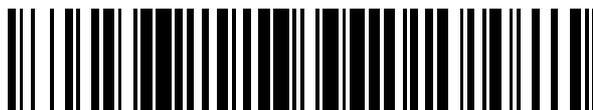


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 460 949**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61N 1/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2006 E 06779983 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 1919510**

54 Título: **Electrotransferencia de ácidos nucleicos en células tisulares**

30 Prioridad:

02.09.2005 EP 05291825
02.09.2005 US 713623 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.05.2014

73 Titular/es:

BIOALLIANCE PHARMA (33.3%)
49, boulevard du Général Martial Valin
75015 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (33.3%) y
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY (33.3%)

72 Inventor/es:

MIR, LUIS y
MIKLAVCIC, DAMIJAN

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 460 949 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

Electrotransferencia de ácidos nucleicos en células tisulares

5 **[0001]** La presente invención se refiere a la transferencia génica por mediación eléctrica de ácidos nucleicos en células tisulares, en particular en células musculares o tumorales.

[0002] La transferencia génica por mediación eléctrica, también denominada electrotransferencia de ADN o electrogenerapia, ha adquirido un interés real ya que es uno de los métodos más eficaces de transferencia génica
10 no vírica *in vivo* (Andre y Mir, 2004). El método ha demostrado ser eficaz para electrotransferir ADN de plásmido a varios tejidos: músculos (Aihara y Miyazaki, 1998; Mir y col., 1998a; Mir y col., 1999), hígado (Heller y col., 1996; Suzuki y col., 1998), piel (Titomirov y col., 1991; Zhang y col., 1996), tumores (Heller y col., 2000; Wells y col., 2000; Heller y Coppola, 2002), testículos de ratón (Muramatsu y col., 1997; Muramatsu y col., 1998), etc. (Andre y Mir, 2004).

15

[0003] Los mecanismos por los que los pulsos eléctricos median en la transferencia de ADN a las células objetivo no son bien comprendidos. No obstante, existe un acuerdo común en que para una transferencia de ADN mejorada en tejidos, las células del tejido deben ser permeabilizadas. Dicha permeabilización puede conseguirse mediante el uso de simples series de pulsos eléctricos cortos de onda cuadrada (en el intervalo de 100 μ s) (Mir y col., 1991b; Gehl y col., 1999; Miklavcic y col., 2000). Este tipo de pulsos se ha usado ampliamente para la administración local de fármacos antineoplásicos no permeantes (como bleomicina o cisplatino) en un tratamiento denominado "electroquimioterapia antitumoral" (Mir y col., 1991a; Glass y col., 1997; Sersa y col., 1998; Mir y col., 1998b; Rodríguez y col., 2002). De hecho, la administración a tumores de, por ejemplo, 8 pulsos de 1.300 V/cm y 100 μ s tanto *in vitro* como *in vivo* es suficiente para inducir unas reestructuraciones transitorias de la membrana
20 celular que permiten que moléculas antineoplásicas no permeantes como la bleomicina entren en la célula mediante difusión y ejerzan completamente su actividad citotóxica (Poddevin y col., 1991; Mir y col., 1991b; Gehl y col., 1998).

25

[0004] Estos cortos pulsos eléctricos permeabilizantes también han demostrado aumentar la transferencia de ADN de plásmido en varios tejidos (Heller y col., 1996; Heller y col., 2000). Sin embargo, se aplicó otro tipo de pulsos eléctricos de onda cuadrada a músculos (Aihara and Miyazaki, 1998; Mir y col., 1999), tumores (Rols y col., 1998), hígado (Suzuki y col., 1998) y algunos otros tejidos (Andre and Mir, 2004), y se averiguó que eran más eficaces para la electrotransferencia de ADN (Mir y col., 1999; Heller y col., 2000). Estos pulsos son habitualmente de un voltaje menor pero de mucha más duración (en el intervalo de décimas de milisegundos) (Aihara y Miyazaki, 1998; Rols y col., 1998; Mir y col., 1999; Bettan y col., 2000; Matsumoto y col., 2001). Se asume que este tipo de pulsos median
30 en la transferencia de ADN en las células mediante la inducción de dos efectos distintos que incluyen la permeabilización celular (como los pulsos cortos) y la migración electroforética del ADN durante el suministro del campo eléctrico (Klenchin y col., 1991; Sukharev y col., 1992; Neumann y col., 1996; Mir y col., 1999; Golzio y col., 2002).

35

[0005] Se ha descrito una electrotransferencia eficiente en células musculares en el documento WO-A-99/01158 mediante el uso de una o más (hasta 100.000) impulsiones eléctricas unipolares de 1 - 800 volts/cm, y en el documento WO-A-98143702 mediante el uso de una estimulación con una corriente eléctrica de 5 - 200 volts/cm, en la que la corriente eléctrica puede estar en forma de 2 - 30.000 pulsos bipolares cuadrados.

40

[0006] El doble papel de los pulsos eléctricos sobre la electrotransferencia de ADN *in vivo* fue demostrado mediante el uso de combinaciones de pulsos eléctricos que consisten en pulsos cortos de alto voltaje (o HV; por ejemplo, de 800 V/cm y 100 μ s) seguido de pulso largos de bajo voltaje (o LV; por ejemplo, de 80 V/cm y 100 ms) (Bureau y col., 2000; Satkauskas y col., 2002). En este último estudio se ha demostrado que estos pulsos de HV y LV pueden estar separados por varios lapsos entre el HV y el LV sin una pérdida significativa en la eficacia de
45 transfección. Estos lapsos varían en combinaciones de hasta 300 s durante 1 HV y 1 LV, y hasta 3.000 s durante 1 HV y 4LV (Satkauskas y col., 2002).

50

[0007] El solicitante ha averiguado que todavía era posible mejorar la eficacia de electrotransferencia mediante el uso de una combinación específica de pulsos HV y LV.

55

[0008] La transfección de tumores y/o de otros tejidos, por ejemplo, de hígado, también puede ser de interés para similar La intensidad de campo eléctrico preferida (en V/cm) para el HV y/o el LV cambiará dependiendo de los tejidos.

[0009] Un primer objeto de la invención es por tanto el uso de un ácido nucleico para la preparación de un medicamento o fármaco humano o veterinario destinado a ser transferido *in vivo* en células tisulares, en el que el medicamento se pone en contacto con las células tisulares, y el tejido es estimulado eléctricamente como sigue:

5 - en primer lugar con al menos un pulso de alto voltaje (HV) con una intensidad de campo de entre 200 y 2.000 volts/cm

- en segundo lugar con un pulso individual de bajo voltaje (LV) con una intensidad de campo de entre 50 y 200 volts/cm y una duración de entre 300 y 2.000 ms.

10

[0010] Según se usa en este documento, el término "tejido" representa un tejido tumoral o no tumoral de un animal, por ejemplo, de un ser humano, o de un mamífero no humano, tal como un roedor (por ejemplo, un ratón, un conejo o una rata), un perro, un gato o un primate. Un tejido no tumoral puede ser un músculo, especialmente músculo esquelético, o el hígado.

15

[0011] De acuerdo con una forma de realización, el tejido es un músculo. Para este tipo de tejido, aunque no exclusivamente, se prefiere que el tejido sea estimulado eléctricamente en primer lugar con al menos un pulso de HV con una intensidad de campo de entre 200 y 1.400 volts/cm.

20 **[0012]** De acuerdo con otra forma de realización, el tejido es un tejido tumoral. Para este tipo de tejido, aunque no exclusivamente, se prefiere que el tejido sea estimulado eléctricamente en primer lugar con al menos un pulso de HV con una intensidad de campo de entre 400 y 2.000 volts/cm.

25 **[0013]** Preferiblemente, el medicamento está destinado a entrar en contacto con las células tisulares antes de aplicar el pulso individual de LV, y aún más preferiblemente, antes de la aplicación del pulso o pulsos de HV. El tiempo entre la inyección del ácido nucleico y el pulso eléctrico, especialmente entre la inyección y el pulso o pulsos de HV, no es crítico. Típicamente, el medicamento se ha puesto en contacto con las células tisulares desde unos pocos segundos antes hasta 10 minutos, por ejemplo, entre 30 s y 5 minutos. También es aceptable un intervalo de 5 a 10 minutos antes del pulso o pulsos de HV. El medicamento puede ponerse en contacto a través de una
30 inyección intramuscular directa, a través de una administración sistémica (por ejemplo, por vía intravenosa o intraarterial) o mediante una administración tópica o subcutánea.

[0014] En un aspecto ventajoso de la invención, en particular para un músculo, el pulso individual de LV tiene una intensidad de campo de entre 50 y 140 volts/cm, especialmente de entre 80 y 120 volts/cm, preferiblemente de
35 entre 90 y 110 volts/cm, típicamente de aproximadamente 100 volts/cm.

[0015] En un aspecto ventajoso de la invención, en particular para un tejido tumoral, el pulso individual de LV tiene una intensidad de campo de entre 100 y 200 volts/cm, preferiblemente de entre 120 y 160 volts/cm, típicamente de aproximadamente 140 volts/cm.

40

[0016] En otro aspecto ventajoso de la invención, para el músculo y el tejido tumoral, el pulso individual de LV tiene una duración de entre 300 y 800 ms, preferiblemente de entre 350 y 600 ms, típicamente de aproximadamente 400 ms.

45 **[0017]** El pulso de LV puede tener la misma polaridad que el pulso de HV.

[0018] Sin embargo, de acuerdo con un aspecto ventajoso, el pulso de LV tiene una polaridad opuesta a la del pulso de HV.

50 **[0019]** Preferiblemente, el pulso individual de LV es un pulso cuadrado. También puede ser trapezoidal o discontinuo.

[0020] Sin estar ceñidos a ninguna teoría, se considera que el pulso individual de LV de acuerdo con la invención mejora al menos la migración electroforética del ácido nucleico.

55

[0021] Pueden realizarse varios pulsos de HV, es decir, entre 2 y 10 pulsos de HV con las especificaciones desveladas en los mismos. En este caso es más conveniente tener pulsos de HV idénticos.

[0022] Sin embargo, se ha demostrado que un pulso individual de HV con las especificaciones desveladas en

el mismo es suficiente para permeabilizar la membrana celular. Por lo tanto, en la forma de realización preferida se hace uso de un pulso individual de HV.

5 **[0023]** En un aspecto ventajoso adicional de la invención, para un músculo, aunque no exclusivamente, el pulso de HV tiene una intensidad de campo de entre 300 y 1.300, preferiblemente de entre 400 y 1.200 volts/cm, más preferiblemente de entre 500 y 900, aún más preferiblemente de entre 600 y 800 volts/cm, típicamente de aproximadamente 700 volts/cm.

10 **[0024]** En un aspecto ventajoso adicional de la invención, para un tejido tumoral, aunque no exclusivamente, el pulso de HV tiene una intensidad de campo de entre 600 y 2.000, preferiblemente de entre 800 y 1.600 volts/cm, más preferiblemente de entre 900 y 1.200, típicamente de aproximadamente 1.000 volts/cm.

15 **[0025]** En un aspecto ventajoso adicional de la invención más de la invención, para tejido muscular o tumoral, el pulso de HV tiene una duración de entre 10 y 1.000 μ s, preferiblemente de entre 50 y 200 μ s, típicamente de aproximadamente 100 μ s.

20 **[0026]** Cuando hay un pulso individual de HV, preferiblemente es un pulso cuadrado. En el caso de varios pulsos de HV, puede hacerse uso de pulsos unipolares o bipolares, o de pulsos con diferentes direcciones y/o polaridades, preferiblemente del tipo cuadrado.

