

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 466**

51 Int. Cl.:
A61K 39/145 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07787493 .1**
96 Fecha de presentación: **13.07.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2049154**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.04.2009**

54 Título: **Plásmido con acción inmunológica**

30 Prioridad:
10.08.2006 EP 06118717

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.03.2012

73 Titular/es:
**INTERNATIONAL INVESTMENT AND PATENTS
SA
31, BOULEVARD GRANDE-DUCHESSE
CHARLOTTE
1331 LUXEMBOURG, LU**

72 Inventor/es:
GERLONI, Mara

74 Agente/Representante:
Morales Durán, Carmen

ES 2 377 466 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

Plásmido con acción inmunológica

5 El objeto de la presente invención está representado mediante un plásmido recombinante utilizable para la transfección de células eucariotas y procariotas, que tienen la secuencia SEC ID N° 1. Un objeto adicional de la invención está representado mediante el uso del plásmido mencionado anteriormente para la preparación de una formulación farmacéutica, o de una vacuna o un tratamiento terapéutico, para inducir una respuesta inmunitaria en un organismo humano.

10 En particular, se describe y se reivindica una secuencia de bases que se usan para la construcción de un plásmido que puede usarse:

15 - en un proceso de transfección de células procariotas o eucariotas (*ex vivo*) que pueden inocularse en organismos superiores para inducir una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica (por medio del plásmido 1 que tiene la secuencia SEC ID N° 1);

También se proporciona una descripción de un perfil de patologías que pueden tratarse con los plásmidos descritos.

20 Estado de la técnica

Puede usarse ADN de origen plasmídico para la transfección de células procariotas y eucariotas a través de métodos conocidos. Los plásmidos construidos para este fin están constituidos generalmente por un esqueleto que tiene unidades insertadas de material genético que codifican cierta proteína que puede estar o no provista de su propia actividad biológica.

25 Los plásmidos pueden ser de origen comercial, en los que una parte que porta la especificidad se introduce en una construcción estructural que ya se conoce y se usa, o generarse de forma autónoma, es decir, ensamblando fragmentos de material genético seleccionado en base a cierto perfil a reconstruir en el organismo al que está destinado el plásmido.

30 La síntesis de un plásmido es una operación de importancia fundamental para el fin de obtener las propiedades celulares deseadas. Los plásmidos determinan la eficacia de la transfección y de la síntesis de la proteína transgénica, y también la seguridad de la transfección y, por lo tanto, en el análisis final la eficacia resultante de la expresión proteica de la célula transfectada.

35 Un plásmido es un vector de datos genéticos que influyen en el ciclo celular de la célula huésped y, por consiguiente, el ciclo vital del organismo que aloja a estas células transfectadas: cuantos más datos se hayan introducido en el plásmido, más riesgos se corren durante la transfección.

40 Un plásmido se caracteriza por la especificidad de los datos contenidos: cuanto menos complejo sea, más fácil será su síntesis y más seguro será su uso.

45 Un plásmido ejerce la capacidad de transfectar una población celular de forma más o menos espontánea dependiendo del tipo de célula y las condiciones experimentales de contacto/incubación en las que se realiza la transfección. Cuanto más selectivo sea un plásmido para una población celular específica, más utilizable es en condiciones de seguridad.

50 Las condiciones en las que se realiza la transfección son decisivas para el éxito de la misma: la homogeneidad y la concentración de las células a transfectar, el tiempo y las condiciones de incubación, la posibilidad de monitorizar el fenómeno con métodos específicos y selectivos constituyen un corolario extremadamente importante para el éxito de la operación.

55 En el caso específico en el que un plásmido se usa para transfectar células a inyectar *in vivo* en pacientes, dichas células deben manipularse con extremo cuidado en la medida en que deben reinsertarse en el paciente, y no se pueden permitir fenómenos de riesgo y colaterales fatales: cuanto menos manipulación sea necesaria, mayor será la seguridad del método y más reproducible será el resultado.

60 A partir de lo anterior, es inevitable que el uso de un plásmido de dimensiones reducidas, especialmente si se combina con un método con manipulación limitada, sea una condición preferida en la transfección usada con fines profilácticos y terapéuticos.

65 El uso de un plásmido que codifica epítomos inmunógenos en un método de transfección autóloga es uno de los sistemas que pueden usarse para inducir una respuesta inmunitaria específica en algunas patologías caracterizadas por la aparición de agentes infecciosos, o por mutación celular espontánea o inducida (carcinogénesis), con modificación del ciclo apoptótico de una célula o línea celular seleccionada.

El documento WO 90/09804 describe inmunoglobulinas manipuladas genéticamente para expresar un epítipo peptídico predefinido en la región variable o en el dominio de unión de la inmunoglobulina.

- 5 El documento WO 00/61766 describe antígenos tumorales obtenidos de telomerisis que pueden usarse para generar una respuesta mediada por células T contra telomerisis y, por consiguiente, contra el propio tumor.

10 El documento WO 00/64488 describe un plásmido que codifica cadena pesada quimérica de una inmunoglobulina, el plásmido pN γ ₁V_H62, que se obtiene subclonando el gen murino V_H62 en el plásmido pN γ ₁, que contiene una secuencia que codifica una región constante γ ₁ humana. Este plásmido puede modificarse mediante la introducción de epítotos heterólogos en cualquiera de las regiones determinantes de la complementariedad de la región variable. Por lo tanto, se describe su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria.

15 Sin embargo, el plásmido pN γ ₁V_H62 contiene partes que serán perjudiciales si este plásmido se inyectara en seres humanos. Además, las dimensiones de este plásmido son tales que se obtiene un rendimiento de transfección muy bajo.

Descripción de la invención

20 Los inventores de la presente invención han desarrollado actualmente un plásmido que comprende una secuencia que codifica la cadena pesada de inmunoglobulina que no presenta las desventajas del plásmido pN γ ₁V_H62 cuando se usa para inducir una respuesta inmunitaria *in vivo* o *ex vivo* en un organismo humano. En particular, los plásmidos desarrollados tiene un mejor perfil de seguridad y muestran un mayor rendimiento cuando se transfectan en células.

25 Este plásmido tiene una longitud de 9727 pb y es capaz de expresar la cadena pesada de inmunoglobulina cuando se transfectan en linfocitos.

30 El plásmido expresa una cadena pesada quimérica de inmunoglobulina, que comprende preferiblemente una región variable murina y una región constante humana, preferiblemente Ig γ ₁.

35 La región variable murina es la región V_H del hibridoma 62 obtenido de esplenocitos de un ratón adulto hiperinmunizado (Zanetti et al., J. Immunol., 1983, 131: 2452), denominada en lo sucesivo en este documento región V_H62.

El hibridoma 62 de V_H62 secreta un anticuerpo monoclonal con actividad anti-tiroglobulina.

El gen de la región Ig γ ₁ se clona del vector pN γ ₁.

