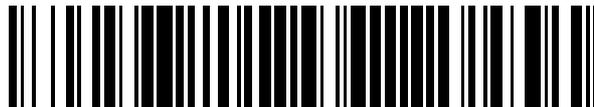


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 987**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2010 E 10711388 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2411519**

54 Título: **Ácido nucleico antisentido de kanamicina para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

27.03.2009 EP 09290224

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

22.10.2015

73 Titular/es:

CHOMIENNE, CHRISTINE (50.0%)

1 rue Gustave Mathieu

77590 Bois le Roi, FR y

PADUA, ROSE ANN (50.0%)

72 Inventor/es:

PADUA, ROSE ANN y

CHOMIENNE, CHRISTINE

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 548 987 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

Ácido nucleico antisentido de kanamicina para el tratamiento del cáncer

- 5 **[0001]** La invención como se define en las reivindicaciones 1 a 23 se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia complementaria a un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina. Este ácido nucleico es útil como adyuvante de vacuna de ADN, y se puede usar, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, en combinación con un inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales tales como ácido retinoico todo trans (ATRA).
- 10 **[0002]** El cáncer es la segunda causa más frecuente de mortalidad en Estados Unidos, justo después de las enfermedades cardiovasculares. Aproximadamente el 10 % de estas muertes por cáncer están provocadas por cánceres de la sangre tales como leucemias, linfomas y mielomas. Solo en la Unión Europea y Estados Unidos, se estima que 1,9 millones de personas padecen cánceres de la sangre. Algunos de estos cánceres de la sangre son enfermedades huérfanas, como la leucemia mieloide aguda (LMA). La leucemia promielocítica aguda (LPA, LMA tipo 15 M3) se caracteriza por una translocación recíproca t(15;17) que funde el gen de la leucemia promielocítica (PML) al gen del receptor alfa del ácido retinoico (RAR α), y por una detención de la diferenciación mieloide en la etapa promielocítica. La terapia de diferenciación mediada por el ácido retinoico todo trans (ATRA) ahora es la base del tratamiento habitual en pacientes con LPA. Sin embargo, a pesar de la supervivencia prolongada obtenida con los ensayos actuales al combinar ATRA con quimioterapia, el 10 % aproximadamente de los pacientes todavía recaen 20 debido a la falta de cumplimiento de la terapia de mantenimiento actual. Por lo tanto, se necesitan nuevas estrategias terapéuticas para erradicar la enfermedad residual y mejorar la calidad de vida.
- [0003]** Hasta la fecha, se han identificado muchos antígenos asociados a tumores y se han desarrollado 25 estrategias de vacunación que inducen una respuesta inmunitaria contra estos antígenos tumorales. Los antígenos de proteínas cancerígenas naturales y recombinantes contienen antígenos inmunógenos definidos a niveles normalizados y su eficacia depende de hallar el adyuvante y el sistema de administración adecuados. La administración de ADN, por ejemplo, la inyección directa de *cassettes* de expresión génicos en hospedadores vivos, es un nuevo enfoque para la vacunación e inmunoterapia. La expresión de los genes administrados puede producir 30 una activación inmunitaria específica de las defensas inmunitarias del hospedador contra el antígeno expresado.
- [0004]** La eficacia de una estrategia de vacunación depende de la adquisición de una respuesta inmunitaria que pueda ser tanto humoral como citotóxica. Se ha demostrado que las vacunas de ADN cumplen estos 35 requerimientos, lo que da lugar a respuestas inmunitarias mediadas por células (generación de linfocitos T citotóxicos CD8+ y colaboradores CD4+) y humoral potentes y persistentes al antígeno codificado por el plásmido. La aplicación de este tipo de vacunación a cánceres se usó por primera vez en linfoma B no de Hodgkin (B-LNH) usando el idiotipo de la inmunoglobulina de superficie como antígeno contra el cual se obtuvo la respuesta anti-tumoral (Stevenson et al., 1995; Syrengeles et al., 1996, Nature Medicine 2:1038-41, Rice et al., 2008, Nature Reviews 8:108-20). También se observó inmunidad protectora en otros modelos de ratón de linfoma y mieloma. 40
- [0005]** Sin embargo, se informó de un deterioro generalizado del sistema inmunitario celular en algunos 45 pacientes con cáncer. Teniendo esto en cuenta, el mal estado inmunitario de estos pacientes, en particular de pacientes con LPA, se considera un obstáculo importante para enfoques inmunoterapéuticos para el tratamiento de estrategias de vacunación solas.
- [0006]** Padua et al. (2003, Nature Medicine 9:1413-1417) se aprovecharon de un modelo animal de LPA 50 (Brown et al. 1997, Proc Natl Acad Sci USA. 94:2551-6) para someter a ensayo la eficacia *in vivo* de una vacuna de ADN que comprende un ácido nucleico en el que el antígeno tumoral PML-RAR α está unido a secuencias del fragmento C de la toxina tetánica (FrC). Sus resultados demuestran que el ATRA actúa como adyuvante con la vacunación de ADN PML-RAR α -FrC para prolongar la supervivencia de los ratones LPA. Esto iba acompañado de un incremento en los linfocitos T CD4+ and CD8+, los anticuerpos del RAR α y la producción de IFN γ , lo que demuestra la inducción de respuestas inmunitarias relevantes.
- [0007]** El documento WO 03/090778 además enseña que composiciones de vacuna que comprenden (i) un 55 inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales tal como ATRA y (ii) un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido inmunógeno tal como PML-RAR α -FrC, PML-RAR α -AS-FrC o ScFvBCL1-FrC rescataron a ratones LPA de recaída y muerte.
- [0008]** Por lo tanto, las terapias de combinación de una vacuna de ADN con la administración de ATRA

constituyen tratamientos prometedores para leucemias (Padua y Chomienne 2004, Discovery Medicine 4:41-44). Existe una necesidad en la técnica del desarrollo de adyuvantes de ADN que sean útiles para aumentar la respuesta inmunitaria en pacientes con cáncer.

5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0009] La presente invención se define en las reivindicaciones 1 a 23.

[0010] Sorprendentemente se ha comprobado que la secuencia KanAS de la SEQ ID NO: 1, que es complementaria a un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina, es un adyuvante muy eficiente en la vacunación con ADN.

[0011] Más específicamente, los inventores han demostrado que un plásmido que comprende la secuencia KanAS de la SEQ ID NO: 1, solo o fusionado con el antígeno tumoral PML-RAR α prolongaba la supervivencia de ratones LPA cuando se administraba en combinación con ATRA. Además, la KanAS sola prolongaba la vida de ratones SMD. Las respuestas inmunitarias se midieron mediante citometría de flujo, y se comprobó que ratones SMD tratados con KanAS sola presentaban tres veces más linfocitos T de memoria en comparación con ratones FVB/N de tipo silvestre identificados. Por otra parte, la población progenitora de células pluripotenciales leucémicas se redujo tras el tratamiento con KanAS (25 % aproximadamente en ratones sin tratar frente al 10 % aproximadamente en ratones tratados). Por último, se observó una regulación al alza transitoria del transcrito MyD88, que se encuentra en la vía aguas abajo de los receptores de tipo Toll (TLRs), receptores para los que el ADN es uno de los ligandos.

[0012] Se puede clonar aguas arriba o aguas abajo de la KanAS cualquier antígeno que ejerza una respuesta inmunitaria. La vacunación de ADN con un ácido nucleico que comprende KanAS por tanto es aplicable a todos los cánceres, y a muchas otras enfermedades que requieran respuestas inmunitarias, incluyendo enfermedades infecciosas. La estrategia de vacunación con ADN desvelada en la presente solicitud también puede ser aplicable a individuos con una predisposición hereditaria al cáncer tal como cáncer de mama y de colon, en el que los oncogenes se encuentran en la línea germinal y heredados.

[0013] Además, y a diferencia de las vacunas autólogas, las vacunas de ADN desveladas en la presente solicitud no son vacunas específicas para una enfermedad cancerígena determinada. Tampoco presentan ningún riesgo de inducir autoinmunidad a un antígeno. Además, estas vacunas se pueden fabricar mediante procesos de fermentación bacteriana convencionales que se pueden escalar fácilmente.

Ácidos nucleicos de KanAS desvelados en la presente invención

[0014] La presente solicitud desvela un ácido nucleico aislado y/o purificado que comprende, o está constituido por, una secuencia complementaria a un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina. Dicho ácido nucleico se denomina como "ácido nucleico de KanAS". Dicho fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina puede ser de cualquier longitud, por ejemplo de al menos, como máximo o aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 473 o 500 nucleótidos consecutivos.

[0015] En el contexto de la presente invención, un "ácido nucleico" se refiere a la forma polimérica del éster de fosfato de ribonucleósidos ("moléculas de ARN") o desoxirribonucleósidos ("moléculas de ADN"), o cualquiera de sus análogos de fosfoéster, tales como fosforotioatos y tioésteres, en forma de cadena sencilla, o de hélice de doble cadena. El término "ácido nucleico" incluye todo ADN de doble cadena, entre otros, en moléculas de ADN lineales (por ejemplo, fragmentos de restricción) o circulares. El ácido nucleico preferentemente corresponde a una molécula de ADN.

[0016] Como se usa en el presente documento, "aislado y/o purificado" se refiere a un compuesto que se encuentra aislado y/o purificado del cuerpo humano o de un animal, y/o de una librería de compuestos.

[0017] Como se usa en el presente documento, el término "proteína de resistencia a la kanamicina" se refiere a una enzima capaz de conferir resistencia a la kanamicina. Dicha enzima cataliza la siguiente reacción enzimática:



[0018] La secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina se puede obtener de cualquier microorganismo, por ejemplo, de *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus circulans*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Streptomyces fradiae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptomyces ribosidificus*, *Campylobacter jejuni* o *Lactococcus lactis*. Preferentemente, dicha secuencia que
5 codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina tiene una secuencia constituida por los nucleótidos 1226 a 2020 de la SEQ ID NO: 9.

[0019] Por lo tanto, el ácido nucleico de KanAS desvelado en la presente solicitud además puede comprender una secuencia complementaria a un fragmento del vector pVAX1 (Nº de catálogo V260-20, Invitrogen,
10 Carlsbad, California, EE.UU.). La secuencia del vector pVAX1 se muestra como SEQ ID NO: 9.

[0020] Por lo tanto, el ácido nucleico de KanAS desvelado en la presente solicitud, por ejemplo, puede comprender o estar constituido por una secuencia complementaria a un fragmento de la SEQ ID NO: 9, en el que dicho fragmento de la SEQ ID NO: 9 comprende al menos, como máximo o aproximadamente 50, 100, 150, 200,
15 250, 300, 350, 400, 450, 473 o 500 nucleótidos consecutivos de los nucleótidos situados entre la posición 1226 y la posición 2020 de la SEQ ID NO: 9. El fragmento de la SEQ ID NO: 9 por ejemplo puede comprender de 50 a 500, 100 a 500, 200 a 500, 300 a 500, 400 a 500 o 450 a 500 nucleótidos consecutivos de los nucleótidos situados entre la posición 1226 y la posición 2020 de la SEQ ID NO: 9. El ácido nucleico de KanAS también puede corresponder a un derivado de dichas secuencias.

20 **[0021]** En una realización preferida, el ácido nucleico de KanAS comprende, o está constituido por:

- una secuencia al menos un 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 o 2;
- un fragmento de al menos 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 450 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO:
25 1 o 2; o
- un derivado de la SEQ ID NO: 1 o 2.

[0022] Estos ácidos nucleicos de KanAS preferentemente presentan actividad biológica. Como se usa en el presente documento, el término "actividad biológica" de un ácido nucleico de KanAS se refiere a la capacidad para
30 provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero tal como un ratón, rata o un ser humano. Los métodos para medir dicha actividad biológica son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar los métodos desvelados en Padua et al. (2003, Nature Medicine 9: 1413-1417). En una realización preferida, la actividad biológica del ácido nucleico de KanAS se mide evaluando su capacidad para prolongar la supervivencia en modelos de ratón de LPA o SMD (en lo sucesivo "ratones LPA" o "ratones SMD"), cuando se administra en combinación con
35 ATRA (véanse Ejemplos 2 y 3 de la presente solicitud de patente).

[0023] Por ácido nucleico que tiene una secuencia al menos, por ejemplo, un 95 % "idéntica" a una secuencia de búsqueda de la presente invención, se quiere decir que la secuencia del ácido nucleico es idéntica a la secuencia de búsqueda excepto por que la secuencia puede incluir hasta cinco alteraciones de nucleótidos por cada 100
40 nucleótidos de la secuencia de búsqueda. En otras palabras, para obtener un ácido nucleico que tiene una secuencia al menos un 95 % idéntica a una secuencia de búsqueda, hasta el 5 % (5 de 100) de los nucleótidos de la secuencia puede estar insertado, eliminado o sustituido con otro nucleótido.

[0024] El término "derivado" incluye fragmentos, homólogos, mutantes y variantes de origen natural, tales
45 como variantes alélicas, variantes de procesamiento alternativo o variantes obtenidas a través de procesamiento proteolítico. Derivados constituidos por una secuencia de aminoácidos "al menos un 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica" a una secuencia de referencia pueden comprender mutaciones, tales como deleciones, inserciones y/o sustituciones en comparación con la secuencia de referencia. En caso de sustituciones, el derivado constituido por una secuencia de aminoácidos al menos un 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a una secuencia de
50 referencia puede corresponder a una secuencia homóloga derivada de otra especie distinta de la secuencia de referencia. La sustitución puede corresponder a una sustitución conservativa como se indica en la siguiente tabla.

Sustituciones conservativas	Tipo de aminoácido
Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp	Aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas alifáticas
Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys	Aminoácidos con cadenas laterales no cargadas pero polares
Asp, Glu	Aminoácidos con cadenas laterales ácidas
Lys, Arg, His	Aminoácidos con cadenas laterales básicas
Gly	Cadena lateral neutra

[0025] En una realización específica, el ácido nucleico de KanAS comprende, o está constituido por, una secuencia antisentido que codifica al menos un péptido o polipéptido, en el que dicha secuencia antisentido es complementaria a un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina.

5 **[0026]** El ácido nucleico de KanAS además puede comprender una secuencia que codifica al menos un polipéptido inmunógeno. Dicha secuencia que codifica al menos un polipéptido inmunógeno puede corresponder, por ejemplo, a la secuencia de un ácido nucleico que codifica un polipéptido inmunógeno de acuerdo con el documento WO 03/090778.

10 **[0027]** En una realización, el polipéptido inmunógeno corresponde a un antígeno tumoral. Por lo tanto, según esta realización, el ácido nucleico de KanAS desvelado en la presente solicitud comprende una secuencia complementaria a un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina y una secuencia que codifica para un antígeno tumoral. Estas dos secuencias se pueden fusionar en el marco de lectura, es decir, dan lugar a la expresión de una proteína de fusión entre el antígeno tumoral y un péptido o polipéptido
15 codificado por la secuencia complementaria a un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina. El antígeno tumoral se puede fusionar al extremo N- o C-terminal del péptido o polipéptido codificado por la secuencia complementaria a un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina.

