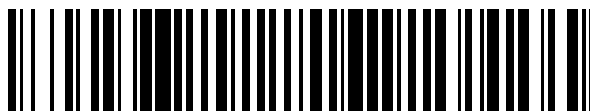


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 178**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2003** **E 03717465 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013** **EP 1496937**

54 Título: **Vacuna de ADN combinada con un inductor de la apoptosis de células tumorales**

30 Prioridad:

26.04.2002 EP 02291069

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2013

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (100.0%)
101, RUE DE TOLBIAC
75013 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**PADUA, ROSE ANN;
CHOMIENNE, CHRISTINE y
CHARRON, DOMINIQUE**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 400 178 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

Vacuna de ADN combinada con un inductor de la apoptosis de células tumorales

5 **[0001]** La presente invención se refiere a la combinación de una técnica de vacunación de ADN que utiliza un ácido nucleico que codifica un polipéptido inmunogénico, en particular, un antígeno tumoral, con un inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales, útil para el tratamiento del cáncer.

10 **[0002]** Hasta la fecha, se han identificado muchos antígenos asociados a tumores y se han desarrollado técnicas de vacunación para inducir una respuesta inmune frente a estos antígenos tumorales. Los antígenos proteicos cancerígenos naturales y recombinantes contienen antígenos inmunogénicos definidos a niveles estandarizados y su eficacia depende de encontrar el adyuvante y el sistema de administración correctos. La administración de ADN, p. ej., la inyección directa de los casetes de expresión génica dentro de un huésped vivo, es una técnica novedosa para la vacunación e inmunoterapia. La expresión de los genes administrados puede producir
15 una activación inmune específica de las defensas inmunes del huésped frente al antígeno expresado.

[0003] La eficacia de una técnica de vacunación depende de la adquisición de una respuesta inmune que puede ser tanto humoral como citotóxica. Se ha demostrado que las vacunas de ADN cumplen estos requisitos, induciendo potentes y persistentes respuestas inmunes mediadas por células (generación de células T citotóxicas
20 CD8+ y colaboradoras CD4+) y humorales frente al antígeno codificado por el plásmido. La aplicación de este tipo de vacunación a cánceres se realizó por primera vez sobre el LNH-B usando el idiotipo de la inmunoglobulina de superficie como el antígeno frente al que se indujo la respuesta antitumoral (Stevenson, F.K. y col., 1995; Syrengelas, A.D. y col., 1996). También se observó inmunidad protectora en otros modelos de linfoma y mieloma en ratón. En el documento US 6156316 también se describe el uso de vacunas de ADN en el tratamiento del cáncer. En
25 el documento WO 0178700 y en Stephensen CB y col., 2001, se describe el uso de compuestos retinoides como adyuvante amina.

[0004] La leucemia promielocítica aguda (ALP, por sus siglas en inglés) se caracteriza por una translocación t(15,17) recíproca que fusiona el gen de la leucemia promielocítica (PML, por sus siglas en inglés) con el gen del
30 receptor alfa del ácido retinoico (RAR α) y por una parada de la diferenciación mieloide en el estadio promielocítico. En la actualidad, la base del tratamiento habitual en pacientes con APL es la terapia de diferenciación mediada por ácido todo trans retinoico (ATRA). Sin embargo, a pesar de la prolongación de la supervivencia obtenida con los actuales ensayos clínicos en los que se combina ATRA con quimioterapia, entre el 10% y el 20% de los pacientes sigue presentando recaídas. Por tanto, son necesarias nuevas estrategias terapéuticas para erradicar la enfermedad
35 residual.

[0005] Se ha demostrado que los péptidos de unión PML-RAR α pueden ser reconocidos específicamente por linfocitos T CD4+ (Dermime, S y col., 1996). Sin embargo, este método presentaba limitaciones ya que podían generarse una línea de células T o clon no específicos de péptido a partir de las células de pacientes con APL. Este
40 resultado se adscribe a la alteración generalizada del sistema inmune celular ya notificado en pacientes con cáncer. Por este motivo, el mal estado inmunitario de los pacientes con APL se interpreta como un obstáculo principal para las estrategias inmunoterapéuticas frente a la APL.

[0006] Los colaboradores inventores desarrollaron previamente ratones transgénicos que expresaban un
45 ADNc de PML-RAR α humano que proporciona un modelo animal preciso para la APL humana (Brown, D. y col., 1997). Los inventores aprovecharon este modelo animal de APL para comprobar la eficacia *in vivo* de una vacuna basada en el ADN de PML-RAR α recientemente desarrollada unida a secuencias del fragmento C (FrC) de la toxina tetánica. Sorprendentemente, sus resultados demuestran que ATRA actúa como un adyuvante para la vacunación con el ADN de PML-RAR α -FrC para prolongar la supervivencia. Esto se acompañó de un aumento en el número de
50 células T CD4+ y CD8+; y producción de anticuerpos anti-RAR α y de IFN γ que sugieren la inducción de respuesta inmunes relevantes. Cuando se administran altas dosis de ATRA, también se detectan anticuerpos dirigidos frente a FrC. Por tanto, es un sujeto especial de la presente invención una composición de vacuna que comprende un ácido nucleico de PML (gen de la leucemia promielocítica)-RAR α (gen del receptor alfa del ácido retinoico) - FrC (fragmento C de la toxina tetánica) y ácido todo trans retinoico (ATRA) que induce inmunidad protectora y aumenta
55 la esperanza de vida en un modelo de leucemia promielocítica aguda en animales.

[0007] Más en general, estos resultados proporcionan una nueva estrategia dirigida al tratamiento de la APL que puede mejorar el desenlace clínico en la APL humana, combinando una vacunación con ADN con el tratamiento convencional con ATRA.

[0008] Además, los inventores encuentran la capacidad del ADN que contiene un gen PML-RAR α -FrC para inducir la protección frente a la estimulación alentadora y les llevó a contemplar otras fusiones oncogénicas. Los inventores han mostrado de hecho, por primera vez, que la propiedad adyuvante de la combinación de ATRA y una

5 secuencia de ADN fuertemente inmunogénica pueden ayudar a mantener remisiones clínicas estimulando las respuestas inmunes frente a antígenos tumorales generadas por los pacientes.

[0009] Los inventores han mostrado además la capacidad de un ADN que contiene una secuencia inmunogénica no específica unida a una secuencia que codifica un polipéptido que potencia la respuesta inmune,

10 como una secuencia PML-RAR α AS-FrC o una secuencia ScFvBCL1-FrC combinada con ATRA, para inducir la protección frente a la estimulación.

[0010] Por tanto, la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende i) un compuesto retinoide que induce diferenciación y ii) un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un

15 polipéptido inmunogénico, en particular un antígeno tumoral, fusionado en marco con una secuencia que codifica un fragmento C (FrC) de la toxina tetánica en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicho ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido inmunogénico se presenta en una cantidad eficaz para suprimir o atenuar el crecimiento tumoral tras la administración a un mamífero, en especial a un ser humano.

20 **[0011]** La invención se define en las reivindicaciones.

Definiciones

[0012] En el contexto de la presente invención, la expresión «ácido nucleico» se refiere a la forma polimérica

25 de éster fosfato de ribonucleósidos («moléculas de ARN») o desoxirribonucleósidos («moléculas de ADN») o cualquier análogo fosfoéster de los mismos, como fosforotioatos y tioésteres, en su forma de cadena sencilla o hélice de doble cadena. El término «ácido nucleico» incluye ADN de cadena doble circular, entre otros, moléculas de ADN en forma lineal o circular (p. ej., fragmentos de restricción).

[0013] La presente invención utiliza ácidos nucleicos (o polinucleótidos) que codifican polipéptidos que confieren inmunidad (en otras palabras, polipéptidos inmunogénicos), como los antígenos asociados a tumores. A continuación, estos polipéptidos pueden actuar como inmunógenos para inducir una respuesta humoral o celular, o ambas. En el contexto de la invención, el polipéptido inmunogénico puede ser «específico» de una afección, como un antígeno asociado a tumor, o «no específico», como un polipéptido codificado por una secuencia

35 complementaria, por ejemplo, complementaria de un antígeno tumoral, o un polipéptido inmunogénico sin importancia con respecto a la enfermedad. Entre estos polipéptidos inmunogénicos irrelevantes se incluyen, por ejemplo, una proteína ScFv exclusiva de un paciente con linfoma (pScFvBcl1 FrC, King y col., 1998) cuando la enfermedad es leucemia.

[0014] Las secuencias polinucleotídicas inmunogénicas y, en particular, las secuencias polinucleotídicas de antígenos tumorales pueden usarse en asociación con otras secuencias polinucleotídicas que codifican proteínas reguladoras que controlan la expresión de la secuencia inmunogénica (antígeno tumoral). El ácido nucleico según la invención puede contener adicionalmente las secuencias de reconocimiento y promotora. De forma ventajosa, el ácido nucleico es un vector, como un plásmido.

[0015] Los ácidos nucleicos utilizados en las composiciones de la invención puede ser materiales «desnudos». Un material de ácido nucleico «desnudo» significa que no contiene ningún vehículo de administración que pueda actuar para facilitar su entrada en la célula. Por ejemplo, las secuencias polinucleotídicas no contienen secuencias víricas, especialmente ninguna partícula vírica, que puedan llevar información genética. En el documento

50 EP 0465529 se describe un producto farmacéutico que comprende un polinucleótido desnudo para la vacunación.

[0016] Según se usa en este documento, dos secuencias de ácido nucleico que están «unidas de forma operativa» se colocan bajo el control de una secuencia control de la expresión que controla y regula la transcripción y la traducción de ambas secuencias de ácido nucleico.

[0017] Según se usa en este documento, las secuencias que están «fusionadas en marco» hacen referencia a secuencias que forman un gen híbrido que codifica de este modo un polipéptido de fusión. Un polipéptido de fusión es aquel que contiene un polipéptido inmunogénico y, más específicamente, un antígeno tumoral de la invención, fusionado al extremo N o C terminal de cualquier otro polipéptido. Un ejemplo preferido de un polipéptido de fusión

es aquel en el que el polipéptido inmunogénico, como un antígeno tumoral, se fusiona con otro polipéptido que tiene actividad adyuvante, como el fragmento C de la toxina tetánica. Por ejemplo, la fusión del fragmento C de la toxina tetánica con un antígeno tumoral promueve la respuesta inmune inducida por el antígeno tumoral.

- 5 **[0018]** La clonación y secuenciación del gen estructural de la toxina tetánica se ha descrito en Fairweather y col. (1986) y Fairweather y Lyness (1986) (SEQ ID N° 9). El fragmento C (FrC) es un polipéptido de 50 kD generado por escisión con papaína de la toxina y comprende los 451 aminoácidos del extremo C terminal.

- 10 **[0019]** La expresión «antígeno PML-RAR α » indica una proteína de fusión que es el resultado de la traslocación cromosómica t(15;17) descrita en Thé y col. (1990), que abarca el punto de rotura de bcr 1 más frecuente de los 3 descritos hasta el momento. Los ejemplos de antígenos PML-RAR α son codificados por polinucleótidos que comprenden la secuencia SEQ ID N°1 o derivados de la misma, siempre que la unión PML/RAR α sea reconocida por el sistema inmune del paciente.

- 15 **[0020]** «PML-RAR α AS» indica un polipéptido codificado por una secuencia complementaria a la secuencia SEQ ID N°1 o un fragmento de la misma que abarca el punto de fusión PML-RAR α . Preferiblemente, PML-RAR α AS es codificado por la secuencia mostrada en la SEQ ID N°8.

- 20 **[0021]** Entre los «derivados» se incluyen variantes conservadoras de secuencia y variantes conservadoras de función. Las «variantes conservadoras de secuencia» de una secuencia polinucleotídica son aquellas en las que un cambio de uno o más nucleótidos en una posición de codón determinada no produce la alteración del aminoácido codificado en esta posición. Las «variantes conservadoras de función» son secuencias polinucleotídicas que codifican proteínas en las que se ha cambiado al menos un resto de aminoácido determinado sin alteran la conformación ni la función general del polipéptido, incluyendo, pero sin limitaciones, la sustitución de un aminoácido por otro con propiedades similares (como, por ejemplo, polaridad, potencial de unión a hidrógeno, si tiene carácter ácido, básico, hidrófobo, aromático y similares). Los aminoácidos con propiedades similares son bien conocidos en la técnica.

- 30 **[0022]** La actividad «adyuvante» se define en este documento como el efecto alcanzado por la combinación de dos componentes, que es mayor que el efecto de cada uno de los componentes por separado. Este efecto sinérgico es especialmente aparente cuando el efecto de la vacunación de ADN y ATRA por separado se comparan con el efecto combinado. ATRA o la vacuna solas seguían produciendo recaída y muerte de todos los animales, mientras que su combinación produce una cura eficaz en el 50% de los animales tratados.

- 35 **[0023]** La expresión «vehículo farmacéuticamente aceptable» se refiere a cualquier vehículo en el que pueden formularse las composiciones de vacunas, ácidos nucleicos y kits según la invención. Esto incluye una solución salina como la solución salina tamponada con fosfato. En general, el diluyente o vehículo se selecciona en base al modo y vía de administración, y a la práctica farmacéutica convencional.

- 40 **[0024]** «Apoptosis» se refiere a una forma de muerte celular que muestra cambios morfológicos estereotípicos según se revisa en Raff (1998). La apoptosis puede medirse, por ejemplo, mediante la prueba de citometría de flujo con yoduro de propidio descrita en Dengler y col. (1995) o mediante el ensayo *in situ* de la desoxinucleotidil transferasa terminal y el desplazamiento de mella (análisis TUNEL) descrito en Gorczyca (1993).

- 45 **[0025]** La expresión «compuestos relacionados con el arsénico» indica cualquier compuesto que, como el arsénico, es un inhibidor de la fosfatasa o es capaz de crear enlaces covalentes mediante la unión de un grupo ditiol.

Composiciones de vacuna

- 50 **[0026]** En la solicitud se describen composiciones de vacuna que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido inmunogénico y, opcionalmente, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que potencia la respuesta inmune. La secuencia que codifica un polipéptido inmunogénico y la secuencia que codifica un polipéptido que potencia la respuesta inmune pueden estar unidas de forma operativa, preferiblemente, fusionadas en marco.

- 55 **[0027]** La secuencia que codifica un polipéptido que potencia la respuesta inmune puede seleccionarse entre el grupo compuesto por una secuencia de toxina tetánica, preferiblemente, la secuencia del fragmento C (FrC), la secuencia de la toxina colérica (TC), la secuencia de la toxina termosensible (TS) de *E. coli*, la secuencia de la toxina A de *Clostridium difficile* y la secuencia de la toxina pertussis (TP), o fragmentos, homólogos, derivados y fusiones de cualquiera de estas toxinas que también están disponibles, siempre que mantengan su actividad

adyuvante.