40 El plásmido contiene además un promotor específico para células linfocíticas, preferiblemente de aproximadamente 50 pb.

El plásmido de la invención también comprende la secuencia de poliadenilación AATAAA.

45 El plásmido de la invención no expresa resistencia a antibióticos betalactámicos y en particular a ampicilina, y/o no comprende un origen de replicación de SV40.

Por consiguiente, el plásmido contiene un origen de replicación de *Escherichia coli*, que es PBR322. Además, el plásmido expresa resistencia a neomicina.

50 El plásmido de la invención es el plásmido 1 que tiene una longitud de 9727 pb (SEC ID N° 1 y figura 1).

El plásmido descrito codifica una cadena pesada quimérica de inmunoglobulina.

55 El esqueleto del plásmido está representado mediante pSV2neo, un ADN de origen bacteriano que contiene el gen para resistencia a neomicina y el origen de replicación PBR322.

La secuencia genética que codifica la cadena pesada de inmunoglobulina está compuesta por:

- 60 - una región variable murina (V_H62) de aproximadamente 2,5 kb, originalmente clonada a partir de un hibridoma de ratón (hibridoma 62) que secreta un anticuerpo monoclonal con actividad anti-tiroglobulina (Sollazzo, et al., Eur. J. Immunol., 1989);
- una región constante de Ig γ ₁ humana que se obtiene del vector pN γ ₁ (Hybritech Corporation, San Diego, CA).

El promotor de inmunoglobulina del plásmido 1 es una parte integrante de V_H62. El gen para la resistencia a neomicina también otorga una resistencia a kanamicina para el crecimiento selectivo en células procariotas.

5 La secuencia de poliadenilación está en la posición 5178:5183 del plásmido y sigue a la región constante humana. La secuencia es la siguiente: AATAAA. El origen de replicación bacteriano es de *Escherichia coli* y está situado en la posición 8324:9264.

10 La característica particular del plásmido de la invención es que las regiones que determinan la complementariedad (CDR) de la proteína codificada pueden mutagenizarse con el fin de introducir epítomos en su interior (de 5 a 25 restos de aminoácidos) con propiedades antigénicas (Gerloni et al Nature Biotechnology 1997). Dichas propiedades hacen posible usar el plásmido en cuestión para inducir una respuesta inmunitaria específica por medio de una transfección *ex vivo* con el inóculo de células transfectadas de forma espontánea.

15 Por consiguiente, un objeto de la presente invención es el uso de un plásmido de la invención para la preparación de una formulación farmacéutica para la vacunación con ADN, en particular para inducir una respuesta inmunitaria en un organismo humano. Además, otro objeto de la invención es una formulación que contiene al menos el plásmido de acuerdo con la invención junto con excipientes y/o coadyuvantes farmacéuticamente aceptables.

20 La formulación de la invención puede usarse para fines profilácticos o terapéuticos.

La formulación de la invención puede usarse en particular en un organismo humano que está o estuvo afectado por:

25 - tumores pertenecientes a la familia de carcinomas y/o adenomas y/o sarcomas y/o lipomas y/o tumores sólidos y/o ascíticos, por carcinoma de próstata o pancreático, renal o pulmonar. Preferiblemente, en este caso dicho organismo está o estuvo afectado por la presencia de células tumorales que tienen en la superficie al menos un epítomo antigénico, cuya secuencia codificante está contenida en el plásmido.

30 - infecciones bacterianas, víricas, fúngicas y/o parasitarias. Un objeto adicional de la presente invención es un método para inducir una respuesta inmunitaria en un organismo humano. Dicho método comprendía la transfección de células procariotas y/o eucariotas *ex vivo* y la posterior inoculación de dichas células procariotas y/o eucariotas en dicho organismo humano. Preferiblemente, dichas células transfectadas pertenecen a la familia de linfocitos y se toman preferiblemente de los vasos periféricos de dicho organismo humano. La inoculación de las células procariotas y/o eucariotas en dicho organismo humano se realiza preferiblemente por medio de administración por inyección o transmucosal.

35 La proteína codificada por los plásmidos de la invención, como todas las inmunoglobulinas, posee 3 CDR, CDR1 con un sitio de restricción utilizable para la inserción de secuencias peptídicas AfIII, CDR2 con un sitio para NcoI y CDR3 con un sitio para Acc65I.

40 Es posible, por lo tanto, insertar en ellas diversas secuencias peptídicas capaces de provocar diversas respuestas inmunitarias tanto de tipo humoral (mediadas por células B) como del tipo mediado por células (mediado por células T CD4 y CD8); por ejemplo, es posible insertar al menos una única secuencia en cada CDR, para un total de tres secuencias capaces de provocar diversas respuestas inmunitarias; es posible además insertar una o más secuencias, opcionalmente fusionadas entre sí, en cada CDR.

45 Un ejemplo de inserción de epítomos antigénicos en las CDR se muestra en la figura 2.

Los epítomos antigénicos para los fines de la presente invención son: antígenos tumorales de telomerasis que son p540 (ILAKFLHWL), y pY572 (YLFFYRKSIV)

50 El producto transgénico codificado por el plásmido 1 es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 156.000 daltons (figura 3). La región pesada codificada es de naturaleza quimérica: parte humana (la región constante) y parte murina (la región variable). Sin embargo, la parte murina contiene secuencias homólogas al 80% con las regiones variables humanas.

55 Características importantes del plásmido mencionado anteriormente son la ausencia del gen para resistencia a ampicilina y la presencia del gen para resistencia a kanamicina que posibilita el uso seguro del mismo en sujetos con alergias potenciales a los antibióticos betalactámicos. Otro factor ventajoso es que la kanamicina es un antibiótico estable a 37°C (condiciones de cultivo del plásmido) durante 24-48 horas, mientras que la ampicilina es estable solamente durante 3-4 horas, permitiendo por consiguiente un rendimiento de cultivo del plásmido que es mayor (producción menos cara) y más estable.

60 El plásmido mencionado anteriormente también está desprovisto de secuencias "inútiles" (por ejemplo la secuencia SV40 o pedazos de material genómico) que representarían mayores riesgos de homología con el genoma de la célula huésped y, por lo tanto, mayores riesgos de integración en la propia célula.

65

Análisis del mapa de restricción del plásmido

El mapa de restricción obtenido mediante digestión con enzimas de restricción es el primer criterio a considerar para definir la identidad de un plásmido. En particular, el mapa mostrado en la figura 4 identifica de manera exclusiva al plásmido 1. También se muestra en sucesión una imagen de los fragmentos del plásmido 1 después de la digestión, el desplazamiento en gel de agarosa en paralelo con un patrón de dimensión conocida ("escalera" [*ladder*] de 1 Kb) para determinar su dimensión exacta. La secuencia del plásmido 1 se muestra en la SEC ID N° 1.