[0027] Los pulsos de HV y de LV pueden estar separados por un lapso, y este lapso puede ser ventajosamente de entre 300 ms y 3.000 s, preferiblemente de entre 500 ms y 1.000 s, típicamente de aproximadamente 1.000 ms.

25 **[0028]** En una forma de realización en particular, no hay lapso, o únicamente uno corto, digamos que de menos de 300 ms, y el pulso de HV tiene una intensidad de campo de entre 300 y 1.000 volts/cm, preferiblemente de entre 400 y 800 volts/cm.

30 **[0029]** El ácido nucleico es útil en la terapia génica, bien a través de la expresión de una molécula de interés o bien a través de la modulación o el bloqueo de un gen dentro del hospedador que tiene un efecto terapéutico. Preferiblemente, los objetivos de la transfección de acuerdo con la invención son:

35 - hacer del músculo un órgano secretor para moléculas que tienen un efecto terapéutico directo o indirecto, incluyendo un efecto inmunoestimulante o de vacuna,

- corregir una disfunción en células tisulares, en particular, en células musculares.

40 **[0030]** En un aspecto preferido, el ácido nucleico comprende secuencias de ácido nucleico capaces de expresar *in vivo* en las células tisulares transfectadas una o más moléculas terapéuticamente activas, preferiblemente una proteína o proteínas de interés. Esta molécula activa puede ser terapéuticamente activa por sí misma o indirectamente, por ejemplo, a través de un metabolito de dicha molécula. Puede actuar en el propio tejido y/o fuera del tejido en otra ubicación corporal, por ejemplo, en un tumor ubicado en cualquier sitio del cuerpo si la molécula expresada es activa frente a un tumor. Como ejemplos de moléculas terapéuticas de interés pueden mencionarse los indicados en el documento WO-A-99/01158. Se apreciará que no hay limitación sobre el tipo de moléculas que pueden ser expresadas de acuerdo con la invención, y por lo tanto el experto en la técnica será capaz de llevar a cabo la invención con una molécula de interés conociendo la secuencia de la misma, y con experimentación rutinaria para seleccionar el mejor vector de construcción o de expresión.

50 **[0031]** Puede usarse cualquier ácido nucleico, por ejemplo, ADN de plásmido, ADN lineal, ADN y ARN antisentido. En una forma de realización preferida, el ácido nucleico es un vector de expresión de ADN del tipo bien conocido en la técnica. Generalmente, un vector de expresión contiene un promotor unido operativamente a una secuencia de ADN que codifica para la proteína de interés, seguido de una señal de terminación tal como una señal de poliadenilación.

55 **[0032]** Se apreciará que el uso de acuerdo con la invención engloba el caso en el que se usan dos o más ácidos nucleicos capaces de expresar *in vivo* diferentes moléculas activas, para preparar el medicamento. Los ácidos nucleicos se eligen preferiblemente de forma que sean complementarios y/o que actúen de una forma sinérgica en el tratamiento de una dolencia.

[0033] También está englobado el uso de al menos un ácido nucleico que es capaz de expresar *in vivo* al menos dos moléculas activas, que preferiblemente son complementarias y/o actúan de una forma sinérgica en el tratamiento de una dolencia. En ese caso, las secuencias de nucleótidos que codifican para las diferentes moléculas pueden estar bajo el control del mismo promotor o de promotores diferentes.

5

[0034] De acuerdo con varios aspectos de la invención, el ácido nucleico expresa una o varias (al menos 2) molécula(s) activa(s) seleccionadas de forma que:

- el medicamento sea eficaz en la reducción, la supresión o la regresión de la angiogénesis tumoral,
- el medicamento reduzca o suprima el crecimiento tumoral,
- el medicamento inhiba la metástasis,
- el medicamento sea contra el cáncer.

10

[0035] Una forma de realización es transfectar un tejido, en particular células musculares, con un constructo que comprende el Dominio de la Desintegrina Recombinante Humana del gen ADAM-15 (gen RDD). Este gen, su secuencia y los constructos útiles (por ejemplo, el vector de expresión pBi-RDD) han sido descritos completamente en la técnica por Trochon-Joseph V. y col. 2004, a lo que puede referirse el experto en la técnica. El gen RDD y las secuencias proteicas se muestran en la SEQ ID No.1 y en la SEQ ID No.2, respectivamente. La RDD puede actuar como un agente antineoplásico, puede reducir o suprimir el crecimiento tumoral y/o actuar como un agente antiangiogénico y/o antimetastásico.

15

20

[0036] Un aspecto específico de la invención es por tanto el uso de un ácido nucleico que codifica para la proteína RDD o para un fragmento eficiente de la misma (eficiente significa que la proteína codificada por el fragmento desencadena una actividad terapéutica igual o similar a la del polipéptido RDD completo) para la preparación de un medicamento destinado a ser transferido *in vivo* en células tisulares y a producir en las mismas un polipéptido RDD o un fragmento del mismo que sea terapéuticamente activo, en el que el medicamento es inyectado en un tejido y el tejido es estimulado eléctricamente como sigue:

25

- en primer lugar con al menos un pulso de alto voltaje (HV) con una intensidad de campo de entre 200 y 2.000 volts/cm

30

- en segundo lugar con un pulso individual de bajo voltaje (LV) con una intensidad de campo de entre 50 y 200 volts/cm y una duración de entre 300 y 2.000 ms.

[0037] De acuerdo con una forma de realización, el tejido es un músculo. Para este tipo de tejido, aunque no exclusivamente, se prefiere que el tejido sea estimulado eléctricamente en primer lugar con al menos un pulso de HV con una intensidad de campo de entre 200 y 1.400 volts/cm.

35

[0038] De acuerdo con otra forma de realización, el tejido es un tejido tumoral. Para este tipo de tejido, aunque no exclusivamente, se prefiere que el tejido sea estimulado eléctricamente en primer lugar con al menos un pulso de HV con una intensidad de campo de entre 400 y 2.000 volts/cm.

40

[0039] Las diversas características y aspectos descritos más arriba, especialmente en relación con las características de la electrotransferencia y la composición del ácido nucleico, se aplican de la misma forma a este uso específico, y por lo tanto se hace referencia a lo anterior en este aspecto con objeto de caracterizar adicionalmente este uso específico. Este medicamento es ventajosamente útil como un agente antiangiogénico y/o antimetastásico.

45

[0040] En otro aspecto interesante, como molécula terapéuticamente activa, el ácido nucleico codifica para uno o varios inmunógenos (o péptidos, polipéptidos o proteínas inmunógenos, incluyendo glucoproteínas) que son capaces de inducir una respuesta inmunitaria en el hospedador. En una forma de realización, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria protectora para el hospedador. En esta forma de realización, la invención se refiere a la producción de una composición inmunógena, o de una vacuna, o de una vacuna terapéutica, que está dirigida contra un microorganismo, por ejemplo, virus o bacterias, o contra cánceres. Únicamente a modo de ejemplo, el ácido nucleico codifica para uno o varios (al menos 2) inmunógenos del HIV, del HBV, del virus de Epstein-Barr, de virus de la pseudorrabia, de virus formadores de sincitio. La persona experta en la técnica tiene acceso a los ácidos nucleicos que codifican para la mayoría de las moléculas interesantes para la aplicación elegida, por ejemplo, para la mayoría de los inmunógenos o combinaciones de inmunógenos eficientes para una enfermedad en particular.

50

55

5 **[0041]** En otra forma de realización, la respuesta inmunitaria da lugar a la producción de anticuerpos, especialmente de anticuerpos policlonales, y estos anticuerpos están destinados a ser recuperados a partir del suero producido y usados de la forma habitual.

[0042] La presente invención también desvela un procedimiento para el tratamiento de un ser humano o de un animal, que comprende la inyección de un ácido nucleico en un tejido, y la estimulación eléctrica del tejido como sigue:

10 - en primer lugar con al menos un pulso de alto voltaje (HV) con una intensidad de campo de entre 200 y 2.000 volts/cm

- en segundo lugar con un pulso individual de bajo voltaje (LV) con una intensidad de campo de entre 50 y 200 volts/cm y una duración de entre 300 y 2.000 ms,

15

siendo el ácido nucleico transferido a las células tisulares como resultado de esta estimulación eléctrica.

[0043] De acuerdo con una forma de realización, el tejido es un músculo. Para este tipo de tejido, aunque no exclusivamente, se prefiere que el tejido sea estimulado eléctricamente en primer lugar con al menos un pulso de HV con una intensidad de campo de entre 200 y 1.400 volts/cm.

[0044] De acuerdo con otra forma de realización, el tejido es un tejido tumoral. Para este tipo de tejido, aunque no exclusivamente, se prefiere que el tejido sea estimulado eléctricamente en primer lugar con al menos un pulso de HV con una intensidad de campo de entre 400 y 2.000 volts/cm.

25

[0045] Como se ha descrito más arriba, de acuerdo con un aspecto preferido, el ácido nucleico es capaz, una vez transferido *in vivo* a las células tisulares, de producir en las mismas una molécula terapéuticamente activa, que está destinada a ejercer directa o indirectamente, una acción terapéutica en las células musculares y/o en otra ubicación corporal, o incluso en células de un tejido tumoral.

30

[0046] Preferiblemente, como se ha mencionado anteriormente, el ácido nucleico se inyecta antes de aplicar el pulso individual de LV, y aún más preferiblemente, antes de la aplicación del pulso o pulsos de HV.

[0047] Las diversas características y aspectos descritos más arriba en relación con el uso de acuerdo con la invención se aplican de la misma forma al método de tratamiento, y por lo tanto debe hacerse referencia a lo anterior con objeto de caracterizar adicionalmente este método.

35

[0048] Un aspecto es, por tanto, un método tal que el ácido nucleico codifica para el gen RDD o un fragmento eficiente del mismo, según se desvela en este documento, y el método está destinado a reducir o suprimir el crecimiento tumoral, y/o a actuar como un agente antiangiogénico y/o antimetastásico.

40

[0049] Otro aspecto es, por tanto, un método tal que el ácido nucleico codifica para un inmunógeno, según se desvela en este documento, y el método está destinado a inmunizar un ser humano o un animal, o a producir anticuerpos que se van a recuperar.

45

[0050] La invención también desvela un método de electroporación, que comprende la colocación de los electrodos cerca de un tejido que contiene un ácido nucleico intersticialmente, y la posterior estimulación eléctrica del tejido como sigue:

50 - en primer lugar con al menos un pulso de alto voltaje (HV) con una intensidad de campo de entre 200 y 2.000 volts/cm

- en segundo lugar con un pulso individual de bajo voltaje (LV) con una intensidad de campo de entre 50 y 200 volts/cm y una duración de entre 300 y 2.000 ms,

55

siendo el ácido nucleico transferido a las células tisulares como resultado de esta estimulación eléctrica.

[0051] De acuerdo con una forma de realización, el tejido es un músculo. Para este tipo de tejido, aunque no exclusivamente, se prefiere que el tejido sea estimulado eléctricamente en primer lugar con al menos un pulso de HV

con una intensidad de campo de entre 200 y 1.400 volts/cm.

[0052] De acuerdo con otra forma de realización, el tejido es un tejido tumoral. Para este tipo de tejido, aunque no exclusivamente, se prefiere que el tejido sea estimulado eléctricamente en primer lugar con al menos un pulso de HV con una intensidad de campo de entre 400 y 2.000 volts/cm.