[0028] La composición de vacuna según la invención comprende:

5 i) un compuesto retinoide que induce diferenciación y apoptosis y

ii) un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido inmunogénico fusionado en marco con una secuencia que codifica un fragmento C (FrC) de la toxina tetánica;

10 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0029] Según una primera realización, el polipéptido inmunogénico puede ser «no específico» de una afección cancerosa. De forma ventajosa, la secuencia que codifica dicho polipéptido inmunogénico puede seleccionarse entre las secuencias PML-RAR α AS-FrC (SEQ ID N°10) o ScFvBCL1-FrC (SEQ ID N°11).

15

[0030] «PML-RAR α AS-FrC» indica la secuencia PML-RAR α As que se ha clonado en marco con una secuencia líder de BCL1 en la posición 5' y con el fragmento C completo en la posición 3' (SEQ ID N°10).

[0031] «ScFvBCL1-FrC», también denominada BCL1-Frc en la figura, indica la construcción ScFv descrita en King y col., 1998, que se ha clonado a partir de un paciente con linfoma, fusionada en marco con una secuencia líder de BCL1 en la posición 5' y con el fragmento C completo en la posición 3' (SEQ ID N°11).

[0032] Puede ser apropiada cualquier secuencia inmunogénica que comprende una secuencia FrC, o cualquier potenciador de la respuesta inmune equivalente, incluso a través de la secuencia que no incluye un antígeno tumoral. El alcance de esta realización no debería limitarse exclusivamente a las secuencias PML-RAR α AS-FrC y ScFvBCL1-FrC descritas anteriormente.

[0033] En otra realización, el polipéptido inmunogénico puede comprender un antígeno tumoral. Por tanto, según esta realización, las composiciones de vacuna de la invención comprenden un ácido nucleico que codifica un antígeno tumoral.

[0034] Entre los antígenos tumorales que pueden utilizarse de forma ventajosa, pueden citarse las fusiones PML (gen de leucemia promielocítica)-RAR α (gen del receptor alfa del ácido retinoico), leucemia mieloide aguda 1/ocho veintiuno (AML1/ETO), factor beta de unión al núcleo/cadena pesada de la miosina muscular (CBF beta/MYH11), gen similar a ets/cadena beta del receptor del factor de crecimiento derivado de plaqueta (Tel-PDGF), dedos de cinc de leucemia promielocítica/receptor alfa del ácido retinoico (PLZF/RAR), mieloide/linfocito (MLL), de las cuales se conocen 40 posible parejas, gene similar a ets/ leucemia mieloide aguda 1 (TEL/AML-1) y región de agrupamiento de puntos de rotura/Abelson (BCR/ABL) (Yun y col., 1999). En un aspecto en particular de la invención, el antígeno tumoral es PML-RAR α . Por consiguiente, el polinucleótido que codifica un antígeno tumoral de la composición de vacuna puede comprender la secuencia SEQ ID N°1 (punto de fusión de PML-RAR α).

**5'-gag gtc ttc ctg ccc aac agc aac cac gtg gcc agt ggc gcc ggg gag gca
g←PML|RAR→cc att gag acc cag agc agc agt tct gaa gag ata gtg ccc agc cct
ccc tgg-3'.**

[0035] Preferiblemente, el ácido nucleico utilizado en la composición de la invención comprende una secuencia que codifica un antígeno PML-RAR α -FrC (SEQ ID N° 2 o 7).

[0036] La composición vacuna de la solicitud comprende un inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales o un modificador de células tumorales no inmunosupresor que presenta actividad adyuvante de la respuesta biológica mostrada por dicho ácido nucleico que codifica el antígeno tumoral.

50

[0037] El inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales puede seleccionarse entre inductores de diferenciación o seleccionarse entre el grupo compuesto por compuestos de arsénico y relacionados con arsénico (Lallemand-Breitenbach y col., 1999), ácidos todo trans retinoico y otros compuestos retinoides que

inducen la diferenciación y apoptosis, como AR 9-cis, N-(4-hidroxifenil)retinamida (4 HPR), AR 13-cis. También pueden ser eficaces CD437 y otros inductores de diferenciación y apoptosis, activación de CD44 mediante anticuerpos o ácido hialurónico, factores de crecimiento y diferenciación hematopoyéticos.

5 **[0038]** Según la invención, el inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales es un compuesto retinoide que induce diferenciación y apoptosis.

[0039] La composición de vacuna de la invención permite la administración simultánea de un compuesto retinoide y de un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido inmunogénico, en particular un antígeno tumoral. Sin embargo, esta politerapia también puede lograrse mediante la administración simultánea o secuencial de una composición que comprende un compuesto retinoide y una composición que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno tumoral.

15 **[0040]** Para este objetivo, las composiciones pueden estar en forma de kit.

Kits

[0041] La presente invención también proporciona un kit que comprende i) una primera composición farmacéutica que comprende un compuesto retinoide que induce la diferenciación y apoptosis y ii) una segunda composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico compuesto por una secuencia que codifica un polipéptido inmunogénico, preferiblemente un antígeno tumoral, fusionado en marco con una secuencia que codifica un fragmento C (FrC) de la toxina tetánica.

25 **[0042]** El ácido nucleico y el inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales son como se define anteriormente.

[0043] Los componentes del kit están preferiblemente formulados en vehículos farmacéuticamente aceptables.

30 **[0044]** El ácido nucleico y el inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales puede administrarse de forma concurrente, es decir, simultánea en el tiempo, o secuencial, es decir, en momento diferentes durante el transcurso de una pauta posológica frecuente.

Ácidos nucleicos específicos

35 **[0045]** En este documento también se incluyen ácidos nucleicos aislados específicos útiles para las composiciones y los kits.

[0046] En particular, se describe un ácido nucleico aislado que comprende a) una secuencia que codifica un antígeno PML-RAR α y además comprende b) una secuencia que codifica un polipéptido que potencia la respuesta inmune frente a dicho antígeno PML-RAR α .

[0047] La secuencia que codifica un antígeno PML-RAR α y la secuencia que codifica un polipéptido que potencia la respuesta inmune al antígeno PML-RAR α pueden estar unidas de forma operativa. Dichos polinucleótidos pueden estar fusionados en marco. La secuencia del polinucleótido que codifica un antígeno PML-RAR α puede ser la SEQ ID N° 1.

[0048] La secuencia que codifica un polipéptido que potencia la respuesta inmune al antígeno PML-RAR α puede seleccionarse entre el grupo compuesto por una secuencia de la toxina tetánica, preferiblemente la secuencia del fragmento C (FrC), la secuencia de la toxina colérica (TC), la secuencia de la toxina termosensible (TS) de *E. coli*, la secuencia de la toxina A de *Clostridium difficile* y la secuencia de la toxina pertussis (TP), o fragmentos, homólogos, derivados y fusiones de cualquiera de estas toxinas que también están disponibles, siempre que mantengan su actividad adyuvante. Por tanto, el ácido nucleico aislado puede comprender la SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 7.

Ácidos nucleicos no específicos

[0049] En este documento también se incluyen ácidos nucleicos aislados no específicos en las composiciones y en los kits. En el documento se describe un ácido nucleico aislado que comprende a) una secuencia que codifica

un polipéptido inmunogénico, como PML-RAR α AS y, además comprende b) una secuencia que codifica un polipéptido que potencia la respuesta inmune a dicho polipéptido inmunogénico.

[0050] La secuencia que codifica un polipéptido inmunogénico y la secuencia que codifica un polipéptido que potencia la respuesta inmune al polipéptido inmunogénico pueden estar unidas de forma operativa. Dichos polinucleótidos pueden estar fusionados en marco. La secuencia del polinucleótido que codifica PML-RAR α AS puede ser la SEQ ID N° 8.

[0051] La secuencia que codifica un polipéptido que potencia la respuesta inmune a los polipéptidos inmunogénicos puede seleccionarse entre el grupo compuesto por una secuencia de toxina tetánica, preferiblemente la secuencia del fragmento C (FrC), la secuencia de la toxina colérica (TC), la secuencia de la toxina termosensible (TS) de *E. coli*, la secuencia de la toxina A de *Clostridium difficile* y la secuencia de la toxina pertussis (TP), o fragmentos, homólogos, derivados y fusiones de cualquiera de estas toxinas que también están disponibles, siempre que mantengan su actividad adyuvante. Por tanto, el ácido nucleico aislado puede comprender una secuencia que codifica un polipéptido PML-RAR α AS-FrC como se muestra en la secuencia SEQ ID N° 10.

Agentes terapéuticos

[0052] Los ácidos nucleicos como se define según la invención pueden administrarse en forma desnuda, sin ningún vehículo de administración. Con esta finalidad, el ácido nucleico simplemente se diluye en una solución fisiológicamente aceptable, como una solución salina estéril o solución salina tamponada estéril, con o sin vehículo. Cuando está presente, el vehículo es, preferiblemente, isotónico, hipotónico o ligeramente hipertónico y tiene una fuerza iónica relativamente baja, como la que proporciona una solución de sacarosa, p. ej., una solución tónica que contiene sacarosa al 20%.

[0053] Alternativamente, el ácido nucleico aislado o el ácido nucleico de las composiciones o kits de vacunas de la invención pueden administrarse en asociación con agentes que ayudan a la captación celular. Ejemplos de estos agentes son i) compuestos químicos que modifican la permeabilidad celular, como bupivacaina (véase, p. ej., el documento WO 94/16737), ii) liposomas o partículas víricas para la encapsulación del polinucleótido o iii) lípidos catiónicos o micropartículas de sílice, oro o tungsteno que se asocian ellos mismos con los polinucleótidos.

[0054] Los liposomas aniónicos y neutros son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Liposomes: A Practical Approach, RPC New Ed, IRL press (1990), para obtener más información sobre los métodos de preparación de liposomas) y son útiles para la administración de una amplia gama de productos, incluyendo polinucleótidos.

[0055] Los lípidos catiónicos también son conocidos en la técnica y normalmente se utilizan para la administración de genes. Entre estos lípidos se incluyen LipofectinTM también conocido como DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil-N,N,N-trimetilamino], DOTAP (1,2-bis (oleiloxy)-3-(trimetilamonio) propano), DDAB (bromuro de dimetildiocetadecil-amonio), DOGS (dioctadecilamidoglicil espermina) y derivados del colesterol como DC-Col(3-beta-(N-(N',N'-dimetil aminometano)-cabamoil)colesterol). Una descripción de estos lípidos catiónicos puede encontrarse en los documentos EP 187.702, WO 90/11902; patente de EE.UU. N° 5.283.185, documentos WO 91/15501, WO 95/26356 y la patente de EE.UU. N° 5.527.928. Los lípidos catiónicos para la administración de genes se utilizan preferiblemente en asociación con un lípido neutro utilizado en asociación con un lípido neutro como DOPE (dioleil fosfatidiletanolamina) como se describe en el documento WO 90/11092, por ejemplo.

[0056] La formulación que contiene liposomas catiónicos puede contener opcionalmente otros compuestos que faciliten la transfección. Algunos de ellos se describen en los documentos WO 93/18759, WO 93/19768, WO 94/25608 y WO 95/02397. Entre ellos se incluyen derivados de espermina útiles para facilitar el transporte del ADN a través de la membrana nuclear (véase, por ejemplo, el documento WO 93/18759) y compuestos que permeabilizan la membrana como GALA, gramicidina S y sales de ácidos biliares catiónicas (véase, por ejemplo, el documento WO 93/19768).

[0057] Pueden usarse micropartículas de oro o tungsteno para la administración de genes, como se describe en los documentos WO 91/00359 y WO 93/17706, y en Tang y col. (1992). El polinucleótido recubierto con micropartículas se inyecta por vía intradérmica o intraepidérmica usando un dispositivo de inyección sin aguja («pistola de genes»), según se describe en la patente de EE.UU. N° 4.945.050, patente de EE.UU. N° 5.015.580 y documento WO 94/24263. Por otro lado, puede inyectarse directamente ADN desnudo, p. ej., por vía intramuscular.

[0058] La cantidad de ADN utilizada en un receptor de la vacuna depende, por ejemplo, de la potencia del promotor utilizado en la construcción de ADN, la inmunogenicidad del antígeno tumoral expresado, la condición del mamífero al que se pretende administrar (p. ej., peso o edad), el modo de administración y el tipo de formulación. En general, puede administrarse a adultos humanos una dosis terapéuticamente eficaz de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1 mg, preferiblemente de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 800 µg y, más preferiblemente, de aproximadamente 25 µg a aproximadamente 250 µg. La administración puede realizarse en una única dosis o a intervalos repetidos.

[0059] La vía de administración es cualquier vía convencional utilizada en el campo de la vacunación. Como directriz general, un ácido nucleico de la invención puede administrarse por vía parenteral, p. ej., por vía intradérmica, intraepidérmica o intramuscular. La elección de la vía de administración depende de la formulación que se seleccione. Un polinucleótido formulado en asociación con bupivacaína se administra de forma ventajosa por vía intramuscular. Cuando se utiliza un liposoma neutro o aniónico o un lípido catiónico, como DOTMA o DC-Col, la formulación puede inyectarse de forma ventajosa por vía intramuscular o intradérmica. Un polinucleótido en forma desnuda puede administrarse de forma ventajosa por vía intramuscular, intradérmica o subcutánea. Además puede desarrollarse una electroporación para mejorar la administración del ADN al músculo (Mir y col. 1999).

[0060] El tratamiento con ácido nucleico se combina con la administración de un inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales, como arsénico, quimioterapia a bajas dosis, ácido todo trans retinoico u otros compuestos de ácido retinoico, como AR 9.cis, 4 HPR, AR 13.cis, CD437 y otros inductores de diferenciación y apoptosis, activación de CD44 mediante anticuerpos o ácido hialurónico, factores de crecimiento y diferenciación hematopoyéticos.

[0061] Se administra a un paciente este inductor que está presente en la misma composición de vacuna que el ácido nucleico de la invención o está presente en forma de una composición independiente. En este último caso, la vía de administración puede ser idéntica o diferente a la vía de administración utilizada para el ácido nucleico. Por ejemplo, uno puede administrar la composición de ácido nucleico por vía intradérmica o intramuscular, mientras que el inductor se administra por vía oral.

30 *Aplicaciones terapéuticas*

[0062] Los ácidos nucleicos, kits y composiciones de vacunas de la invención son especialmente útiles para el tratamiento de afecciones tumorales, más especialmente cánceres. En especial, las composiciones de vacunas que comprenden PML-RARα como el antígeno tumoral son útiles para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda. Entre los ejemplos de antígenos útiles para el tratamiento del cáncer se incluyen la fusiones AML1/ETO para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés) de tipo M2, CBF beta/MYH11 en AML de tipo M4 eosinofilia, Tel/PDGF para la leucemia mielomonocítica crónica (CMML, por sus siglas en inglés), PLZF-RARα en una variante de la leucemia promielocítica aguda, fusiones de MLL en diversas leucemias linfoides o mieloides TEL/AML-1 para la leucemia linfoblástica aguda infantil y BCR/ABL para el tratamiento de la leucemia mielogénica crónica.