Caracterización biológica del plásmido

Ya se ha indicado anteriormente que un plásmido que codifica epítomos inmunógenos en un método de transfección es uno de los sistemas que pueden usarse para inducir una respuesta inmunitaria específica en algunas patologías caracterizadas por la aparición de agentes infecciosos, o por una mutación celular espontánea o inducida (carcinogénesis), con modificación del ciclo apoptótico de una célula o línea celular seleccionada.

Un uso adicional para dicho plásmido es la inyección directa *in vivo* en organismos inmuno-competentes para inducir una respuesta inmunitaria contra proteínas de una naturaleza extraña y microorganismos patógenos (Tang et al., Nature 1992, Ulmer et al., Science 1993, Gerloni et al., Nature Biotechnology 1997). En este campo, con la inoculación de genes funcionales, se demostró la inducción de respuestas humorales (mediadas por anticuerpos) y respuestas mediadas por células (mediadas por linfocitos T de tipo CD4 y CD8) eficaces en el tratamiento o la prevención de patologías de origen infeccioso y canceroso.

Por consiguiente, el concepto de inmunización génica es adoptado actualmente por vacunólogos en todo el mundo, que usan plásmidos que codifican antígenos obtenidos de bacterias, virus y parásitos y también de diversos tipos de tumores para provocar respuestas inmunitarias específicas y protectoras. Actualmente hay ensayos clínicos en curso para la terapia o profilaxis de VIH, herpes, gripe, gripe aviar, síndrome respiratorio agudo grave, hepatitis B y C y carcinomas de diversos tipos.

Los componentes esenciales de un plásmido a usar *in vivo* son el gen que codifica el antígeno (o pedazos del mismo) de interés, una secuencia promotora (normalmente obtenida de citomegalovirus, CMV) que guía la transcripción del antígeno y una región de poliadenilación que asegura la traducción del mismo.

Además, junto con el origen de replicación para la amplificación del plásmido en células bacterianas, también hay un gen que codifica resistencia a antibióticos para asegurar la selección de la población bacteriana y para eliminar la contaminación durante el cultivo.

Otra propiedad intrínseca de las vacunas de ADN es que los plásmidos de origen bacteriano contienen secuencias de citosina no metilada junto con restos de guanosina (CpG). Estas unidades de CpG tienen la capacidad de aumentar la capacidad inmunógena de los propios plásmidos y, por lo tanto, funcionan como adyuvantes.

La inoculación directa de ácidos nucleicos en células somáticas parece imitar la inmunidad inducida por infecciones naturales y ofrece diversas ventajas, incluyendo la posibilidad de producir y ensayar dichos plásmidos de manera económica, fácil y rápida. Además, los plásmidos son mucho más estables que las vacunas convencionales y pueden conservarse como liofilizados.

El plásmido se inocula habitualmente *in vivo* por vía intramuscular o intradérmica, aunque otras vías tales como las vías oral, vaginal, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea son aplicables. Los plásmidos se administran en diversos diluyentes que incluyen agua destilada, solución salina o soluciones glucosadas, tampones fisiológicos, compuestos de isotonicidad, sustancias conservantes o crioprotectoras en caso de que los procesos de liofilización sean necesarios.

La dosis de plásmido usada en los protocolos de inmunización varía de un caso a otro pero, por norma general, se usan cantidades de 25 a 200 µg por dosis con 3 dosis/inyecciones a intervalos de tres semanas.

El objeto de la presente invención está, por lo tanto, constituido por un plásmido recombinante caracterizado por una secuencia correspondiente a la SEC ID N° 1. Este plásmido tiene dimensiones que son reducidas pero adecuadas para el fin y un método de transfección que es adecuado, reproducible, seguro y eficaz.

El uso de dicho plásmido tiene características específicas:

- rendimiento óptimo en el proceso de producción, en la medida en que un plásmido de contenido medido es más sencillo de producir y da origen a mejores rendimientos de producción si tiene una amplitud reducida;
- estabilidad óptima del cultivo celular, dado que el plásmido contiene el gen para resistencia al antibiótico kanamicina estable a 37°C durante 24-48 horas (frente a ampicilina estable solamente durante 4-6 horas a la misma temperatura) la estabilidad del cultivo bacteriano aumenta por consiguiente de forma significativa, con indudables ventajas en términos de rendimiento;

- alta eficacia de transfección espontánea (capacidad de penetración en la célula) debido a dimensiones moleculares limitadas y menor volumen estérico, un detalle no despreciable en el caso de protocolos en los que está previsto el uso de transfección espontánea;
- 5 - la ausencia de la posibilidad de reacciones anafilácticas que puedan ser inducidas en los sujetos tratados, si están predispuestos a una reacción alérgica a ampicilina, en la medida en que el plásmido, que no posee el gen para resistencia a ampicilina, no crece en presencia de ese antibiótico;
- baja, si no nula, posibilidad de integración en el genoma de la célula huésped en la medida en que la cantidad mínima de plásmido usada para la transfección hace prácticamente despreciable el riesgo de integración (por consiguiente, posibilidad reducida de inducción de mutaciones oncógenas en la célula huésped);
- 10 - baja, si no nula, posibilidad de integración directa en el genoma de la célula huésped en la medida en que el plásmido no posee secuencias externas (tales como SV40) que podrían tener homologías con el genoma de la propia célula y representar mayores riesgos de integración;
- 15

Un objeto adicional de la presente invención está constituido por el uso de un método de transfección *ex vivo* sin el uso de medio físico o químico alguno que pudiera facilitar el proceso. Dicho método no induce alteraciones en la funcionalidad de las células transfectadas y no induce transformación genética de las mismas. El método se caracteriza por la separación del material celular específico a transfectar del resto de la parte corpuscular y de fluido de la sangre periférica, obtenible con procesos con menos manipulación que los métodos de centrifugado normales: el uso de aféresis hace posible separar un gran número de células linfocíticas en las cuales realizar transfección de una manera que sea indolora para el paciente y mucho más útil para fines experimentales. De hecho:

- 25 - no altera la funcionalidad de las células con choques gravitacionales o mecánicos;
- permite la recogida de gran número de células, que se usarán para el proceso y para mantenerlas almacenadas como referencia para la posterior fase de monitorización terapéutica;
- 30 - no agota los recursos funcionales y estructurales del paciente o sus procesos de coagulación o reparación;
- no añade ningún riesgo de contaminación del material biológico y/o del paciente.

