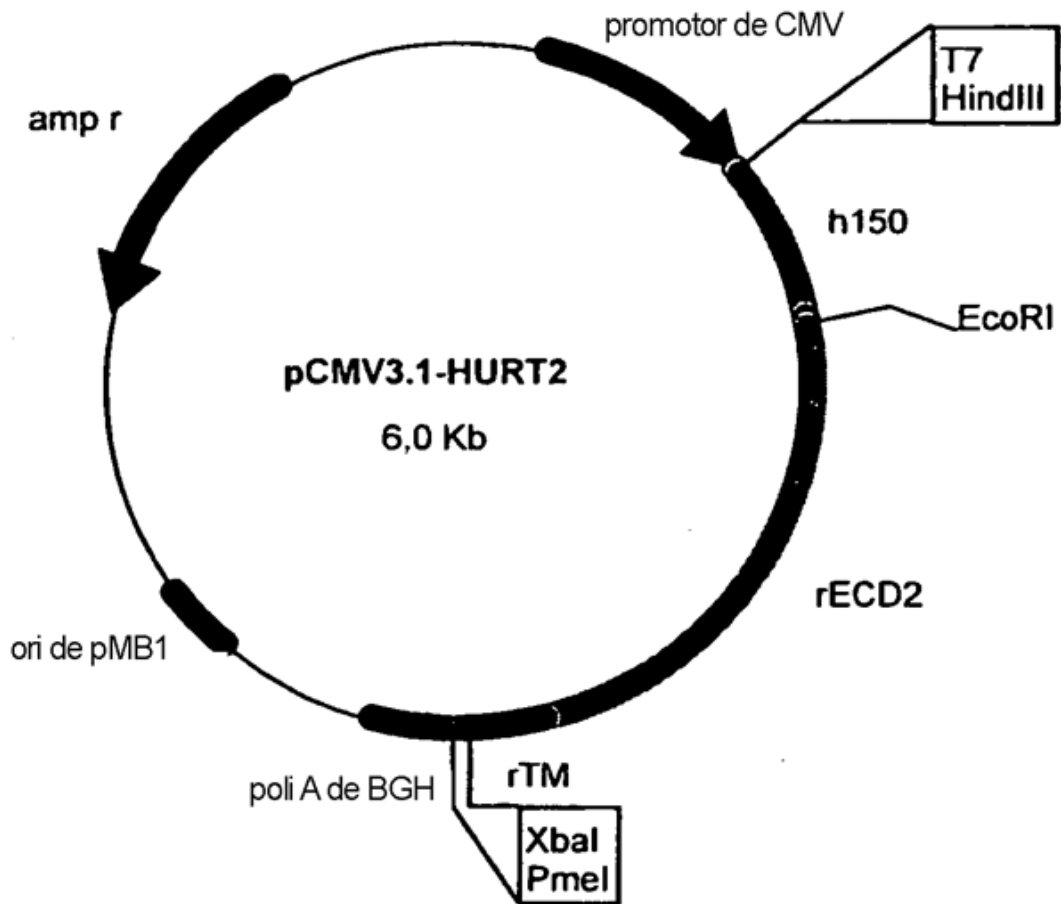


**Fig. 8**

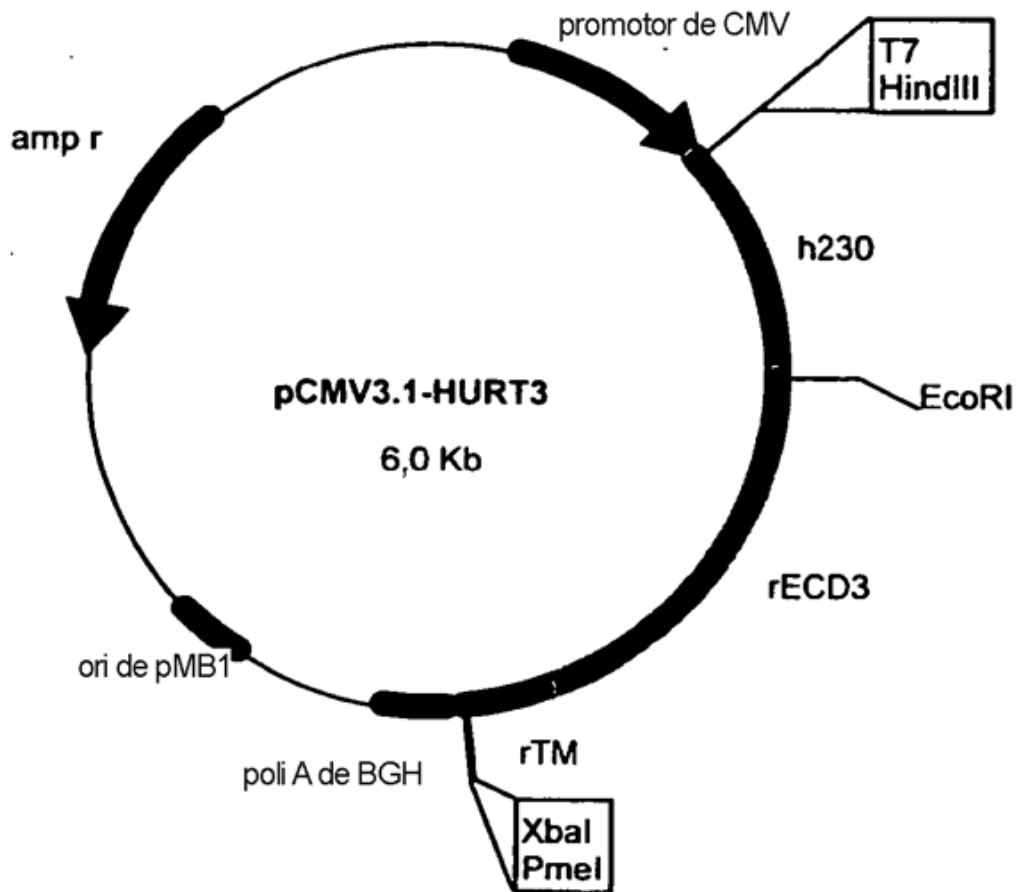