[0053] El ácido nucleico es heterogéneo al cuerpo y es del tipo descrito más arriba. Preferiblemente es un ácido nucleico que comprende secuencias de ácidos nucleicos capaces de expresar *in vivo* en las células musculares o en el tejido tumoral transfectado, una o más moléculas terapéuticamente activas, preferiblemente una proteína o proteínas de interés.

[0054] En un aspecto, los electrodos se ponen en contacto con la piel, es decir, fuera del cuerpo y no hay necesidad de realizar un acto quirúrgico.

[0055] En otro aspecto, los electrodos se ponen en contacto con el propio tejido, en particular, el músculo o el tejido tumoral. En ese caso, los electrodos pueden ser portados por un dispositivo que realice tanto la inyección del ácido nucleico como la estimulación eléctrica. Los electrodos también pueden estar separados del dispositivo de inyección.

[0056] Los electrodos van a ser posicionados cerca del lugar de inyección de forma que la corriente eléctrica que viaja a través de los electrodos pase a través del sitio o región de inyección, en la que el líquido inyectado ha difundido tras la inyección.

[0057] Las diversas características y aspectos descritos más arriba, especialmente en relación con las características de la electrotransferencia y la composición del ácido nucleico, se aplican de la misma forma al método de electroporación, y por lo tanto se hace referencia a lo anterior con objeto de caracterizar adicionalmente este método.

[0058] La invención también se refiere al uso de un ácido nucleico que es capaz de expresar una molécula en la preparación de un medicamento o fármaco para su uso en un método de administración de dicho ácido nucleico a células tisulares, especialmente a células tisulares tumorales o no tumorales, por ejemplo, a células musculares, en el que

a) dicho ácido nucleico va a ser inyectado en el tejido
b) el tejido es estimulado eléctricamente como sigue:

- en primer lugar con al menos un pulso de alto voltaje (HV) con una intensidad de campo de entre 200 y 2.000 volts/cm

- en segundo lugar con un pulso individual de bajo voltaje (LV) con una intensidad de campo de entre 50 y 200 volts/cm y una duración de entre 300 y 2.000 ms.

[0059] Como se deduce de lo anterior, el uso puede ser:

- para la inmunización del hospedador mediante la transfección del ácido nucleico en células musculares, especialmente en células musculares esqueléticas del hospedador, en la que el ácido nucleico codifica para un inmunógeno que inducirá una respuesta inmunitaria en el hospedador

- o para suministrar sistémicamente una molécula terapéuticamente activa al hospedador, mediante la transfección del ácido nucleico en células musculares, especialmente en células del músculo esquelético, o en células de tejido tumoral.

[0060] Este uso puede definirse adicionalmente con las diversas características definidas anteriormente relativas especialmente a las condiciones de la electroestimulación, de la administración del ácido nucleico, de la composición del ácido nucleico, de la naturaleza de los hospedadores...

[0061] Otro objeto más de la invención es un método para la producción de anticuerpos, especialmente de anticuerpos policlonales, que comprende la inyección de un inmunógeno que codifica para un ácido nucleico en un tejido, especialmente en un músculo, de un animal vivo, y la estimulación eléctrica del tejido como sigue:

- en primer lugar con al menos un pulso de alto voltaje (HV) con una intensidad de campo de entre 200 y 2.000 volts/cm

5 - en segundo lugar con un pulso individual de bajo voltaje (LV) con una intensidad de campo de entre 50 y 140 volts/cm y una duración de entre 300 y 2.000 ms,

siendo el ácido nucleico transferido a las células tisulares como resultado de esta estimulación eléctrica y expresando en dicho hospedador un inmunógeno capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria en el
10 hospedador, y recuperar los anticuerpos.

[0062] El animal puede ser un ratón, una rata o un conejo o cualquier otro animal, especialmente un roedor usado habitualmente para la producción de anticuerpos.

15 **[0063]** La recuperación del suero y de los anticuerpos, la purificación y/o la concentración de los anticuerpos puede realizarse mediante el uso de los métodos convencionales conocidos por la persona experta en la técnica.

[0064] Este método puede definirse adicionalmente con las diversas características definidas anteriormente concernientes, especialmente, a las condiciones de la electroestimulación, a la administración del ácido nucleico, a
20 la composición del ácido nucleico, a la naturaleza de los hospedadores...

[0065] La presente invención se describirá ahora con detalle adicional con la presentación de los siguientes experimentos no limitantes y con referencia a los dibujos, en los que:

25 Fig. 1. Expresión de luciferasa después de una electrotransferencia de ADN mediante el uso de combinaciones de uno u ocho pulsos HV (800 V/cm; 0,1, 0,2 ó 0,5 ms) y de cuatro pulsos LV (80 V/cm; 100 ms) (combinación de pulsos xHV + 4LV). Los datos se presentan como la media \pm DT. La diferencia estadística entre cada uno de los grupos xHV + 4LV se calculó mediante el uso de pruebas de la t; NS - no
30 significativo.

Fig. 2. Expresión de luciferasa después de una electrotransferencia de ADN mediante el uso de una combinación de un pulso de HV (800 V/cm; 100 μ s) y de varios números de pulsos LV (100 ms; 80 V/cm) (combinaciones de pulsos HV + xLV). Los datos se presentan como la media \pm DT. La diferencia estadística entre los grupos vecinos mostrados en la figura se calculó mediante el uso de pruebas de la t y está indicada por asteriscos (** P < 0,01; *** P < 0,001; NS - no significativo).
35

Fig. 3. Expresión de luciferasa después de una electrotransferencia de ADN mediante el uso de la combinación de un pulso de HV (800 V/cm; 100 μ s) y de varios números de pulsos LV (50 ms; 80 V/cm) (combinación de pulsos HV + xLV). Los datos se presentan como la media \pm DT. La diferencia estadística entre los grupos vecinos mostrados en la figura se calculó mediante el uso de pruebas de la t y está indicada por asteriscos (* P < 0,05; ** P < 0,01; NS - no significativo).
40

Fig. 4. Expresión de luciferasa después de una electrotransferencia de ADN mediante el uso de la combinación de un pulso de HV (800 V/cm; 100 μ s) y pulso(s) de LV en función del número de pulsos y de la duración del pulso de los pulso(s) de LV manteniendo constante la duración total del LV. Los datos se presentan como la media \pm DT. La diferencia estadística entre el grupo 1HV + 1LV (400 ms) y cada uno de los otros grupos se calculó mediante el uso de pruebas de la t y está indicada por asteriscos (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001).
45

Fig. 5. Número de metástasis en los ratones después de una electrotransferencia de pBi (control) o de pBi-RDD.
50

Fig. 6. Expresión de luciferasa después de una electrotransferencia de ADN en los músculos tibiales mediante el uso de combinaciones de diferentes pulsos HV (desde 200 hasta 1.800 V/cm, 100 μ s) seguido de un pulso de LV (80 V/cm; 400 ms) 1 s después del HV. Los datos se presentan como la media \pm DT.
55

Fig. 7. Expresión de luciferasa después de una electrotransferencia de ADN en los músculos tibiales mediante el uso de combinaciones de diferentes pulsos HV (desde 200 hasta 1.800 V/cm, 100 μ s) seguido de

un pulso de LV (80 V/cm; 400 ms) inmediatamente después del HV. Los datos se presentan como la media \pm DT.

5 Fig. 8. Expresión de luciferasa después de una electrotransferencia de ADN en un tumor mediante el uso de combinaciones de diferentes pulsos HV (desde 400 hasta 2.000 V/cm, 100 μ s) seguido de un pulso de LV (80 V/cm; 400 ms). Los datos se presentan como la media \pm DT.

10 Fig. 9. Expresión de luciferasa después de una electrotransferencia de ADN en un tumor mediante el uso de combinaciones de un pulso de HV (800 V/cm, 100 μ s) seguidas o no por un pulso de LV (60, 80, 100, 120 ó 140 V/cm; 400 ms). Los datos se presentan como la media \pm DT.

Fig. 10. Medición de los anticuerpos de IgG anti-RDD producidos en conejo y en rata.

EJEMPLO 1

15

- Materiales y métodos

ADN de plásmido

20 **[0066]** Se usó el plásmido pXL 3031 (pCMV-Luc+) que contiene el promotor del citomegalovirus (nucleótidos 229 - 890 de pADNc3, Invitrogen) insertado secuenciado arriba de la secuencia codificante del gen citosólico modificado luc+ que codifica para la luciferasa de luciérnaga (Soubrier y col., 1999). El ADN de plásmido se preparó mediante el uso de los procedimientos habituales (Ausubel y col., 1994). Alternativamente, también se usó el plásmido pEGFP-N1 (BD Biosciences Clontech, Saint Quentin Yvelines, Francia) que presenta el gen de la proteína
25 fluorescente verde (GFP) bajo el control del promotor del CMV y preparado en PBS (disolución salina tamponada con fosfato, Gibco, Cergy-Pontoise, Francia) mediante el uso del Kit EndoFree Plasmid Giga (QIAGEN, Courtabeuf, Francia).

Animales

30

[0067] Para todos los procedimientos experimentales se anestesiaron ratones hembra C57Bl/6 de 7 - 9 semanas de edad mediante la administración intraperitoneal de los anestésicos ketamina (100 mg/kg; Ketalar, Panpharma, Francia) y xilacina (40 mg/kg; Rompun, Bayer, Francia). Antes de los experimentos se rasuraron las patas mediante el uso de una rasuradora eléctrica. Se incluyeron al menos 10 músculos (5 ratones) en cada grupo
35 experimental para las determinaciones de luciferasa. En el caso de los datos cualitativos de la GFP, se usaron cuatro músculos para cada condición experimental.

Inyección de ADN

40 **[0068]** Para los experimentos de luciferasa se inyectaron 3 μ g de ADN de plásmido preparado en 30 μ l de NaCl al 0,9 %. En la mayoría de los experimentos (Figs. 1 a 5), la disolución de ADN se complementó con 120 UI/ml de heparina (Laboratoires Leo, Saint Quentin en Yvelines, Francia; un mg de la heparina (PM de 10 - 12 kDa) correspondía a aproximadamente 137 UI). El ADN se inyectó en los músculos tibiales anteriores mediante el uso de una jeringa Hamilton con una aguja de calibre 26. Para los experimentos de la GFP se inyectaron 4 μ g en 20 μ l de
45 PBS en cada tibia tratada, siempre en ausencia de heparina.

Electrotransferencia de ADN

[0069] Se generaron combinaciones de pulsos de HV y LV mediante un dispositivo que consiste en un electropulsador de onda cuadrada PS-15 (Jouan, St Herblain, Francia) para el HV y un generador con función de conmutador guiado por microprocesador construido en la University of Ljubljana, Faculty of Electrical Engineering, Eslovenia, para el LV. El dispositivo permitía un control preciso de cada parámetro eléctrico en las combinaciones de pulsos de HV + LV (Satkauskas y col., 2002).

55 **[0070]** Las combinaciones de pulsos de HV y LV se administraron rápidamente (40 \pm 15 s) después de la inyección intramuscular de ADN. En todos los experimentos, el lapso entre HV y LV se fijó en 1 s. Para la administración de pulsos a los músculos se usaron electrodos de placa de acero inoxidable separados 4,4 mm. Las placas de 1 cm abarcaban toda la pata del ratón. Para asegurar un buen contacto entre el músculo tibial anterior de

la pata expuesta y las placas de los electrodos se usó un gel conductor. Los valores del campo eléctrico (en V/cm) se expresan siempre en términos de la proporción entre el voltaje aplicado (V) y la distancia entre los electrodos (cm).