[0063] Otro sujeto de la invención es una composición de vacuna, un kit o ácidos nucleicos específicos como se define anteriormente para su uso en un procedimiento de tratamiento de una afección tumoral, p. ej., cánceres.

[0064] La invención se entenderá más en profundidad a la vista de los siguientes ejemplos y figuras adjuntas.

FIGURAS:

[0065]

50 En la figura 1 se muestra un protocolo representativo de un estudio preclínico. APL: leucemia promielocítica aguda, ATRA: ácido todo trans retinoico, D = días, ADN = inyección de ADN.

La figura 2 representa la protección de la vacunación de ADN frente a la progresión de la enfermedad. 2A: curvas de supervivencia de Kaplan Meier de ratones inyectados con células de APL tratados con placebo, con o sin la construcción PML-RARαFrC. 2B: curvas de supervivencia de Kaplan Meier de ratones inyectados con células de APL tratados con ATRA, con o sin la construcción PML-RARαFrC, 2C: curvas de supervivencia de Kaplan Meier de ratones inyectados con células de APL tratados con placebo o ATRA, con o sin construcción pCINPML-RARα de longitud completa. Se censuraron las muertes debidas al procedimiento (mostradas con rombos negros)

En la figura 3 se muestra la supervivencia acumulada y la respuesta de anticuerpos frente a RAR α . El umbral se estableció en $U_a=1$. Se obtuvieron $n=19$ respuestas positivas y $n=28$ respuestas negativas para la producción de anticuerpos. Este umbral se determinó de forma arbitraria en base a la dilución del control positivo, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-RAR α .

En la figura 4 se muestra el análisis por inmunotransferencia en el que se confirma la producción de anticuerpos, usando un anticuerpo anti-RAR α (pocillo 1), sueros de ratones control (pocillo 2), sueros de ratones vacunados a día 18 (pocillo 3) o suero de ratones vacunados a día 38 (pocillo 4).

En la figura 5 se muestra la correlación entre el aumento en el número de células T CD4 $^{+}$ (figura 5A) y CD8 $^{+}$ (figura 5B) inducido por las secuencias PML-RAR α y los desenlaces de los ratones (figura 5C). Se muestran las diferentes poblaciones de células T para ratones individuales, tratados con ATRA o PML-RAR α FrC + ATRA con sus correspondientes curvas de supervivencia. Los ratones que muestran respuesta completa (RC), definida como aquellos animales que permanecen vivos después de 120 días, se muestran con líneas continuas, los ratones que muestran respuesta parcial (RP), aquellos que sobreviven más de 75 días, se muestran con líneas discontinuas y aquellos sin respuesta (SR), definido como los que murieron (cruces) entre los días 40-60 se muestran con líneas punteadas.

La figura 6 representa un histograma en el que se muestra el aumento de IFN- γ en ratones APL tras el tratamiento con ATRA+ PML-RAR α FrC en comparación con ratones FVB/N sanos tratados con ATRA. Los valores medios $\pm$ D.E. ($n=3$) se obtuvieron tras la estimulación con células APL irradiadas.

La figura 7 representa un histograma que muestra la liberación de citoquinas (TNF α , IFN α , IL5, IL4, IL2) tras 48 horas de cultivo con células de APL irradiadas como estimuladores asociados con ratones FVB/N tratados con 5 mg de ATRA (liberación diaria durante 21 días) solo, ratones APL tratados con 5 mg de ATRA + PML-RAR α FrC, o ScFvBcl1FrC (denominado Bcl1FrC en las figuras).

La figura 8 representa la protección de la vacunación de ADN frente a la progresión de la enfermedad. Se recogen las curvas de supervivencia de Kaplan Meier de ratones inyectados con células APL tratados sólo con ATRA, ATRA con el vector pCIN vacío, ATRA con la construcción ScFvBcl1FrC y ATRA con la construcción PML-RAR α FrC.

La figura 9 representa la eficacia de la composición de vacuna que comprende ATRA (10 mg diarios liberados durante 21 días) y la construcción PML-RAR α AS-FrC en modelos transgénicos de neoplasia mieloide.

La figura 10 representa inmunotransferencias en las que se muestra la producción de anticuerpos anti-RAR α .

A. Los sueros de ratones APL tratados reconocen el RAR α humano y de ratón y el oncogén humano PML-RAR α

[0066] Se realizaron inmunotransferencias de los extractos proteicos de esplenocitos de ratones APL (pocillos 1,2) y de esplenocitos de ratones sanos (pocillo 3) y se inmunotransfirieron con un anticuerpo monoclonal 9 α F frente a anticuerpos anti-RAR α (pocillo 1), un suero del día 58 de un ratón APL tratado con ATRA (pocillo 2) o un suero del día 58 de un ratón tratado con ATRA y vacunado con ADN de PML-RAR α FrC (pocillo 3). Las transferencias muestran bandas con pesos moleculares aparentes de 50 kDa y 105 kDa, correspondientes a RAR α y PML-RAR α , respectivamente (pocillos 1, 2), mientras que solo aparecía una banda de 50 kDa con el extracto de esplenocitos normales (pocillo 3). Una nueva incubación de la transferencia con un anticuerpo anti- α -tubulina como sonda muestra la carga de la proteína. Los tiempos de exposición fueron, respectivamente: anti-RAR α (pocillo 1: 30 min), suero del día 58 (pocillo 2: 2 min), suero del día 58 (pocillo 3: 30 seg)- anti- α -tubulina (pocillos 1 y 2: 4 horas), (pocillo 3: 5 min).

B. Los sueros de ratones tratados con PML-RAR α de longitud completa reconocen PML-RAR α

[0067] Los extractos proteicos de NB4 fueron inmunotransferidos con anticuerpo anti-RAR α (pocillo 1), suero del día 18 de un ratón tratado con ATRA y la vacuna de ADN PML-RAR α FrC (pocillo 2) y suero del día 58 de un ratón tratado con ATRA + vacunado con ADN PML-RAR α de longitud completa (pocillo 3). Una nueva incubación de la transferencia con un anticuerpo anti- α -tubulina como sonda muestra la carga de la proteína. Los tiempos de exposición fueron, respectivamente: anti-RAR α (pocillo 1: 30 min), suero del día 18 (pocillo 2: 5 min), suero del día 58 (pocillo 3: 5 min)-anti- α -tubulina (pocillos 1 y 3: 5 min).

C Los sueros de ratones APL tratados reconocen GST-RAR α recombinante usado en el ELISA.

- [0068]** Las inmunotransferencias se realizaron con una proteína GST-RAR α recombinante (pocillos 1, 3) o una proteína GST control (pocillos 2,4) según se confirma mediante la incubación con un anticuerpo anti-GST (panel inferior) y un anticuerpo anti-RAR α (panel central) como sonda. Estas transferencias se incubaron con sueros del día 18 (pocillos 1,2) y del día 38 (pocillos 3,4) como sonda obtenidos a partir de un ratón tratado con ATRA y ADN de PML-RAR α FrC (panel inferior). En las transferencias se muestran bandas con un peso molecular aparente de 85 kDa que se correspondían con GST-RAR α recombinante (85 kDa, panel superior) y se revelaban con un anticuerpo anti-RAR α (pocillo 3, panel intermedio), mientras que se observaba una banda de 50 kDa adicional en el pocillo 1 probablemente debido a RAR α y cuando se incubó un anticuerpo monoclonal anti-RAR α 9 α F (pocillo 1) como sonda. Los tiempos de exposición fueron respectivamente: suero del día 18 (pocillos 1 y 2: 5 min), suero del día 38 (pocillos 3 y 4: 5 min); anti-RAR α (pocillos 1 a 4: 5 min).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Material y procedimientos

1.a) Modelo animal

- [0069]** Los ratones transgénicos se obtuvieron previamente usando el ADNc de PML-RAR α humano, clonado a partir de un paciente con un punto de rotura bcr 1 en PML-RAR α en la cepa de ratones endogámicos FVB/N como se describe en Brown, D. y col (1997). Esta fusión contiene un aminoácido generado por la fusión de PML con RAR α específico para la oncoproteína. Se estableció un modelo de trasplante a partir de líneas transgénicas en las que células blásticas, aisladas a partir de los bazos de animales transgénicos, se resuspendieron en 200 μ l de solución salina tamponada y se inyectaron en la vena de la cola de ratones singénicos no sometidos previamente a experimentación previos de 6-8 semanas. Los recuentos de sangre periférica se realizaron usando un contador Hemavet (CDC Technologies, Oxford, CT). Se prepararon cortes histológicos fijando los tejidos en formalina tamponada e incluyéndolos en bloques de parafina. El ARN se extrajo del bazo de ratones mediante centrifugación en cloruro de cesio como se describe en Chen y col. (2000). Se realizó una PCR-RT y una PCR-RT en tiempo real con las sondas Taqman para confirmar la presencia de las transcripciones PML-RAR α y se evaluó la carga tumoral como se describe en Cassinat y col., (2000). Este modelo es reproducible en el 100% de los ratones trasplantados muertos debido a la enfermedad, mientras que sólo el 30% de los animales transgénicos desarrollan leucemia. El número de células requeridas para inducir la leucemia con éxito en el 100% de los ratones singénicos no sometidos previamente a experimentación con una esperanza de vida de 3-4 semanas se valoró en 10^4 células blásticas derivadas del bazo leucémico de un ratón transgénico. El tratamiento con pellas de ATRA (pellas de liberación durante 21 días de 5 mg o 10 mg de Innovative Research, Sarasota, Florida), administradas por vía subcutánea detrás del cuello, evitará la muerte de estos ratones, pero al igual que ocurre en los pacientes humanos tratados solo con ATRA, los ratones recaen y mueren 6-12 semanas después del trasplante. Las células del bazo de dos progenitores independientes se usaron (líneas 909 y 935) en protocolos diferentes con resultados idénticos. Todos los procedimientos cumplían con la normativa europea o nacional sobre el uso de animales de experimentación.

- [0070]** Los modelos transgénicos de neoplasia mieloide son ratones transgénicos que tienen una enfermedad que recuerda a la mielodisplasia humana en estadio terminal (anemia resistente al tratamiento de tipo francés, americana y británica [FAB] con exceso de blastos (RAEB), RAEB en transformación de RAEBt y leucemia mielomonocítica crónica (CMML). Estos son ratones doblemente transgénicos para mutantes NRAS y BCL-2 o CBF β -MYH11 y BCL-2, o triplemente transgénicos con mutantes NRAS/CBF β -MYH11/BCL-2.

1.b) Construcción de vacuna de ADN y plásmidos

- 50 • Construcción PML-RAR α FrC

- [0071]** La clonación direccional de 105 pb de secuencias alrededor de la fusión PML-RAR α asociadas con una señal peptídica y las secuencias del fragmento C (FrC) de la toxina tetánica en un vector basado en pCNA3, el clon YJFrC (King y col., 1998) se realizó usando un kit de clonación Seamless (Stratagene) (denominado PML-RAR α FrC). Las secuencias de los cebadores utilizados son las siguientes:

PMLRAR

PMLRAR S : 5'-ACTGCTCTTCTCCGAGGTCTTCTGCCCAACAGC-3' (SEQ ID N°3)

PMLRAR AS : 5'-ACTGCTCTTCCTTTTCGAGGGAGGGCTGGGCACTAT-3' (SEQ ID N°4)

YJFC

5

Líder AS: 5'-ACTGCTCTTCGGAGTGGGCCCGCGGGGCCAC-3' (SEQ ID N°5)

Frag C.S : 5'-ACTGCTCTTCCAAAAACCTTGATTGTTGGGTC-3' (SEQ ID N°6)

10 **[0072]** La construcción se verificó mediante secuenciación (instalaciones UCSF). La expresión de la fusión PML-RAR α y FrC se confirmó mediante transfección transitoria del ADN plasmídico en células COS. La mayoría de las preparaciones de ADN plasmídico se purificaron para la vacunación usando el procedimiento del cloruro de cesio como se describe en Sambrook y col. (1989). También se utilizó pCINPML-RAR α de longitud completa (de Thé, H. y col., 1991).

15

• Construcción PML-RAR α AS-FrC

[0073] La secuencia complementaria de los 105 pares de bases alrededor de la fusión PML-RAR α se ha clonado en marco con el fragmento C (PML-RAR α AS-FrC).

20

[0074] Las secuencias de los cebadores utilizados son las siguientes:

RARPOL S : que se corresponde con RAR-PML sens – cebador en dirección 5' *Flip seamless* 5'-ACTGCTCTTCCTCCCGAGGGAGGGCTGGGC-3' (SEQ ID N°12)

25

RARPOL AS : que se corresponde con RAR-PML complementaria – cebador en dirección 3' *Flip seamless* 5'-ACTGCTCTTCCTCCCGAGGGAGGGCTGGGC-3' (SEQ ID N°13)

También se usaron las secuencias líder AS y Frag C.S

30

[0075] La secuencia PML-RAR α AS-FrC parcial se muestra en la SEQ ID N° 10:

• La construcción ScFvBCL1-FrC también se denomina BCL1-FrC en las figuras

35 **[0076]** Esta construcción se ha obtenido del laboratorio Stevenson (Southampton, Inglaterra) y se muestra una secuencia parcial en la SEQ ID N° 11.

1.c) Protocolo preclínico de vacunación

40 **[0077]** Para determinar si la vacunación mejora el tratamiento una vez que se ha establecido la enfermedad, se realizaron una serie de estudios preclínicos en ratones trasplantados con 10^4 , 10^5 o 10^7 células APL singénicas para definir el mejor modelo que mimetiza la enfermedad y la eficacia del tratamiento. Una semana después de la inyección con células APL, los animales fueron asignados aleatoriamente a uno de los cuatro grupos siguientes: placebo, placebo + ADN, ATRA, ATRA + ADN. Se inyectó ADN resuspendido en HBSS el día después de la administración de placebo o de la pella de ATRA. Se administraron por vía intramuscular 2 ciclos sucesivos de inyecciones en los cuádriceps con 2 inyecciones por ratón cada vez a intervalos de 20 días (un total de 300 μ g de ADN según el protocolo). Las muestras para recuentos de células sanguíneas y la preparación de los sueros para el análisis de anticuerpos se recogieron 10 días después de cada ciclo de inyección. El protocolo representativo se muestra en la figura 1. Se realizó un seguimiento de la enfermedad activa en los ratones midiendo los recuentos de células sanguíneas, inmunofenotipado de poblaciones mieloides y supervivencia.

50

1.d) Métodos analíticos

• Análisis estadístico

55

[0078] La supervivencia se analizó mediante el procedimiento de Kaplan Meier y las comparaciones entre grupos se realizaron mediante pruebas de Wilcoxon y de rango logarítmico. Las comparaciones de respuesta de anticuerpos entre grupos se realizaron mediante la prueba de la *t* de Student.