20 **[0028]** Entre los antígenos tumorales que se pueden usar de forma ventajosa, se pueden citar el PML (gen de la leucemia promielocítica)-RAR α humano (gen del receptor alfa del ácido retinoico), leucemia mieloide aguda 1/Ocho-Veintiuno (AML1/ETO), factor de unión central beta/cadena pesada de la miosina muscular (CBF beta/MYH11), gen de tipo ets/receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (Tel-PDGF), dedos de zinc de la leucemia promielocítica/receptor alfa del ácido retinoico (PLZF-RAR), fusiones mieloide/linfoide (MLL), de
25 las cuales hay 40 posibles pares, gen de tipo ets/leucemia mieloide aguda 1 (LMA-1-ETO), región de rotura de *cluster*/Abelson (BCR-ABL), TEL-AML1, E2A-PBX, MLL-AF4 y oncogenes activados por mutaciones, tales como los genes RAS.

[0029] En una realización específica de la invención, el antígeno tumoral es PML-RAR α . El término "antígeno
30 PML-RAR α " indica una proteína de fusión resultante de la translocación cromosómica t(15;17) descrita en Thé et al. (1990, Nature 347: 558-61). El antígeno PML-RAR α puede comprender, por ejemplo, o está constituido por, la secuencia de SEQ ID NO: 5, o uno de sus derivados.

[0030] En una realización preferida, el ácido nucleico de KanAS comprende, o está constituido por:
35
- una secuencia al menos un 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la secuencia PML-RAR α KanAS de la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4;
- un fragmento de al menos 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o 550 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; o
40 - un derivado de la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

[0031] Estos ácidos nucleicos de KanAS preferentemente presentan actividad biológica.

[0032] De manera alternativa, la secuencia que codifica el polipéptido inmunógeno es "no específica" de la
45 enfermedad cancerígena. En el marco de esta realización, puede ser apropiado cualquier potenciador de la respuesta inmunitaria, incluso aunque la secuencia no incluya un antígeno tumoral.

[0033] Polipéptidos inmunógenos que son "no específicos" de la enfermedad cancerígena se describen por ejemplo, en el documento WO 03/090778 e incluyen PML-RAR α AS o ScFvBCL1. El polipéptido inmunógeno "no
50 específico" puede estar codificado, por ejemplo, por una secuencia que comprende o está constituida por la secuencia de SEQ ID NO: 6 (PML-RAR α AS), o sus derivados. La secuencia que codifica dicho polipéptido inmunógeno "no específico" también se puede seleccionar del grupo constituido por un fragmento C de la toxina tetánica (FrC) (SEQ ID NO: 16), una secuencia de la toxina del cólera (CT), una toxina termolábil de *E. coli* (LT), una secuencia de la toxina pertussis (PT), una secuencia de la toxina A de *Clostridium difficile* y sus fragmentos
55 inmunógenos.

[0034] Los polipéptidos inmunógenos pueden ser identificados fácilmente por el experto en la materia usando *softwares* apropiados. Por ejemplo, la caracterización del carácter hidrófobo (por ejemplo, mediante el análisis de gráficas de hidrofobicidad) de los polipéptidos permite predecir si son inmunógenos. Los *softwares* para caracterizar

el carácter hidrófobo de un polipéptido incluyen, por ejemplo, los basados en el uso del algoritmo de Kyte-Doolittle o de Hopp-Woods. El algoritmo de Kyte-Doolittle es una escala aplicada de forma generalizada para delinear el carácter hidrófobo de una proteína. Las regiones con valores superiores a 0 son de carácter hidrófobo. El algoritmo de Hopp-Woods fue diseñado para predecir las regiones potencialmente antigénicas de polipéptidos. Valores superiores a 0 son hidrófilos, y por lo tanto es probable que se encuentren expuestos en la superficie de una proteína plegada.

5 **[0035]** En una realización específica, el polipéptido inmunógeno se selecciona del grupo constituido por una cualquiera de las SEQ ID Nos. 18-23. Estos polipéptidos inmunógenos se identificaron utilizando los *softwares* anteriores para caracterizar el carácter hidrófobo de un polipéptido.

15 **[0036]** La presente solicitud además desvela un vector que comprende un ácido nucleico de KanAS, sobre el que se pone el ácido nucleico de KanAS bajo el control de señales (por ejemplo, un promotor, un terminador y/o un potenciador) que permiten la transcripción del ácido nucleico de KanAS. El vector corresponde preferentemente a un vector de vacunación con ADN, es decir, un vector diseñado específicamente para el desarrollo de vacunas de ADN. El vector de vacunación con ADN puede corresponder o derivar de, por ejemplo, el vector de expresión pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) o pCDNA₃ (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.). El vector además puede comprender un gen de resistencia que confiera resistencia a un antibiótico tal como ampicilina o kanamicina. De manera alternativa, el vector no comprende ningún gen que confiera resistencia a un antibiótico.

20

Usos terapéuticos de los ácidos nucleicos de KanAS desvelados en la presente solicitud

25 **[0037]** Se ha comprobado que el ácido nucleico de KanAS descrito anteriormente es útil en la vacunación con ADN, en particular, como adyuvante. Dicho ácido nucleico de KanAS provoca la respuesta inmunitaria y por lo tanto se puede utilizar para el tratamiento de diversas enfermedades en las que se busca una respuesta inmunitaria mejorada para, por ejemplo, enfermedades infecciosas y cánceres. Por lo tanto, la presente solicitud desvela un ácido nucleico de KanAS de acuerdo con la invención para su uso en la vacunación con ADN (por ejemplo, como adyuvante), y/o para su uso en el tratamiento o la prevención de cánceres, tumores benignos o enfermedades infecciosas.

30

[0038] Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a cualquier tipo de tumor maligno (es decir, no benigno).

35 **[0039]** El tumor maligno corresponde preferentemente a un cáncer de la sangre (o hematológico) tal como una leucemia, un linfoma o un mieloma. Dichos cánceres de la sangre incluyen, por ejemplo, leucemia promielocítica aguda (LPA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfoide o mieloide, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia mielomonocítica (LMMC), leucemia linfoblástica aguda infantil (LLA), síndrome mielodisplásico (SMD), linfoma de Hodgkin (LH), linfoma no de Hodgkin (LNH) y mieloma múltiple (MM).

40 **[0040]** De manera alternativa, el tumor puede corresponder a un tumor sólido, tal como por ejemplo, un carcinoma, un adenocarcinoma, un sarcoma, un melanoma maligno, un mesotelioma o una blastoma. En una realización específica, el tumor sólido corresponde a un cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon o cáncer colorrectal.

45 **[0041]** El término "enfermedad infecciosa" incluye enfermedades causadas por diversos organismos tales como bacterias, micoplasmas, protozoos, hongos y virus (por ejemplo, VIH, virus de la hepatitis, en particular HBV o HCV).

50 **[0042]** Por "tratamiento" se entiende un uso terapéutico (es decir, en un paciente que tiene una enfermedad dada) y por "prevenir" se entiende un uso profiláctico (es decir, en un individuo susceptible de desarrollar una enfermedad dada). El término "tratamiento" no solo incluye el tratamiento que da lugar a una cura total de las enfermedades, sino también a tratamientos que ralentizan la progresión de la enfermedad y/o prolongan la supervivencia del paciente.

55 **[0043]** En el marco de los tratamientos del cáncer, el ácido nucleico de KanAS desvelado en la presente solicitud preferentemente es para su uso simultáneo o secuencial en combinación con un inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales. En otros términos, el ácido nucleico y el inductor no inmunosupresor de la apoptosis de las células tumorales se pueden administrar simultáneamente, es decir, de forma simultánea en el tiempo, o secuencialmente, es decir, en diferentes momentos durante el transcurso de un programa

de tratamiento común de un paciente. Sin embargo, el ácido nucleico de KanAS desvelado en la presente solicitud también es eficiente cuando se usa solo (véase, por ejemplo el Ejemplo 3).

[0044] "Apoptosis" se refiere a una forma de muerte celular que presenta cambios morfológicos estereotípicos. La apoptosis se puede medir, por ejemplo, por el ensayo de citometría de flujo con yoduro de propidio descrito en Dengler et al. (1995, Anticancer Drugs 6: 522-32), o por el ensayo de la desoxinucleotidil transferasa terminal *in situ* y el ensayo de desplazamiento de muescas (análisis TUNEL) descrito en Gorczyca (1993, Cancer Res. 53: 1945-1951).

10 **[0045]** Los "inductores no inmunosupresores de la apoptosis de células tumorales" son muy conocidos en la técnica. El inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales puede corresponder, por ejemplo, a un compuesto retinoide, un compuesto relacionado con arsénico, CD437 y otros inductores de la diferenciación y la apoptosis, compuestos de activación de CD44 tales como anticuerpos y ácido hialurónico, factores de crecimiento hematopoyético y de diferenciación, 5-azacitidina y otros agentes de desmetilación, inhibidores de la farnesil transferasa (FTI), inhibidores de la histona desacetilasa (HDACi), moléculas pequeñas tales como Imatinib, 15 inhibidores miméticos de BH3 tales como ABT 737, e inhibidores de RAC1.

[0046] Los "compuestos retinoides" se refieren a derivados de la vitamina A e incluyen, por ejemplo, el ácido retinoico (AR), ácido retinoico todo trans (ATRA), 9-cis AR, 4-HPPR, 13-cis AR y análogos sintéticos del ácido 20 retinoico tales como AM 580. Preferentemente, el compuesto retinoide corresponde a ATRA o AM 580.

[0047] "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 por unión del grupo ditiol. Dichos compuestos 25 incluyen, por ejemplo, el arsénico y el trióxido de arsénico.

[0048] En una realización preferida, el inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales tiene actividad adyuvante hacia la respuesta biológica provocada por dicho ácido nucleico. "Actividad adyuvante" se define 30 en el presente documento como un efecto logrado por la combinación de dos componentes que es superior al efecto de cualquiera de los dos componentes solos.

[0049] El ácido nucleico de KanAS desvelado en la presente solicitud, opcionalmente combinado con un inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales, se puede administrar en combinación con al 35 menos un fármaco anticancerígeno, como por ejemplo, 5-azacitidina (Vidaza™) o decitabina (simultánea o secuencialmente).

[0050] En el marco de los tratamientos del cáncer, el ácido nucleico de KanAS desvelado en la presente solicitud preferentemente comprende una secuencia que codifica un antígeno tumoral. Más preferentemente, el 40 antígeno tumoral es específico del cáncer a tratar. Ejemplos de antígenos útiles para la terapia del cáncer incluyen PML-RAR α para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (LPA) y el síndrome mielodisplásico (SMD), AML1-ETO para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) de tipo M2, CBF beta-MYH11 en LMA eosinofilia tipo M4, Tel-PDGF para la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), PLZF-RAR α en la variante de LPA, fusiones MLL en varias leucemias linfoides o mieloides, TEL-LMA-1, E2A-PBX, MLL-AF4 u oncogenes activados por mutaciones tales como los genes RAS para la leucemia linfoblástica aguda infantil y BCR-ABL para el tratamiento de 45 la leucemia mieloide crónica o la leucemia linfoblástica aguda infantil (LLA).

[0051] La presente solicitud también desvela un método para provocar una respuesta inmunitaria y/o para tratar o prevenir cánceres o enfermedades infecciosas que comprende la etapa de administración de una cantidad 50 eficaz de un ácido nucleico de KanAS como se desvela en la presente solicitud, opcionalmente en combinación con un inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales, a un individuo que lo necesite.

[0052] Por "cantidad eficaz" se entiende una cantidad suficiente para lograr una concentración de péptido que es capaz de prevenir, tratar o retrasar la enfermedad a tratar. Dichas concentraciones pueden ser determinadas de forma rutinaria por los expertos en la materia. La cantidad real del compuesto administrado normalmente será determinada por un médico, en vista de las circunstancias relevantes, incluyendo la dolencia a tratar, la vía de 55 administración seleccionada, el compuesto real administrado, la edad, el peso, y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y similares. Los expertos en la materia también deben apreciar que la dosificación puede depender de la estabilidad del péptido administrado.

[0053] Por "individuo que lo necesite" se entiende un individuo que padece o es susceptible de padecer la

enfermedad a tratar o prevenir. Los individuos a ser tratados en el marco de la invención preferentemente son seres humanos. Sin embargo, también se desvela el uso veterinario de ácidos nucleicos de KanAS.

Composiciones farmacéuticas desveladas en la presente solicitud

5

[0054] Los ácidos nucleicos de KanAS desvelados en la presente solicitud son útiles como fármacos (medicamentos). Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico como se ha descrito anteriormente, y/o un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico de KanAS en un vehículo fisiológicamente aceptable. Dichas composiciones farmacéuticas preferentemente corresponden a composiciones de vacunas.

10

[0055] El término "vehículo fisiológicamente aceptable" se entiende que engloba cualquier vehículo, que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del principio activo y que no sea tóxico para el hospedador al cual se administra. Vehículos fisiológicamente aceptables adecuados son muy conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, Easton, USA, 1985), que es un texto de referencia en este campo.

15

[0056] En una realización preferida, la composición farmacéutica además comprende un inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales tales como por ejemplo, arsénico, trióxido de arsénico, ácido retinoico todo trans (ATRA), 9-cis AR, 4-HPPR, 13-cis AR o AM 580. Dichas composiciones farmacéuticas son especialmente útiles para el tratamiento de cánceres. Preferentemente, el inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales tiene actividad adyuvante hacia la respuesta biológica provocada por el ácido nucleico de KanAS y/o el vector de expresión que comprende el ácido nucleico de KanAS. Lo más preferentemente, el ácido nucleico de KanAS desvelado en la presente solicitud comprende una secuencia que codifica un antígeno tumoral, por ejemplo un antígeno tumoral específico para el cáncer a tratar.

20

25

[0057] La composición farmacéutica además puede comprender al menos un fármaco anticancerígeno, como por ejemplo, 5-azacitidina (Vidaza™) o decitabina.

30

[0058] La presente solicitud además desvela una combinación de:

(i) una primera composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico de KanAS como se desvela en la presente solicitud y/o un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico de KanAS en un vehículo fisiológicamente aceptable; y

35

(ii) una segunda composición farmacéutica que comprende un inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales tal como por ejemplo, arsénico, trióxido de arsénico, ácido retinoico todo trans (ATRA), 9-cis AR, 4-HPPR, 13-cis AR o AM 580 en un vehículo fisiológicamente aceptable; y, opcionalmente

(iii) un fármaco anticancerígeno, tal como 5-azacitidina (Vidaza™) o decitabina.

40

[0059] Dicha combinación puede corresponder, por ejemplo, a un kit. El kit además puede comprender instrucciones para su uso en el tratamiento de cáncer. De manera alternativa, las primera y segunda composiciones farmacéuticas se pueden comercializar por separado.