- 5 **[0071]** Para los experimentos de la GFP las combinaciones de pulsos se suministraron mediante el uso de un generador CLINIPORATOR™ (IGEA, s. r. l., Carpi (MO), Italia) y electrodos separados 5 mm de la misma compañía.

Medición de la actividad de luciferasa

- 10 **[0072]** Los ratones fueron sacrificados 2 días después de la electrotransferencia de ADN. Se extrajeron los músculos (peso neto de aproximadamente 60 mg) y se homogenizaron en 1 ml de disolución de reactivo de lisis de cultivo celular (10 ml de reactivo de lisis de cultivo celular (Promega Charbonnières, Francia), se diluyeron con 40 ml de agua destilada y se complementaron con 1 comprimido del cóctel inhibidor de proteasa de Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Después una centrifugación a 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C se evaluó la actividad de la
15 luciferasa en 10 µl del sobrenadante, mediante el uso de un luminómetro Walac Victor², mediante la integración de la luz producida durante 1 s, comenzando después de la adición de 50 µl de sustrato de ensayo de luciferasa (Promega) al lisado muscular. Los resultados se recogieron desde el luminómetro en unidades relativas de luz (RLU). La calibración con proteína de luciferasa de luciérnaga purificada mostró que 10⁶ de RLU se correspondían con aproximadamente 70 ng de luciferasa expresada. Los resultados finales se expresaron como pg de luciferasa
20 por músculo.

Observaciones de fluorescencia de la GFP

- [0073]** Los ratones fueron sacrificados 3 días después de la inyección del plásmido pEGFP-N1 y el tejido
25 transfectado se observó mediante el uso de un estereomicroscopio de fluorescencia Leica MZ12 con un conjunto de filtros Leica GFP Plus (Art. N° 10446143: filtro de excitación de 480/40 nm, espejo dicróico de 505 nm LP, filtro de barrera de 510 nm LP) (Leica, Rueil-Malmaison, Francia). Las imágenes se tomaron mediante el uso de una cámara digital en color refrigerada (AxioCam HRC, Zeiss, Le Pecq, Francia), y la cuantificación de la expresión de la GFP se realizó mediante la integración con un programa informático (AxioVision Light Edition Release 4.1.1.0) de la luz
30 detectada por la cámara.

Análisis estadístico

- [0074]** Para la comparación estadística de varios grupos se hizo uso de la prueba de la *t* de Student para
35 datos no emparejados. En las figuras, los datos de expresión de la luciferasa se indican como la media ± DT.

Resultados

- [0075]** En el caso de los experimentos con luciferasa, debido a la elevada sensibilidad de las mediciones, se
40 inyectó una disolución de ADN de plásmido complementada con bajas cantidades de heparina (120 UI/ ml). La heparina a esta dosis provoca una gran disminución en la captación espontánea de ADN por el músculo, pero no deteriora significativamente la eficacia de la electrotransferencia de ADN en las fibras musculares (Satkaukas y col., 2001). Por lo tanto, las respectivas contribuciones de los pulsos de HV y de LV sobre la eficacia de la electrotransferencia de ADN puede ser analizada de forma más precisa en presencia de heparina. Adicionalmente,
45 el lapso entre los pulsos de HV y de LV se fijó en 1 s.

Influencia de la duración y el número de pulsos de HV

- [0076]** Para analizar el papel de los pulsos electropermeabilizantes (HV), se usaron pulsos de LV que aportan
50 el mejor nivel de expresión génica según los datos previos (Satkaukas y col., 2002). De acuerdo con esta enseñanza, los parámetros componentes del LV se fijaron para este experimento en cuatro LV de 80 V/cm y 100 ms de duración, con un lapso entre los pulsos de 1 segundo.

- [0077]** Se intentó o una mejora en la permeabilización muscular mediante el aumento de, bien el número de
55 pulsos de HV (de 1 a 8), o bien de la duración del HV (desde 100 µs hasta 500 µs). Como se muestra en la Fig. 1, ni el aumento en la duración del HV ni el aumento en el número de HV mejoraron significativamente la transfección muscular.

Influencia del número de pulsos de LV

- [0078]** Como consecuencia de los resultados mostrados en la Fig. 1, se usó siempre un único HV de 800 V/cm y de 100 μ s para analizar el papel del componente LV. En primer lugar se examinó la influencia del número de LV. La intensidad del pulso de LV se fijó en 80 V/cm, la duración en 100 ms y el lapso entre LV en 1 s. La expresión de la luciferasa aumentó notablemente cuando el número de LV se aumentó desde 1 hasta 4 (Fig. 2). Coherentemente con los datos previos (Satkaukas y col., 2002), con cuatro LV la expresión de la luciferasa era 10 veces mayor que con un LV. No se observó un aumento significativo adicional con un número mayor (6 u 8) de pulsos de LV (Fig. 2).
- 10 **[0079]** Se realizaron experimentos subsiguientes sobre la influencia del número de pulsos en la eficacia de la transferencia génica mediante el uso de LV de 50 ms de duración (Fig. 3). Se observó la misma tendencia que en el caso de los LV de 100 ms de duración (Fig. 2). En ambos casos, el comienzo de la meseta en la expresión del gen de la luciferasa comenzó a una duración de pulsos total de 400 ms. De nuevo, no se observó un aumento significativo al aumentar el número (12 ó 16) de pulsos de LV.
- 15 **[0080]** Se usaron adicionalmente cuatro combinaciones diferentes en número y duración de LV y se compararon, resultando todas ellas en una duración total de los pulsos de bajo voltaje igual a 400 ms (Fig. 4). Se encontró una tendencia a una disolución progresiva en la expresión del gen de la luciferasa con la concomitante disminución en la duración del pulso individual y aumento en el número de pulsos (Fig. 4). Notable e inesperadamente, las combinaciones de HV y LV mediante el uso de un único LV de 400 ms dio como resultado un aumento adicional y una mejor expresión en el gen de la luciferasa, por ejemplo, aproximadamente 2 veces mayor que mediante el uso de ocho LV de 50 ms ($p < 0,001$).
- 20

Observaciones de fluorescencia de la GFP

- 25 **[0081]** Después de la electrotransferencia del gen de la GFP mediante el uso de un HV de 100 μ s y de 800 V/cm, seguido después de un lapso de 1 s por un pulso de LV de 400 ms de 60, 80 ó 100 V/cm, se midieron cualitativamente y semicuantitativamente la distribución y la intensidad de la fluorescencia en los músculos mediante el uso de un estereomicroscopio de fluorescencia. Las imágenes se tomaron bien a un tiempo de exposición constante (100 ms, Paneles A, B y C) o bien a un tiempo de exposición variable, es decir, permitiendo que la cámara ajustara el tiempo de exposición para adquirir una cantidad equivalente de luz entre imagen e imagen (Paneles D, E y F). Las imágenes que se han realizado representan las imágenes observadas en cuatro músculos de cada condición experimental. Se elaboraron dos series de imágenes que muestran la reproducibilidad de los resultados así como un gran aumento en la fluorescencia al aumentar la intensidad de campo de los pulsos de LV (Paneles A, B y C). El análisis cuantitativo de la densidad media del color verde en estas imágenes apoya los datos cualitativos: en una escala relativa con 256 niveles de intensidad, se alcanzaron los niveles 41 (músculo izquierdo) y 33 (músculo derecho) a 60 V/cm (panel A), mientras que se alcanzaron los niveles 111 y 89 a 80 V/cm (panel B) y 138 y 127 a 100 V/cm (panel C). Estas imágenes también demuestran que la "superficie óptica" fluorescente es idéntica cualquiera que sea la intensidad de campo del LV (Paneles D, E y F). Este aumento en la fluorescencia resulta de una mayor fluorescencia de cada fibra, pero el volumen de tejido afectado por la electrotransferencia era el mismo. El aumento en el número de moléculas de plásmido electrotransferidas en las fibras explica el aumento en la fluorescencia observado de las fibras individuales.
- 30
- 35
- 40

EJEMPLO 2

- 45 **[0082]** Los vectores de expresión usados en este experimento se prepararon de acuerdo con Trochon-Joseph V. y col. 2004.
- [0083]** Se inyectaron 20 μ g de cada pBi (control) o pBi-RDD (tratamiento experimental), junto con 10 μ g del plásmido Tet-tTS y 20 μ g del plásmido Tet-On, en NaCl estéril al 0,9 % (volumen final, 30 μ l) en los músculos tibiales anteriores. Se electrotransferieron dos patas por animal.

La electrotransferencia se realizó como se describe a continuación.

- 55 **[0084]** Se rasuraron las patas de ratones C57BL/6 mediante el uso de una rasuradora eléctrica el día anterior a la electrotransferencia. Antes del procedimiento de electrotransferencia, los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina (100 mg/kg de peso corporal) y xilazina (40 mg/kg).

5 **[0085]** La mezcla de plásmidos se inyectó mediante el uso de una jeringa Hamilton. Se aplicó un gel conductor para asegurar un buen contacto entre la piel de la pata y los dos electrodos de placa de acero inoxidable (espacio entre los electrodos: 5 mm). Posteriormente, se aplicó en primer lugar un pulso eléctrico transcutáneo de HV de onda cuadrada de 700 V/cm y 100 μ s (1 Hz) para permeabilizar la membrana. Después de una pausa de 1.000 ms y sin mover los electrodos se aplicó un pulso eléctrico transcutáneo de LV de onda cuadrada de 100 V/cm y de 400 ms para permitir la entrada del ADN en las células mediante migración electroforética. La electrotransferencia se realizó con el electropulsador Cliniporator (IGEА, Italia). Se siguió el mismo procedimiento para cada grupo animal y cada pata. Se usaron 10 ratones en cada grupo.

10 **[0086]** Se indujo la producción de la RDD desde los músculos electrotransferidos mediante la adición de doxiciclina en el agua de bebida del animal 3 días antes de la implantación del tumor. La inducción con doxiciclina se mantuvo durante el experimento.

15 **[0087]** Se desprendieron células de melanoma B16F10 cultivadas hasta una fase logarítmica con EDTA al 0,02 % y se resuspendieron a una concentración final de 4×10^6 /ml en NaCl estéril al 0,9 %. Se inyectaron 100 μ l de la suspensión I.V. en el seno retro-orbital de los ratones. Siete días después de la última inyección, los ratones se sacrificaron, se extirparon los pulmones y se contaron los nódulos metastásicos bajo un microscopio de disección.

20 **[0088]** Como se muestra en la figura 5, en presencia de la RDD, se detectó un 70,5 % menos de nódulos metastásicos en el grupo experimental que en los controles. La RDD inhibió el desarrollo del melanoma B16F10.

EJEMPLO 3

25 **[0089]** Las Figuras 6 y 7 presentan la expresión de la luciferasa después de la electrotransferencia de ADN en los músculos tibiales de ratones mediante el uso de combinaciones de diferentes pulsos de HV (desde 200 hasta 1.800 V/cm, 100 μ s) seguido de un pulso de LV (80 V/cm; 400 ms) 1 s después del HV (Figura 6) o inmediatamente después del HV (Figura 7). Estos experimentos se han realizado como en el ejemplo 1 para el protocolo de la luciferasa, en 6 ratones para cada grupo, mediante el uso del CLINIPORATOR™ para suministrar los impulsos, y la actividad de la luciferasa se ha expresado en pg/mg de músculo.