• *Medición de la respuesta de anticuerpos.*

ELISA

- 5 **[0079]** La proteína RAR α recombinante humana (RAR α rh) se purificó a partir de una construcción GST-RAR α en el plásmido pGEX2T como se describe en Delva y col. (1999). Se detectaron anticuerpos frente a RAR α mediante un método de ELISA como se describe a continuación en este documento. Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos con proteína RAR α recombinante humana (RAR α rh) purificada a 10 μ g/ml durante la noche. Tras los pasos de saturación y lavado, se añadieron sueros de ratón diluidos (1/50) y los anticuerpos se revelaron mediante IgG e
- 10 IgM de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa (Jackson Immuno Research, PA). Se añadió sustrato TMB (BD Pharmingen, San Diego, CA) para la reacción de la peroxidasa que se detuvo con ácido fosfórico 1 M. La absorbancia se midió a 405 nm con un filtro de referencia a 630 nm usando un densitómetro óptico (Dynatech). Cada suero se ensayó por duplicado y se calculó la absorbancia específica como la diferencia entre la absorbancia media en los pocillos con RAR α rh y la absorbancia media en pocillos sin RAR α rh. El control positivo consistía en un anticuerpo
- 15 monoclonal de ratón anti-RAR α (9 α F) diluido de 1/1.000 a 1/200.000. La absorbancia específica obtenida para cada muestra se dividió por la absorbancia específica de la dilución 1/200.000 del control positivo para normalizar los resultados de todos los experimentos y, por tanto, para obtener unidades arbitrarias ($U_A : 1 U_A \text{ muestra } i = A_{\text{muestra espe}} i / A_{\text{control espe positivo 1/200.000}}$). Se consideró que un suero de ratón era positivo para la presencia de anticuerpos anti-RAR α si el valor de U_A era superior a 1.
- 20 **[0080]** Se controló la producción de anticuerpos anti-FrC en los ratones usando procedimientos descritos previamente (Spellerberg y col. 1997; King y col., 1998).

Análisis de la transferencia de ARN

- 25 **[0081]** El análisis de la transferencia de ARN se realizó como se describe en Delva y col., (1999); Fenaux y col., (2001) usando extractos de proteínas de la línea celular NB4. Las membranas se incubaron durante toda la noche con sueros de ratón (dilución 1:50) o anticuerpo anti-RAR α (dilución 1:800 de 115 o dilución 1/1.000 de 9 α) como sonda. Tras la incubación con una IgG antiratón para los sueros inmunes de los ratones o anticuerpo IgG anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante para el anticuerpo policlonal 115 (Boehringer-Mannheim, Meylan, Alemania); las proteínas inmunoreactivas se revelaron usando un kit de detección de quimioluminiscencia ECL (Amersham, Les Ulis, Francia).
- 30

• *Ensayos de citotoxicidad de CTL*

- 35 **[0082]** Los ensayos de CTL se realizaron según se describe en Dresser y col. (1968). Brevemente, los ratones receptores se inyectaron con 10^7 esplenocitos irradiados (25Gy) extraídos de animales tratados con ADN el día 40 en las almohadillas plantares. Después de 3 días se prepararon suspensiones celulares de los ganglios linfáticos extraídos y las células se cultivaron *in vitro* durante 4 días más en ausencia de células estimulantes en medio de
- 40 cultivo que contenía sobrenadante de esplenocitos de rata estimulados con ConA como fuente de linfoquinas (50 U de IL-2/ml). El medio de cultivo utilizado fue medio α -MEM (Life Technologies, Gaithersburg, MD) suplementado con 100 U/ml de penicilina (Life Technologies), glutamina 2 mM (Life Technologies), ME 5×10^{-5} M (Sigma, St Louis, MO) y FCS al 10% inactivado por calor (Life Technologies).

45 • *Estudios de respuesta inmune mediada por células*

- [0083]** Se realizaron ensayos de citotoxicidad mediada por células para determinar si los ratones tratados con ADN generan una respuesta CTL frente a células APL. Los cultivos mixtos de linfocitos se establecieron mediante el cultivo conjunto de esplenocitos de los ratones BALB/c tratados o no (control alogénico) con ADN y células APL
- 50 irradiadas (25 Gy). El medio de cultivo celular consistía en medio α -MEM (Life Technologies, Gaithersburg, MD) suplementado con 100 U/ml de penicilina (Life Technologies), 100 μ g/ml de estreptomicina (Life Technologies), glutamina 2 mM (Life Technologies), 2-ME 5×10^{-5} M (Sigma) y suero fetal de ternera al 10% inactivado por calor (Life Technologies). Después de 6 días, los CTL generados en estos cultivos primarios policlonales se probaron en el ensayo de liberación de ^{51}Cr .
- 55 • *Ensayo de liberación de ^{51}Cr*

- [0084]** Se incubaron 5.000 células diana marcadas con ^{51}Cr (APL o células de ratones sin tratar estimulados durante 48 h con 5 μ g/ml de concanavalina A) con células efectoras a diversas proporciones E:T en pocillos de

fondo redondo durante 4 horas. El porcentaje de liberación de ^{51}Cr específico se calculó como (liberación experimental - espontánea)/(liberación máxima - espontánea) x 100.

• *Ensayos NK*

5

[0085] La actividad NK se evaluó mediante un ensayo de liberación de ^{51}Cr usando líneas celulares YAC como células diana según se ha descrito (Lust y col., 1981).

• *Ensayo de proliferación*

10

[0086] Los ratones con supervivencia prolongada (posterior al día 300 según se muestra en la figura 2B) se sacrificaron y se comprobó la proliferación y liberación de citoquinas. Brevemente, se colocaron 5×10^5 células respondedoras (esplenocitos de ratones FVB/N inyectados con células ALP y tratados con ATRA + PML-RAR α -FrC o ScFvBCL1-FrC) en cada pocillo con 200 μl de medio compuesto por RPMI 1640, FCS al 10% y 2 β -mercaptoetanol al 0,5%. Esplenocitos de ratones sanos tratados con ATRA. Las células estimuladoras (esplenocitos de FVB/N, APL o BALB/c) se irradiaron con 25 Gy y se añadieron 1×10^6 células en cada pocillo. Después de 24, 48 y 72 horas de incubación, se ensayó la incorporación de ^3H -timidina por las células y se recogieron los sobrenadantes para realizar ensayos de liberación de citoquinas. Los cultivos se dispusieron por duplicado.

20 • *Ensayo de liberación de citoquinas*

[0087] La liberación de citoquinas se determinó usando un kit de matrices de perlas citométricas de citoquinas Th1/Th2 de ratón según los protocolos del fabricante (Becton, Dickinson, Pharmingen, San Jose, California). Este kit mide las citoquinas IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ y TNF- α . Se sacrificaron los ratones con supervivencia prolongada de entre los incluidos en el protocolo ilustrado en la figura 8 y sus esplenocitos se cultivaron como se describe a continuación. Brevemente, se incubaron 50 μl de sobrenadante con 50 μl de la mezcla de partículas de captura y 50 μl del reactivo de detección PE de Th1/Th2 de ratón durante 2 horas, y se analizaron en un citómetro FACSCalibur. El análisis se realizó usando el sistema BD CBA (Becton Dickinson, Pharmingen) y el software Cell Quest.

30 • *Análisis de citometría de flujo*

[0088] La expresión de células T y NK se midió en sangre periférica usando los marcadores de superficie celular CD4, CD8 y CD3 con anticuerpos conjugados con FITC o PE que se obtuvieron de Becton Dickinson/Pharmingen (San Jose, California). Las células se tiñeron según los protocolos proporcionados por los fabricantes y se analizaron con un citómetro FACSCalibur. Los análisis de citometría de flujo se realizaron a intervalos de 10 días tras la inyección de ADN en el protocolo preclínico. Los análisis se realizaron usando el software Cell Quest (Becton-Dickinson, San Jose, CA).

Ejemplo 2: Resultados

40

2.a) Modelo animal de leucemia promielocítica aguda I

[0089] El ensayo preclínico diseñado consiste, en primer lugar, en trasplantar primero células de ratones transgénicos APL en ratones singénicos para establecer la enfermedad. Una vez establecida la leucemia, los ratones se separaron en dos grupos terapéuticos (placebo frente a ATRA) y, posteriormente, se asignaron al tratamiento con ADN de PML-RAR α FrC o a diversos controles de plásmidos (figura 1 y resumen en la tabla 1). Se realizaron tres inyecciones a intervalos de 20 días. El ADN de PML-RAR α -FrC inyectado constaba de una secuencia de 105 pb alrededor de la fusión PML-RAR α clonada en dirección 3' de las secuencias promotor y líder del CMV y en marco con las secuencias del fragmento C de la toxina tetánica, PML-RAR α -FrC.

50

Tabla 1: Resumen de la supervivencia de los ratones en el ensayo preclínico

	Nº de ratones/total (% de supervivientes)		
	Día 30	Día 80	Día 120
Placebo	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)
Placebo + pCINPML-RAR α	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)
Placebo + PML-RAR α FrC	6/11 (56%)	2/11 (18%)	0/11 (0%)
ATRA	24/24 (100%)	5/24 (21%)	0/24 (0%)
ATRA+ pCINPML-RAR α	12/12 (100%)	4/12 (33%)	0/12 (0%)
ATRA + PML-RAR α FrC	23/23 (100%)	11/23 (48%)	10/23 (44%)

5 **[0090]** El control de los recuentos de sangre periférica mostraba que los ratones tratados con placebo desarrollaban recuentos altos de leucocitos y bajos de plaquetas, lo que confirmaba la enfermedad como se describió previamente en Dresser y col. (1968). Las autopsias post mórtem mostraron que en todos los casos los órganos estaban hipertrofiados. El estudio de los cortes de tejido mostraba la invasión alrededor de las cavidades periportales del hígado y de los bazo con células promielocíticas agudas confirmando que la causa de muerte era la APL. El ARN extraído de los esplenocitos en puntos temporales diferentes en algunos ratones confirmaba adicionalmente mediante RT-PCR la presencia de la transcripción de PML-RAR α .

2.b) La combinación de ADN de PML-RAR α FrC y ATRA aumenta drásticamente la supervivencia de los ratones tratados

15 **[0091]** Los análisis de supervivencia muestran que los ratones sin ATRA (grupo de placebo) presentaban una supervivencia significativamente prolongada cuando se trataban con PML-RAR α FrC en comparación con los tratados solo con placebo. (Figura 2A, $p < 0,001$). Asimismo, en los ratones tratados con ATRA, la adición de PML-RAR α FrC prolongaba la supervivencia extendiéndola en el 50% de los animales ($p < 0,02$). En comparación con los ratones tratados solo con PML-RAR α FrC, los ratones tratados con ATRA + PML-RAR α FrC presentaban una supervivencia significativamente prolongada ($p < 0,002$). Los análisis estadísticos generales de los diferentes grupos terapéuticos (placebo, solo ATRA o ATRA + PML-RAR α FrC) confirman la ventaja de la politerapia (ATRA + vacunación con ADN, $p = < 0,0001$). Otros protocolos realizados a tiempos diferentes confirman estos resultados y proporcionan diversos criterios sobre la eficacia de la vacunación con ADN en este modelo trasplantable de APL. Los ratones tratados solo con ATRA ($n=24$) y los tratados con ATRA + PML-RAR α FrC ($n=23$) difieren significativamente ($p < 0,01$). Adicionalmente, como la mayor parte de la supervivencia prolongada se producía en la parte última de la curva, se repitió el análisis estadístico para dos periodos anterior y posterior del día 50 y las diferencias entre estos grupos posteriores al día 50 eran altamente significativas ($p < 0,001$, intervalo logarítmico). El primer criterio para la eficacia de la vacunación con ADN es la carga tumoral; de hecho los modelos en ratones creados con la inyección de más de 10^6 células APL no aportaron diferencias estadísticamente significativas. El segundo criterio estaba relacionado con el tipo de construcción plasmídica inyectada (figura 1 y tabla 1). Resultaba claramente obvio que la adición del fragmento C era crucial para potenciar la supervivencia (del 48% de supervivencia con PML-RAR α FrC frente al 33% con las construcciones PML-RAR α de longitud completa a día 60 en los grupos de ATRA), no mostrando esta última construcción diferencias significativas con respecto a los grupos de control de placebo y ATRA, respectivamente. A día 120, el 44% de los ratones del primer grupo permanecían vivos en comparación con ninguno del último (tabla 1).

2.c) Se induce una respuesta de anticuerpos específica frente a RAR α mediante la vacunación con PML-RAR α FrC que aumenta adicionalmente con ATRA

40 **[0092]** Para evaluar los mecanismos responsables del aumento de la respuesta al protocolo de vacunación de ADN, se realizó un seguimiento de la producción de anticuerpos y de la respuesta inmune mediada por células en los ratones. Se estableció una técnica de ELISA para detectar anticuerpos frente a RAR α en el suero de los ratones a diferentes intervalos de tiempo. Se detectaron niveles significativos de anticuerpos frente a RAR α en ratones tratados con ATRA con o sin vacuna de ADN, pero no en los ratones tratados con placebo o solo con la vacuna de ADN (tabla 2). Aunque esto era cierto para ambos grupos tratados con ATRA, el nivel de anticuerpos producido era aparentemente más alto solo con ATRA. Sin embargo, la diferencia entre los grupos de ATRA no era significativa. De manera interesante, en un análisis retrospectivo, los ratones que habían producido anticuerpos al menos una vez presentaban una ventaja para la supervivencia (fig. 3, $P < 0,001$). Se confirmó la especificidad de la prueba de ELISA mediante análisis por inmunotransferencia (fig. 10B). Cuando el suero extraído el día 18 y el día 38 de un ratón tratado con ADN de ATRA + PML-RAR α FrC se aplicó a un filtro de nitrocelulosa con proteínas extraídas de la línea

celular PML-RAR α NB4, se detectaron al menos dos bandas, una con una masa molecular de 105 kDa (pocillos 2 y 3) y otra de 50 kDa (pocillo 3). En comparación con el mismo filtro inmunotransferido con un anticuerpo anti-RAR α (pocillo 1), estas dos bandas se corresponden en tamaño con PML-RAR α y RAR α , respectivamente.

5 Tabla 2: la producción de anticuerpos anti-RAR α en ratones aumenta con la duración del tratamiento

		Día 18	Día 38	Día 58
Placebo	Positivo para Ac ¹ (%)	0/12	0/12	0/12
	m $\pm$ DE ²	NP	NP	NP
	Mediana ²	NP	NP	NP
Placebo + PML-RAR α FrC	Positivo para Ac ¹ (%)	0/11	0/11	0/11
	m $\pm$ DE ²	NP	NP	NP
	Mediana ²	NP	NP	NP
ATRA	Positivo para Ac ¹ (%)	0/12	7/12 (58%)	4/5 (80%)
	m $\pm$ DE ²	NP	2.22 $\pm$ 1.18	13.03 $\pm$ 5.41
	Mediana ²	NP	1,95	15,09
ATRA + PML-RAR α FrC	Positivo para Ac ¹ (%)	1/12 (8%)	5/12 (42%)	7/7 (100%)
	m $\pm$ DE ²	1,79	2,35 $\pm$ 1,71	3,78 $\pm$ 3,9
	Mediana ²	NP	1,82	2,44

NP = no procede

¹ Número de ratones que presentan niveles detectables de anticuerpos/número de ratones vivos a esta fecha.