Un objeto de la presente invención está constituido por el uso de un plásmido como se ha descrito para realizar la transfección *ex vivo* de células seleccionadas por medio de un proceso espontáneo con la adopción de las siguientes modalidades:

- 40 1. transferencia de la sangre periférica originaria de un paciente a un instrumento capaz de separar directamente la familia de linfocitos del resto de la fracción corpuscular y del suero (proceso de aféresis);
2. aislamiento de una cantidad de células linfocíticas adecuada para la aplicación del tratamiento descrito en lo sucesivo en este documento; a continuación transferencia de los linfocitos aislados y lavado con PBS (sin Ca^{++} ni Mg^{++}) y centrifugado adicional;
- 45 3. dilución 1:1 con azul triptano y recuento de los linfocitos mediante hemocitómetro y microscopio para verificar que han conservado al menos el 90% de la vitalidad;
4. re-suspensión de los linfocitos a una concentración de aproximadamente 20×10^6 células/ml en PBS (sin Ca^{++} ni Mg^{++}) y división de nuevo de una alícuota en placas con pocillos en forma de U, donde se añaden 25 μ g de un plásmido que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1;
5. incubación de las placas con los pocillos de transfección en una incubadora durante 30-90 minutos a 37°C y el 5% de CO_2 ;
- 50 6. transferencia de una alícuota adecuada de células tratadas con plásmido a un medio de cultivo adecuado y dejar incubar durante una noche;
7. verificación de que la viabilidad celular se mantiene por encima del umbral que se considera que es apropiado (típicamente el 70%) y cálculo de la dosis a transferir al paciente;
8. transferencia a una bolsa de fleboclisis de un volumen adecuado de células transfectadas que contiene la dosis a administrar de nuevo al paciente (típicamente variable desde pocos miles a varias decenas de millones de células);
- 55 9. en el alcance del tratamiento diseñado para generar una respuesta inmunitaria contra las células que expresan en la superficie las proteínas cuyos epítomos están contenidos en el plásmido, inoculación en el paciente de la sangre contenida en la bolsa, transgenizada por medio del uso del plásmido que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1.
- 60

Como alternativa al método descrito anteriormente, al aislamiento de los linfocitos a transfectar también puede realizarse mediante un método clásico basado en el centrifugado; en ese caso el tratamiento de aféresis descrito anteriormente en el punto 1 y el punto 2 puede sustituirse por el siguiente:

- 65 1. transferencia de la sangre periférica originaria de un paciente a tubos de ensayo, adición de tampón con

Ficoll y centrifugado hasta que los linfocitos se estratifiquen en una banda inconfundible;
 2. transferencia de los linfocitos aislados y lavado con PBS (sin Ca^{++} ni Mg^{++}) y centrifugado adicional.

5 El uso del plásmido de dimensiones reducidas y una población seleccionada de células como se ha descrito anteriormente hace posible obtener ventajas del proceso, tales como un tiempo reducido para la manipulación de la sangre y de su fracción linfocítica, un tiempo de incubación reducido, un rendimiento del proceso sustancialmente reproducible, la posibilidad de aplicar un alto grado de automatización a las diversas etapas del proceso y la posibilidad de realizar el proceso de transfección directamente dentro de un dispositivo aislado que no requiere la adopción de condiciones estériles del ambiente de trabajo fuera del propio dispositivo, que son requeridas por la manipulación de fluidos biológicos previstos para administración al ser humano.

15 Un objeto de la presente invención está constituido por el uso de un plásmido de dimensión limitada y caracterizado por la secuencia descrita, con un método de aislamiento del material al transfectar con manipulación reducida, con condiciones de transfección descritas para inducir respuestas inmunitarias en los pacientes tratados contra el agente responsable de la infección o la mutación, cuya huella específica a nivel secuencial y conformacional está contenida en el material genético representado en el plásmido.

20 Un objeto adicional de la presente invención está constituido por el uso de un dispositivo en el cual realizar la incubación del plásmido con las células, caracterizado por la presencia de un espacio en el cual alojar el volumen deseado de células, un orificio a través del cual insertar una aguja para depositar una solución del plásmido y otro orificio opcional a través del cual realizar el muestreo de las células transfectadas.

25 En una aplicación típica de la presente invención, el plásmido con la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1 se usa en una población de células linfocíticas separadas de la sangre mediante el método de aféresis; estas células transfectadas, después de la incubación en las condiciones normales usadas para fluidos biológicos, se vuelven a inyectar en un paciente para inducir un tipo de respuesta inmunitaria.

30 En una aplicación adicional de la presente invención, el plásmido construido como se ha descrito se usa en las condiciones descritas para transfectar una población de células linfocíticas recogidas por medio de aféresis o centrifugado de un paciente afectado por un tumor del páncreas, o de próstata, pulmón, riñón o piel, o afectado por algún otro tipo de tumor adenomatoso o carcinomatoso u otra forma tumoral, de forma sólida o ascítica, para inducir en el propio paciente una respuesta inmunitaria selectiva solamente contra las células cancerosas, que expresan de forma superficial la fracción proteica contenida en el plásmido y por aquellas a las que se les hace expresar los linfocitos, usadas como APC (células que presentan el antígeno).

35 Los plásmidos descritos se evaluaron para:

1. la capacidad de transfectar de forma espontánea linfocitos humanos;
- 40 2. la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria en ratones de laboratorio cuando se les inyectan células transfectadas *ex vivo*;

Los siguientes ejemplos pretenden ser puramente ilustraciones no limitantes de la invención.

45 El plásmido 1 se construyó de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Modificación del plásmido PSV2 neo
 - 50 - El plásmido PSV2 neo se digirió con las enzimas de restricción AhdI y XmnI para retirar el segmento de resistencia a ampicilina (amp^r)
 - PSV2 neo (amp^r menos) se digirió con BsmBI y HindIII para retirar el origen de replicación de SV40 (SV40)
 - 55 - PSV2 neo (amp^r y SV40 menos) se digirió con AatII y BstBI. Al final de este proceso se obtuvo un fragmento de 2737 pares de bases que contenía el origen de replicación de *E. coli* y el gen de resistencia a neomicina/kanamicina. Este fragmento se aisló a partir de gel de agarosa, se purificó en una columna y se mantuvo a 4°C hasta el posterior uso.
2. Modificación del plásmido $\gamma 1V_{H62}$
 - 60 - El plásmido $\gamma 1V_{H62}$ se digirió con las enzimas de restricción FseI y BamHI para retirar el segmento de 4787 pares de bases que codifica ADN genómico humano
 - 65 - El plásmido obtenido de este modo ($\text{ADN}^{\text{genómico}}$ menos) se circularizó con la nueva dimensión de 10721 pares de bases. Se digirió con AatII y BstBI y el fragmento que contenía la región variable y constante se purificó para la posterior reacción de ligamiento

3. Construcción del plásmido final 1

- El plásmido PSV2 neo (amp^r y SV40 menos) obtenido del pase 1 se digirió con AatII y BstBI.
- 5 - El plásmido modificado $\gamma 1V_{H62}$ ($\text{ADN}^{\text{genómico}}$ menos) obtenido del pase 2 se digirió con AatII y BstBI.
- Los dos plásmidos modificados digeridos de este modo se unieron juntos y se usaron para transfectar células competentes de *E. coli*.
- 10 - El ADN plasmídico extraído de las células de *E. coli* se usó a continuación para los ensayos de identificación por medio de PCR, mapa de restricción y secuenciación.