[0060] Las primera y segunda composiciones farmacéuticas de la combinación desvelada en la presente solicitud pueden estar destinadas a su administración de forma secuencial (es decir, en diferentes momentos durante el transcurso de un programa de tratamiento común), o estar destinadas a su administración de forma simultánea.

45

[0061] En una realización preferida, la primera composición farmacéutica de la combinación desvelada en la presente solicitud comprende un ácido nucleico de KanAS que comprende una secuencia que codifica un antígeno tumoral, por ejemplo un antígeno tumoral específico del cáncer a tratar (por ejemplo, PML-RAR α , AML1-ETO, CBF beta-MYH11, Tel-PDGF, PLZF-RAR α , fusiones MLL, TEL-LMA-1 o BCR-ABL). Lo más preferentemente, el inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales tiene actividad adyuvante hacia la respuesta biológica provocada por el ácido nucleico de KanAS y/o el vector de expresión que comprende el ácido nucleico de KanAS.

50

55

[0062] Los ácidos nucleicos de KanAS y/o vectores que comprenden dicho ácido nucleico de KanAS desvelados en la presente solicitud se pueden administrar en forma desnuda, libres de cualquier vehículo de administración. Con este fin, el ácido nucleico simplemente se diluye en una solución fisiológicamente aceptable tal como solución salina estéril o solución salina estéril tamponada, con o sin vehículo. Cuando está presente, el

vehículo preferentemente es isotónico, hipotónico, o débilmente hipertónico, y tiene una concentración iónica relativamente baja, tal como la proporcionada por una solución de sacarosa, por ejemplo, una solución que contiene el 20 % de sacarosa.

5 **[0063]** De manera alternativa, los ácidos nucleicos de KanAS y/o vectores que comprenden dicho ácido nucleico de KanAS desvelados en la presente solicitud, o el ácido nucleico de las composiciones, combinaciones o kits de vacuna desvelados en la presente solicitud se pueden administrar junto con agentes que ayuden en la captación celular. Ejemplos de dichos agentes son (i) los productos químicos que modifican la permeabilidad celular, tales como bupivacaína (véase, por ejemplo, documento WO 94/16737), (ii) los liposomas o partículas víricas para la
10 encapsulación del polinucleótido, o (iii) los lípidos catiónicos o micropartículas de sílice, oro o wolframio, que se asocian a los polinucleótidos.

[0064] Los liposomas aniónicos y neutros son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Liposomes: A Practical Approach, RPC New Ed, IRL Press, 1990), para una descripción detallada de los métodos para preparar
15 liposomas) y son útiles para la administración de una gran gama de productos, incluyendo polinucleótidos.

[0065] Los lípidos catiónicos también son conocidos en la técnica y se utilizan habitualmente para la administración de genes. Dichos lípidos incluyen Lipofectina™ también conocida como DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trimetilamonio), DOTAP (1,2-bis(oleiloxi)-3-(trimetilamonio)propano), DDAB (bromuro de dimetildioctadecil-amonio), DOGS (dioctadecilamidoglicil espermina) y derivados de colesterol tales como DC-Chol (3-beta-(N-(N',N'-dimetil aminometano)carbamoil)colesterol). Una descripción de estos lípidos catiónicos se puede encontrar en los documentos EP 187702, WO 90/11092, la patente de Estados Unidos N° 5.283.185, los documentos WO 91/15501, WO 95/26356 y la patente de Estados Unidos N° 5.527.928. Los lípidos catiónicos para la administración de genes preferentemente se usan junto con un lípido neutro tal como DOPE (dioleil
20 fosfatidiletanolamina), como se describe en el documento WO 90/11092 como ejemplo.

[0066] La formulación que contiene liposomas catiónicos opcionalmente puede contener otros compuestos que facilitan la transfección. Algunos de ellos se describen en los documentos WO 93/18759, WO 93/19768, WO 94/25608 y WO 95/02397. Estos incluyen derivados de espermina útiles para facilitar el transporte de ADN a través
30 de la membrana nuclear (véase, por ejemplo, el documento WO 93/18759) y compuestos de permeabilización de la membrana tales como GALA, Gramicidina S, y sales biliares catiónicas (véase, por ejemplo, el documento WO 93/19768).

[0067] Se pueden utilizar micropartículas de oro o wolframio para la administración de genes, como se describe en los documentos WO 91/00359 o WO 93/17706. El polinucleótido revestido de micropartículas se inyecta por vía intradérmica o intraepidérmica utilizando un dispositivo de inyección sin aguja ("pistola de genes"), tales como los descritos en la patente de Estados Unidos N° 4.945.050, la patente de Estados Unidos N° 5.015.580 y el documento WO 94/24263. De lo contrario, el ADN desnudo se puede inyectar directamente, es decir, por vía intramuscular.
40

[0068] La cantidad de ADN a usar en una composición farmacéutica depende, por ejemplo, de la fuerza del promotor usado en la construcción de ADN, la inmunogenicidad del antígeno tumoral expresado, la dolencia del mamífero destinado a la administración (por ejemplo, peso o edad), el modo de administración, y el tipo de formulación. En general, a adultos humanos se les puede administrar una dosis terapéuticamente eficaz de 1 µg aproximadamente a 8 mg aproximadamente, preferentemente de 1 µg aproximadamente a 1 mg aproximadamente (Graham, B.S. et al., J. Infect. Dis. 194, 1650/60 (15-12-2006)), preferentemente, de 10 µg aproximadamente a 800 µg aproximadamente y, más preferentemente, de 25 µg aproximadamente a 250 µg aproximadamente. La administración se puede conseguir en una sola dosis o se puede repetir a intervalos.

50 **[0069]** La vía de administración es cualquier vía convencional usada en el campo de la vacunación con ADN. Como guía general, un ácido nucleico de la invención se puede administrar por una vía parenteral, por ejemplo, por una vía intradérmica, intraepidérmica, o intramuscular. La elección de la vía de administración depende de la formulación que se selecciona. Un polinucleótido formulado junto con bupivacaína se administra de forma ventajosa en los músculos. Cuando se usa un liposoma neutro o aniónico o un lípido catiónico, tal como DOTMA o DC-Chol, la
55 formulación se puede inyectar de forma ventajosa por vía intramuscular o intradérmica. Un polinucleótido en una forma desnuda se puede administrar de forma ventajosa por vía intramuscular, intradérmica, o subcutánea. Además, se puede desarrollar la electroporación para mejorar la administración de ADN en el músculo (Mir et al., 1999, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 96:4262-7).

[0070] En el marco de los tratamientos contra el cáncer, la terapia con ácidos nucleicos se combina preferentemente con la administración de un inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales, tal como arsénico, dosis bajas de quimioterapia o ácido retinoico todo trans u otros compuestos del ácido retinoico, tales como 9-cis AR, 4 HPR, 13-cis AR, CD437 y otros inductores de la diferenciación y la apoptosis, activación de CD44 por anticuerpos o el ácido hialurónico, factores de crecimiento hematopoyético y de diferenciación. A un paciente se le administra este inductor que ya está presente en la propia composición de vacuna como ácido nucleico de la invención, o está presente en forma de composición separada. 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, la composición de ácidos nucleicos se puede suministrar por vía intradérmica o intramuscular, mientras que el inductor se administra por vía oral.

[0071] Todas las referencias citadas en este documento, incluyendo artículos de revistas o resúmenes, solicitudes de patentes publicadas, patentes expedidas o cualquier otra referencia, se incorporan en su totalidad en este documento por referencia, incluyendo todos los datos, tablas, figuras y textos presentados en las referencias citadas.

[0072] A pesar de tener significados distintos, los términos "que comprende", "que tiene", "que contiene" y "que está constituido por" se han utilizado indistintamente en toda esta memoria descriptiva y se puede sustituir unos por otros.

[0073] La invención se evaluó adicionalmente en vista de los siguientes ejemplos y figuras.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0074]

La Figura 1 representa los plásmidos pVax14 y pVax15, que comprenden ácidos nucleicos de KanAS de acuerdo con la invención. pVax14 comprende un ácido nucleico de KanAS de la SEQ ID NO: 1, y pVax15 comprende un ácido nucleico PML-RAR α KanAS de la SEQ ID NO: 3.

La Figura 2 muestra que el ácido nucleico pVax14, que comprende el ácido nucleico de KanAS de la SEQ ID NO: 1, prolonga la esperanza de vida en un modelo de ratón LPA (leucemia promielocítica aguda). Véase Figura 10 para los mapas de plásmidos. Fila 1: ATRA + pVaxKanAS (n = 12) (pVax14, VVACS02); Fila 2: ATRA + pCDNA₃PML-RAR α FrC (n = 48) (VVACS01); Fila 3: ATRA + pCDNA₃PML-RAR α ASFrC (n = 12) (VVACS04); Fila 4: ATRA + pVaxPML-RAR α FrC (n = 12) (VVACS01). Fila 5: ATRA (n = 32). Fila 6: placebo + ADN (pCDNA₃PML-RAR α FrC) (n = 11) (VVACS01). Fila 7: Placebo (n = 10).

La Figura 3 muestra que el ácido nucleico pVax15, que comprende el ácido nucleico PML-RAR α KanAS de la SEQ ID NO: 3, prolonga la esperanza de vida en un modelo de ratón LPA. Fila 1: ATRA + pCDNA₃PML-RAR α FrC (n = 21) (VVACS01); Fila 2: ATRA + pVaxPML-RAR α KanAS (n = 10) (pVax15, VVACS03); Fila 3: ATRA (n = 9).

La Figura 4 muestra que el ácido nucleico pVax14 (VVACS02), que comprende el ácido nucleico de KanAS de la SEQ ID NO: 1, prolonga la esperanza de vida en un modelo de ratón SMD (síndrome mielodisplásico). Fila 1: pVaxKanAS (pVax14, VVACS02) (n = 6); Fila 2: Sin tratamiento (n = 25). P = 0,0002

La Figura 5 muestra que el ácido nucleico pVax14, que comprende el ácido nucleico de KanAS de la SEQ ID NO: 1, prolonga la esperanza de vida en un modelo de ratón SMD. pVaxKanAS (n = 10) (pVax14, VVACS02); PML-RAR α AS-FrC (n = 16) (VVACS04); Sin tratamiento: n = 25. Valores de p: Sin tratamiento vs. PML-RAR α AS-FrC <0,0001; Sin tratamiento vs. pVaxKanAS = 0,0002; PML-RAR α AS-FrC vs. pVaxKanAS = 0,3648.

La Figura 6 muestra que pCDNA₃PMLRAR α ASFrC prolonga la esperanza de vida de ratones SMD. pCDNA₃PMLRAR α ASFrC (n = 16) (VVACS04); Sin tratamiento: n = 26; ATRA: n = 11; ATRA + pCDNA₃PMLRAR α ASFrC (n = 9) (VVACS04). Valores P Log-rank: pCDNA₃PMLRAR α FrC (VVACS04), ATRA o ADN ATRA + vs. sin tratar = <0,0001; pCDNA₃PML-RAR α ASFrC (VVACS04) vs. ATRA = 0,9994; pCDNA₃PML-RAR α ASFrC (VVACS04) vs. ATRA + pCDNA₃PML-RAR α ASFrC (VVACS04) = 0,1957; ATRA vs. pCDNA₃PML-RAR α ASFrC + ATRA = 0,3834.

La Figura 7 muestra que la vacunación de ratones con el ácido nucleico pVax14, que comprende el ácido nucleico de KanAS de la SEQ ID NO: 1, produce un aumento de la población de linfocitos T de memoria CD4⁺ CD44^{hi} CD62L^{lo}. D15, D33 y D183 indican los días desde el diagnóstico del SMD.

La Figura 8 muestra que la vacunación de ratones con el ácido nucleico pVax14, que comprende el ácido nucleico de KanAS de la SEQ ID NO: 1, permite el mantenimiento de la población iniciadora de la leucemia Mac-2^{hi}/Gr1^{lo} a un nivel estable. D15, D33 y D183 indican los días desde el diagnóstico del SMD.

La Figura 9 muestra que la vacunación con ADN regula al alza MyD88, que está en la vía de señalización aguas abajo de los receptores de tipo Toll (TLRs), los receptores para los que el ADN es el ligando. Así, el aumento de la

expresión de MyD88 observado tras la vacunación de ADN indica que hay una activación transitoria de TLRs.

La Figura 10 representa mapas de los plásmidos VVACS.

La Figura 11 muestra el efecto de diferentes productos VVACS (VVACS 01 y VVACS 02 y VVACS 03) más ATRA en un modelo de ratón LMA.

- 5 La Figura 12 muestra que la vacunación de ADN con ADN VVCAS02 produce una respuesta de linfocitos T específica. El ensayo Elispot muestra un incremento en el IFNg.

La Figura 13 muestra que la vacunación de ADN con VVCAS02 mantiene estable la enfermedad.

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA

10

[0075]

La SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de un ácido nucleico de KanAS que comprende una secuencia complementaria a un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina.

- 15 La SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de un ácido nucleico de KanAS que comprende una secuencia complementaria a un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina y que además comprende una secuencia complementaria a un fragmento del plásmido pVAX.

La SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de un ácido nucleico PML-RAR α KanAS que comprende una secuencia que codifica el antígeno PML-RAR α y una secuencia complementaria a un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina.

20 La SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de un ácido nucleico PML-RAR α KanAS que comprende una secuencia que codifica el antígeno PML-RAR α , una secuencia complementaria a un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina, y una secuencia complementaria a un fragmento del plásmido pVAX.

La SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia que codifica el antígeno PML-RAR α .

- 25 La SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia de PML-RAR α AS.

La SEQ ID NO: 7 muestra un fragmento del plásmido pVax14.

La SEQ ID NO: 8 muestra un fragmento del plásmido pVax15.

La SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de un vector pVAX1 vacío.

Las SEQ ID Nos. 10-13 muestran los cebadores utilizados para la construcción del plásmido pVax14.

- 30 Las SEQ ID Nos. 14-15 muestran los cebadores utilizados para la construcción del plásmido pVax15.

La SEQ ID NO: 16 muestra la secuencia FrC.

La SEQ ID NO: 17 muestra la secuencia completa del plásmido pVax14. La región "Flipper" comprende la secuencia de KanAS de la SEQ ID NO: 2.

Las SEQ ID Nos. 18-23 muestran las secuencias de polipéptidos inmunógenos.

35

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Construcciones de ADN

- 40 **[0076]** Se utilizaron cinco construcciones de ADN:

- la construcción pCDNA₃PML-RAR α FrC (también denominado VVACS01), que se describe en el Ejemplo 1 b, de la página 18, línea 12, hasta la página 19, línea 2 del documento WO 03/090778.

- 45 - la construcción pCDNA₃PML-RAR α ASFrC (también denominado VVACS04), que se describe en el Ejemplo 1 b, página 19, líneas 4-15 del documento WO 03/090778.