30

EJEMPLO 4

35 **[0090]** Experimentos con tumores: se cultivaron células de melanoma B16 F10 *in vitro* mediante el uso de los procedimientos clásicos, y el medio de cultivo MEM se complementó con 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina, y 8 % de suero bovino fetal. Se inocularon subcutáneamente ratones hembra jóvenes C57Bl/6 (de 6 - 8 semanas) en el flanco izquierdo con 1×10^6 células singénicas B16 (en 100 μ l de medio de cultivo MEM). Los tumores se trataron cuando alcanzaron un diámetro medio de 6 - 7 mm (7 - 8 días después de la inoculación).

40 **[0091]** Se inyectaron localmente 50 μ g de ADN (plásmido pCMV-Luc+) en 50 μ l en los tumores mediante el uso de una jeringa Hamilton de tipo RN con agujas de tipo 4, de calibre 26 de 16 mm de longitud. La inyección se realizó en de 15 a 25 segundos. Se colocaron dos electrodos de placa de acero inoxidable externos de 1 cm de ancho, 1 mm de espesor y separados 5 mm (IGEА, Carpi, Italia) sobre la piel a cada lado del tumor con objeto de abarcar el tumor completo. El contacto eléctrico se aseguró mediante un gel conductor de ultrasonografía (EKO-GEL, Eгна, Italia).

45

[0092] Cuando se usó un componente de LV fijo (1 LV de 400 ms a 140 V/cm), los resultados obtenidos en función de la intensidad de campo del HV eran similares a los conseguidos en el músculo esquelético, excepto porque se habían tenido que aplicar unas intensidades de campo mayores para alcanzar la meseta de expresión óptima. Véase la Figura 8.

50

[0093] Cuando se usó un componente de HV fijo (1 HV de 100 μ s a 800 V/cm), los resultados obtenidos en función de la intensidad de campo de LV eran similares a los conseguidos en el músculo esquelético, excepto porque, de nuevo, se habían tenido que aplicar unas intensidades de campo mayores para alcanzar la meseta de expresión óptima.

55

[0094] Se averiguó que la eficacia máxima de los pulsos óptimos de HV + LV era 10 veces mayor que la eficacia de series de pulsos en las condiciones óptimas públicas previamente (series de pulsos de onda cuadrada idénticos).

EJEMPLO 5: producción de anticuerpos policlonales**- Materiales y métodos****5 ADN de plásmido**

[0095] Se insertó el gen RDD humano bajo el control de la señal de secreción de urocinasa murina en el plásmido pVAX1 (Invitrogen, V260-20) que contenía el promotor de citomegalovirus (CMV) y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, para generar el plásmido pVAX-RDD. Se usó el vector vacío pVAX1 como control negativo. Los plásmidos se prepararon en NaCl estéril al 0,9 % mediante el uso del Kit EndoFree NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel).

Animales

15 [0096] Se anestesiaron ratas Wistar hembras mediante la administración intraperitoneal de los anestésicos ketamina (40 mg/kg) y xilazina (5,5 mg/kg). En primer lugar se trataron conejos New Zealand hembras con una inyección subcutánea de Calmivet (1 ml/kg) y después se anestesiaron mediante una inyección intravenosa de pentobarbital. Antes de los experimentos, las patas se rasuraron mediante el uso de una rasuradora eléctrica.

20 Inyección y electrotransferencia de ADN

[0097] Se introdujeron electrodos de aguja penetrante en los músculos Gracilis de los conejos y en los músculos Gluteus de las ratas. Se inyectaron 100 µg de cada ADN de plásmido preparado en 100 µl de NaCl al 0,9 % en tres veces entre las líneas de los electrodos. Inmediatamente después de la inyección intramuscular de ADN, se realizó la electrotransferencia muscular con el CLINIPORATOR™ como se describió previamente: un pulso eléctrico de 700 V/cm y 100 µs (1 Hz), una pausa de 1.000 ms, y sin mover los electrodos, un pulso eléctrico de 100 V/cm y 400 ms. El procedimiento se realizó en ambas patas de cada animal, y dos veces por músculo para los conejos (es decir, 4 inyecciones por animal) y una vez por músculo para las ratas (es decir, 2 inyecciones por animal). Los animales fueron inmunizados en la semana 0, 6, y 12.

30

Medición de las respuestas de anticuerpos

[0098] Se recogió sangre antes de la primera inmunización, y después en la semana 4, 9 (momento de sacrificio de los conejos), y 16 (momento de sacrificio de las ratas). El suero se recuperó mediante centrifugación. Los anticuerpos anti-RDD (IgG) se midieron mediante ELISA como sigue. Se recubrió cada pocillo de placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc Maxisorb, Roskilde, Dinamarca) con 100 ng de la RDD recombinante producida en *E. coli*. Después de una incubación de una noche a 4 °C, los pocillos se lavaron seis veces con TBST (disolución de TBS salino tamponado con Tris, Tween 20 al 0,02 %) y después se incubaron con TBST-5 % de leche durante 3 h a temperatura ambiente en condiciones de agitación. Una vez lavados, como se ha descrito anteriormente, los pocillos se incubaron con 100 µl de disoluciones sucesivas de los sueros en TBST-5 % de leche (desde 1:125 hasta 1:8.000). Se usó un suero policlonal de conejo anti-RDD producido mediante inmunización peptídica (Neosystem) como control positivo. Después de una incubación de 2 h con agitación, los pocillos se lavaron y se incubaron durante 1 h con 100 µl de anticuerpos conjugados con peroxidasa diluidos a 1:5.000 en TBST-5 % de leche: los anticuerpos de conejo unidos fueron detectados con una IgG anti-conejo conjugada con peroxidasa (ref. NA934, Amersham), y los anticuerpos de rata unidos fueron detectados con un fragmento F(ab')₂ de cabra de IgG (H + L) de rata peroxidasa (ref. IM0825, Beckman Immunotech). Después del lavado, como se ha descrito anteriormente, los pocillos se incubaron con 200 µl del sustrato diclorhidrato de o-fenilendiamina (Sigma Fast OPD, conjunto de comprimidos de sustrato de peroxidasa) durante 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de HCl 3 N, y se obtuvo una lectura espectrofotométrica a 490 nm.

50

[0099] El suero policlonal de conejo anti-RDD usado como control positivo se produjo de acuerdo con la inmunización peptídica estándar (producción realizada por Neosystem SA, Strasbourg, Francia). El péptido seleccionado comprendía los residuos de aminoácidos desde el 57 hasta el 68 de la secuencia de la RDD (ID. SEC. Nº 2) conjugados con Gluta-KLH (hemocianina de lapa californiana, una proteína portadora para mejorar la inmunogenicidad). Se inyectaron subcutáneamente 2 mg de este péptido en los conejos en la semana 0, 2, 4 y 8. Se recogió sangre antes de la primera inyección y después en la semana 6, 10, y 12, (momento del sacrificio). El suero recogido en la semana 12 se usó como control positivo.

- Resultados

[0100] Como se muestra en la figura 10, los anticuerpos de IgG anti-RDD fueron producidos en la semana 9 después de la inmunización de los conejos y las ratas mediante electrotransferencias musculares. Esta inmunización mediante electrotransferencia indujo una producción de anticuerpo anti-RDD tan eficiente como una inmunización clásica mediante inyección peptídica en conejos (véase la curva de control de conejo). Se obtuvieron los mismos resultados para las ratas en la semana 16.

[0101] Adicionalmente, estos sueros policlonales anti-RDD obtenidos en conejos y en ratas eran capaces de detectar específicamente RDD recombinante en experimentos de inmunotransferencia western.

10

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[0102]

- 15 AIHARA, H., y MIYAZAKI, J. (1998). *Nat. Biotechnol.* 16, 867 - 870.
 ANDRE, F., y MIR, L. M. (2004). *Gene Ther.* 11 Supl. 1, S33 - S42.
 Ausubel, F. M. y col. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, Nueva York.
 BETTAN, M. y col. (2000). *Mol. Ther.* 2, 204 - 210.
 BUREAU, M. F. y col. (2000). *Biochim. Biophys. Acta* 1474, 353 - 359.
- 20 GEHL, J., y MIR, L. M. (1999). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 377 - 380.
 GEHL, J., SKOVGAARD, T., y MIR, L. M. (1998). *Anticancer Drugs* 9, 319 - 325.
 GEHL, J. y col. (1999). *Biochim. Biophys. Acta* 1428, 233 - 240.
 GLASS, L. F. y col. (1997). *J. Am. Acad. Dermatol.* 37, 596 - 599.
 GOLZIO, M. y col. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 99, 1292 - 1297.
- 25 HELLER, L. y col. (2000). *Gene Ther.* 7, 826 - 829.
 HELLER, L. C., y COPPOLA, D. (2002). *Gene Ther.* 9, 1321 - 1325.
 HELLER, R. y col. (1996). *FEBS Lett.* 389, 225 - 228.
 KLENCHIN, V.A. y col. (1991). *Biophys. J.* 60, 804 - 811.
 MATSUMOTO, T. y col. (2001). *Gene Ther.* 8, 1174 - 1179.
- 30 MIKLAVCIC, D. y col. (2000). *Biochim. Biophys. Acta* 1523, 73 - 83.
 MIR, L. M. y col. (1991a). *C. R. Acad. Sci. III* 313, 613 - 618.
 MIR, L. M. y col. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 96, 4262 - 4267.
 MIR, L. M. y col. (1998a). *C. R. Acad. Sci. III* 321, 893 - 899.
 MIR, L. M. y col. (1998b). *Br. J. Cancer* 77, 2336 - 2342.
- 35 MIR, L. M. y col. (1991 b). *Eur. J. Cancer* 27, 68 - 72.
 MURAMATSU, T. y col. (1997). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233, 45 - 49.
 NEUMANN, E. y col. (1996). *Biophys. J.* 71, 868 - 877.
 PODDEVIN, B. y col. (1991). *Biochem. Pharmacol.* 42 Supl. S67 - S75, y col.,
 BARROSO, B. y col. (2002). *Arch. Med. Res.* 32, 273 - 276.
- 40 ROLS, M. P. y col. (1998). *Nat. Biotechnol.* 16, 168 - 171.
 SATKAUSKAS, S. y col. (2001). *Mol. Ther.* 4, 317 - 323.
 SATKAUSKAS, S. y col. (2002). *Mol. Ther.* 5, 133 - 140.
 SERSA, G. y col. Z. (1998). *Eur. J. Cancer* 34, 1213 - 1218.
 SOUBRIER, F. y col. (1999). *Gene Ther.* 6, 1482 - 1488.
- 45 SUKHAREV, S. I. y col. (1992). *Biophys. J.* 63, 1320 - 1327.
 SUZUKI, T. y col. (1998). *FEBS Lett.* 425, 436 - 440.
 TITOMIROV, A. V. y col. (1991). *Biochim. Biophys. Acta* 1088, 131 - 134.
 TROCHON - JOSEPH, V. y col., *Cancer Research* 2004, 64:2062 - 2069.
 WELLS, J. M. y col. (2000). *Gene Ther.* 7, 541 - 547.
- 50 ZAHAROFF, D. A. y col. (2002). *Gene Ther.* 9, 1286 - 1290.
 ZAHAROFF, D. A., y YUAN, F. (2004). *Bioelectrochemistry* 62, 37 - 45.
 ZHANG, L. y col. (1996). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220, 633 - 636.