Los siguientes ejemplos pretenden ser puramente una ilustración no limitante de la invención.

15 **Ejemplo 1.**

Una alícuota de aproximadamente 50 ml de sangre periférica originaria de un paciente, con la adición de una alícuota adecuada de anticoagulante, se transfiere a tubos de 50 ml, se diluye a 1:1 con tampón, se añaden 20 ml de Ficoll-Paque™ y se realiza centrifugado durante 20 minutos a 2000 rpm.

20 Después del centrifugado, los linfocitos, contenidos en la banda de interfaz, se recogen y se transfieren a un nuevo tubo y se lavan 3 veces en PBS (sin Ca^{++} ni Mg^{++}) con recuperación mediante centrifugado.

25 Una alícuota de linfocitos se diluye a 1:1 en azul de triptano y se cuenta en un hemocitómetro con el microscopio para determinar su vitalidad (al menos el 90%).

30 Después del recuento, los linfocitos se resuspenden a una concentración de 20×10^6 células por ml en PBS y se dividen en alícuotas en placas provistas con pocillos con bases en forma de U. A continuación se añaden 25 μg de un plásmido, que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N° 1, y la placa se introduce en una incubadora durante 60-90 minutos a 37°C y el 5% de CO_2 .

35 Las células se diluyen a continuación a una concentración de 1×10^6 células por ml en medio de cultivo adecuado, se colocan en matraces dentro de una incubadora y se dejan durante una noche a 37°C y el 5% de CO_2 . Después de verificar que la vitalidad celular es superior al 70%, las células se lavan dos veces en solución salina, a continuación se calcula el número de células totales que contienen la dosis a inocular, correspondiente a un número de células variable de 10.000 a 100 millones y estas últimas se resuspenden a continuación en una bolsa de administración intravenosa, que a continuación se usa para la inoculación en el paciente.

40 Una alícuota de los linfocitos transfectados se ensaya antes del uso por medio de la extracción de ADN y ARNm en un ensayo de PCR anidada de tal manera que se evalúe la transfección de linfocitos que se ha producido y se de una cuantificación de los mismos, aunque sea aproximada.

45 La figura 6 muestra la amplificación con un ensayo de PCR del ADN de linfocitos humanos transfectados con ADN plasmídico. La "escalera" es la referencia para la determinación de la dimensión de los fragmentos amplificados. Los números se refieren al número de células amplificadas, y "virgen/vírgenes" (Naive) significa linfocitos no transfectados con ADN (control negativo). La figura demuestra la transfección de los linfocitos del paciente que ha tenido lugar, y por encima de todo denota su especificidad, en la medida en que no se amplifica ningún fragmento de linfocitos no sometidos a transfección.

50 **Ejemplo 2.**

Procediendo a partir de la suposición de que los linfocitos transfectados con un ADN que codifica secuencias antigénicas son capaces de provocar una respuesta inmunitaria después de la inoculación en animales de laboratorio y que el plásmido de la presente invención, mostrado en la SEC ID N° 1, codifica un epítipo capaz de provocar una respuesta celular por parte de los linfocitos T CD4, para verificar la actividad biológica de los linfocitos transfectados con ADN, se planificó un experimento para la verificación de la inmunogenicidad de dichos linfocitos *in vivo*, diseñado como se describe en lo sucesivo en este documento.

60 - a 4 ratones C57/B16 se les inocularon 5.000 linfocitos murinos transfectados con el plásmido como se ha descrito en el protocolo contenido en la presente invención. La inoculación se realizó por vía intravenosa en la vena caudal;

- 14 días después de la inoculación, los ratones fueron sacrificados y las células del bazo se usaron en un ensayo de proliferación en presencia del epítipo codificado por el plásmido usado para la transfección;

65 - los esplenocitos se cultivaron durante 72 horas con el epítipo de referencia, y a continuación se les añadió

timidina tritiada (un radioisótopo capaz de mostrar la proliferación celular);

- 5 - después de 18 horas, las células se recogieron y la radiactividad se midió con un contador de partículas beta. La proliferación se expresó como índice de estimulación (SI), que se calcula dividiendo los recuentos radiactivos en presencia del epítipo específico por los recuentos radiactivos en presencia de un epítipo no correlacionado (proliferación no específica). Convencional, un SI de más de 3 se considera positivo.

10 El experimento descrito anteriormente muestra una respuesta inmunitaria específica inducida en ratones cuando se inmunizan con linfocitos transfectados con el ADN plasmídico, demostrando una clara propiedad biológica de los mismos cuando se usan en un ensayo *in vivo*.

LISTA DE SECUENCIAS

- 15 <110> European Patent and Investments
<120> Plásmidos que tienen acción inmunológica
- 20 <130> 06fb47e
<160> 1
<170> PatentIn versión 3.3
- 25 <210> 1
<211> 9727
<212> ADN
<213> Artificial
- 30 <220>
<223> plásmido que tiene acción inmunológica
<400> 1

ES 2 377 466 T3

aattcttcag atacaaagaa tctctaaacc ctgaggacat tctatcacia ataagtaaaa 60
ttcagaaaaat tctgaatgct cccatcacag agatgaatct gctatgaaca gctcataggt 120
gtgaagctct acaaaagcca tattattgaa aagccacatt gtgcccagac tttggaaaga 180
ctgagctcat atcctgaaat acagttatgt gtggttctat ctaattacac atttacacta 240
aggaacatg gcagtatggg aatgaagctt gttctgtaca cattaacaga gggaaactaa 300
acaaagtatg gtgaatccct aacccaaaagt aaaaaaaaaa aaaaaaaaga aaagaaaaga 360
aaaaaaaaagt gaaactacaa tatgtttcaa atgctgtaac tgaaatctgg ttttttgatg 420
ccttataatct gttatcatca gtgacttcag atttagtcca actccagagc atggtatagc 480
aggaagacat gcaaataggt cttctctgtg cccatgaaaa acacctcggc cctgaccctg 540
cagctctgac agaggaggcc tgtcctggat tcgattcca gttcctcaca ttcagtgatc 600
agcactgaac acagaccctt caccatgaac ttcgggctca gattgatttt ccttgtcctt 660
gttttaaaag gtaatttatt gagaatagag gacatctgtt gtatgcacag aggtacagaa 720
aaaatgttgt ttgttttttt tagtgacaat tttccaaaca gtattctttc tttgcagggtg 780
tcctgtgtga cgtgaagctc gtggagtctg ggggaggctt agtgaagctt ggagggtccc 840
tgaaactctc ctgtgcagcc tctggattca ctttcagtag gtattacatg tattacctat 900
tcttctacag aaagtcagtc atcatgtctt gggttcgcca gactccagag aagaggctgg 960
agttggtcgc agccattaat agtaatggcc atggtaatgc aaacccaaat gtagatccca 1020
atgccaaccc acatggtagc acctactatc cagacactgt gaagggccga ttcaccatct 1080
ccagagacaa tgccaaaaac accctgtacc tgcaaatgag cagtctgaag tctgaggaca 1140
cagccttgta ttactgtgca agaaaggtag aatcctggc caagttcctg cactggctgg 1200
taccctactc tcatggtagt gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc gtctcctcag 1260
gtaagaatgg cctctccagg tctttatfff taacctttgt tatggagttt tctgagcatt 1320
gcagactaat cttggatatt tgtccctgag ggagccggct gagagaagtt gggaaataaa 1380
ctgtctaggg atctcagagc ctttaggaca gattatctcc acatttttga aaaactaaga 1440