- la construcción pVaxKanAS (también denominado pVax14 o VVACS02), que se generó por clonación de un ácido nucleico constituido por la secuencia de SEQ ID NO: 1 en el vector pVAX1.

- la construcción pVaxPML-RAR α KanAS (también denominado pVax15 o VVACS03), que se generó por clonación de la secuencia que codifica el antígeno tumoral PML-RAR α en pVax14.

- 50 - la construcción pVaxPML-RAR α FrC, que se generó por clonación de PML-RAR α FrC en el vector pVAX1.

[0077] pVax14 (pVaxKanAS o VVACS02) se construyó mediante la amplificación por PCR de pVAX1 con los siguientes pares de cebadores: un par de cebadores de las SEQ ID Nos. 10 y 11, y un par de cebadores de las SEQ ID Nos. 12 y 13. Como sitios de clonación se utilizaron *NotI* y *BamHI*.

55

[0078] pVax15 (pVaxPML-RAR α KanAS o VVACS03) se construyó mediante la amplificación de secuencias LeaderPML-RAR105bp de pCDNA₃PML-RARFrC usando los cebadores de las SEQ ID Nos. 14 y 15. El fragmento amplificado se clonó en pVax14 usando los sitios de clonación *HindIII* y *BamHI*.

[0079] pCDNA₃PML-RAR α FrC (VVACS01) y pVaxPML-RAR α KanAS (VVACS03) se transfectaron transitoriamente en células COS. Los experimentos de RQ-PCR demostraron que PML-RAR α se expresa con ambas construcciones.

5 Ejemplo 2: Kanas prolonga la esperanza de vida en un modelo de ratón LPA

[0080] Se estudió el efecto de diferentes construcciones de ADN en un modelo de ratón LPA utilizando el protocolo descrito en Padua et al. (2003, Nature Medicine 9: 1413-1417). En resumen, 10⁴ células LPA se inyectaron a ratones FVB/N. A continuación, se introdujo una pastilla de ATRA, que libera 5 mg/día de ATRA durante 21 días, detrás del cuello de los ratones con un trocar. Se inyectó ADN (2 x 50 microgramos de plásmido) el día después de la introducción de la pastilla de ATRA, y cada 20 días para un total de tres inyecciones. Se inyectaron las siguientes construcciones de ADN a los ratones:

- la construcción pVaxKanAS, también denominado pVax14;
- 15 - la construcción pCDNA₃PML-RAR α FrC (VVACS01);
- la construcción pVaxPML-RAR α FrC; y
- la construcción pCDNA₃PML-RAR α ASFrC (VVACS04).

[0081] Como placebo se usó una pastilla adquirida del fabricante de la pastilla de ATRA (Innovative Research, Sarasota, EE.UU.).

[0082] Se hizo un seguimiento de los ratones durante dos años y se construyeron curvas de Kaplan-Meier.

[0083] Los resultados se muestran en Figura 2 y en la Tabla 1 a continuación. Se aplicaron los ensayos log-rank (Mantel-Cox) y de Wilcoxon general a las curvas de Kaplan-Meier. Los dos ensayos estadísticos condujeron a idénticas conclusiones en términos de importancia.

Tabla 1

	log-rank (Mantel-Cox)			Wilcoxon general		
	Valor Chi-2	valor de p		Valor Chi-2	valor de p	
ATRA vs. ATRA + pCDNA ₃ PML-RAR α ASFrC	8,7257E+00	3,1375E-03	p < 0,005	7,1234E+00	7,6086E-03	p < 0,01
ATRA vs. ATRA + pCDNA ₃ PML-RAR α FrC	1,7729E+01	2,5473E-05	p < 0,0001	1,0263E+01	1,3571E-03	p < 0,005
ATRA vs. ATRA + pVaxPML-RAR α FrC	5,0145E+00	2,5136E-02	p < 0,05	5,1840E+00	2,2796E-02	p < 0,05
ATRA vs. ATRA + pVaxKanAS	6,5927E+00	1,0240E-02	p < 0,05	2,3055E+00	1,2892E-01	n.s.
ATRA vs. placebo	6,0018E+01	9,3994E-15	p < 0,0001	5,1827E+01	6,0611 E-13	p < 0,0001
ATRA vs. placebo+ADN	8,7059E+00	3,1718E-03	p < 0,005	1,6318E+01	5,3547E-05	p < 0,0001
ATRA + pCDNA ₃ PML-RAR α ASFrC vs. ATRA + pCDNA ₃ PML-RAR α FrC	2,9314E-02	8,6406E-01	n.s.	7,4390E-03	9,3127E-01	n.s.
ATRA + pCDNA ₃ PML-RAR α ASFrC vs. ATRA + pVaxPML-RAR α FrC	2,3666E+00	1,2395E-01	n.s.	1,0271E+00	3,1085E-01	n.s.
ATRA + pCDNA ₃ PML-RAR α ASFrC vs. ATRA + pVaxKanAS	6,0339E-05	9,9380E-01	n.s.	8,7577E-02	7,6728E-01	n.s.
ATRA + pCDNA ₃ PML-RAR α ASFrC vs. placebo	3,1948E+01	1,5838E-08	p < 0,0001	2,4578E+01	7,1365E-07	p < 0,0001
ATRA + pCDNA ₃ PML-RAR α ASFrC vs. placebo+ADN	1,3354E+01	2,5792E-04	p < 0,0005	1,3575E+01	2,2917E-04	p < 0,0005
ATRA + pCDNA ₃ PML-	3,8212E+00	5,0608E-	n.s.	1,0797E+00	2,9876E-01	n.s.

RARαFrC vs. ATRA + pVaxPML-RARαFrC		02					
ATRA + pCDNA ₃ PML-RARαFrC vs. ATRA + pVaxKanAS	1,3756E-02	9,0663E-01	n.s.	2,5419E-01	6,1414E-01	n.s.	
ATRA + pCDNA ₃ PML-RARαFrC vs. placebo	7,3553E+01	9,7951E-18	p < 0,0001	6,4450E+01	9,9035E-16	p < 0,0001	
ATRA + pCDNA ₃ PML-RARαFrC vs. placebo+ADN	2,9433E+01	5,7887E-08	p < 0,0001	3,0640E+01	3,1065E-08	p < 0,0001	
ATRA + pVaxPML-RARαFrC vs. ATRA + pVaxKanAS	2,2960E+00	1,2971E-01	n.s.	5,2380E-01	4,6923E-01	n.s.	
ATRA + pVaxPML-RARαFrC vs. placebo	2,6830E+01	2,2214E-07	p < 0,0001	2,1359E+01	3,8082E-06	p < 0,0001	
ATRA + pVaxPML-RARαFrC vs. placebo+ADN	1,0216E+01	1,3921E-03	p < 0,005	1,0704E+01	1,0688E-03	p < 0,005	
ATRA + pVaxKanAS vs. placebo	1,7202E+01	3,3607E-05	p < 0,0001	1,2455E+01	4,1695E-04	p < 0,0005	
ATRA + pVaxKanAS vs. placebo+AND	7,8950E+00	4,9572E-03	p < 0,005	6,2853E+00	1,2174E-02	p < 0,05	
placebo vs. placebo+ADN	4,0649E+00	4,3783E-02	p < 0,05	4,1371 E+00	4,1953E-02	p < 0,05	

[0084] Así, la construcción pVaxKanAS, administrada en combinación con ATRA, tiene un efecto protector en el modelo de ratón LPA. Aproximadamente el 40 % de los ratones fueron rescatados de la muerte. Este efecto protector es comparable con el efecto protector de la construcción pCDNA₃PML-RARαFrC. Por otra parte, el efecto protector de la construcción pVaxKanAS es significativamente diferente del ATRA solo (p = <0,05 para ATRA vs. ATRA + pVaxKanAS).

[0085] Se llevó a cabo un experimento separado para estudiar el efecto de la construcción de PML-RARαKanAS (también denominado pVax15). El protocolo fue el mismo que el anterior, excepto por el hecho de que las células LPA usadas para este experimento se habían sometido a más pasos y más agresivos, y que el seguimiento de los ratones fue de nueve meses.

[0086] Los resultados se muestran en la Figura 3 y en la Tabla 2 a continuación.

15

Tabla 2

	log-rank (Mantel-Cox)	
	Valor Chi-2	valor de p
ATRA vs. ATRA + pCDNA ₃ PML-RARαFrC	9,883	0,0017
ATRA vs. ATRA + pVAXKanASFrC	11,080	0,0009
ATRA + pCDNA ₃ PML-RARαFrC vs. ATRA + pVAXKanAS	0,004	0,9482

[0087] La construcción PML-RARαKanAS también tiene un efecto protector en comparación con el ATRA solo (p = 0,0009). La construcción PML-RARαKanAS es al menos tan eficaz como la construcción pCDNA₃PML-RARαFrC.

Ejemplo 3: Kanas y PMLRARαASFrC prolongan la esperanza de vida en un modelo de ratón SMD

[0088] Se utilizó el modelo de ratón SMD descrito en Omidvar et al. (2007, Cancer Res 67: 11657-67) para estudiar el efecto de KanAS en SMD. Este modelo de ratón se basa en el uso de ratones portadores de NRAS mutante con BCL-2, a los que se hace un seguimiento hasta que presentan un recuento plaquetario reducido indicativo de trombocitopenia y muerte inminente.

[0089] El protocolo de vacunación era el siguiente: se administraron 2 x 50 microgramos de ADN el día después del diagnóstico (día 0), que correspondía a la fecha en la que el recuento de plaquetas en sangre periférica cayó por debajo de lo normal (<10⁵/microlitro). El día 20 y el día 40, se volvieron a inyectar 2 x 50 microgramos de ADN.

30

[0090] Se llevó a cabo un primer experimento con seis ratones tratados con pVaxKanAS (VVACS02). Como se muestra en Figura 4, KanAS solo prolonga la esperanza de vida de los ratones en comparación con el grupo no tratado ($p = 0,003$).

5

[0091] Se llevó a cabo un segundo experimento con diez ratones tratados con pVaxKanAS y dieciséis ratones tratados con pCDNA₃PML-RAR α FrC (VVACS04). Este experimento, cuyos resultados se muestran en Figura 5, confirmó los resultados obtenidos en el marco del experimento anterior.

10 **[0092]** Se llevó a cabo un tercer experimento con el fin de estudiar el efecto de la administración combinada de ATRA y pCDNA₃PMLRARASFrC o VVACS04 (Figura 6). Los ratones se dividieron en cuatro grupos:

- ratones tratados con pCDNA₃PMLRARASFrC;
- ratones tratados con ATRA;

15 - ratones tratados con ATRA y pCDNA₃PMLRARASFrC; y
 - ratones no tratados.

[0093] Se hizo un seguimiento de los ratones hasta el inicio de la enfermedad, cuando los recuentos de plaquetas cayeron por debajo de 10^5 /microlitro. Los ratones se trataron con pastillas que liberan 10 mg de ATRA durante 21 días (Innovative Research, Sarasota, EE.UU.). Al día siguiente, los ratones se trataron con 2x50 microgramos de ADN, y a continuación a intervalos de 20 días en dos ocasiones, dando un total de 300 microgramos por ratón.

20 **[0094]** En conclusión, las construcciones de ADN que comprenden KanAS son muy eficientes en la vacunación con ADN, ya sea solas o combinadas con un inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales. Dichas construcciones KanAS se pueden utilizar como vacunas de ADN, por ejemplo, para proteger de recaída o progresión de la enfermedad a pacientes con LPA y SMD.

Ejemplo 4: Recaída de la enfermedad en un modelo de ratón SMD

30

[0095] Los ratones transgénicos portadores de NRAS mutante con BCL-2 nunca se podrán curar, y necesariamente recaerán y morirán. Por lo tanto, se llevaron a cabo experimentos con el fin de determinar cuánto tiempo puede durar la inmunidad inducida tras la administración de construcciones de ADN que comprende KanAS. Con este fin, se analizaron el perfil de CD4⁺ CD44^{hi} CD62L^{lo} (Figura 7) y el perfil Mac-2^{hi}/Gr1^{lo} (Figura 8) de ratones SMD tratados con pVaxKanAS (pVax14, VVACS02). La recaída de la enfermedad se sigue por un incremento en la población Mac1^{hi}/Gr1^{lo}, que es un marcador de progenitores de células pluripotenciales leucémicas enfermas.

35 **[0096]** Se hizo un seguimiento de los ratones para la progresión de la enfermedad midiendo los recuentos sanguíneos. Cuando las plaquetas cayeron por debajo de 10^5 /microlitro, los ratones fueron reclutados para el ensayo y se vacunaron con 2 x 50 microgramos de ADN pVax14 (pVaxKanAS). A intervalos de 20 días, se repitieron las inyecciones con ADN. Así, la última inyección se realizó el día 40.

40 **[0097]** Después de la tercera ronda de inyecciones, se hizo un seguimiento de los ratones para la progresión de la enfermedad. Más específicamente, se estudió el estado de Mac1/Gr1 por citometría de flujo (Figura 8) y la presencia de linfocitos T de memoria marcada por CD44^{hi} y CD62L^{lo} (Figura 7). Parece que la recaída de la enfermedad se produjo en torno al día 150.

45 **[0098]** Se comprobó que los ratones SMD tratados con pVaxKanAS solo tenían unas 3 veces más linfocitos T de memoria en comparación con los ratones FVB/N de tipo silvestre. Además, la población de células que inician la leucemia se redujo tras el tratamiento con pVaxKanAS (el 25 % aproximadamente en ratones no tratados frente al 10 % aproximadamente en los ratones tratados). Estos resultados confirman que las construcciones de ADN que comprenden KanAS son eficientes para el tratamiento de pacientes con cáncer.

Ejemplo 5: Efecto de construcciones de ADN que comprenden KanAS en un modelo de ratón LMA

55

[0099] Se evaluó el efecto de diferentes construcciones, que comprenden o no un ácido nucleico de KanAS, en un modelo de ratón de LMA.

[0100] Las construcciones se muestran en la Figura 10. Las construcciones que se denominan VVACS02 y

VVACS04 comprenden un ácido nucleico de KanAS de acuerdo con la invención en la región "Flipper". Más específicamente, VVACS02 es el vector denominado pVax14 anteriormente. La secuencia de este vector se muestra como SEQ ID NO: 17.

5 **[0101]** Las Figuras 2 y 11 muestran que la combinación de ATRA y de construcciones de ADN que comprende KanAS prolonga la esperanza de vida de los ratones.

[0102] Se usó el ensayo Elispot (Furugaki et al., Blood 2010; 115: 653-6) para determinar si la vacunación de ADN con ADN VVACS02 (pVax14 o pVaxKanAS) produce una respuesta de linfocitos T específica. Los resultados se muestran en la Figura 12.

[0103] Como se muestra en Figura 13, la vacunación de ADN con VVACS02 (pVax14 o pVaxKanAS) produce una estabilización de la enfermedad.