² Los valores se proporcionan como media, desviación estándar (D.E.) y mediana de Ua a partir de los ratones positivos.

2.d) Se induce una respuesta de anticuerpos específica frente a FrC mediante la vacunación con PML-RAR α FrC + ATRA

10 [0093] Se controló la producción de anticuerpos anti-FrC en los ratones usando procedimientos descritos previamente (Spellerberg y col. 1997; King y col., 1998). En el protocolo de vacunación, los ratones tratados con 5 mg de ATRA /día durante 21 días no producían anticuerpos frente al fragmento C. Un aumento de dosis a 10 mg de ATRA/día durante 21 días inducía una respuesta de anticuerpos frente al fragmento C en 2/2 ratones analizados
15 mientras que no se detectaron anticuerpos frente al fragmento C en el único ratón tratado solo con 10 mg de ATRA sin ADN.

[0094] En este caso es la combinación de ADN y ATRA solo la que induce la respuesta de anticuerpos, ya que las células de ratón no expresan normalmente el fragmento C. Parte de la explicación del mecanismo es que las
20 células que incorporan el ADN exógeno y procesan la proteína (transfección *in vivo*) son inducidas a apoptosis por ATRA y el antígeno fragmento C entra en las células presentadoras de antígeno (CPA) para inducir de esta forma la producción de anticuerpos.

2.e) Los ratones tratados con PML-RAR α FrC + ATRA presentan un aumento en los niveles de células CD4+ o CD8+

25 [0095] Se observó un aumento en el número de células CD4+ y CD8+ en sangre periférica a día 18 en ratones que presentaban respuestas parciales y completas, dándose predominantemente en aquellos tratados con ATRA + PML-RAR α FrC (figuras 5A y 5B).

30 [0096] La población NK estaba aumentada en ratones APL en comparación con los ratones FVB/N control y en los inyectados con pCINPML-RAR α y con PML-RAR α -FrC. No se detectaron diferencias en la actividad NK en el bazo de ninguno de los animales inmunizados en comparación con los controles FVB/N normales. Aunque los autores fueron capaces de confirmar esto en un entorno alogénico, en el que los ratones FVB/N pueden generar
35 CTL, no fue posible detectar niveles de células T citotóxicas (CTL) significativamente elevados. Esto podría explicarse por la cantidad normalmente baja de CTL producida y/o por la falta de células diana competentes en este modelo.

40 [0097] Los datos de supervivencia muestran que la construcción PML-RAR α -FrC confiere una prolongación de la esperanza de vida sola o en combinación con ATRA y que las secuencias del fragmento C son necesarias para

aumentar la supervivencia. La significativa prolongación de la esperanza de vida tras la vacunación sugiere que se habían inducido respuestas anti-APL por la vía de la vacuna de ADN confirmada mediante el aumento en el número de células CD4+ y el aumento de anticuerpos anti-RAR α . Previamente se refirió que las células de APL irradiadas solas podrían inducir una respuesta de anticuerpos, por tanto, es probable que este efecto inmune sea específico y esté desencadenado por las células APL como fuente de antígeno tumoral. De hecho, el ensayo ELISA mostraba una respuesta de anticuerpos específicamente frente a RAR α en ratones tratados con ATRA. Esta producción de anticuerpos puede estar correlacionada con el aumento en el número de células T CD4+ que se sabe son efectoras de la vacuna de ADN, usando estas construcciones de FrC (King y col., 1998; Bogen y col., 1996; Rice y col., 2001). Se han notificado resultados similares de producción de anticuerpos para otros modelos murinos de vacunas de ADN o de péptidos (King y col., 1998; Spellerberg y col., 1997). Las células T CD4+ están implicadas en el establecimiento de la memoria inmune y pueden explicar la prolongación o retraso del efecto (Chen y col., 2000).

2.f) Los ratones tratados con PML-RAR α FrC + ATRA presentan un aumento en los niveles de interferón gamma

[0098] Se realizaron ensayos de proliferación y de liberación de citoquinas en ratones de supervivencia prolongada (es decir, ratones tratados con ATRA solo o ATRA y PML-RAR α FrC del estudio mostrado en la figura 2B). Aunque podía inducirse a los esplenocitos de ratones tratados con ATRA y PML-RAR α FrC a proliferar en presencia de esplenocitos de ratones Balb/c alogénicos, estos no proliferaban más que los esplenocitos control de FVB/N cuando se estimulaban con células APL singénicas (datos no mostrados).

[0099] Por el contrario, se apreció un aumento específico en los niveles de INF- γ (6 veces) tras 48 horas de cultivo cuando los esplenocitos de ratones tratados con la combinación de ATRA y PML-RAR α FrC eran estimulados con células APL irradiadas en comparación con los esplenocitos de ratones sanos tratados solo con ATRA (327 pg/ml frente a 52 pg/ml) ($P < 0,02$) (figura 6). No se observaron diferencias significativas en otras citoquinas como IL-2, IL-4, IL-5 y TNF α . Todas estas citoquinas aumentaban cuando se cultivaban los mismos esplenocitos efectoras con esplenocitos de Balb/c.

2.g) Los ratones tratados con ScFvBCL9-FrC + ATRA o PML-RAR α ASFrC + ATRA presentaban un aumento de la esperanza de vida y un aumento del nivel de TNF α .

[0100] Cuando se usó una construcción irrelevante (es decir, no específica) como ScFvBCL1-FrC (figura 8) o PML-RAR α AS-FrC (figura 9), se observó que los ratones presentaban un aumento de la esperanza de vida con elevación en los niveles de TNF α aproximadamente un año después de la inyección de células APL.

[0101] En particular, la combinación de ATRA + PML-RAR α ASFrC era eficaz para aumentar la esperanza de vida de los ratones transgénicos RAS/BCL-2, CBF β -MYH11/BCL-2 o RAS/CBF β -MYH11/BCL-2 que normalmente podrían morir de una enfermedad como el síndrome mielodisplásico tardío (de insuficiencia medular) (figura 9).

[0102] Las secuencias complementarias son altamente inmunogénicas ya que normalmente no existen y, por tanto, son «extrañas» para el organismo. Por consiguiente, no causan ningún peligro de autoinmunidad.

[0103] En este contexto, el ADN actúa como adyuvante. Esta combinación debería funcionar contra otros cánceres ya que se explotan las propiedades apoptóticas del compuesto retinoide para inducir la apoptosis de las células tumorales para diseminar antígenos asociados a tumores y el efecto combinado de los retinoides para inducir Th2 y anticuerpos y del ADN para inducir Th1 y CTL para el efecto terapéutico a largo plazo.

[0104] En el experimento recogido anteriormente, los ratones con la supervivencia más larga permanecen en esta situación durante aproximadamente un año y, finalmente, sucumben a la enfermedad. Sin embargo, es necesario recordar que, a diferencia del modelo de trasplante donde potencialmente es posible la cura, en un modelo transgénico, vencerá siempre el gen anómalo ya que no pueden erradicarse estas células porque están en la línea germinal. No obstante, la mayoría de los cánceres se adquieren somáticamente y pocos son hereditarios.

[0105] Puesto que las pautas terapéuticas para la APL a base de ATRA convencionales son de hecho muy buenas para inducir remisiones completas y prolongación de la supervivencia en casos de APL humana, la vacunación con ADN en este contexto puede tener un beneficio adicional para el control de la enfermedad residual mínima, donde las células de leucemia pueden ser menos sensibles a fármacos administrados previamente. Este es también el momento en que puede comprobarse que la vacunación es más eficaz de lo que los inventores han mostrado ya que la respuesta inmune y la eficacia de la vacunación de ADN se correlaciona con la carga tumoral.

[0106] Más en general, los presentes resultados muestran que la vacunación con ADN debería combinarse con ATRA. Se ha descrito bien el carácter adyuvante de la vitamina A (Dresser y col., 1968), aunque en el estudio actual se insiste en que su metabolito activo ATRA es un buen adyuvante para estimular la respuesta inmune de expresión de ADN.

[0107] ATRA, además de sus propiedades para inducir respuestas Th2 inducía la diferenciación. La posterior apoptosis y diseminación del antígeno permitían respuestas inmunes de producción de anticuerpos según se determina mediante ELISA usando RAR α recombinante. Esto explicaba la observación por primer vez de que los ratones APL tratados solo con ATRA producían anticuerpos anti-RAR α , lo que está relacionado con la mejora de la supervivencia (véase arriba). Sin embargo como con la APL humana, ATRA solo no era suficiente y todos los ratones recaían de la enfermedad y morían. Las construcciones del fragmento C parecen ser necesarias para actuar de forma sinérgica con ATRA para rescatar a los ratones de la muerte inducida por leucemia. Al contrario que en los ratones tratados con la construcción específica ATRA + PML-RAR α FrC donde se aumenta IFN γ (véase anteriormente), los niveles de TNF α están aumentados en ratones que se corresponden con el tratamiento con ADN ATRA + ScFcBCL1 (figura 7).

[0108] Se plantea la hipótesis de que las respuestas Th1 inducidas por ADN llevan a una actividad CTL o NK como posibles mecanismos de protección. En las respuestas Th1, las células T activadas secretan tanto TNF α como IFN γ , sin embargo, es interesante apreciar que con la construcción específica aumenta IFN γ , mientras que con la construcción no específica, se usa TNF α .

[0109] Por tanto, la hipótesis es que ATRA induce apoptosis y también promueva las respuestas de anticuerpos, mientras que el ADN induce una respuesta Th1 que resulta en una vigilancia inmune mediada por CTL o NK de las células malignas.

[0110] En resumen, los datos preclínicos recogidos en este estudio muestran que la construcción *PML-RAR α FrC* confiere una prolongación de la esperanza de vida sola o en combinación con ATRA. Además, este estudio muestra por primer vez que la acción adyuvante de la combinación de ATRA con el fragmento C puede ayudar a mantener las remisiones clínicas estimulando las respuestas inmunes frente a los antígenos generados por individuos enfermos.

BIBLIOGRAFÍA

[0111]

- Bogen y col., (1996) Eur J Immunol 26, 2671-9.
- Brown y col., (1997) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 2551-6.
- Cassinat, B. y col. (2000) Leukemia 14, 324-328.
- Chen, S.A. y col. (2000) Clin Cancer Res 6, 4381-8.
- de Thé, H. y col. (1991) Cell 66, 675-84.
- Delva y col. (1999) Molecular & Cellular Biology, 19, 7158-67.
- Dengler y col. (1995) Anticancer Drugs. 6, 522-32.
- Dermime, S. y col. (1996) Clinical Cancer Research 2, 593-600.
- Dresser, D.W. (1968) Nature 217, 527-9.
- Fairweather y Lyness (1986) Nuc. Acid Res. 14, 7809-7812.
- Fairweather y col. (1986) J. Bacteriol. 165, 21-27.
- Fenaux y col. (2001) Seminars in Hematology 38, 13-25.
- Gambacorti-Passerini, C. y col. (1993) Blood 81, 1369-75.
- Gorczyca, (1993) Cancer Res 53, 1945-51.
- King, C.A. y col. (1998) Nature Medicine 4, 1281-6.
- Lallemand-breitenbach y col. (1999) J Exp Med 189, 1043-1052.
- Lust y col. (1981) Journal of Experimental Medicine 154, 306-17.
- Mir y col., (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96, 4262-4267.
- Raff, M. (1998) Nature. 396, 119-122.
- Rice y col., (2001) J Immunol 167, 1558-65.
- Sambrook, (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Spellerberg y col., (1997) Journal of Immunology 159, 1885-92.
- Stevenson, F.K. y col. (1995) Immunological Reviews 145, 211-28.

- Syrengelas y col., (1996) Nature Medicine 2, 1038-41.
- Tang y col. Nature (1992) 356, 152.
- Yun y col., (1999) Tissue Antigens 54, 153-61.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

[0112]

- <110> INSERM University of Wales College of Medicine
- 10 <120> Vacuna de ADN combinada con un inductor de la apoptosis de células tumorales
- <130> BET 03P0149
- 15 <150>EP 02291069.9
- <151> 2002-04-26
- <160> 13
- 20 <170> PatentIn versión 3,1
- <210> 1
- <211> 105
- <212> ADN
- 25 <213> Artificial : PML-RARalfa
- <400> 1
- gaggtcttcc tgcccaacag caaccacgtg gccagtggcg ccggggagggc agccattgag 60
- accagagca gcagttctga agagatagtg ccagccctc cctcg 105
- 30
- <210> 2
- <211> 1461
- <212> ADN
- <213> Artificial : PML-RARalfa-FrC
- 35
- <400> 2
- gaggtcttcc tgcccaacag caaccacgtg gccagtggcg ccggggagggc agccattgag 60

accagagca gcagttctga agagatagtg cccagccctc cctcgaaaaa ccttgattgt	120
tgggtcgaca acgaagaaga catcgatggt atcctgaaaa agtctaccat tctgaacttg	180
gacatcaaca acgatattat ctccgacatc tctggtttca actcctctgt tatcacatat	240
ccagatgctc aattgggtgcc gggcatcaac ggcaaagcta tccacctggg taacaacgaa	300
tcttctgaag ttatcgtgca caaggccatg gacatcgaat acaacgacat gttcaacaac	360
ttcacogtta gcttctgggt ggcggttccg aaagtctctg ctccccacct ggaacagtac	420
ggcactaacg agtactccat catcagctct atgaagaaac actccctgtc catcggtctc	480
ggttgggtctg tttccctgaa gggtaacaac ctgatctgga ctctgaaaga ctccgcgggc	540
gaagtctgtc agatcacttt ccgogacctg ccggacaagt tcaacgcgta cctggctaac	600
aaatgggttt tcatcactat cactaacgat cgtctgtctt ctgctaacct gtacatcaac	660
ggcgttctga tgggctccgc tgaaatcact ggtctgggcg ctatccgtga ggacaacaac	720
atcactotta agctggaccg ttgcaacaac aacaaccagt acgtatccat cgacaagttc	780
cgtatcttct gcaaagcact gaacccgaaa gagatcgaaa aactgtatac cagctacctg	840
tctatcacct tcttgogtga cttctggggg aaccgcgtgc gttacgacac cgaatattac	900
ctgatccgg tagcttctag ctctaaagac gttcagctga aaaacatcac tgactacatg	960
tacctgacca acgcgcgctc ctacactaac ggtaaaactga acatctacta ccgacgtctg	1020
tacaacggcc tgaaattcat catcaaacgc tacactccga acaacgaaat cgattctttc	1080
gttaaactctg gtgacttcat caaactgtac gtttcttaca acaacaacga acacatcggt	1140
ggttaccga aagacggtaa cgttttcaac aacctggaca gaattctgcg tgttggttac	1200
aacgctccgg gtatcccgct gtacaaaaaa atggaagctg ttaaactgcg tgacctgaaa	1260
acctactctg ttcagctgaa actgtacgac gacaaaaacg cttctctggg tctggttggg	1320
accacaacg gtcagatcgg taacgacccg aacogtgaca tctgatcgc ttctaactgg	1380
tacttcaacc acctgaaaga caaaatcctg ggttgcgact ggtacttctg tccgacogat	1440
gaagggttggg ccaacgacta g	1461