ES 2 377 466 T3

atctgtgtga tgggtgttggg ggagtcctcg gatgatggga tagggacttt ggaggctcat 1500
ttgagggaga tgctaaaaca atcctatggc tggagggata gttggggctg taattggaga 1560
ttttcagttt ttagaataaa agtattagct gcggaatata cttcaggacc acctctgtga 1620
cagcatttat acagtatccg atgcataggg acaaagagtg gagtggggca ctttctttag 1680
atctgtgagg aatgttccac actagattgt ttaaaacttc atttgttga aggagagctg 1740
tcttagtgat tgagtcaagg gagaaaggca tctaggctcg gtctcaaaag ggtagtgtct 1800
gtctagagag gtctggtgga gcctgcaaaa gtccagcttt caaaggaaca cagaagtatg 1860
tgtatggaat attagaagat gttgctttta ctcttaagtt ggttcctagg aaaaatagtt 1920
aaatactgtg actttaaaat gtgagagggt tttcaagtac tcattttttt aaatgtccaa 1980
aatTTTTgtc aatcaatttg aggtcttgtt tgtgtagaac tgacattact taaagtttaa 2040
ccgaggaatg ggagtgaggc tctctcatac cctattcaga actgactttt aacaataata 2100
aattaagttt aaaatatattt taaatgaatt gagcaatgtt gagttggagt caagatggcc 2160
gatcagaacc agaacacctg cagcagctgg caggaagcag gtcattgtggc aaggctatTT 2220
ggggaagggga aaataaaaacc actaggtaaa cttgtagctg tggtttgaag aagtggTTTT 2280
gaaacactct gtccagcccc accaaaccga aagtccaggc tgagcaaaac accacctggg 2340
taatttgcatt tcttaaaata agttgaggat tcagccgaaa ctggagaggt cctcttttaa 2400
cttattgagt tcaacctttt aatttttagct tgagttagttc tagtttcccc aaacttaagt 2460
ttatcgactt ctaaaatgta tttagaattc atttcaaaa ttaggttatg taagaaattg 2520
aaggacttta gtgtctttta tttctaatat atttagaaaa cttcttaaaa ttactctatt 2580
attcttccct ctgattattg gtctccattc aattcttttc caatacccga agcatttaca 2640
gtgactttgt tcatgatctt ttttagttgt ttgttttgcc ttactattaa gactttgaca 2700
ttctggtcaa aacggcttca caaatctttt tcaagaccac tttctgagta ttatttttag 2760
gagaaatact ttttttttaa atgaatgcaa ttatctagac ttatttcggt tgaacatgct 2820
ggttggtggt tgagaggaca ctcagtcagt cagtggcgtg aagggcttct aagccagtcc 2880
acatgctctg tgtgaactcc ctctggccct gcttattgtt gaatgggcca aaggtctgag 2940
accaggctgc tgctgggtag gcctggactt tgggtctccc acccagacct gggaatgtat 3000
ggttgtggct tctgccaccc atccacctgg ctgctcatgg accagccagc ctcggtggct 3060
ttgaaggaac aattccacac aaagactctg gacctctccg aaaccaggca cgcgaaatgg 3120
taagccagag gcagccacag ctgtggctgc tgctcttaaa gcttgtaaac tgtttctgct 3180
taagagggac tgagtcttca gtcattgctt tagggggaga aagagacatt tgtgtgtctt 3240
ttgagtaccg ttgtctgggt cactcaggtc gaccggtcga ccccaggcct gaccttggct 3300
ttggggcagg gagggggcta aggtgaggca ggtggcgcca gccaggtgca cacccaatgc 3360
ccatgagccc agacactgga cgctgaacct cgcggacagt taagaacca ggggcctctg 3420
cgccctgggc ccagctctgt cccacaccgc ggtcacatgg caccacctct cttgcagcct 3480

ES 2 377 466 T3

ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc tctgggggca 3540
 cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga 3600
 actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccggc tgtcctacag tcctcaggac 3660
 tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca 3720
 tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaagggtgga caagaaagt ggtgagaggc 3780
 cagcacaggg agggaggggtg tctgctggaa gccaggctca gacgactcct gcctggacgc 3840
 atccccggcta tgcagcccca gtccagggca gcaaggcagg ccccgtctgc ctcttcaccc 3900
 ggaggcctct gcccgcccc ctcatgctca gggagaggggt cttctggctt tttccccagg 3960
 ctctgggcag gcacaggcta ggtgccccta acccaggccc tgcacacaaa ggggcagggtg 4020
 ctgggctcag acctgccaa agccatatcc gggaggaccc tgcccctgac ctaagccac 4080
 cccaaaggcc aaactctcca ctccctcagc tcggacacct tctctctcc cagattccag 4140
 taactcccaa tcttctctct gcagagccca aatcttgtga caaaactcac acatgccac 4200
 cgtgcccagg taagccagcc caggcctcgc cctccagctc aaggcgggac aggtgcccta 4260
 gagtagcctg catccagggc caggccccag ccgggtgctg acacgtccac ctccatctct 4320
 tcctcagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccc aaacccaag 4380
 gacaccctca tgatctccc gaccctgag gtcacatgcg tgggtgggga cgtgagccac 4440
 gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa 4500
 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 4560
 ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc 4620
 ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaaggtg ggaccctgg ggtgcgaggg 4680
 ccacatggac agaggccggc tcggccccacc ctctgccctg agagtgaccg ctgtaccaac 4740
 ctctgtccct acagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga 4800
 tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga 4860
 catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc 4920
 cgtgctggac tccgacggct cttcttctct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag 4980
 gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta 5040
 cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgagtg cgacggccgg caagccccg 5100
 ctccccgggc tctcgcggtc gcacgaggat gcttggcacg taccctgt acatacttcc 5160
 cgggcgcccc gcatggaaat aaagcaccca gcgctgccct gggcccctgc gagactgtga 5220
 tggttctttc cacgggtcag gccgagtctg aggcctgagt ggcagtaggg aggcagagcg 5280
 ggtcccactg tccccacact ggcccaggct gtgcagggtg gcctgggccg cctaggggtg 5340
 ggctcagcca ggggctgccc tcggcaggggt gggggatttg ccagcgtggc cctccctcca 5400
 gcagcacctg ccctgggctg ggccacggga agccctagga gccctgggg acagacacac 5460
 agcccctgcc tctgtaggag actgtcctgt tctgtgagcg ccctgtctc cgacctccat 5520