15 **[0104]** El hecho de que la vacunación de ADN con VVACS02 (pVax14 o pVaxKanAS) produzca una estabilización de la enfermedad se estudió adicionalmente cuantificando ERK con el uso de un Instrumento Firefly™ (Cell Biosciences), como se describe en Fan et al. (Nat Med. 2009; 15:566-71). Los resultados se muestran en las Tablas 3 y 4 a continuación.

20 Tabla 3: Cuantificación de ERK ½ en el bazo

Línea Celular/Tratamiento	Número de identificación	% ppERK1	% pERK1	% ERK1	% ppERK2	% pERK2	% ERK2
FVBN	9140	16,32	74,29	939	NO	9,09	90,91
RAS	6951	21,47	64,33	14,20	NO	17,42	82,58
	6953	20,94	60,66	18,40	NO	17,65	82,35
BCL2	7565	13,47	66,33	20,20	NO	15,98	84,02
	7810	10,33	77,02	12,65	NO	13,81	86,19
MMTV/TBCL2/NRAS	7240	14,38	69,06	16,56	NO	20,25	79,75
	8111	22,21	65,37	12,41	NO	24,76	75,24

Tabla 4: Cuantificación de ERK ½ en el bazo

Tratamiento	Número de identificación	% ppERK1	% pERK1	% ERK1	% ppERK2	% pERK2	% ERK2
Vacuna de ADN	9275	2,6	68,5	28,9	NO	13,5	90,91
	9282	2,7	73,8	23,5	NO	15,6	82,58
	9400	1,3	77,2	21,5	NO	18,0	82,35
	9451	4,2	74,3	21,5	NO	10,3	84,02

25 **[0105]** Se caracterizó el mecanismo de acción de VVACS02 (pVax14 o pVaxKanAS).

[0106] En primer lugar, se evaluaron los linfocitos T de memoria en ratones control FVN y en 4 ratones SMD-LMA en diferentes días después del tratamiento con VVACS02 y ATRA. Se observó un aumento en la población de linfocitos T de memoria CD4 + CD44^{hi} CD62L^{lo} después de la segunda vacunación con ADN (datos no mostrados). Además, los linfocitos T de memoria se mantuvieron a niveles elevados aproximadamente 4-5 meses después de la última inyección de ADN (datos no mostrados).

35 **[0107]** En segundo lugar, se evaluó la expresión de MyD88 (un gen aguas abajo de los TLRs) en (i) ratones FVBN control, (ii) dos ratones SMD-LMA tratados con VVACS02 y ATRA el día 113 o el día 142, y (iii) un ratón SMD-LMA tratado con otro medicamento. En el ratón tratado con VVACS02 el día 113, se observó un aumento de la expresión de MyD88 y una activación de los TLRs (datos no mostrados). Además, había una expresión basal unos 3,5 meses después de la última inyección de ADN. Este efecto no se observó para los otros ratones. Este resultado sugiere que los receptores de tipo Toll desempeñan un papel en el efecto beneficioso de VVACS02.

40 **[0108]** En resumen, los datos experimentales presentados en el Ejemplo 5 demuestran que VVACS02 da lugar a una estabilización de la enfermedad en el modelo SMD. También da lugar a respuestas inmunitarias apropiadas. Estos resultados sugieren que el mecanismo por el cual actúa VVACS02 es como adyuvante de ADN

que involucra a los receptores de tipo Toll, como se muestra mediante la medición de la molécula MYD88 aguas abajo, cuya expresión se regula al alza, en contraste con los tratamientos sin adyuvante de ADN tales como ATRA solo.

5 Ejemplo 6: Efecto de la combinación de una construcción de ADN que comprende KanAS, ATRA y 5-azacitidina en un modelo de ratón SMD

[0109] Se utilizó el modelo de ratón SMD descrito en Omidvar et al. (2007, Cancer Res 67: 11657-67) para estudiar el efecto de la combinación de KanAS, ATRA y 5-azacitidina sobre la SMD.

[0110] 100 microlitros de una solución de 1 mg/ml de 5-azacitidina se inyectó IP a ratones el día del diagnóstico y a continuación los lunes, miércoles y viernes hasta la muerte de los ratones.

[0111] El ATRA se administró a través de una pastilla de liberación de 10 mg durante 21 días.

[0112] El protocolo de vacunación era el siguiente: 100 microgramos de ADN (VVACS02 o pVax14 o pVaxKanAS) se administraron el día después del diagnóstico (día 0), que correspondía a la fecha en la que el recuento de plaquetas de sangre periférica cayó por debajo de lo normal (<10⁵/microlitro). El día 20 y el día 40, se volvieron a inyectar 2 x 50 microgramos de ADN.

[0113] Los ratones se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos después de doce inyecciones de 5-azacitidina:

- 5-azacitidina (n = 5)
- 5-azacitidina + ATRA (n = 4)
- 5-azacitidina + VVACS02 ADN (n = 4)
- 5-azacitidina + ADN ATRA + VVACS02 (n = 4)

[0114] Los resultados se muestran en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5

Tratamiento	Días vivos de tratamiento
5-azacitidina	
1	33
2	Vivo a 24/03/10 (112 días)
3	72
4	Vivo a 24/03/10 (75 días)
5	37
5-azacitidina + ATRA	
1	Vivo a 24/03/10 (112 días)
2	Vivo a 24/03/10 (75 días)
3	59
4	41
5-azacitidina + VVACS02 ADN	
1	100
2	73
3	48
4	Vivo a 24/03/10 (42 días)
5-azacitidina + ATRA + VVACS02DNA	
1	Vivo a 24/03/10 (112 días)
2	Vivo a 24/03/10 (103 días)
3	Vivo a 24/03/10 (75 días)
4	Vivo a 24/03/10 (75 días)

[0115] Por tanto, la combinación de KanAS, ATRA y 5-azacitidina prolonga la esperanza de vida en un modelo de ratón SMD.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0116]

- 5 <110> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
 UNIVERSITE PARIS DIDEROT - PARIS 7
 <120> KANAMYCIN ANTISENSE NUCLEIC ACID FOR THE TREATMENT OF CANCER
 <130> BET 10P0394
 <150> EP 09290224.6
- 10 <151> 2009-03-27
 <160> 23
 <170> PatentIn version 3.4
 <210> 1
 <211> 473
- 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> construcción de KanAS
 <220>
- 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(473)
 <223> Secuencia complementaria a un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina
 <400> 1
agatcatcct gatcgacaag accggcttcc atccgagtac gtgctcgctc gatgcatgt 60
ttcgcttggt ggtcgaatgg gcaggtagcc ggatcaagcg tatgcagccg ccgcattgca 120
tcagccatga tggatacttt ctccggcagga gcaaggtgag atgacaggag atcctgcccc 180
ggcacttgcg ccaatagcag ccagtcctt cccgcttcag tgacaacgtc gagcacagct 240
gcgcaaggaa cgcccgtcgt ggccagccac gatagccgcg ctgcctcgtc ttgcagttca 300
ttcagggcac cggacaggtc ggtcttgaca aaaagaaccg ggcgcccctg cgctgacagc 360
cggaacacgg cggcatcaga gcagccgatt gtctgttggt cccagtcata gccgaatagc 420
ctctccaccc aagcggccgg agaacctgcg tgcaatccat cttgttcaat cat 473
- 25 <210> 2
 <211> 573
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 30 <220>
 <223> construcción de KanAS
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(473)
- 35 <223> Secuencia complementaria a un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (474)..(573)
- 40 <223> Secuencia complementaria a un fragmento del plásmido pVax
 <400> 2

```

agatcatcct gatcgacaag accgggttcc atccgagtac gtgctcgctc gatgcatgt      60
ttcgcttggg ggtcgaatgg gcaggtagcc ggatcaagcg tatgcagccg ccgcattgca      120
tcagccatga tggatacttt ctccggcagga gcaaggtgag atgacaggag atcctgcccc      180
ggcacttcgc ccaatagcag ccagtcctt cccgcttcag tgacaacgtc gagcacagct      240
gcgcaaggaa cgcccgtcgt ggcagccac gatagccgcg ctgcctcgtc ttgcagttca      300
ttcagggcac cggacaggtc ggtcttgaca aaaagaaccg ggcgcccctg cgctgacagc      360
cggaacacgg cggcatcaga gcagccgatt gtctgttgtg cccagtcata gccgaatagc      420
ctctccaccc aagcggccgg agaacctgcg tgcaatccat cttgttcaat catgcgaaac      480
gatcctcatc ctgtctcttg atcagagctt gatcccctgc gccatcanat ccttggcggc      540
aagaaagcca tccantttac tttgcagggg ctt                                     573
<210> 3
<211> 584
<212> ADN
5 <213> Artificial
<220>
<223> construcción de PML-RARalphaKanAS
<220>
<221> misc_feature
10 <222> (1)..(105)
<223> PML-RARalpha
<220>
<221> misc_feature
<222> (112)..(584)
15 <223> Secuencia complementaria a un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la
kanamicina
<400> 3
gaggtcttcc tgcccaacag caaccacgtg gccagtgggc cgggggaggc agccattgag      60
accagagca gcagttctga agagatagtg cccagccctc cctcgggatc cagatcatcc      120
tgatcgacaa gaccggcttc catccgagta cgtgctcgct cgatgcgatg tttcgcttgg      180
tggtcgaatg ggcaggtagc cggatcaagc gtatgcagcc gccgcattgc atcagccatg      240
atggatactt tctcggcagg agcaaggtga gatgacagga gatcctgccc cggcacttcg      300
ccaatagca gccagtcctt tcccgttca gtgacaacgt cgagcacagc tgcgcaagga      360
acgcccgtcg tggccagcca cgatagccgc getgcctcgt cttgcagttc attcagggca      420
ccggacaggt cggctctgac aaaaagaacc ggcgcccctt gcgctgacag ccggaacacg      480
gcggcatcag agcagccgat tgtctgttgt gccagtcat agccgaatag cctctccacc      540
20 caagcggccg gagaacctgc gtgcaatcca tcttgttcaa tcat                                     584
<210> 4
<211> 684
<212> ADN
<213> Artificial
25 <220>
<223> construcción de PML-RARalphaKanAS

```

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(105)
 <223> PML-RARalpha
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (112)..(584)
 <223> Secuencia complementaria a un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (585)..(684)
 <223> Secuencia complementaria a un fragmento del plásmido pVax
 <400> 4
gaggtcttcc tgcccaacag caaccacgtg gccagtggcg ccggggaggc agccattgag 60
accagagca gcagttctga agagatagtg cccagccctc cctcgggatc cagatcatcc 120
tgatcgacaa gaccggcttc catccgagta cgtgctogct cgatgcgatg tttegttgg 180
tggtcgaatg ggcaggtagc cggatcaagc gtatgcagcc gccgcattgc atcagccatg 240
atggatactt tctcggcagg agcaaggtga gatgacagga gatcctgcc cggcacttcg 300
cccaatagca gccagtccct tcccgttca gtgacaacgt cgagcacagc tgggcaagga 360
acgcccgtcg tggccagcca cgatagccgc gctgcctcgt cttgcagttc attcagggca 420
ccggacaggt cggctctgac aaaaagaacc gggcgccctc gcgctgacag ccggaacacg 480
gcggcatcag agcagccgat tgtctgttgt gcccagtcac agccgaatag cctctccacc 540
caagcggccg gagaacctgc gtgcaatcca tcttgttcaa tcatgcgaaa cgatcctcat 600
cctgtctctt gatcagagct tgatccctg cgccatcana tccttggcgg caagaaagcc 660
atccanttta ctttgcaggg nctt 684
 15 <210> 5
 <211> 105
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> PML-RARalpha
 <400> 5
gaggtcttcc tgcccaacag caaccacgtg gccagtggcg ccggggaggc agccattgag 60
accagagca gcagttctga agagatagtg cccagccctc cctcg 105
 <210> 6
 25 <211> 105
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> PML-RARalphaAS
 30 <400> 6
cgagggaggg ctgggcaeta tctcttcaga actgctgctc tgggtctcaa tggctgcctc 60
cccggcgcca ctggccacgt ggttgctgtt gggcaggaag acctc 105

<210> 7
 <211> 627
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Fragmento de pVax14
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 10 <223> n e s a , c , g , o t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(36)
 <223> Sitio de restricción HindIII
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (49)..(54)
 <223> Sitio de restricción BamHI
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (55)..(527)
 <223> KanAS
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (528)..(627)
 <223> pVaxAS
 <400> 7

gagacccaag nctggctagc gtttaaactt aagcttggta ccgagctcgg atccagatca 60
tcctgatcga caagaccggc ttccatccga gtacgtgctc gctcgatggg atgtttcgct 120
tggtggtcga atgggcaggt agccggatca agcgtatgca gccgccgat tgcattcagg 180
atgatggata ctttctcggc aggagcaagg tgagatgaca ggagatcctg ccccggcact 240
tggcccaata gcagccagtc ccttcccgtc tcagtgacaa cgtcgagcac agctgcgcaa 300
ggaacgcccg tcgtggccag ccacgatagc cgcgctgcct cgtcttgag ttcattcagg 360

gcaccggaca ggtcggctct gacaaaaaga accggggcgc cctgcgctga cagccggaac 420
acggcggcat cagagcagcc gattgtctgt tgtgccagc catagccgaa tagcctctcc 480
acccaagcgg ccggagaacc tgcgtgcaat ccattctggt caatcatgcg aaacgatcct 540
catcctgtct cttgatcaga gcttgatccc ctgcgccatc anaccttgg cggcaagaaa 600

gccatccant ttactttgca gggncctt 627
 <210> 8
 30 <211> 770
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragmento de pVax15
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(8)
 <223> n e s a , c , g , o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(23)
 <223> n e s a , c , g , o t
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(29)
 <223> Sitio de restricción HindIII
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (30)..(86)
 <223> Leader sequence
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (87)..(191)
 <223> PML-RARalpha
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (192)..(197)
 20 <223> Sitio de restricción BamHI
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (198)..(670)
 <223> KanAS
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (671)..(770)
 <223> pVaxAS
 <400> 8
nnnnnnntg nnnnnnnnnn nnaagctta tggactggac ctggagggtc ttctgcttgc 60
tggctgtggc cccggggggc cactccgagg tcttcctgcc caacagcaac cacgtggcca 120

gtggcgccgg ggaggcagcc attgagacc agagcagcag ttctgaagag atagtgccca 180
gccctccctc gggatccaga tcatcctgat cgacaagacc ggcttccatc cgagtacgtg 240
ctcgctcgat gcgatgtttc gcttgggtgg cgaatgggca ggtagccgga tcaagcgtat 300
gcagccgccc cattgcatca gccatgatgg atactttctc ggcaggagca aggtgagatg 360
acaggagatc ctgccccggc acttcgccc aatagcagcca gtcccttccc gcttcagtga 420
caacgtcgag cacagctgcg caaggaacgc ccgtcgtggc cagccacgat agccgcgctg 480
cctcgtcttg cagttcattc agggcaccgg acaggtcggc cttgacaaaa agaaccgggc 540
gccctcgcgc tgacagccgg aacacggcgg catcagagca gccgattgtc tgttgtgccc 600
agtcatagcc gaatagcctc tccacccaag cggccggaga acctgcgtgc aatccatctt 660
gttcaatcat gcgaaacgat cctcatcctg tctcttgatc agagcttgat ccctcgcgcc 720
 30 **atcanatcct tggcggcaag aaagccatcc antttacttt gcaggnctt 770**
 <210> 9
 <211> 2999
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>