<210> 3

<211> 35

5 <212> ADN

<213> Artificial : cebador

<400> 3

adgctcttc ctccgaggtc ttctgcccacacgc 35

5 <210> 4

<211> 35

<212> ADN

<213> Artificial : cebador

10 <400> 4

adgctcttc ctccgaggg agggctgggc actat 35

<210> 5

15 <211> 32

<212> ADN

<213> Artificial : cebador

<400> 5

20

adgctcttc cggagtgggc cccgggggac ac 32

<210> 6

<211> 32

25 <212> ADN

<213> Artificial : cebador

<400> 6

30 adgctcttc caaaaacctt gattgtggg tc 32

<210> 7

<211> 666

<212> ADN

35 <213> Artificial : PML-RARalfa-FrC

<220>

<221> misc_característica

<222> (1)..(57)

40 <223> líder de VH1

<220>

<221> misc_característica

<222> (58)..(109)

45 <223> PML

<220>

<221> misc_característica

<222> (111)..(162)

50 <223> RARalfa

<220>

<221> misc_característica

<222> (165)..(666)

55 <223> FrC

<400> 7

```

atggactgga cctggagggg cttctgcttg ctggctgtgg ccccgggggc ccactccgag 60
gtcttctctgc ccaacagcaa ccacgtggcc agtggcgccg gggaggcagc cattgagacc 120
cagagcagca gttctgaaga gatagtgcc agccctccct cgaaaaacct tgattgttgg 180
gtcgacaacg aagaagacat cgatgttatc ctgaaaaagt ctaccattct gaacttggac 240
atcaacaacg atattatctc cgacatctct gggttcaact cctctgttat cacatatcca 300
gatgetcaat tgggtgccggg catcaacggc aaagctatcc acctgggttaa caacgaatct 360
tctgaagtta tcgtgcacaa ggccatggac atcgaataca acgacatgtt caacaacttc 420
accgttagct totggctggc gggtccgaaa gtttctgctt cccacctgga acagtacggc 480
actaacgagt actccatcat cagctctatg aagaaacact ccctgtccat cggctctggt 540
tgggtctgtt ccctgaaggg taacaacctg atctggactc tgaaagactc cgcgggcgaa 600
agttcgtcag atcactttcc gcgacctgcc ggacaaagtt caacgcgtac ctggctaaca 660
aatggg 666

```

<210> 8

5 <211> 105

<212> DNA

<213> Artificial : PML-RARalfa AS

<400> 8

10

```

cgagggaggg ctgggcacta tctcttcaga actgctgctc tgggtctcaa tggctgcctc 60
cccggcgcca ctggccacgt gggtgctggt gggcaggaag acctc 105

```

<210> 9

<211> 1360

15 <212> DNA

<213> Artificial : FrC

<400> 9

```

atgaaaaacc ttgattgttg ggtcgacaac gaagaagaca tcgatgttat cctgaaaaag      60
tctaccattc tgaacttgga catcaacaac gatattatct ccgacatctc tggtttcaac      120
tcctctgtta tcacatatcc agatgctcaa ttggtgccgg gcatcaacgg caaagctatc      180
cacctggtta acaacgaatc ttctgaagtt atcgtgcaca aggccatgga catcgaatac      240
aacgacatgt tcaacaactt caccgtagc ttctggctgc gcgttccgaa agtttctgct      300
tcccacctgg aacagtacgg cactaacgag tactocatca tcagctctat gaagaaacac      360
tcctgtcca tgggtctctg ttggtctgtt tcctgaagg gtaacaacct gatctggact      420
ctgaaagact ccgcggggcg agttcgtcag atcactttcc gcgacctgcc ggacaagtcc      480
aacgcgtacc tggctaacaa atgggttttc atcactatca ctaacgatcg tctgtcttct      540
gctaacctgt acatcaacgg cgttctgatg ggctccgctg aaatcactgg tctgggcgct      600
atccgtgagg acaacaacat cactcttaag ctgaaccgtg gcaacaacaa caaccactac      660
gtatccatcg acaagttccg tatcttctgc aaagcactga acccgaaaga gatcgaaaaa      720
ctgtatacca gctacctgtc tatcaccttc ctgcgtgact tctggggtaa cccgctgcgt      780
tacgacaccg aatattacct gatcccgta gcttctagct ctaaagacgt tcagctgaaa      840
aacatcactg actacatgta cctgaccac gcgcgcctc acactaacgg taaactgaac      900
atctactacc gacgtctgta caacggcctg aaaatcatca tcaaacgcta cactcogaac      960
aacgaaatcg attctttcgt taaatctggt gacttcatca aactgtacgt ttcttacaac     1020
aacaacgaac acatcgttgg ttaccgaaa gacggtaacg tctttcaaca acctggacag     1080

aattctgcgt gttggttaca acgctccggg tatcccgctg tacaaaaaaa gggaagctgt     1140
taaactgcgt gacctgaaaa cctactctgt tcagctgaaa ctgtacgacg acaaaaacgc     1200
ttctctgggt ctggttggtt cccacaacgg tcagatcggg aacgacccga acctgacat     1260
cctgatcgct tctaactggt acttcaacca cctgaaagac aaaatcctgg gttgcgactg     1320
gtacttcgtt ccgaccgatg aagggttgac caacgactag                               1360

```

<210> 10

<211> 1519

5 <212> DNA

<213> Artificial : PML-RARalfaAS-Frc

<220>

<221> misc_característica
 <222> (1)..(57)
 <223> líder de VH1

5 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (58)..(162)
 <223> PML-RARalfaAS

10 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (163)..(1519)
 <223> FrC

15 <400> 10

```

atggactgga cctggagggg tttctgcttg ctggctgtgg ccccgggggc ccactccga      60
gggagggctg ggcactatct cttcagaact gctgctctgg gtctcaatgg ctgcctccc      120
ggcgccactg gccacgtggt tgctgttggg caggaagacc tcaaaaacct tgattgttgg      180
gtcgacaacg aagaagacat cgatgttatc ctgaaaagt ctaccattct gaacttggac      240
atcaacaacg atattatctc cgacatctct ggtttcaact cctctgttat cacatatoca      300
    
```

```

gatgctcaat tgggtgccggg catcaacggc aaagctatcc acctgggtaa caacgaatct 360
tctgaagtta tcgtgcacaa ggccatggac atcgaataca acgacatggt caacaacttc 420
accgtagct tctggctgcg cgttccgaaa gtttctgctt cccacctgga acagtacggc 480
actaacgagt actccatcat cagctctatg aagaaacact coctgtccat cggctctggg 540
tgggtctgttt coctgaaggg taacaacctg atctggactc tgaaagactc cgcgggcgaa 600
gttcgtcaga tcactttccg cgacctgccg gacaagttca acgcgtacct ggctaacaaa 660
tgggttttca tcactatcac taacgatcgt ctgtcttctg ctaacctgta catcaacggc 720
gttctgatgg gctccgctga aatcactggg ctggggcgcta tccgtgagga caacaacatc 780
actcttaagc tgaaccgtgg caacaacaac aaccactacg tatccatcga caagttccgt 840
atcttctgca aagcactgaa cccgaaagag atcgaaaaac tgtataaccag ctacctgtct 900
atcaccttcc tgcgtgactt ctggggtaac ccgctgcgtt acgacaccga atattacctg 960
atcccggtag cttctagctc taaagaogtt cagctgaaaa acatcactga ctacatgtac 1020
ctgaccacag cgcctgctta cactaacggg aaactgaaca tctactaccg acgtctgtac 1080
aacggcctga aaatcatcat caaacgtac actccgaaca acgaaatcga ttctttcgtt 1140
aaatctgggtg acttcatcaa actgtacgtt tcttacaaca acaacgaaca catcgttggg 1200
tacccgaaag acggtaacgt ctttcaacaa cctggacaga attctgcgtg ttgggtacaa 1260
cgctccgggt atcccgctgt acaaaaaaag ggaagctgtt aaactgcgtg acctgaaaac 1320
ctactctgtt cagctgaaac tgtacgacga caaaaaacgt tctctgggtc tggttggtac 1380
ccacaacggg cagatcggta acgaccgaa ccgtgacatc ctgatcgctt ctaactggta 1440
cttcaaccac ctgaaagaca aaatcctggg ttgcgaactg tacttcgttc cgaccgatga 1500
aggttggacc aacgactag 1519

```

<210> 11

<211> 537

5 <212> DNA

<213> Artificial : ScFvBCL1-FrC

<220>

<221> misc_característica

10 <222> (1)..(9)

<223> Secuencia Kozak

<220>

<221> misc_característica
<222> (10)..(66)
<223> líder de BCL1

5 <220>
<221> misc_característica
<222> (67)..(537)
<223> ScFvBCL1-FrC

10 <400> 11

```

gccgccacca tggggtggag ctgtatcatc ttctttctgg tagcaacagc tacaggtgtg      60
cactcccagg tccagctgca gcagtctggg cctgagggtg tgaggcctgg ggtctcagtg      120
aagatttcct gcaaggggtc cggctacaca ttactgatt atgctatgca ctgggtgaag      180
cagagtcatt caaagagtct agagtggatt ggagttatta gtacttaca tggtaatata      240
aactacaacc agaagttaa gggcaaggcc acaatgactg tagacaaatc ctccagcaca      300
gcctatatgg aacttgccag attgacatct gaggattctg ccatctatta ctgtgcaaga      360
tactatggta actactttga ctactggggc caagggacca cggtcacagt ctctcaggt      420
ggaggcgggt caggcggagg tggctctggc ggtggcggat cccaggctgt tgggacatgg      480
gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc ttgacgttgg agtccacgtt ctttaaat      537

```

<210> 12
15 <211> 30
<212> DNA
<213> Artificial : cebador

<400> 12
20

```

adgctctc ccccgagg agggctggc      30

```

<210> 13
<211> 30
25 <212> DNA
<213> Artificial : cebador

<400> 13

```

30 adgctctc ctgaggtc ttctgcca      30

```

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna que comprende:
 - 5 i) un compuesto retinoide que induce diferenciación y apoptosis; y
 - ii) un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido inmunogénico fusionado en marco con una secuencia que codifica un fragmento C (FrC) de la toxina tetánica;
- 10 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
2. La composición de vacuna según la reivindicación 1, en la que dicho compuesto retinoide que induce diferenciación y apoptosis tiene actividad adyuvante de la respuesta biológica inducida por el ácido nucleico que codifica el polipéptido inmunogénico.
- 15 3. La composición de vacuna según la reivindicación 2, en la que dicho compuesto retinoide que induce diferenciación y apoptosis se selecciona entre el grupo compuesto por ácido todo trans retinoico (ATRA), ácido 9-cis retinoico (AR 9-cis), N-(4-hidroxifenil)retinamida (4 HPR) y ácido 13-cis retinoico (AR 13 cis).
- 20 4. La composición de vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido inmunogénico comprende la secuencia SEQ ID N° 10 o la SEQ ID N° 11.
5. La composición de vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el polipéptido
- 25 inmunogénico comprende un antígeno tumoral.
6. La composición de vacuna según la reivindicación 5, en la que la secuencia que codifica el antígeno tumoral es la SEQ ID N° 1.
- 30 7. La composición de vacuna según las reivindicaciones 5 o 6, que comprende un ácido nucleico compuesto por una secuencia SEQ ID N° 2 o SEQ ID N° 7.
8. Una composición de vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en un
- 35 método para el tratamiento del cáncer.
9. La composición de vacuna para el uso de la reivindicación 8, en el que el cáncer es leucemia promielocítica aguda.
10. Un kit que comprende:
- 40 i) una primera composición farmacéutica que comprende un compuesto retinoide que induce diferenciación y apoptosis; y
- ii) una segunda composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico compuesto por una secuencia que
- 45 codifica un polipéptido inmunogénico fusionado en marco con una secuencia que codifica un fragmento C (FrC) de la toxina tetánica.
11. El kit según la reivindicación 10, en el que el polipéptido inmunogénico comprende un antígeno tumoral.
- 50 12. El kit según la reivindicación 11, en el que dicho ácido nucleico comprende a) una secuencia que codifica un antígeno PML-RAR α y además comprende b) una secuencia del fragmento C (FrC) de la toxina tetánica.
13. El kit según la reivindicación 12, en el que la secuencia a) que codifica el antígeno PML-RAR α es la
- 55 SEQ ID N° 1.
14. El kit según la reivindicación 12 o 13, que comprende la secuencia SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 7.
15. El kit según la reivindicación 10, en el que el ácido nucleico comprende la secuencia SEQ ID N° 10 o

SEQ ID N° 11.

16. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en el que dicho compuesto no retinoide que induce diferenciación y apoptosis tiene actividad adyuvante de la respuesta biológica inducida por el ácido nucleico que codifica el antígeno inmunogénico.
17. La composición de vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, en la que el compuesto retinoide que induce diferenciación y apoptosis se selecciona entre el grupo compuesto por ácido todo trans retinoico (ATRA), ácido 9-cis retinoico (AR 9-cis), N-(4-hidroxifenil)retinamida (4 HPR) y ácido 13-cis retinoico (AR 13 cis).
18. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, en el que se pretende administrar dicho compuesto retinoide que induce diferenciación y apoptosis y dicho ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido inmunogénicos secuencialmente.
19. Una combinación de:
 - una composición i) que comprende un compuesto retinoide que induce diferenciación y apoptosis; y
 - una composición ii) que comprende un ácido nucleico compuesto por una secuencia que codifica un polipéptido inmunogénico fusionado en marco con una secuencia que codifica un fragmento C (FrC) de la toxina tetánica;para su uso simultáneo o secuencial en un procedimiento para el tratamiento del cáncer.
20. La combinación para su uso según la reivindicación 19, en la que dicha composición ii) comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno tumoral.
21. La combinación para su uso según la reivindicación 20, en la que dicho ácido nucleico que codifica un antígeno tumoral comprende a) una secuencia que codifica un antígeno PML-RAR α y además comprende b) una secuencia del fragmento C (FrC) de la toxina tetánica.
22. La combinación para su uso según la reivindicación 21, en la que la secuencia a) que codifica el antígeno PML-RAR α es la SEQ ID N° 1.
23. La combinación para su uso según la reivindicación 21 o 22, que comprende la secuencia SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 7.
24. La combinación para su uso según la reivindicación 19, en la que dicha composición (ii) comprende una secuencia SED ID N° 10 o SEQ ID N° 11.
25. La combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, en el que el compuesto retinoide tiene actividad adyuvante en la respuesta biológica inducida por el ácido nucleico que codifica el polipéptido inmunogénico.
26. La combinación para su uso según la reivindicación 25, en la que el compuesto retinoide que induce diferenciación y apoptosis se selecciona entre el grupo compuesto por ácido todo trans retinoico (ATRA), AR 9-cis, 4 HPPR y AR 13-cis.
27. La combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 26, en la que el cáncer es leucemia promielocítica aguda.
28. La combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 27, en la que dicho uso es un uso secuencial de dichas composiciones i) y ii) en el tratamiento del cáncer.
29. La combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 27, en la que dicho uso es un uso simultáneo de dichas composiciones i) y ii) en un procedimiento para el tratamiento del cáncer.