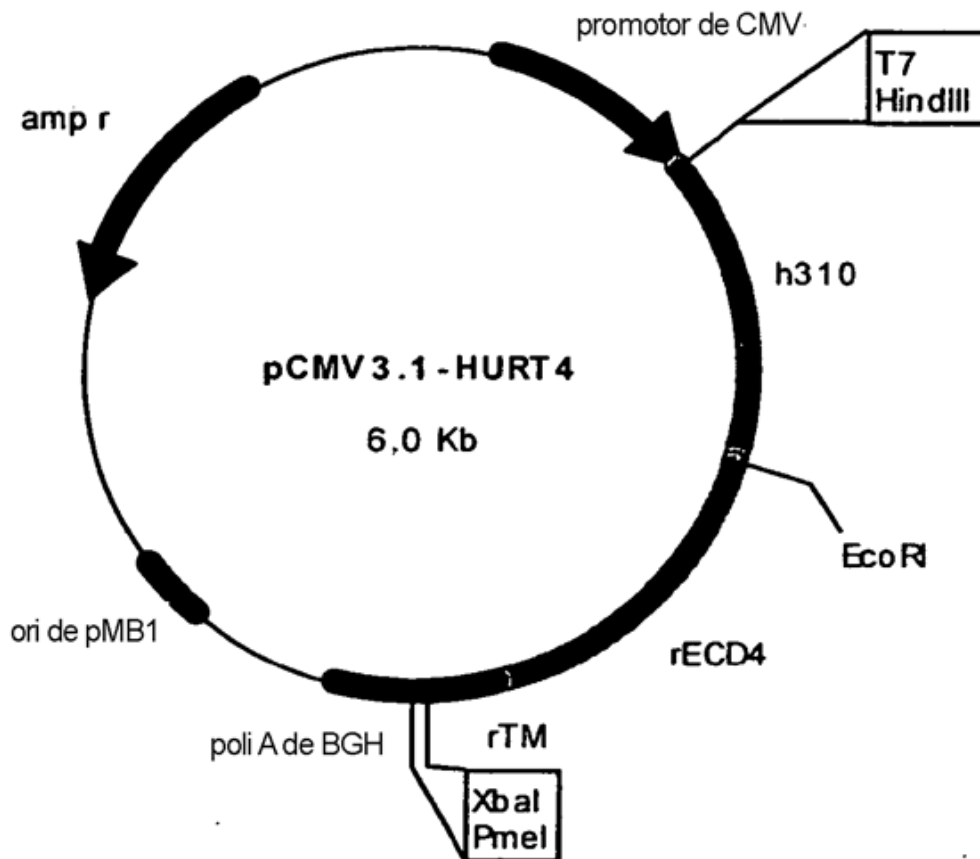
**Fig. 9**



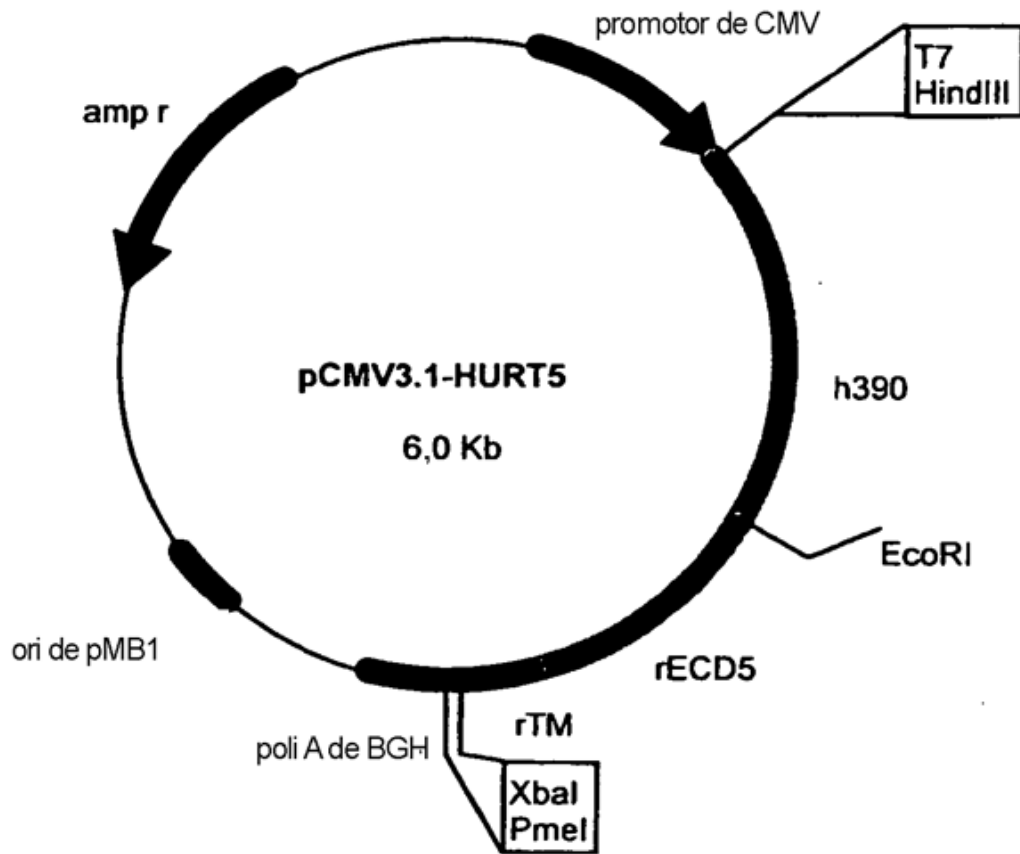