LISTA DE SECUENCIAS

55 [0103]

<110> Bioalliance Pharma Centre National de la Recherche Scientifique Institut Gustave Roussy

<120> Electrotransferencia de ácidos nucleicos en células tisulares

<130> BET 06P0918

<160> 2

5 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 273

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(273)

15

<400> 1

```

atg gct gct ttc tgc gga aat atg ttt gtg gag ccg ggc gag cag tgt      48
Met Ala Ala Phe Cys Gly Asn Met Phe Val Glu Pro Gly Glu Gln Cys
1          5          10          15

gac tgt ggc ttc ctg gat gac tgc gtc gat ccc tgc tgt gat tct ttg      96
Asp Cys Gly Phe Leu Asp Asp Cys Val Asp Pro Cys Cys Asp Ser Leu
          20          25          30

acc tgc cag ctg agg cca ggt gca cag tgt gca tct gac gga ccc tgt      144
Thr Cys Gln Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Ser Asp Gly Pro Cys
          35          40          45

tgt caa aat tgc cag ctg cgc ccg tct ggc tgg cag tgt cgt cct acc      192
Cys Gln Asn Cys Gln Leu Arg Pro Ser Gly Trp Gln Cys Arg Pro Thr
          50          55          60

aga ggg gat tgt gac ttg cct gaa ttc tgc cca gga gac agc tcc cag      240
Arg Gly Asp Cys Asp Leu Pro Glu Phe Cys Pro Gly Asp Ser Ser Gln
65          70          75          80

tgt ccc cct gat gtc agc cta ggg gat ggc gag
Cys Pro Pro Asp Val Ser Leu Gly Asp Gly Glu      273
          85          90
    
```

20 <210> 2

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

25

```

Met Ala Ala Phe Cys Gly Asn Met Phe Val Glu Pro Gly Glu Gln Cys
1          5          10          15

Asp Cys Gly Phe Leu Asp Asp Cys Val Asp Pro Cys Cys Asp Ser Leu
          20          25          30

Thr Cys Gln Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Ser Asp Gly Pro Cys
          35          40          45
    
```

ES 2 460 949 T3

Cys Gln Asn Cys Gln Leu Arg Pro Ser Gly Trp Gln Cys Arg Pro Thr
50 55 60

Arg Gly Asp Cys Asp Leu Pro Glu Phe Cys Pro Gly Asp Ser Ser Gln
65 70 75 80

Cys Pro Pro Asp Val Ser Leu Gly Asp Gly Glu
85 90

REIVINDICACIONES

1. Uso de un ácido nucleico para la preparación de un medicamento destinado a ser transferido *in vivo* en células tisulares, en el que el medicamento se pone en contacto con las células tisulares, y el tejido es estimulado eléctricamente como sigue:
- 5
- en primer lugar con al menos un pulso con una intensidad de campo de alto voltaje de entre 200 y 2.000 volts/cm
 - en segundo lugar con un pulso individual de bajo voltaje con una intensidad de campo de entre 50 y 200 volts/cm y una duración de entre 300 y 2.000 ms.
- 15 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pulso individual de bajo voltaje tiene una intensidad de campo de entre 50 y 140 volts/cm.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pulso individual de bajo voltaje tiene una intensidad de campo de entre 80 y 120 volts/cm.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pulso individual de bajo voltaje tiene una intensidad de campo de entre 90 y 110 volts/cm.
- 20 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pulso individual de bajo voltaje tiene una intensidad de campo de 100 volts/cm.
6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se hace uso del alto voltaje con una intensidad de campo de entre 200 y 1.400 volts/cm.
- 25 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que se hace uso del alto voltaje con una intensidad de campo de entre 400 y 1.200 volts/cm.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que se hace uso del alto voltaje con una intensidad de campo de entre 600 y 800 volts/cm.
- 30 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que se hace uso del alto voltaje con una intensidad de campo de 700 volts/cm.
- 35 10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el tejido es un músculo.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pulso individual de bajo voltaje tiene una intensidad de campo de entre 100 y 200 volts/cm.
- 40 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pulso individual de bajo voltaje tiene una intensidad de campo de entre 120 y 160 volts/cm.
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pulso individual de bajo voltaje tiene una intensidad de campo de 140 volts/cm.
- 45 14. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 11 a 13, en el que se hace uso del alto voltaje con una intensidad de campo de entre 400 y 2.000 volts/cm.
- 50 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que se hace uso del alto voltaje con una intensidad de campo de entre 800 y 1.600 volts/cm.
16. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que se hace uso del alto voltaje con una intensidad de campo de entre 900 y 1.200 volts/cm.
- 55 17. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 14, en el que se hace uso del alto voltaje con una intensidad de campo de 1.000 volts/cm.
18. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 11 a 17, en el que el tejido es un

tejido tumoral.

19. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que el pulso individual de bajo voltaje tiene una duración de entre 300 y 800 ms.
- 5 20. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el pulso individual de bajo voltaje tiene una duración de entre 350 y 600 ms.
21. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el pulso individual de bajo voltaje tiene una
10 duración de 400 ms.
22. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en el que el pulso individual de bajo voltaje tiene una polaridad que es opuesta a la del pulso de alto voltaje.
- 15 23. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que se usa un pulso individual de alto voltaje.
24. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en el que se hace uso de pulso(s) de un campo de alto voltaje con una duración de entre 10 y 1.000 μ s.
- 20 25. El uso de acuerdo con la reivindicación 24, en el que se hace uso de pulso(s) de un campo de alto voltaje con una duración de entre 50 y 200 μ s.
26. El uso de acuerdo con la reivindicación 25, en el que se hace uso de pulso(s) de un campo de alto
25 voltaje con una duración de 100 μ s.
27. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el pulso de alto voltaje y el pulso de bajo voltaje están separados por un lapso.
- 30 28. El uso de acuerdo con la reivindicación 27, en el que el lapso es de entre 300 ms y 3.000 s.
29. El uso de acuerdo con la reivindicación 28, en el que el lapso es de entre 500 ms y 1.000 s.
30. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en el que el lapso es de 1.000 ms.
- 35 31. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido nucleico es capaz de producir una molécula terapéuticamente activa o varias moléculas terapéuticamente activas en las células tisulares.
- 40 32. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se hace uso de dos o más ácidos nucleicos capaces de producir diferentes terapéuticamente activos en las células tisulares.
33. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido nucleico codifica para la proteína RDD o para un fragmento eficiente de la misma.
- 45 34. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento es eficiente para reducir o suprimir la angiogénesis tumoral.
35. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento
50 reduce o suprime el crecimiento tumoral.
36. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento inhibe la metástasis.
- 55 37. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento es contra el cáncer.
38. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y 19 a 32, en el que el tejido es un músculo y el ácido nucleico codifica para uno o varios inmunógenos.

39. El uso de acuerdo con la reivindicación 38, en el que el (los) inmunógeno(s) es/son inmunógeno(s) frente al VIH.
- 5 40. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y 19 a 37, en el que dicho tejido es un músculo.
41. Uso de un ácido nucleico que es capaz de expresar una molécula en la preparación de un medicamento o un fármaco para su uso en un método para administrar dicho ácido nucleico a células tisulares, especialmente a células tisulares tumorales o no tumorales, por ejemplo, a células musculares, en el que
- 10 a) dicho ácido nucleico va a ser inyectado en el tejido
b) el tejido es estimulado eléctricamente como sigue:
- 15 - en primer lugar con al menos un pulso de alto voltaje (HV) con una intensidad de campo de entre 200 y 2.000 volts/cm
- en segundo lugar con un pulso individual de bajo voltaje (LV) con una intensidad de campo de entre 50 y 200 volts/cm y una duración de entre 300 y 2.000 ms.
- 20 42. Método para la producción de anticuerpos, especialmente de anticuerpos policlonales, que comprende la inyección de un ácido nucleico que codifica para un inmunógeno en un tejido, especialmente un músculo, de un animal vivo no humano, y la estimulación eléctrica del tejido como sigue:
- 25 - en primer lugar con al menos un pulso de alto voltaje (HV) con una intensidad de campo de entre 200 y 2.000 volts/cm
- en segundo lugar con un pulso individual de bajo voltaje (LV) con una intensidad de campo de entre 50 y 140 volts/cm y una duración de entre 300 y 2.000 ms.
- 30 siendo el ácido nucleico transferido a las células tisulares como resultado de esta estimulación eléctrica, y expresando en dicho hospedador un inmunógeno capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria en el hospedador, y recuperar los anticuerpos.