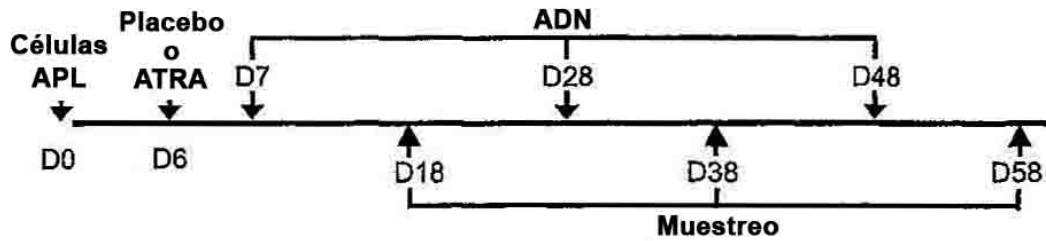


FIG.1

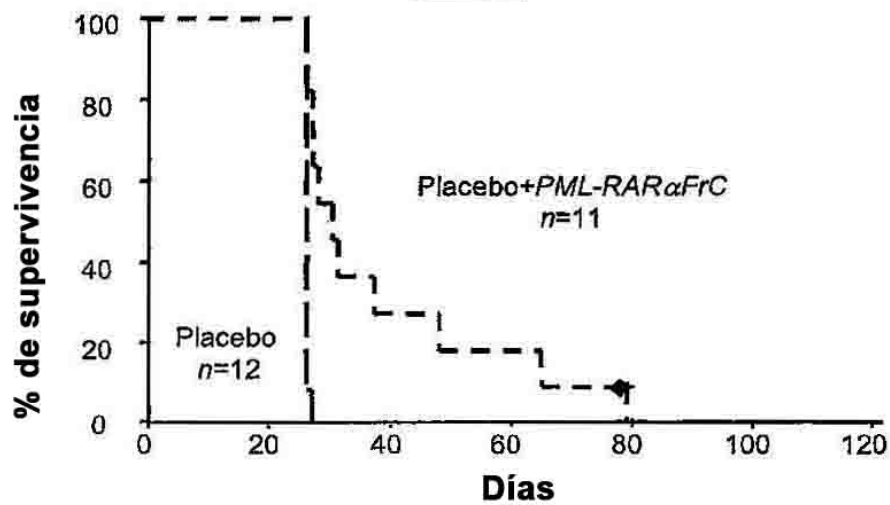


FIG.2A

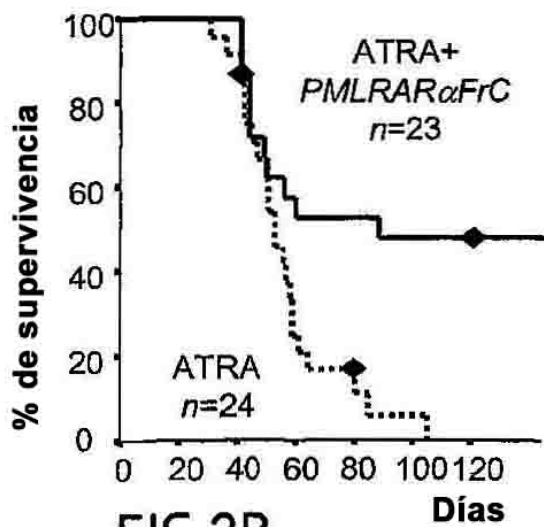


FIG.2B

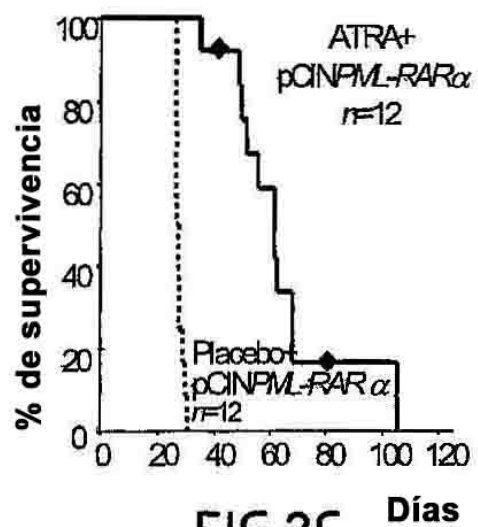


FIG.2C

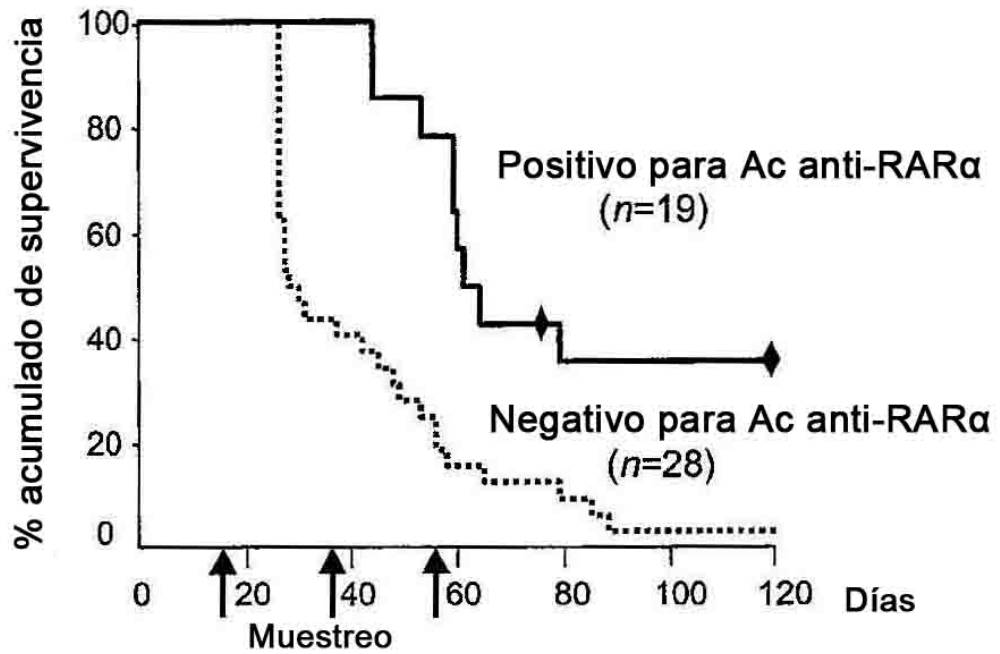


FIG.3

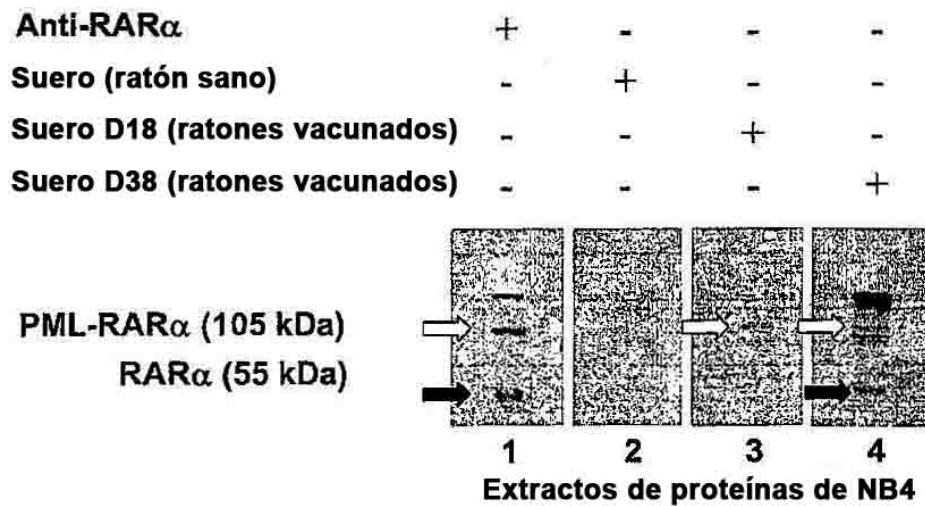


FIG.4

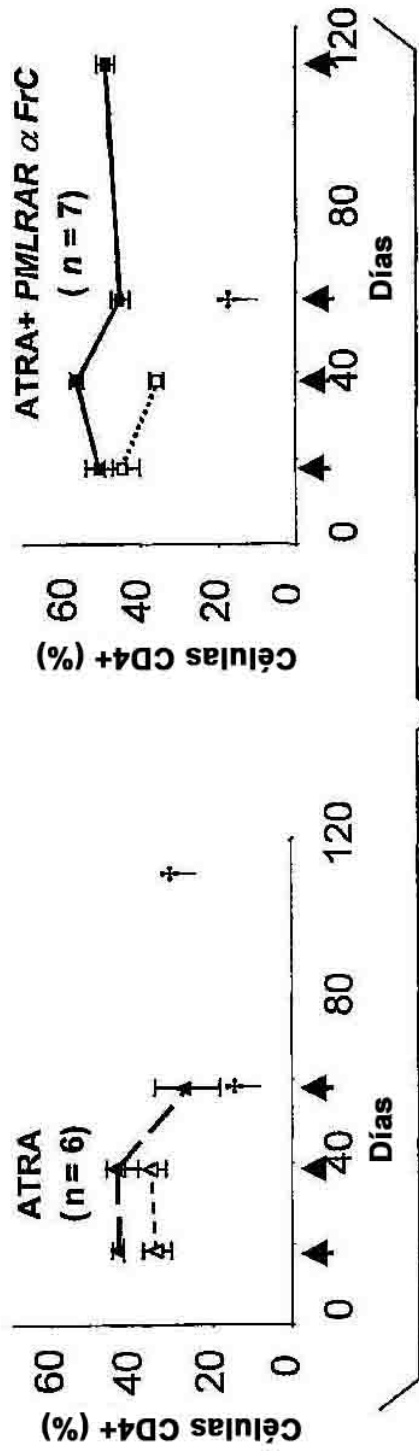