<223> Vector pVax1
 <220>
 <221> promotor
 <222> (137)..(724)
 5 <223> promotor de CMV
 <220>
 <221> promotor
 <222> (664)..(683)
 <223> promotor T7/Sitio de cebado
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (696)..(811)
 <223> Sitio de clonación múltiple
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (1226)..(2020)
 <223> secuencia de codificación para la proteína de resistencia a la kanamicina
 <220>
 <221> rep_origin
 20 <222> (2320)..(2993)
 <223> origen pUC
 <400> 9
gactcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta 60
atagtaatca attacggggg cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata 120
acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat 180
aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga 240

ctatttacgg	taaactgccc	acttggcagt	acatcaagtg	tatcatatgc	caagtacgcc	300
ccctattgac	gtcaatgacg	gtaaattggcc	cgcttgccat	tatgccagct	acatgacctt	360
atgggacttt	cctacttggc	agtacatcta	cgtattagtc	atcgctatta	ccatggtgat	420
gcggttttgg	cagtacatca	atgggcgtgg	atagcggttt	gactcacggg	gatttccaag	480
tctccacccc	attgacgtca	atgggagttt	gttttggcac	caaaatcaac	gggactttcc	540
aaaatgtcgt	aacaactccg	ccccattgac	gcaaatgggc	ggtaggcgtg	tacggtggga	600
ggtctatata	agcagagctc	tctggctaac	tagagaaccc	actgcttact	ggcttatcga	660
aattaatacg	actcactata	gggagaccca	agctggctag	cgtttaaact	taagcttggg	720
accgagctcg	gatccactag	tccagtgtgg	tggaattctg	cagatatcca	gcacagtggc	780
ggccgctcga	gtctagaggg	cccgtttaa	cccgtgatc	agcctcgact	gtgccttcta	840
gttgccagcc	atctgttgtt	tgcccctccc	ccgtgccttc	cttgaccctg	gaaggtgcc	900
ctcccactgt	cctttcctaa	taaaatgagg	aaattgcatc	gcattgtctg	agtaggtgtc	960
attctattct	ggggggtggg	gtggggcagg	acagcaaggg	ggaggattgg	gaagacaata	1020
gcaggcatgc	tggggatgcg	gtgggctcta	tggctctac	tgggcggttt	tatggacagc	1080
aagcgaaccg	gaattgccag	ctggggcgcc	ctctgctaag	gttgggaagc	cctgcaaagt	1140
aaactggatg	gctttctcgc	cgccaaggat	ctgatggcgc	aggggatcaa	gctctgatca	1200
agagacagga	tgaggatcgt	ttcgcatgat	tgaacaagat	ggattgcacg	caggttctcc	1260
ggccgcttgg	gtggagaggc	tattcggcta	tgactgggca	caacagacaa	tcggctgctc	1320
tgatgccgcc	gtgttccggc	tgtcagcgca	ggggcgcccg	gttctttttg	tcaagaccga	1380
cctgtccggt	gccctgaatg	aactgcaaga	cgaggcagcg	cgctatcgt	ggctggccac	1440
gacgggcggt	ccttgcgcag	ctgtgctcga	cgttgctact	gaagcgggaa	gggactggct	1500
gctattgggc	gaagtgcccg	ggcaggatct	cctgtcatct	caccttgctc	ctgccagaaa	1560
agtatccatc	atggctgatg	caatgcggcg	gctgcatacg	cttgatccgg	ctacctgccc	1620
attcgaccac	caagcgaaac	atcgcatcga	gcgagcacgt	actcggatgg	aagccggtct	1680
tgtcgatcag	gatgatctgg	acgaagagca	tcaggggctc	gcccagcccg	aactgttcgc	1740
caggctcaag	gcgagcatgc	ccgacggcga	ggatctcgtc	gtgacccatg	gcgatgcctg	1800
cttgccgaat	atcatggtgg	aaaatggccg	ctttctgga	ttcatcgact	gtggccggct	1860
gggtgtggcg	gaccgctatc	aggacatagc	gttggetacc	cgtgatattg	ctgaagagct	1920
tggcggcgaa	tgggctgacc	gcttcctcgt	gctttacggg	atcgccgctc	ccgattcgca	1980
gcgcatcgcc	ttctatcgcc	ttcttgacga	gttctctga	attattaacg	cttacaattt	2040
cctgatgcgg	tattttctcc	ttacgcatct	gtgcggtatt	tcacaccgca	tacaggtggc	2100
acttttcggg	gaaatgtgcg	cggaaccctt	atgtgttat	ttttctaaat	acattcaaat	2160

atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatagca cgtgctaaaa 2220
cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatocctt ttgataatct catgacccaa 2280
atoccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 2340
tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 2400
ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 2460
ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 2520
cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatacct gttaccagtg 2580
gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 2640
gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 2700
acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc 2760
gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 2820
agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 2880
tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 2940
agcaacgcgg cctttttacg gttcctgggc ttttgctggc cttttgctca catgttett 2999

<210> 10

<211> 31

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 10

acgtctctc cgcgccgct cgagtctaga g 31

10 <210> 11

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> cebador

<400> 11

acgtctctc cggatccgag ctcggtacca ag 32

<210> 12

<211> 35

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 12

25 acgtctctc ctccatggac tggacctgga gggtc 35

<210> 13

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> cebador

<400> 13

acgtctctc ccgcttagtc gttgtccaa cc 32

<210> 14

<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
5 <223> cebador
<400> 14
cgaagcttat ggactggacc tggagggtct 30
<210> 15
<211> 28
10 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 15
15 cgggatcccg agggagggt gggcacta 28
<210> 16
<211> 1360
<212> ADN
<213> Clostridium tetani
20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1360)
<223> secuencia FrC
<400> 16

ES 2 548 987 T3

```

atgaaaaacc ttgattgttg ggtcgacaac gaagaagaca tcgatgttat cctgaaaaag      60
tctaccattc tgaacttggg catcaacaac gatattatct cggacatctc tggtttcaac      120
tcctctgtta tcacatatcc agatgctcaa ttggtgccgg gcatcaacgg caaagctatc      180
cacctgggta acaacgaatc ttctgaagtt atcgtgcaca aggccatgga catcgaatac      240
aacgacatgt tcaacaactt caccgtagc ttctggctgc gcgttccgaa agtttctgct      300
tcccacctgg aacagtacgg cactaacgag tactccatca tcagctctat gaagaaacac      360
tcctctgcca tcggctctgg ttggtctggt tccctgaagg gtaacaacct gatctggact      420
ctgaaagact ccgcgggcga agttcgtcag atcactttcc gcgacctgcc ggacaagttc      480
aacgcgtacc tggctaacaa atgggttttc atcactatca ctaacgatcg tctgtcttct      540

gctaacctgt acatcaacgg cgttctgatg ggctccgctg aaatcactgg tctgggcgct      600
atccgtgagg acaacaacat cactcttaag ctgaaccgtg gcaacaaca caaccactac      660
gtatccatcg acaagttccg tatcttctgc aaagcactga acccgaaaga gatcgaaaaa      720
ctgtatacca gctacctgtc tatcaccttc ctgctgact tctggggtaa cccgctgcgt      780
tacgacaccg aatattacct gatcccggtg gcttctagct ctaaagacgt tcagctgaaa      840
aacatcactg actacatgta cctgaccac gcgcgctcct aactaacgg taaactgaac      900
atctactacc gacgtctgta caacggcctg aaaatcatca tcaaacgcta cactccgaac      960
aacgaaatcg attctttcgt taaatctggt gacttcatca aactgtacgt ttcttacaac     1020
aacaacgaac acatcgttgg ttaccggaaa gacggtaacg tctttcaaca acctggacag     1080
aattctgcgt gttggttaca acgctccggg tatcccgctg tacaaaaaaa gggaaagctgt     1140
taaactgcgt gacctgaaaa cctactctgt tcagctgaaa ctgtacgacg acaaaaacgc     1200
ttctctgggt ctggttggtg cccacaacgg tcagatcggg aacgacctga accgtgacat     1260
cctgatcgtc tctaactggt acttcaacca cctgaaagac aaaatcctgg gttgcgactg     1320
gtacttcggt ccgaccgatg aaggttggac caacgactag                               1360

```

<210> 17

<211> 3540

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> pVax14

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (762)..(1587)

<223> Región Flipper, que comprende una secuencia complementaria a un fragmento de la secuencia de codificación para la proteína de resistencia a la kanamicina

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (1816)..(2610)

ES 2 548 987 T3

<223> Secuencia de codificación para la proteína de resistencia a la kanamicina

<400> 17

tgctggcctt	ttgctcacat	gttcttgctg	cttcgcgatg	tacgggccag	atatacgcgt	60
tgacattgat	tattgactag	ttattaatag	taatcaatta	cggggtcatt	agttcatagc	120
ccatatatgg	agttccgctg	tacataactt	acggtaaata	gcccgcctgg	ctgaccgccc	180
aacgaccccc	gcccattgac	gtcaataatg	acgtatgttc	ccatagtaac	gccaataggg	240
actttccatt	gacgtcaatg	ggtggagtat	ttacggtaaa	ctgcccactt	ggcagtacat	300
caagtgtatc	atatgccaag	tacgccccct	attgacgtca	atgacggtaa	atggccccgc	360
tggcattatg	cccagtacat	gacottatgg	gactttccta	cttggcagta	catctacgta	420

ttagtcatcg ctattacat ggtgatgagg ttttggcagt acatcaatgg gcgaggatag 480
 cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccccattg acgtcaatgg gagtttgttt 540
 tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgttaaca actccgcccc attgacgcaa 600
 atgggaggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctctctg gctaactaga 660
 gaacccactg cttactggct tatcgaaatt aatacgactc actatagggg gaccaagct 720
 ggctagcgtt taaacttaag cttggtaccg agctcggatc cagatcatcc tgatcgacaa 780
 gaccggcttc catccgagta cgtgctcgtc cgatgcgatg tttcgttggg tggcgaatg 840
 ggcaggtagc cggatcaagc gtatgcagcc gccgcattgc atcagccatg atggatactt 900
 tctcggcagg agcaaggtga gatgacagga gatcctgccc cggcacttcg cccaatagca 960
 gccagtcctt tcccgttca gtgacaacgt cgagcacagc tgcgcaagga acgcccgtcg 1020
 tggccagcca cgatagccgc gctgcctcgt cttgcagttc attcagggca cgggacaggt 1080
 cggctctgac aaaaagaacc gggcgcccct gcgctgacag ccggaacacg gcggcatcag 1140
 agcagccgat tgtctgttgt gccagtcat agccgaatag cctctccacc caagcggccg 1200
 gagaacctgc gtgcaatcca tcttgttcaa tcatgcgaaa cgatcctcat cctgtctctt 1260
 gatcagagct tgatcccctg cgccatcaga tccttggcgg cgagaaagcc atccagtta 1320
 ctttgcaggg cttcccacc ttaccagagg ggcccccagc tggcaattcc ggttcgcttg 1380
 ctgtccataa aaccgcccag tagaagccat agagcccacc gcatcccag catgcctgct 1440
 attgtcttcc caatcctccc ccttgcctgc ctgccccacc ccacccccca gaatagaatg 1500
 acacctactc agacaatgag atgcaatttc ctcatcttat taggaaagga cagtgggagt 1560
 ggcaccttcc aggggtcaagg aaggcacggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc 1620
 tggggatgag gtgggctcta tggcttctac tgggcggttt tatggacagc aagcgaaccg 1680
 gaattgccag ctggggcgcc ctctggtaag gttgggaagc cctgcaaagt aaactggatg 1740
 gctttcttgc cgccaaggat ctgatggcgc aggggatcaa gctctgatca agagacagga 1800
 tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttg 1860
 gtggagaggc tattcggcta tgactgggca caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc 1920
 gtgttccggc tgcagcgca ggggcgcccg gttctttttg tcaagaccga cctgtccgg 1980
 gccctgaatg aactgcaaga cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt 2040
 ccttgcgag ctgtgctcga cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc 2100
 gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct caccttctc ctgccgagaa agtatccatc 2160
 atggctgatg caatcggcg gctgcatacg cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac 2220
 caagcgaac atcgcacga gcgagcacgt actcggatgg aagccggtct tgcgatcag 2280
 gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag 2340

gcgagcatgc ccgacggcga ggatctcgtc gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat 2400
 atcatgggtg aaaatggccg cttttctgga ttcacgcact gtggccggct ggggtgtggcg 2460
 gaccgctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa 2520
 tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggg atcgccgctc ccgattcgca gcgcatcgcc 2580
 ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga attattaacg cttacaattt cctgatgcgg 2640
 tattttctcc ttacgcactc gtgcggtatt tcacaccgca tacaggtggc acttttcggg 2700
 gaaatgtgcg cggaaccctc atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc 2760
 tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatagca cgtgctaaaa cttcattttt 2820
 aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaa atccctaac 2880
 gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag 2940
 atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg 3000
 tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca 3060
 gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga 3120
 actctgtagc accgcctaca tacctcgtc tgctaatoct gttaccagtg gctgctgcca 3180
 gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc 3240
 agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca 3300
 ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa 3360
 aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc 3420
 cagggggaaa cgctgggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc 3480
 gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg aaaaacgcca gcaacgcggc 3540

<210> 18
 <211> 35
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido inmunógeno
 <400> 18

Met Arg Cys Phe Ala Trp Trp Ser Asn Gly Gln Val Ala Gly Ser Ser
1 5 10 15

Val Cys Ser Arg Arg Ile Ala Ser Ala Met Met Asp Thr Phe Ser Ala
20 25 30

Gly Ala Arg
35

10 <210> 19
 <211> 35
 <212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido inmunógeno
 <400> 19

Met Phe Arg Leu Val Val Glu Trp Ala Gly Ser Arg Ile Lys Arg Met
 1 5 10 15

Gln Pro Pro His Cys Ile Ser His Asp Gly Tyr Phe Leu Gly Arg Ser
 20 25 30

Lys Val Arg
 35

5 <210> 20
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Polipéptido inmunógeno
 <400> 20

Met Thr Gly Asp Pro Ala Pro Ala Leu Arg Pro Ile Ala Ala Ser Pro
 1 5 10 15

Phe Pro Leu Gln
 20

<210> 21
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido inmunógeno
 20 <400> 21

Met Arg Asn Asp Pro His Pro Val Ser
 1 5

<210> 22
 <211> 59
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido inmunógeno
 <400> 22