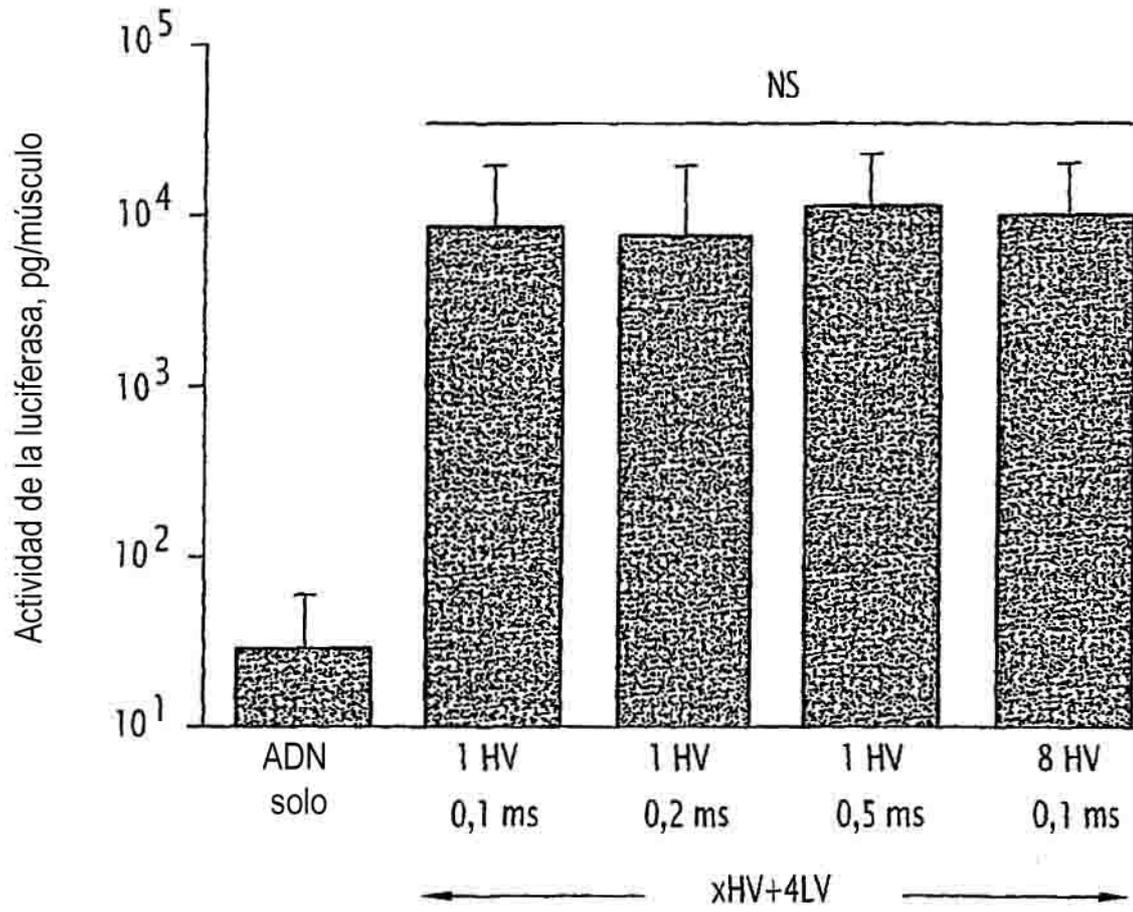


FIG.1

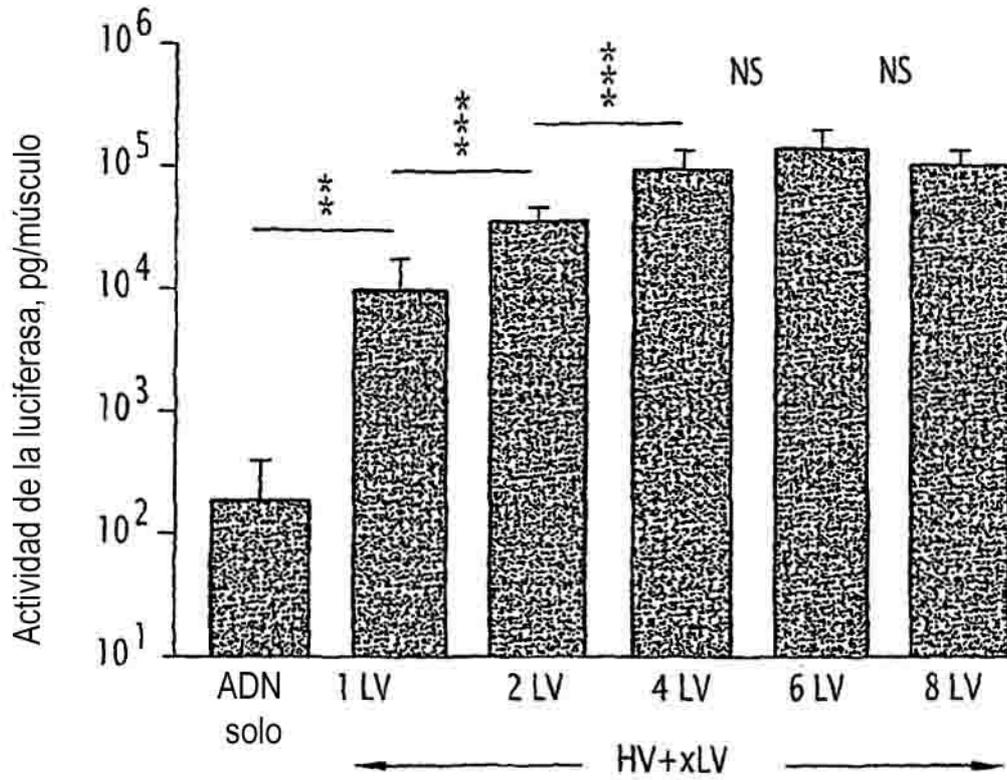


FIG.2

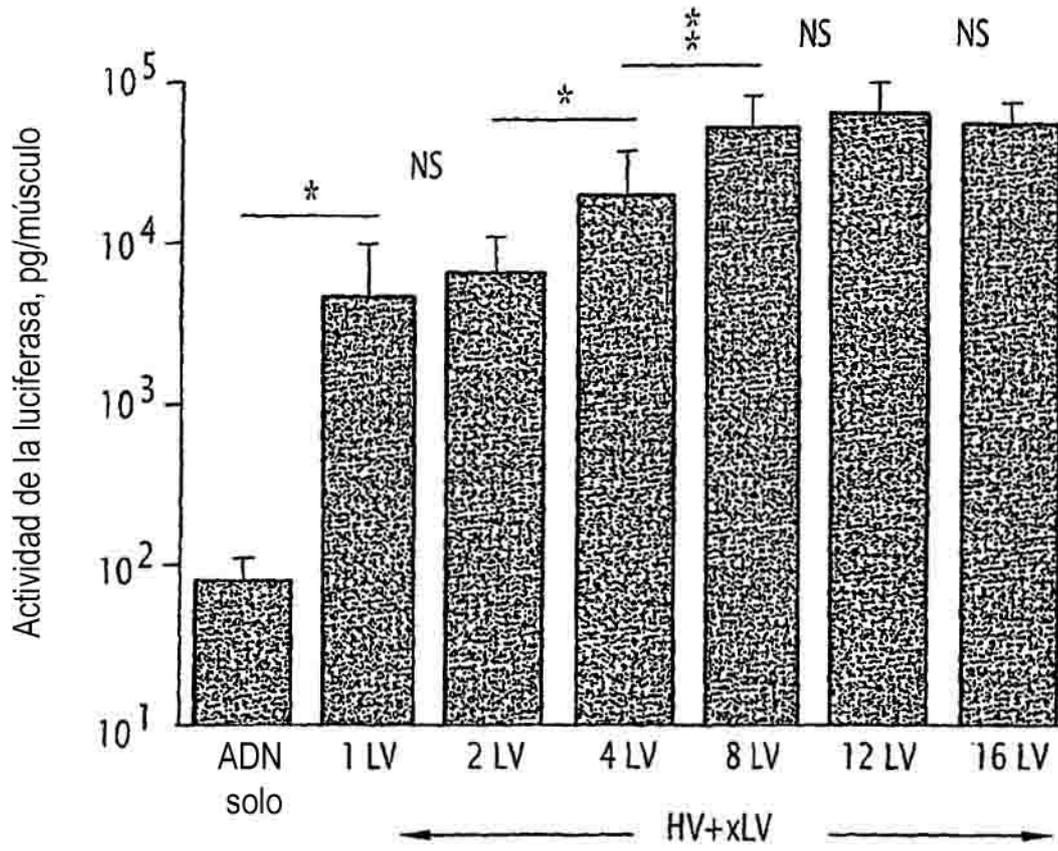


FIG.3

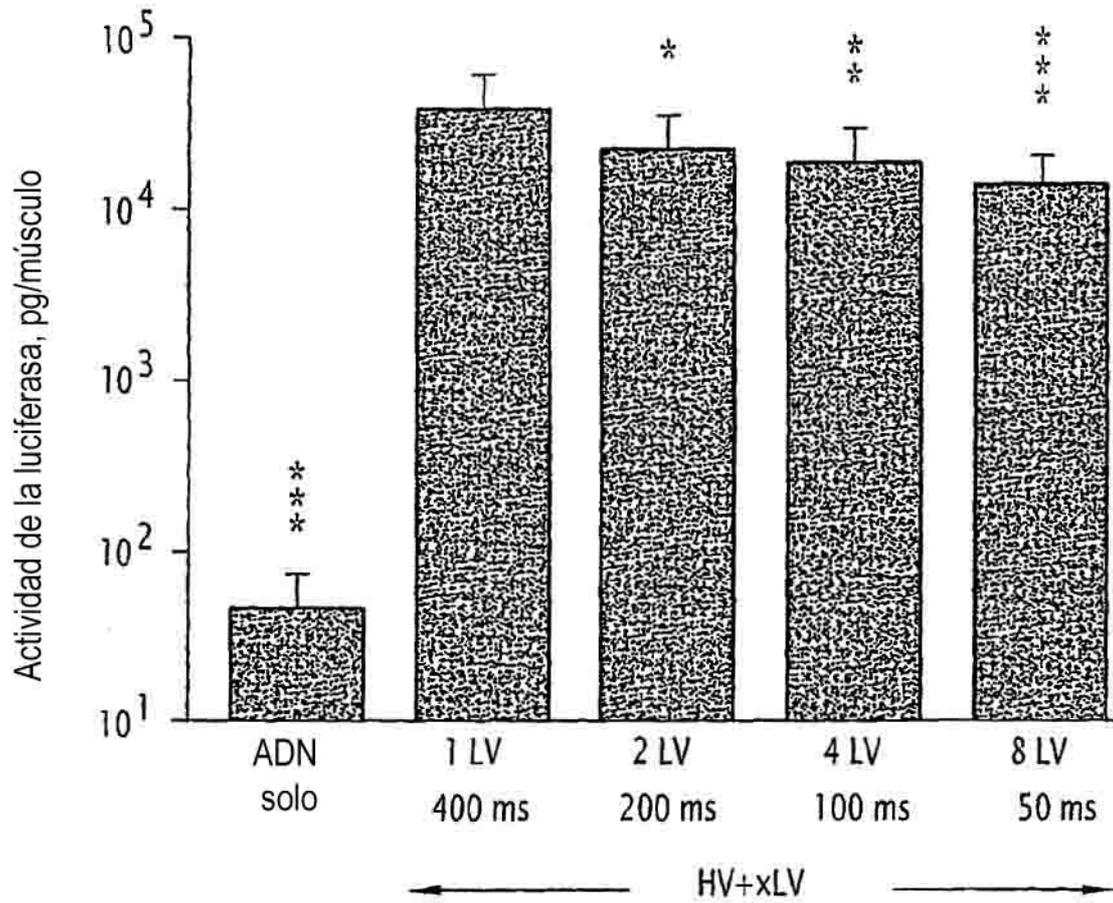


FIG.4

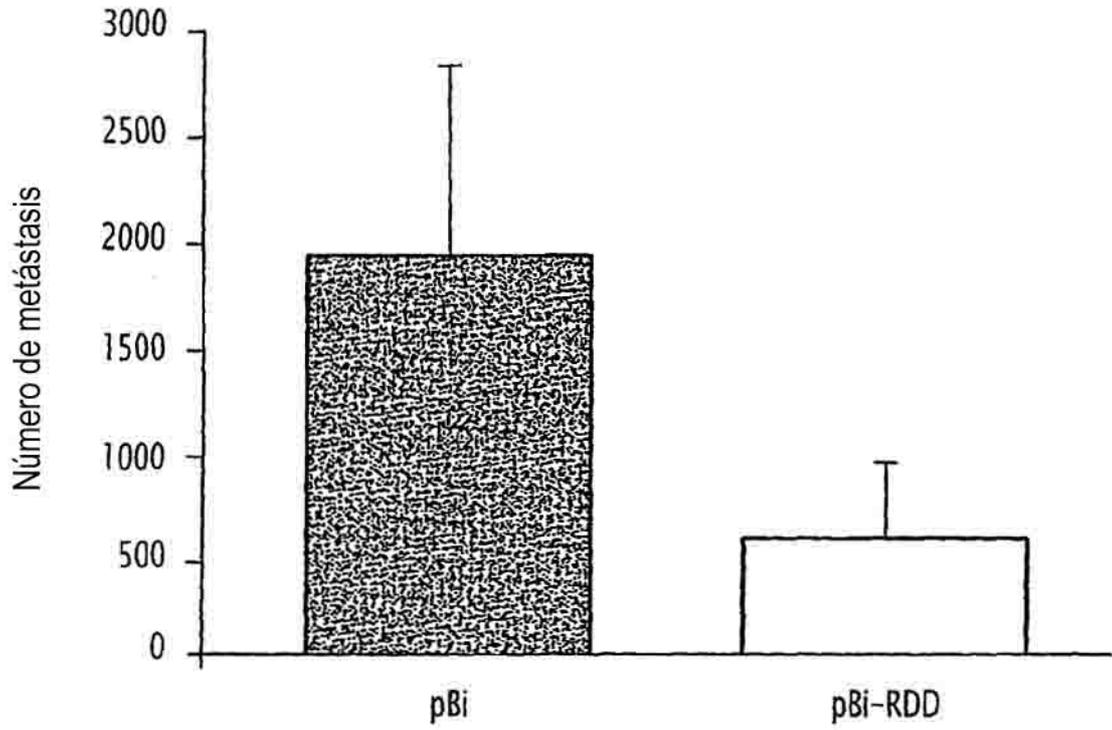


FIG.5