**Fig. 10**



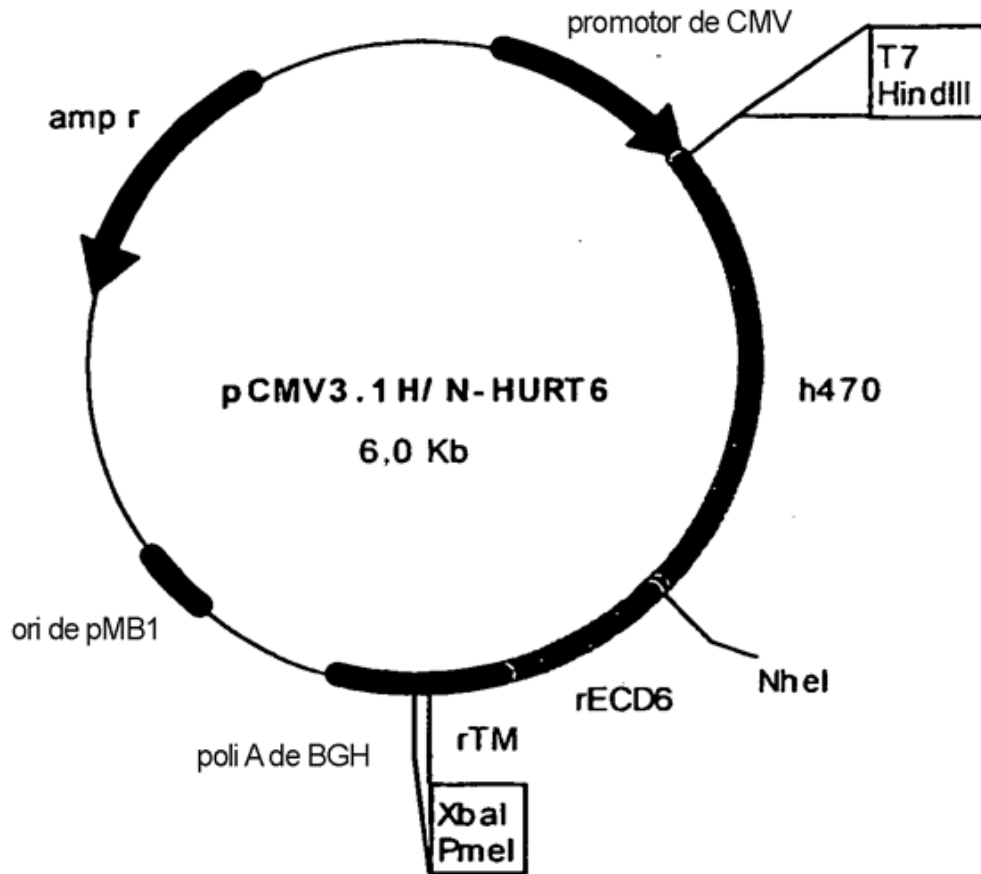
**Fig. 11**



**Fig. 12**



**Fig. 13**



**Fig. 14**