FIG. 5A

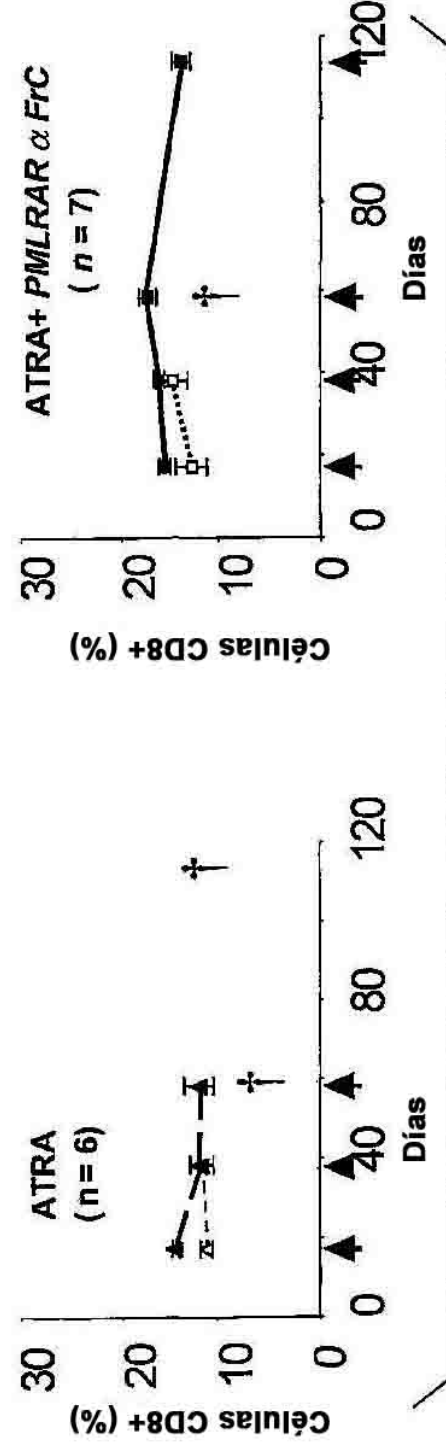


FIG. 5B

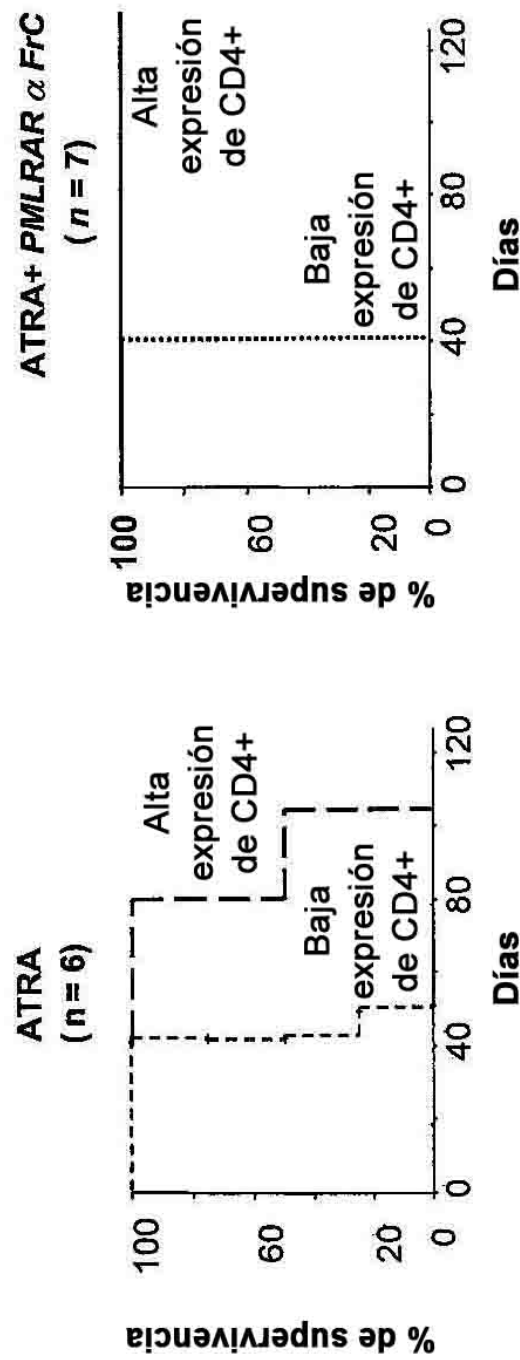


FIG.5C

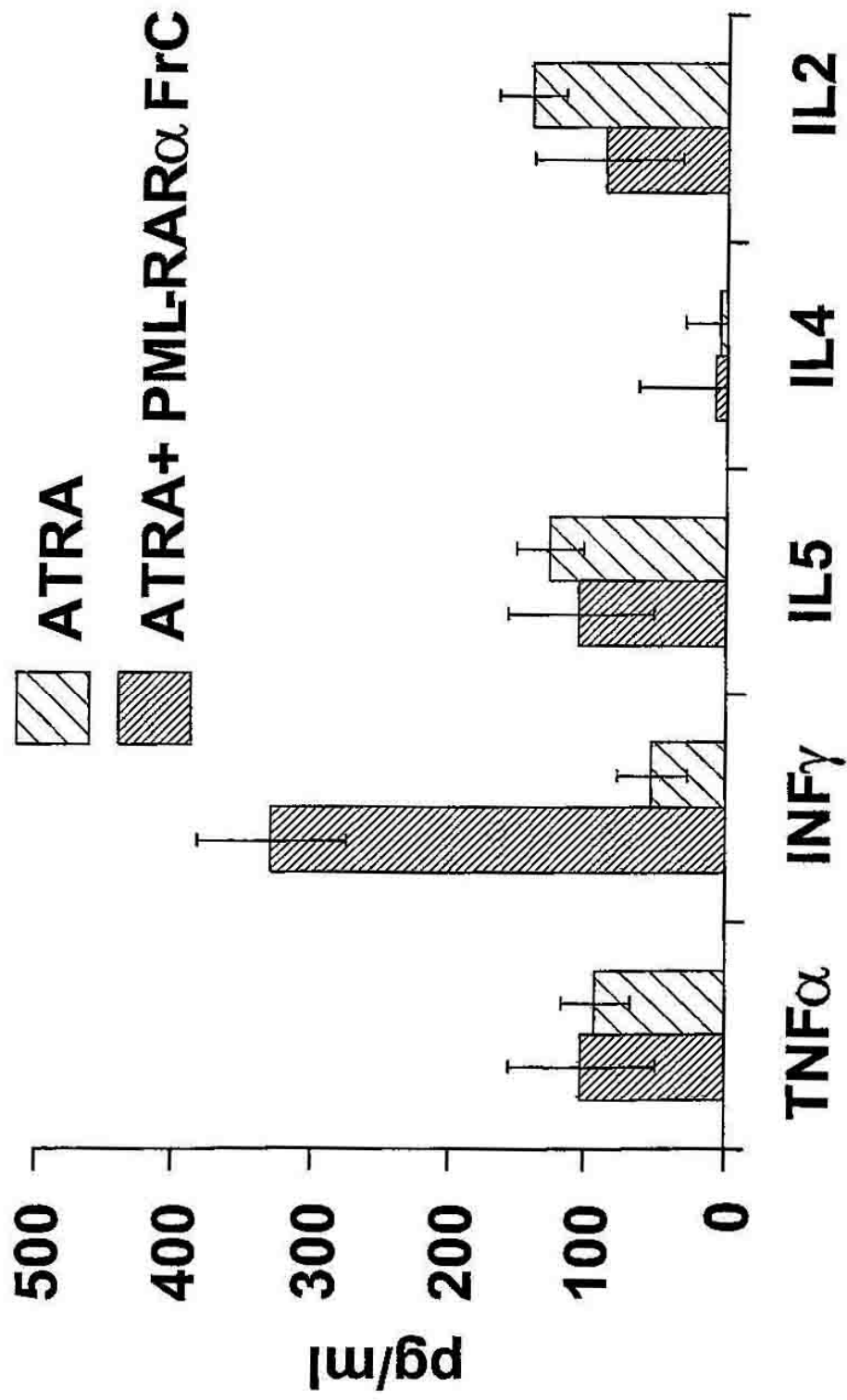


FIG.6

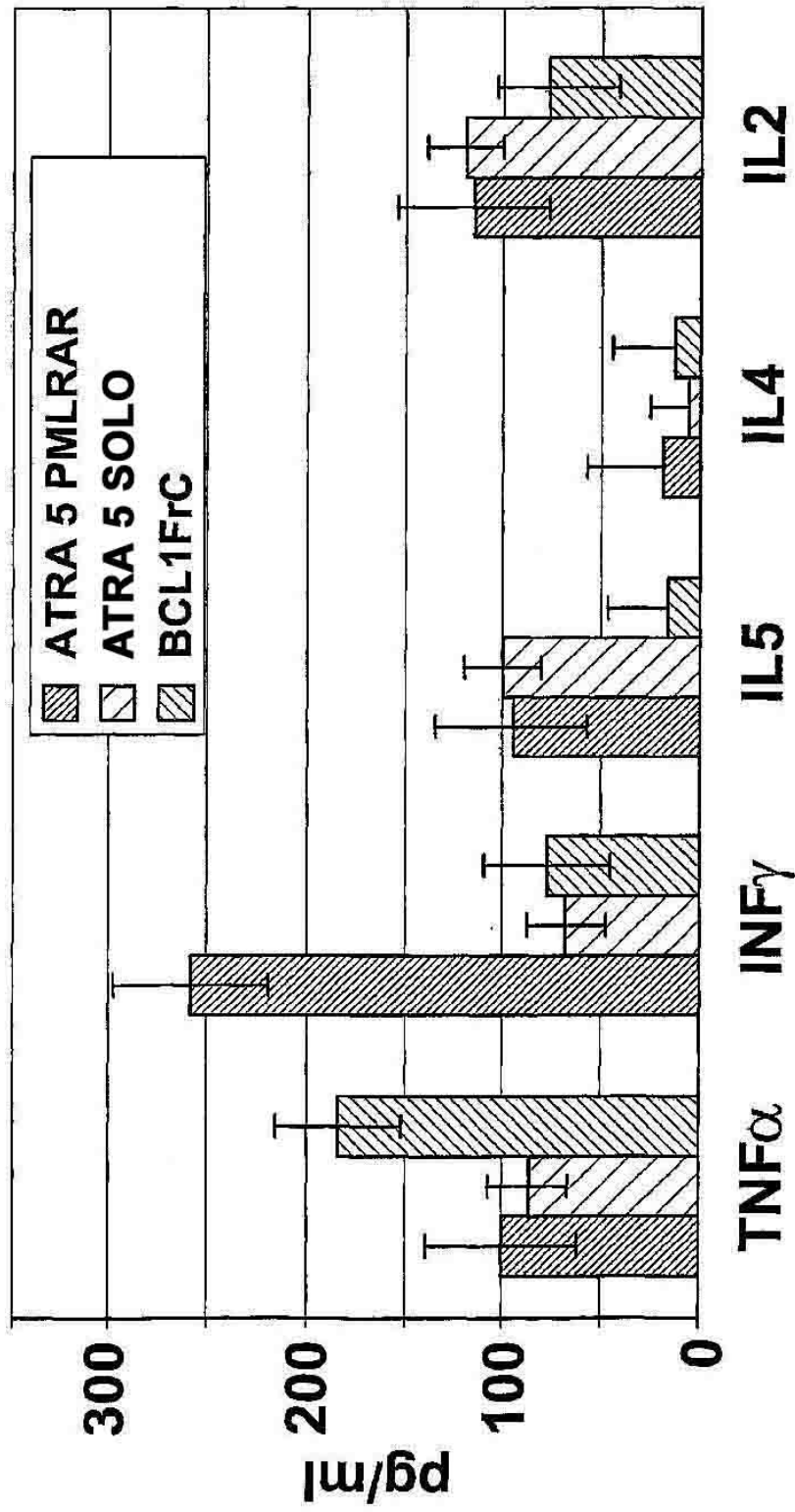
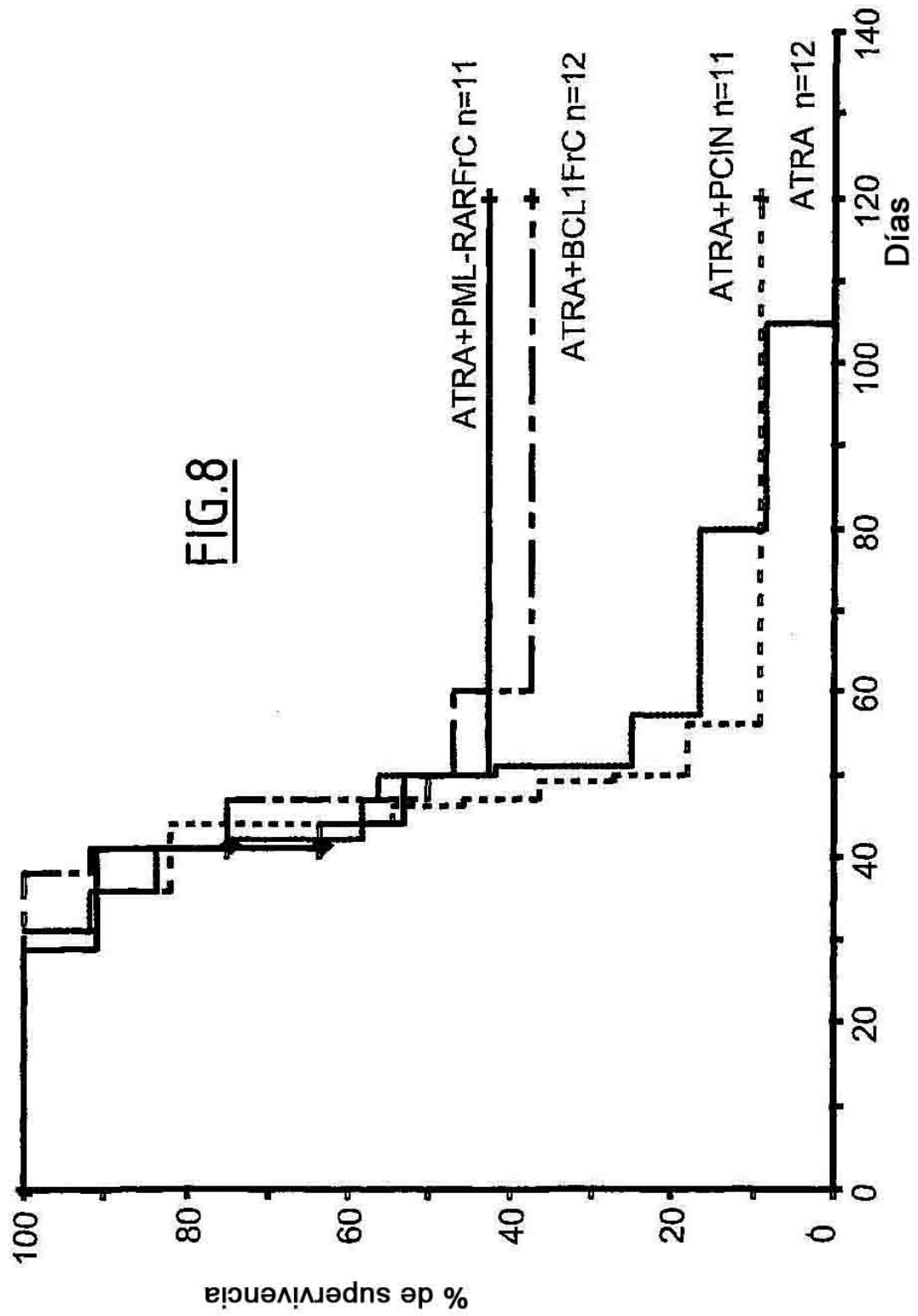


FIG.7



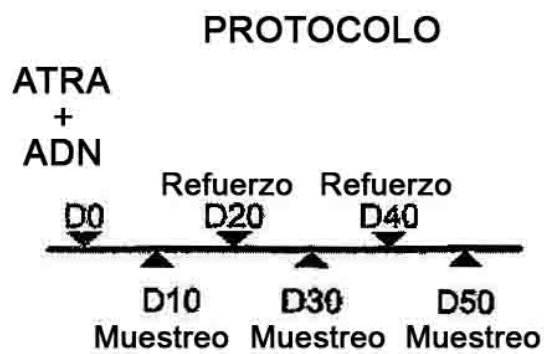
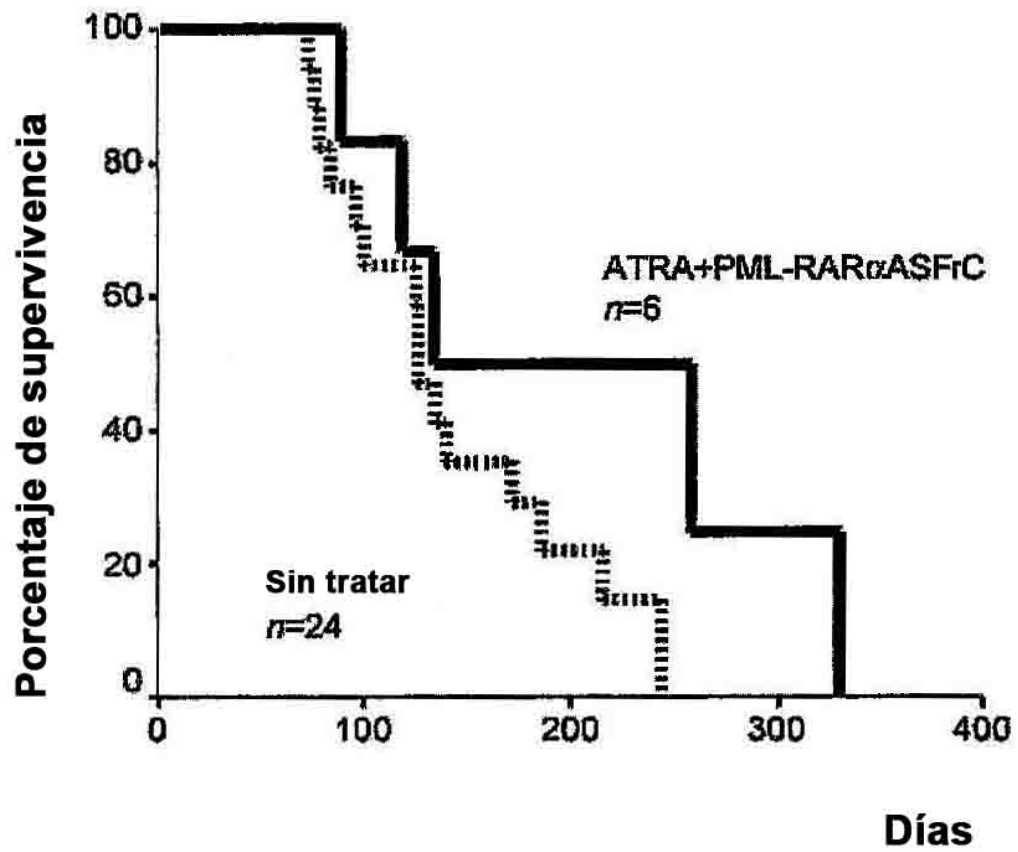


FIG.9