ES 2 377 466 T3

gccactcgg gggcatgcct agtccatgtg cgtagggaca ggcctccct cacccatcta 5580
 cccccacggc actaaccct ggctgccctg cccagcctcg cacccgcatg gggacacaac 5640
 cgactccggg gacatgcact ctcgggccct gtggagggac tggcagat gccacacac 5700
 aactcagcc cagaccgtt caacaaacc cgcactgagg ttggccgga tccagacatg 5760
 ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt 5820
 atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaaca 5880
 gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggaggt gtgggaggtt 5940
 ttttaaagca agtaaacct ctacaaatgt ggtatggctg attatgatct ctagtcaagg 6000
 cactatacat caaatattcc ttattaacc ctttacaat taaaagcta aaggtaacaca 6060
 atttttgagc atagttatta atagcagaca ctctatgcct gtgtggagta agaaaaaaca 6120
 gtatgttatg attataactg ttatgcctac ttataaagggt tacagaatat tttccataa 6180
 ttttcttga tagcagtga gctttttcct ttgtggtgta aatagcaaag caagcaagag 6240
 ttctattact aaacacagca tgactcaaaa aacttagcaa ttctgaagga aagtccttg 6300
 ggtcttctac ctttctcttc tttttggag gagtagaatg ttgagagtca gcagtagcct 6360
 catcatcact agatggcatt tcttctgagc aaaacagggt ttctcatta aaggcattcc 6420
 accactgctc ccattcatca gttccatagg ttggaatcta aaatacaca acaattagaa 6480
 tcagtagttt aacacattat aacttaaaa attttatatt taccttagag ctttaaatct 6540
 ctgtaggtag tttgtccaat tatgtcacac cacagaagta aggttccttc acaaatcc 6600
 ggaccaaagc ggccatcgtg cctccccact cctgcagttc gggggcatgg atgcgcggat 6660
 agccgctgct ggtttcctgg atgccgacgg atttgactg ccggtagaac tccgcgaggt 6720
 cgtccagcct caggcagcag ctgaaccaac tcgcgagggg atcgagccc ggggaggcga 6780
 agaactccag catgagatcc ccgcgctgga ggatcatcca gccggcgtcc cggaaaacga 6840
 ttccgaagcc caaccttca tagaaggcgg cgggtggaatc gaaatctcgt gatggcaggt 6900
 tgggcgctgc ttggtcggtc atttcgaacc ccagagtccc gctcagaaga actcgtcaag 6960
 aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaatc gggagcggcg ataccgtaa gcacgaggaa 7020
 gcggtcagcc cattcgcgc caagctcttc agcaatatca cgggtagcca acgctatgct 7080
 ctgatagcgg tccgccacac ccagccggcc acagtcgatg aatccagaaa agcggccatt 7140
 ttccaccatg atattcggca agcaggcatc gccatgggtc acgacgagat cctcgcctc 7200
 gggcatgcgc gccttgagcc tggcgaacag ttcggctggc gcgagcccct gatgctcttc 7260
 gtccagatca tctgatcga caagaccggc ttccatccga gtacgtgctc gctcagatgcg 7320
 atgtttcgct tgggtggtcga atgggcaggt agccgatca agcgtatgca gccgccgat 7380
 tgcatcagcc atgatggata ctttctcggc aggagcaagg tgagatgaca ggagatcctg 7440
 cccccgact tcgccaata gcagccagtc cttcccgtc tcagtgaca cgctcagcac 7500
 agctgcgcaa ggaacgcccg tcgtggccag ccacgatagc cgcgctgcct cgtcctgcag 7560

ES 2 377 466 T3

ttcattcagg gcaccggaca ggtcggctctt gacaaaaaga accgggccc cctgcgctga 7620
 cagccggaac acggcggcat cagagcagcc gattgtctgt tgtgccagt catagccgaa 7680
 tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc tgcgtgcaat ccatcttggt caatcatgcy 7740
 aaacgatcct catcctgtct cttgatcaga tcttgatccc ctgcgccatc agatccttgg 7800
 cggcaagaaa gccatccagt ttactttgca gggcttccca accttaccag agggcgcccc 7860
 agctggcaat tccggtcgc ttgctgtcca taaaaccgcc cagtctagct atcgccatgt 7920
 aagcccactg caagctacct gctttctctt tgcgcttgcy tttcccttg tccagatagc 7980
 ccagtagctg acattcatcc ggggtcagca ccgcttctgc ggactggctt tctacgtgtt 8040
 ccgcttctt tagcagccct tgcgccctga gtgcttgcy cagcgtgatc ccggagacgg 8100
 tcacagcttg tctgtaagcy gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg 8160
 gtgttggcgg gtgtcggggc gcagccatga cccagtcagc tagcgtatagc ggagtgtata 8220
 ctggcttaac tatgcccgcag cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcggtgtga 8280
 aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgctcttccg cttcctcgtc 8340
 cactgactcy ctgcgctcgg tcyttcggct gcggcgagcy gtatcagctc actcaaagcy 8400
 ggtaatagcy ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagcy 8460
 ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaagcy cgcgttgctg gcgttttcc ataggctccg 8520
 cccccctgac gagcatcaca aaaatcgagc ctcaagtcag aggtggcga acccgacagcy 8580
 actataaaga taccagcgt tccccctgg aagctcctc gtgcgctctc ctgttccgac 8640
 cctgccgctt accggatacc tgtccgctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgttttctca 8700
 tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcgggt gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt 8760
 gcacgaacc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc 8820
 caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag 8880
 agcaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac 8940
 tagaaggaca gtatttgga tctgcgctct gctgaagcca gttacctc gaaaaagagt 9000
 tggtagctct tgatccggca aacaaccac cgtggtagc ggtggtttt ttgtttgcaa 9060
 gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg 9120
 gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggctatga gattatcaaa 9180
 aaggatctt acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat 9240
 atatgagtaa acttggctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc 9300
 gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccg tttctcggg cgaaaactct 9360
 caaggatctt accgctggtg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat 9420
 cttcagcatc ttttactttc accagcgtt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg 9480
 ccgcaaaaaa ggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttccttttc 9540
 aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta 9600

ES 2 377 466 T3

tttagaaaaa	taaacaata	ggggttccgc	gcacatttcc	ccgaaaagtg	ccacctgacg	9660
tctaagaaac	cattattatc	atgacattaa	cctataaaaa	taggcgtatc	acgaggccct	9720
ttcgtcg						9727

REIVINDICACIONES

1. Un plásmido recombinante que tiene la secuencia SEC ID N° 1.
- 5 2. Una formulación que contiene el plásmido de acuerdo con la reivindicación 1, junto con excipientes y/o coadyuvantes farmacéuticamente aceptables.
3. El plásmido de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria en un organismo humano, uso que comprende tomar linfocitos de los vasos periféricos de dicho organismo humano; 10 transfectar *ex vivo* dichos linfocitos con dicho plásmido; e inocular los linfocitos transfectados en dicho organismo humano.
4. El plásmido de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque dicho organismo humano está o estuvo 15 afectado por tumores pertenecientes a la familia de carcinomas y/o adenomas y/o sarcomas y/o lipomas y/o tumores sólidos y/o ascíticos, por carcinoma de próstata o pancreático, renal o pulmonar.
5. El plásmido de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque dicho organismo humano está o estuvo afectado por infecciones bacterianas, víricas, fúngicas y/o parasitarias.
- 20 6. El plásmido de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque dicho organismo humano está o estuvo afectado por la presencia de células tumorales que tienen en la superficie al menos un epítipo antigénico, cuya secuencia codificante está contenida en dicho plásmido.