Met Pro Ala Ile Val Phe Pro Ile Leu Pro Leu Ala Val Leu Pro His
 1 5 10 15

Pro Thr Pro Gln Asn Arg Met Thr Pro Thr Gln Thr Met Arg Cys Asn
 20 25 30

Phe Leu Ile Leu Leu Gly Lys Asp Ser Gly Ser Gly Thr Phe Gln Gly
 35 40 45

Gln Gly Arg His Gly Gly Gly Leu Gly Arg Gln
 50 55

<210> 23
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido inmunógeno
 <400> 23

Met Gln Phe Pro His Phe Ile Arg Lys Gly Gln Trp Glu Trp His Leu
 1 5 10 15

Pro Gly Ser Arg Lys Ala Arg Gly Arg Ile Gly Lys Thr Ile Ala Gly
 20 25 30

Met Leu Gly Met Arg Trp Ala Leu Trp Leu Leu Leu Gly Gly Phe Met
 35 40 45

Asp Ser Lys Arg Thr Gly Ile Ala Ser Trp Gly Ala Leu Trp
 50 55 60

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado para su uso en terapia, en el que dicho ácido nucleico aislado comprende una secuencia antisentido complementaria a un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina, fragmento que es de al menos 50 nucleótidos de longitud y en el que dicho ácido nucleico aislado es capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero.
2. Un ácido nucleico aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha secuencia antisentido está constituida por una secuencia seleccionada del grupo constituido por:
 - (a) una secuencia complementaria a un fragmento de la SEQ ID NO: 9, en el que dicho fragmento comprende al menos 50 nucleótidos consecutivos de los nucleótidos situados entre la posición 1226 y la posición 2020 de la SEQ ID NO: 9;
 - (b) la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2;
 - (c) una secuencia al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y
 - (d) un fragmento de al menos 50 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
3. El ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho ácido nucleico además comprende una secuencia que codifica un polipéptido inmunógeno.
4. El ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho polipéptido inmunógeno es un antígeno tumoral.
5. El ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha secuencia que codifica un antígeno tumoral es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de PML-RAR α de la SEQ ID NO: 5.
6. El ácido nucleico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que dicho ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo constituido por:
 - a) la secuencia SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4;
 - b) una secuencia al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; y
 - c) un fragmento de al menos 50 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.
7. El ácido nucleico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el tratamiento y/o prevención del cáncer, tumores benignos o enfermedades infecciosas.
8. El ácido nucleico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso simultáneo o secuencial en combinación con un inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales en el tratamiento y/o la prevención del cáncer.
9. El ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que dicho cáncer es un cáncer de colon, un cáncer de mama o un cáncer de la sangre seleccionado del grupo constituido por leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielocítica aguda (LMA), leucemia mielomonocítica (LMMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma de Hodgkin (LH), linfoma no Hodgkin (LNH) y mieloma múltiple (MM).
10. El ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que dicho cáncer es un tumor sólido seleccionado del grupo constituido por un carcinoma, un adenocarcinoma, un sarcoma, un melanoma, un mesotelioma y un blastoma.
11. Una composición farmacéutica que comprende:
 - (i) un ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un vector que comprende dicho ácido nucleico;
 - (ii) un vehículo fisiológicamente aceptable; y, opcionalmente,
 - (iii) un inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales.
12. Una combinación de:

(i) una primera composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un vector que comprende dicho ácido nucleico en un vehículo fisiológicamente aceptable; y
(ii) una segunda composición farmacéutica que comprende un inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales en un vehículo fisiológicamente aceptable.

13. Un vector para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 7 a 10, dicho vector que comprende el ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

10 14. Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende:

(i) un ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un vector que comprende dicho ácido nucleico;

15 (ii) un vehículo fisiológicamente aceptable; y, opcionalmente,
(iii) un inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales.

15. Una combinación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, dicha combinación que comprende:

20 (i) una primera composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un vector que comprende dicho ácido nucleico en un vehículo fisiológicamente aceptable; y
(ii) una segunda composición farmacéutica que comprende un inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales en un vehículo fisiológicamente aceptable.

25 16. El ácido nucleico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, o la combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho inductor no inmunosupresor de la apoptosis de células tumorales es un compuesto retinoide o un compuesto relacionado con arsénico.

30 17. El ácido nucleico, la composición farmacéutica, o la combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho compuesto retinoide es ATRA.

35 18. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia antisentido complementaria a un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina, cuyo fragmento es de al menos 100 y como máximo de 450 nucleótidos de longitud, en el que la secuencia antisentido codifica al menos un polipéptido inmunógeno seleccionado del grupo constituido por un polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 18 y un polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 19.

40 19. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia antisentido complementaria a un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína de resistencia a la kanamicina, cuyo fragmento es de al menos 100 nucleótidos de longitud, en el que dicha secuencia antisentido codifica al menos un polipéptido inmunógeno seleccionado del grupo constituido por un polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 18 y un polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 19 y constituido por una secuencia seleccionada del grupo constituido por:

45 (a) una secuencia complementaria a un fragmento de la SEQ ID NO: 9, en el que dicho fragmento comprende al menos 100 nucleótidos consecutivos de los nucleótidos situados entre la posición 1226 y la posición 2020 de la SEQ ID NO: 9;

(b) la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2;

50 (c) una secuencia al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 o al menos un 85 % idéntica a la SEQ ID NO: 2; y

(d) un fragmento de al menos 100 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

20. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 18 o 19, en el que dicho ácido nucleico además comprende una secuencia que codifica un polipéptido inmunógeno, dicho polipéptido inmunógeno que es un antígeno tumoral.

55

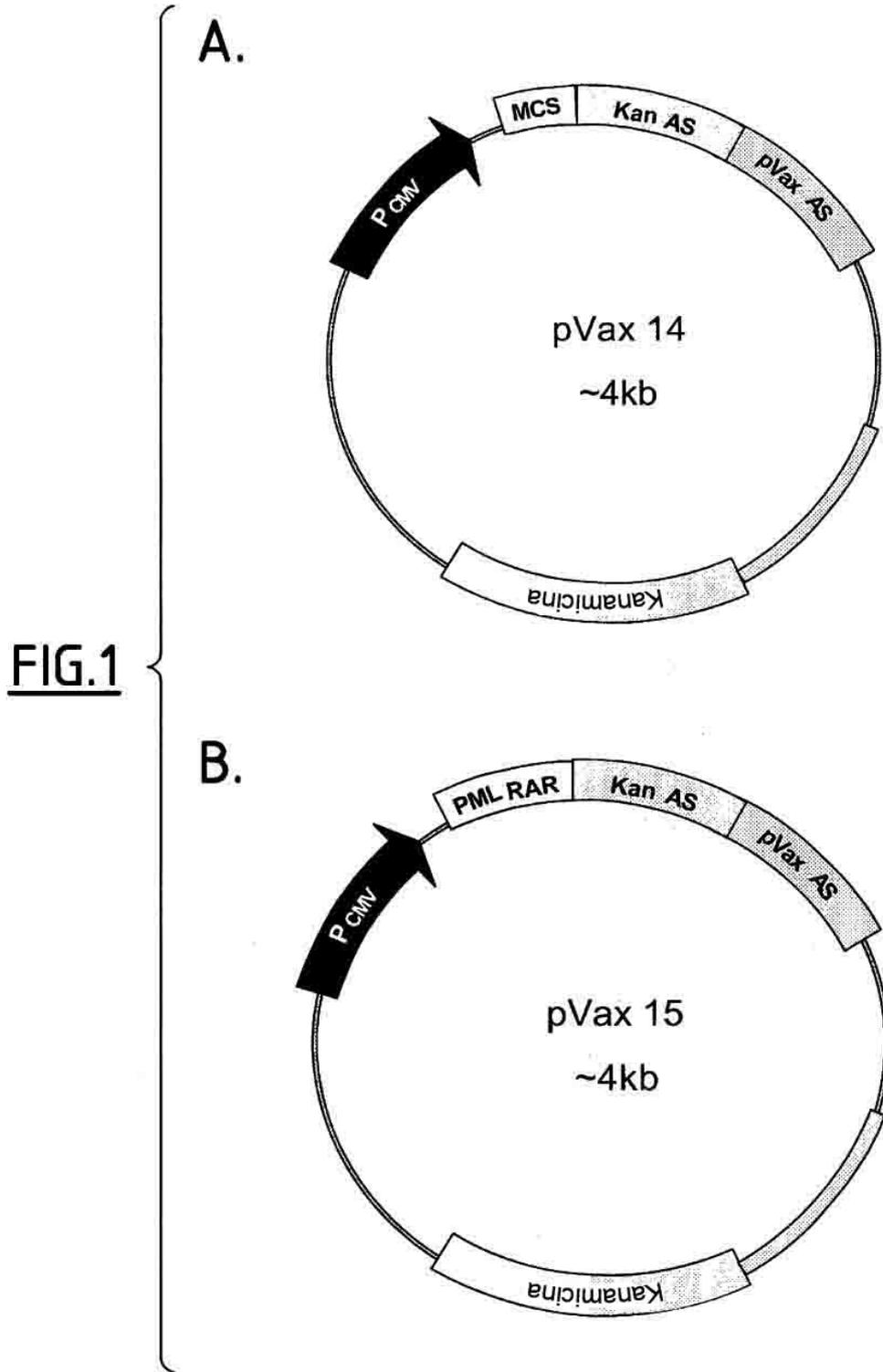
21. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dicha secuencia que codifica un antígeno tumoral es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de PML-RAR α de la SEQ ID NO: 5.

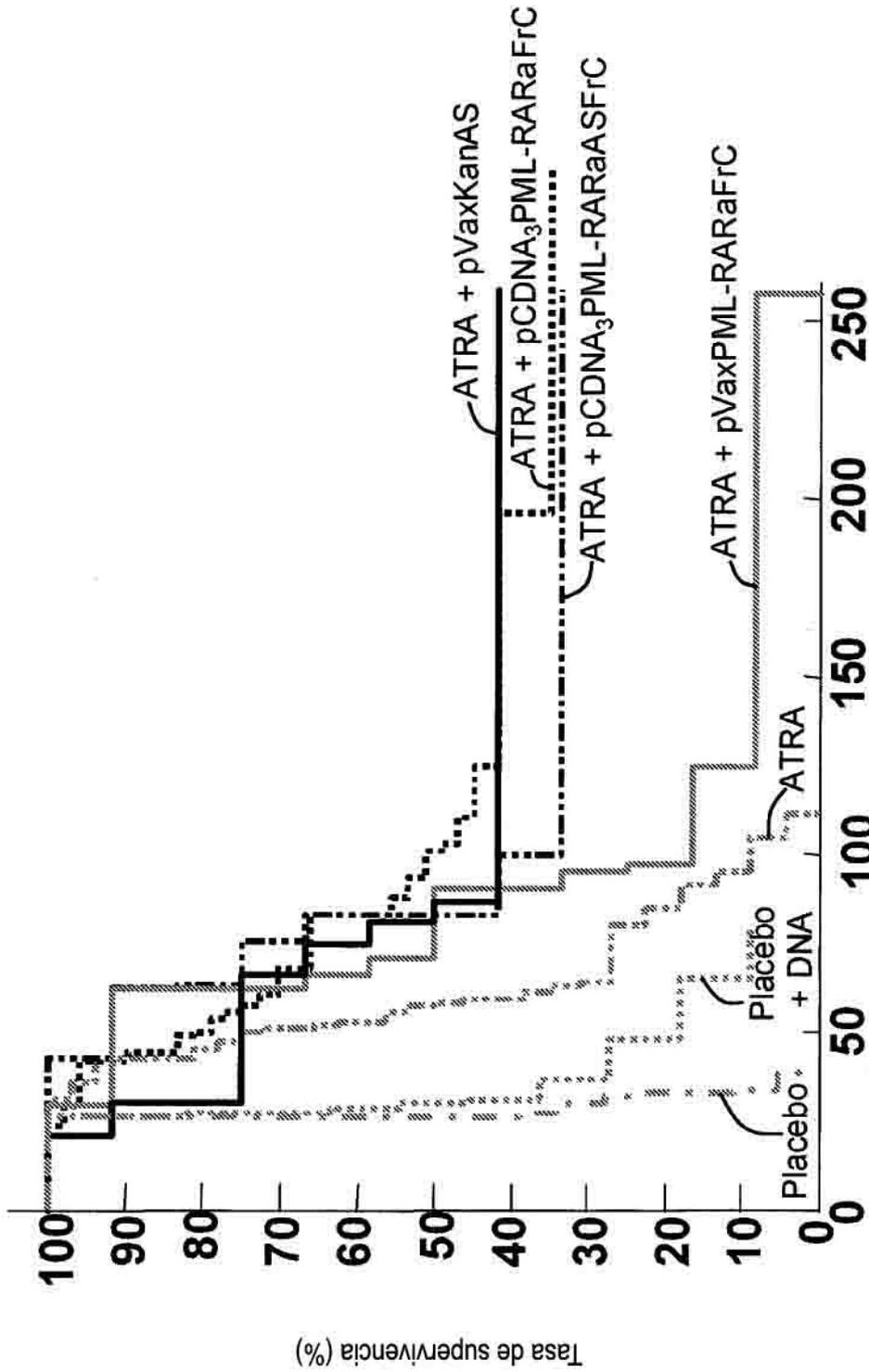
22. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 20 o 21, en el que dicho ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo constituido por:

- (a) la secuencia SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4;
- 5 (b) una secuencia al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4; y
- (c) un fragmento de al menos 100 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