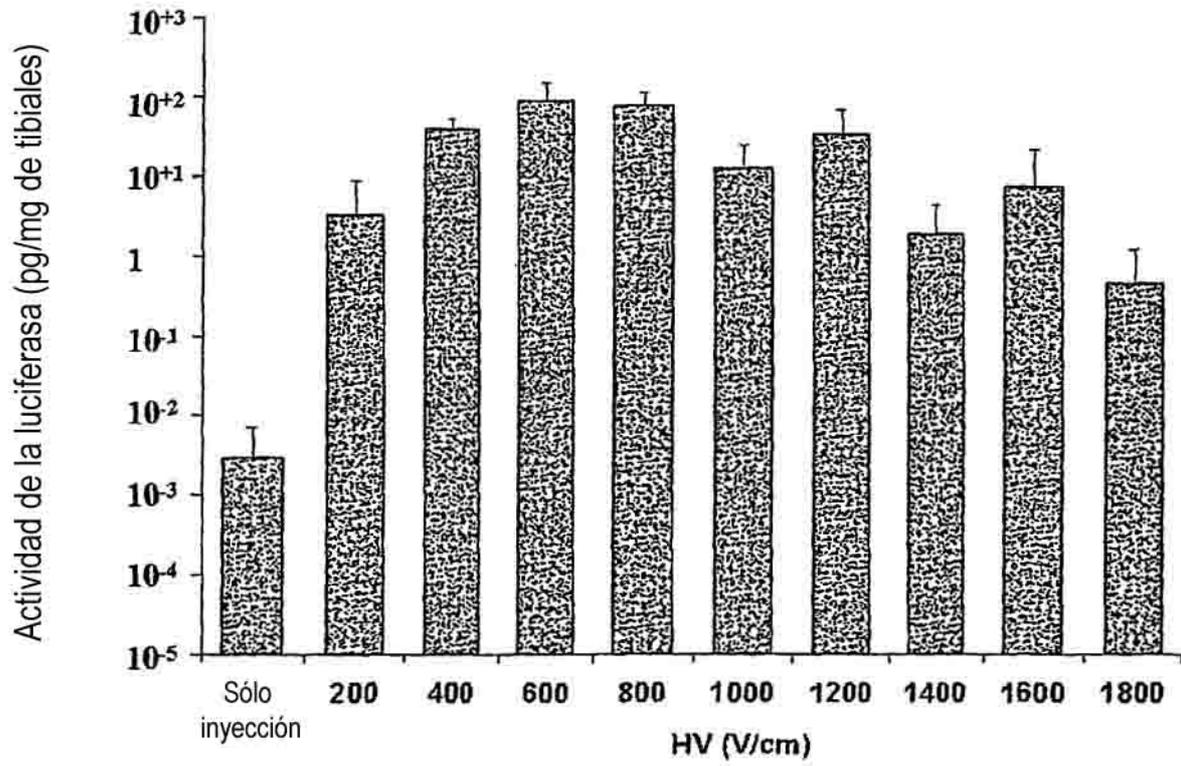


FIG.6

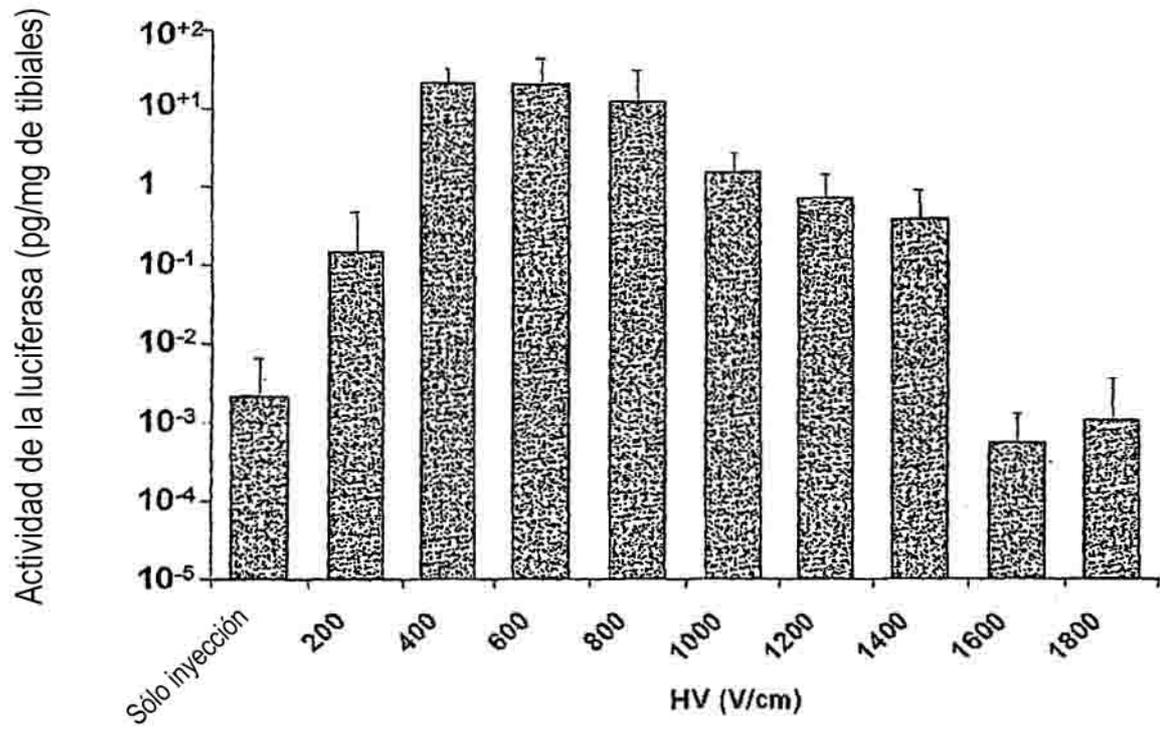


FIG.7

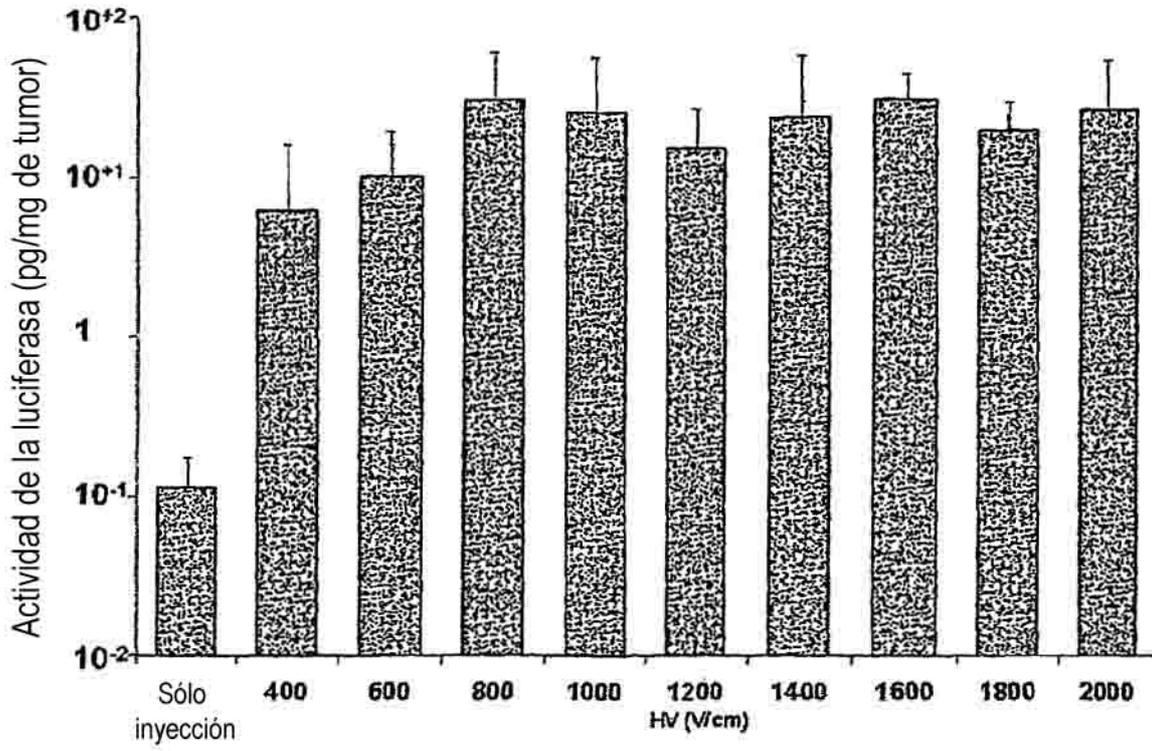


FIG.8

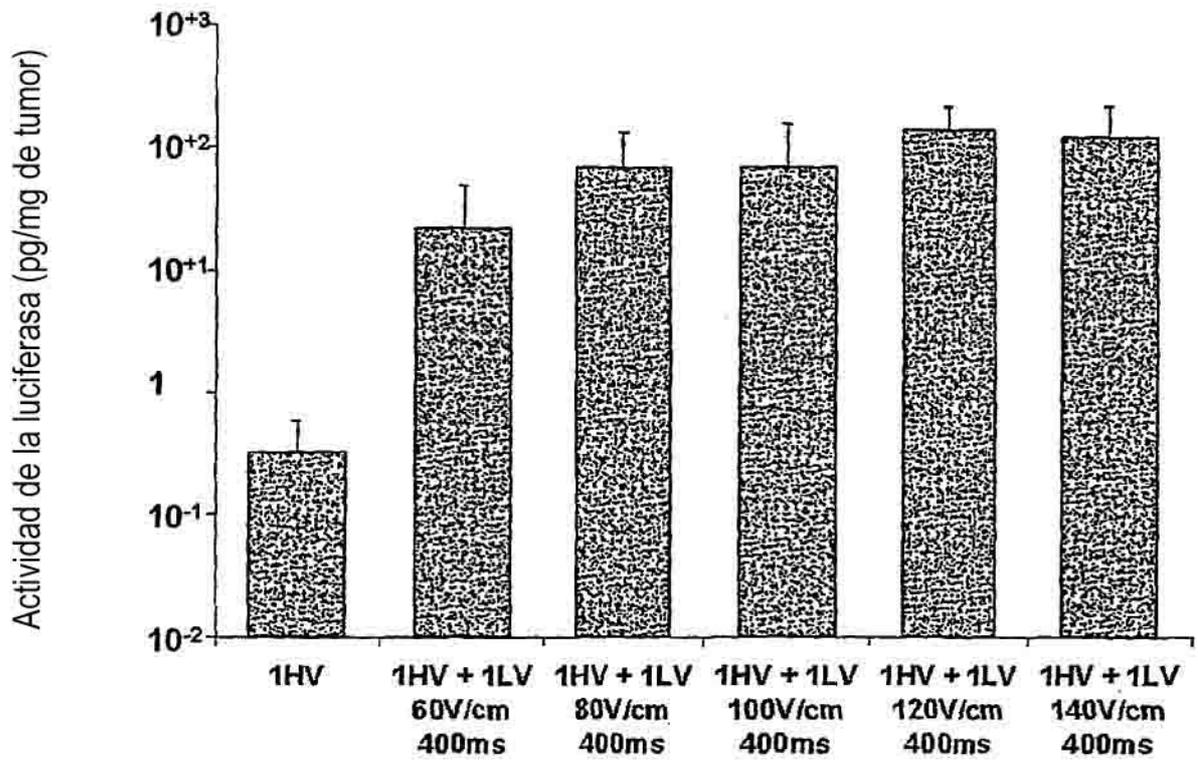


FIG.9

Medición de los anticuerpos de IgG anti-RDD en la semana 9 mediante ELISA