Figura 2. Representación esquemática de un modelo de inserción de epítomos en las CDR del plásmido

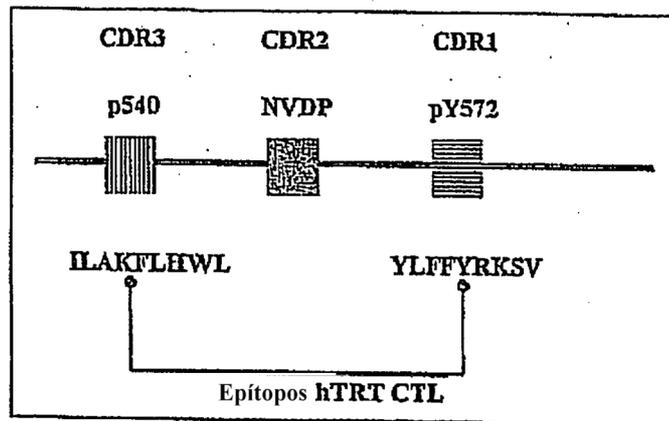


Figura 3. Estructura hipotetizada de una proteína con epítomos antigénicos que es codificada por el plásmido descrito.

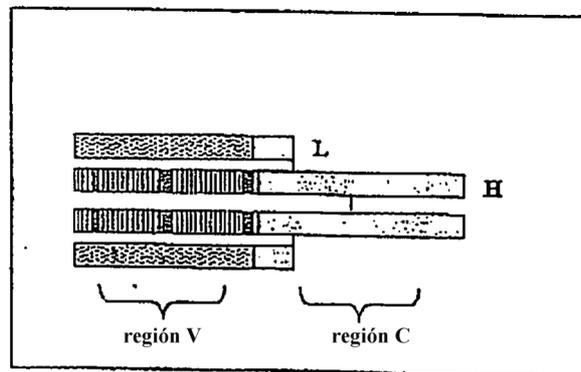
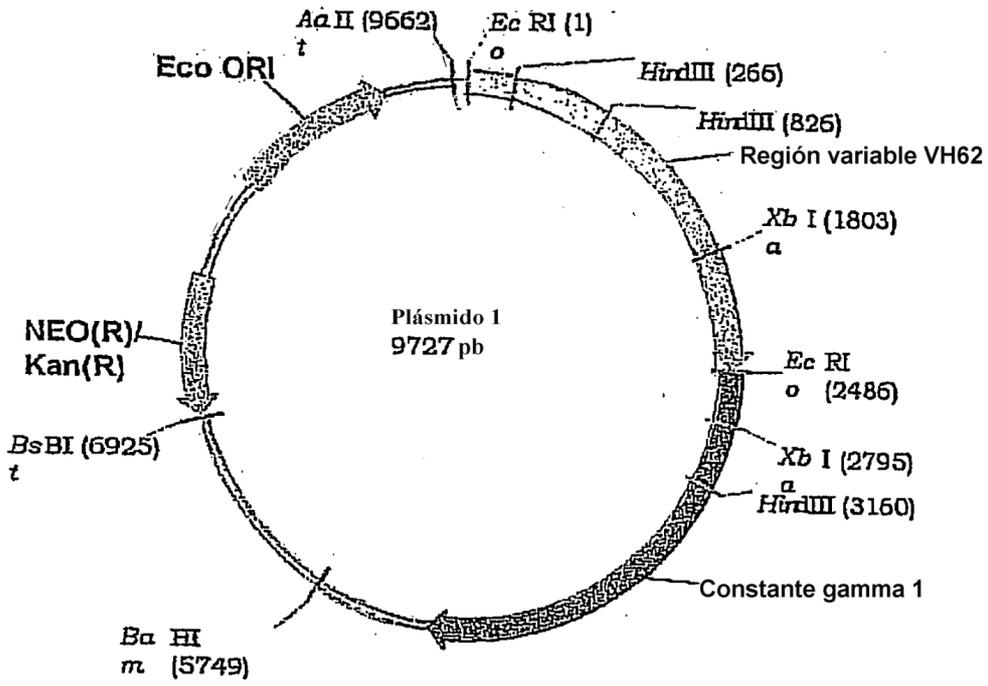


Figura 1. Mapa del plásmido 1



5

- 1-2483 pb Segmento que codifica la región variable vh62
- 2484-5077 pb Segmento que codifica la región constante $\gamma 1$
- 6943-7737 pb Segmento que codifica el gen para resistencia a neomicina
- 9324-9267 pb origen de replicación de *E. coli*

10

Figura 4. Mapa de restricción del plásmido

Enzima de restricción	Fragmentos originados Plásmido 1
EcoRI	2,5 kb + 7,2 kb
XbaI	1 kb + 8,7 kb
BamHI	9,7 kb
HindIII	0,5 kb + 2,4 kb + 4,9 kb + 1,9 kb

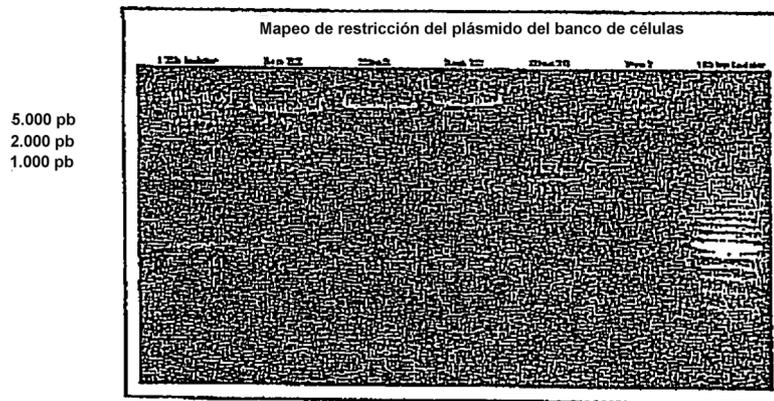


Figura 5. Amplificación, por medio de ensayo de PCR del plásmido, de linfocitos transfectados *ex vivo*.