23. Un vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22.

10





Días desde la inyección de LPA

FIG.2

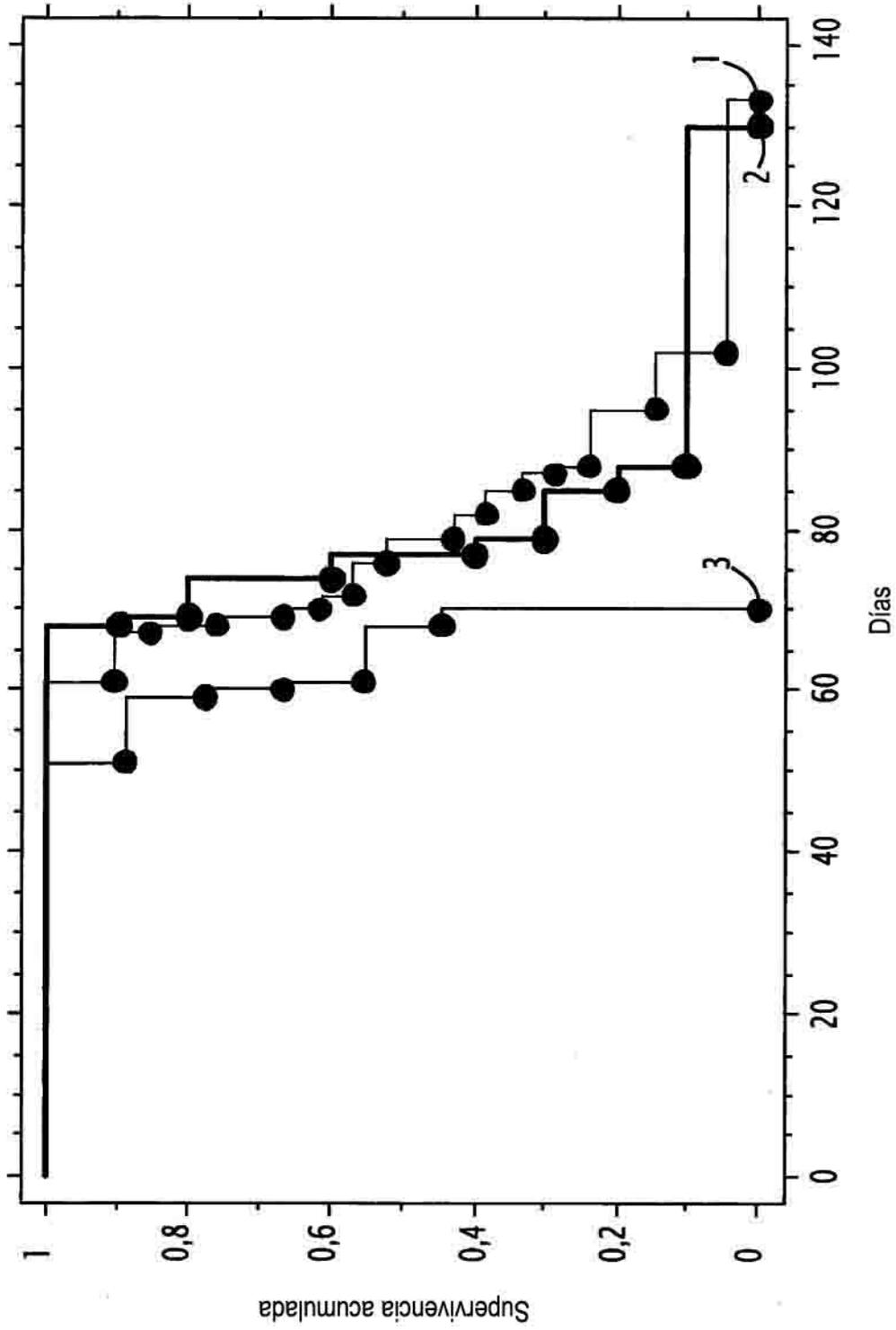
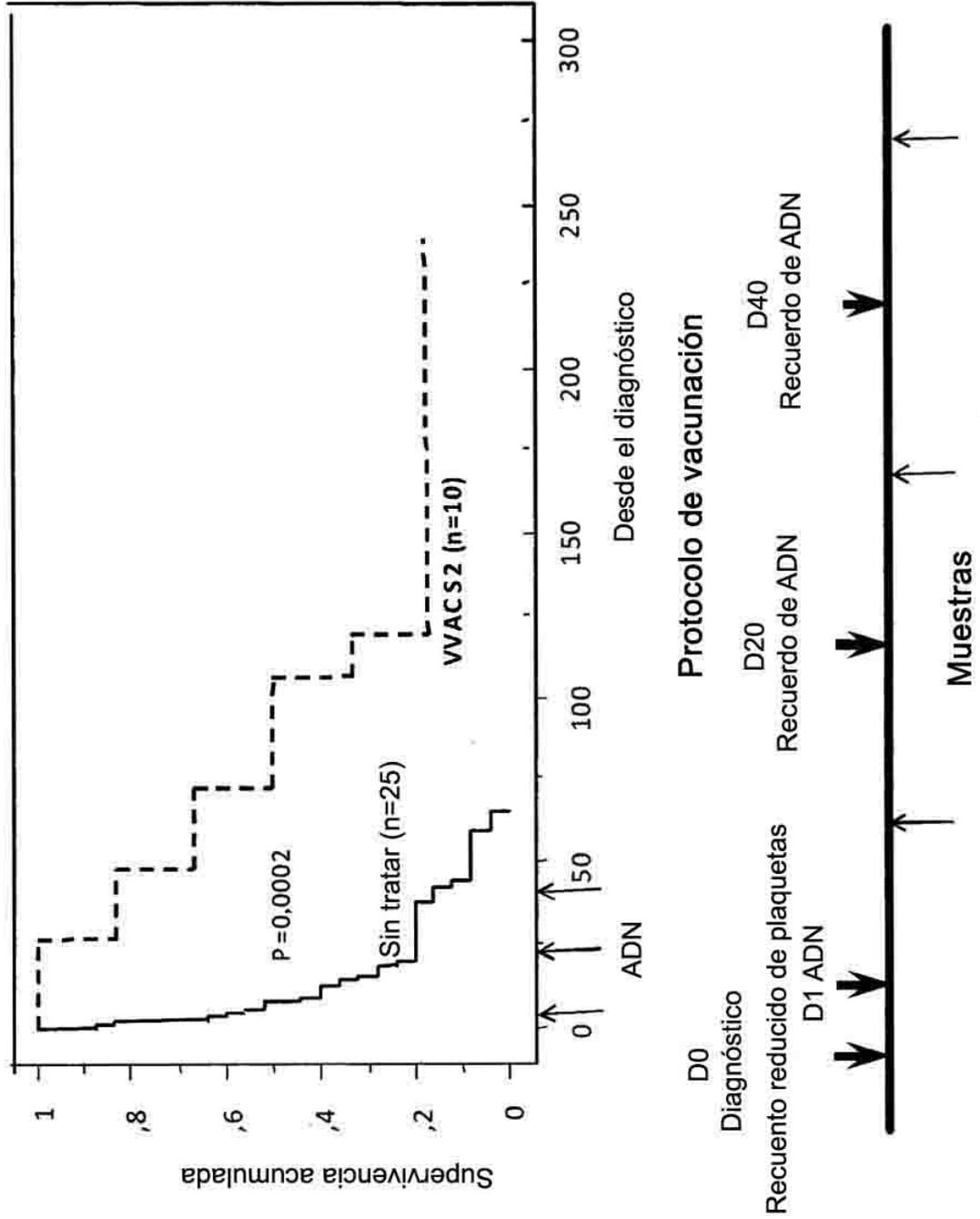


FIG.3



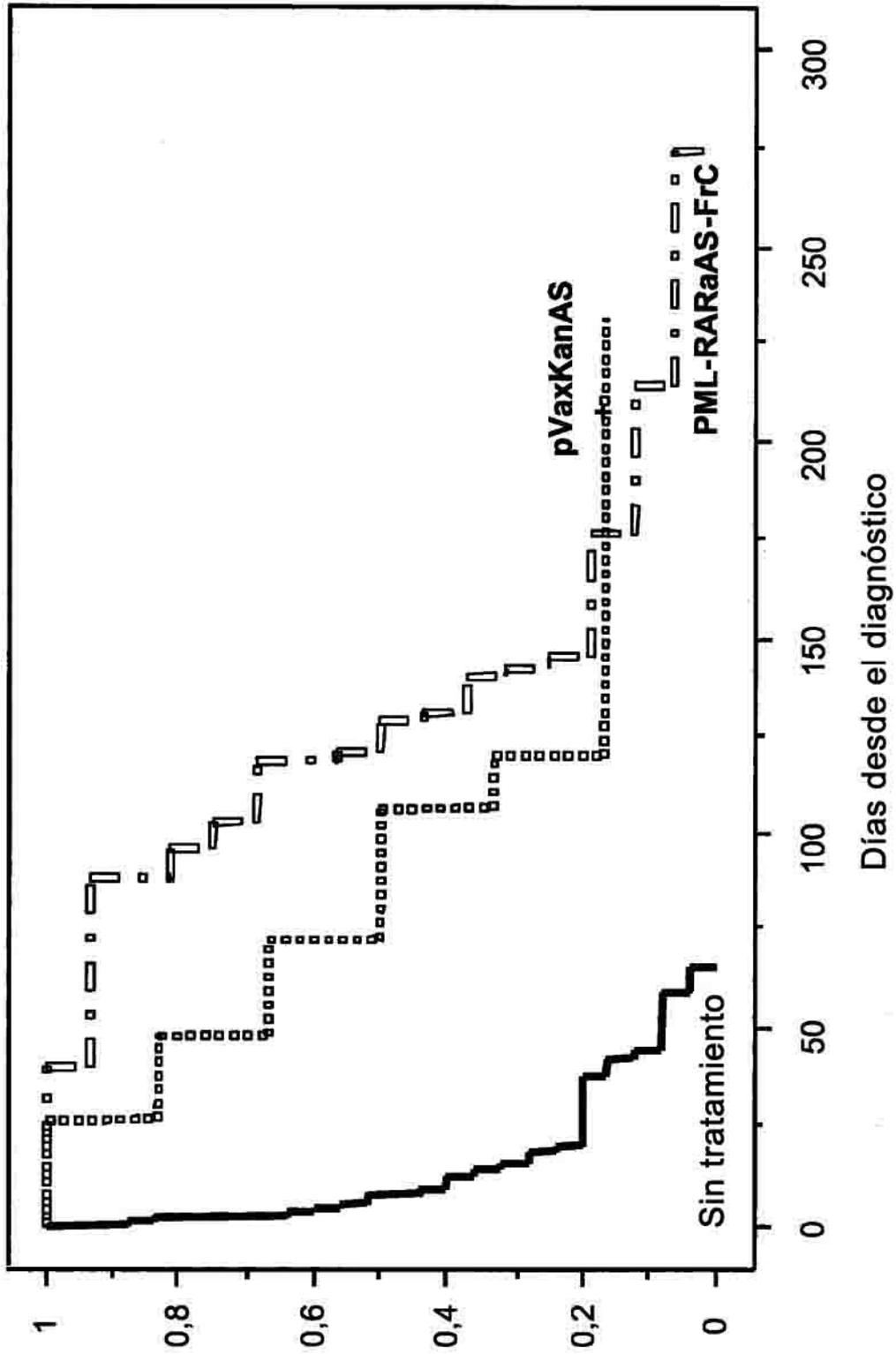


FIG.5

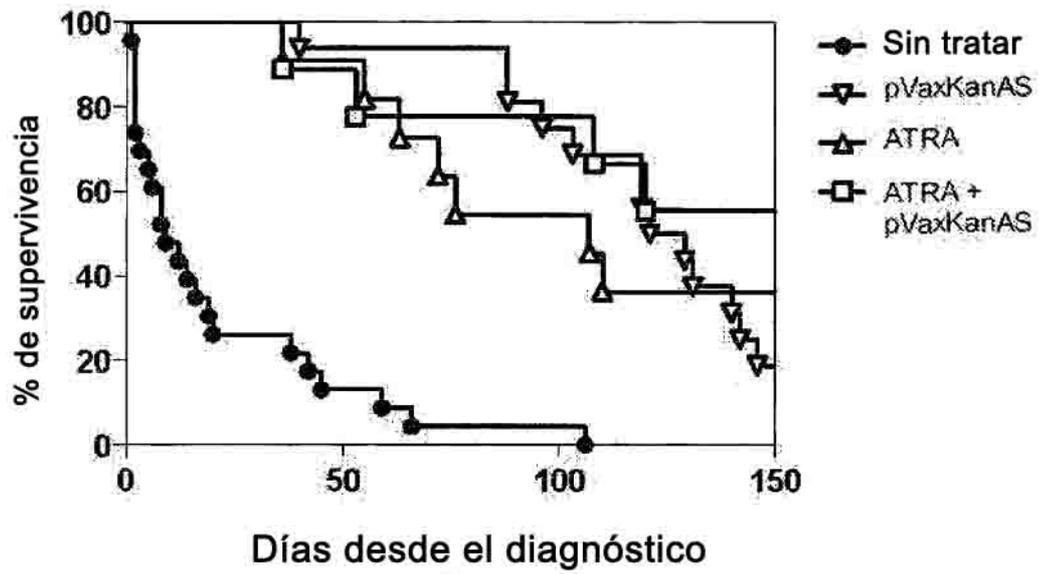


FIG.6

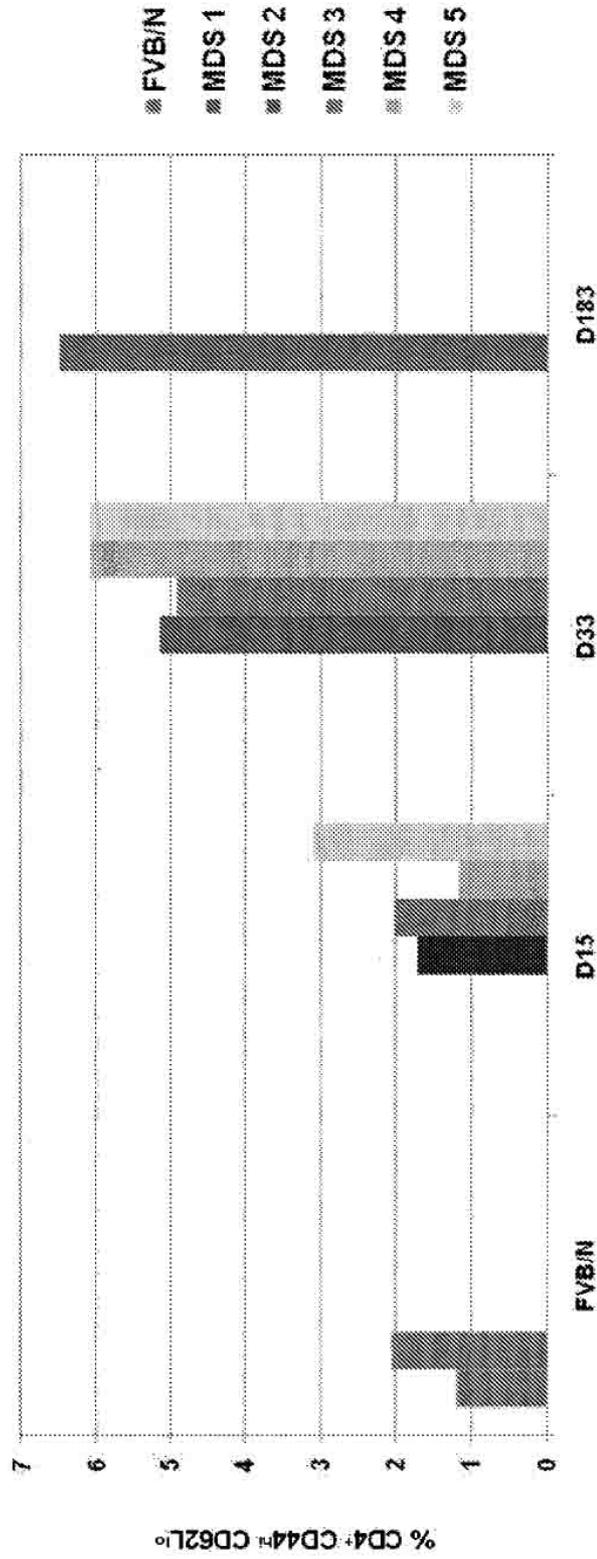


FIG.7

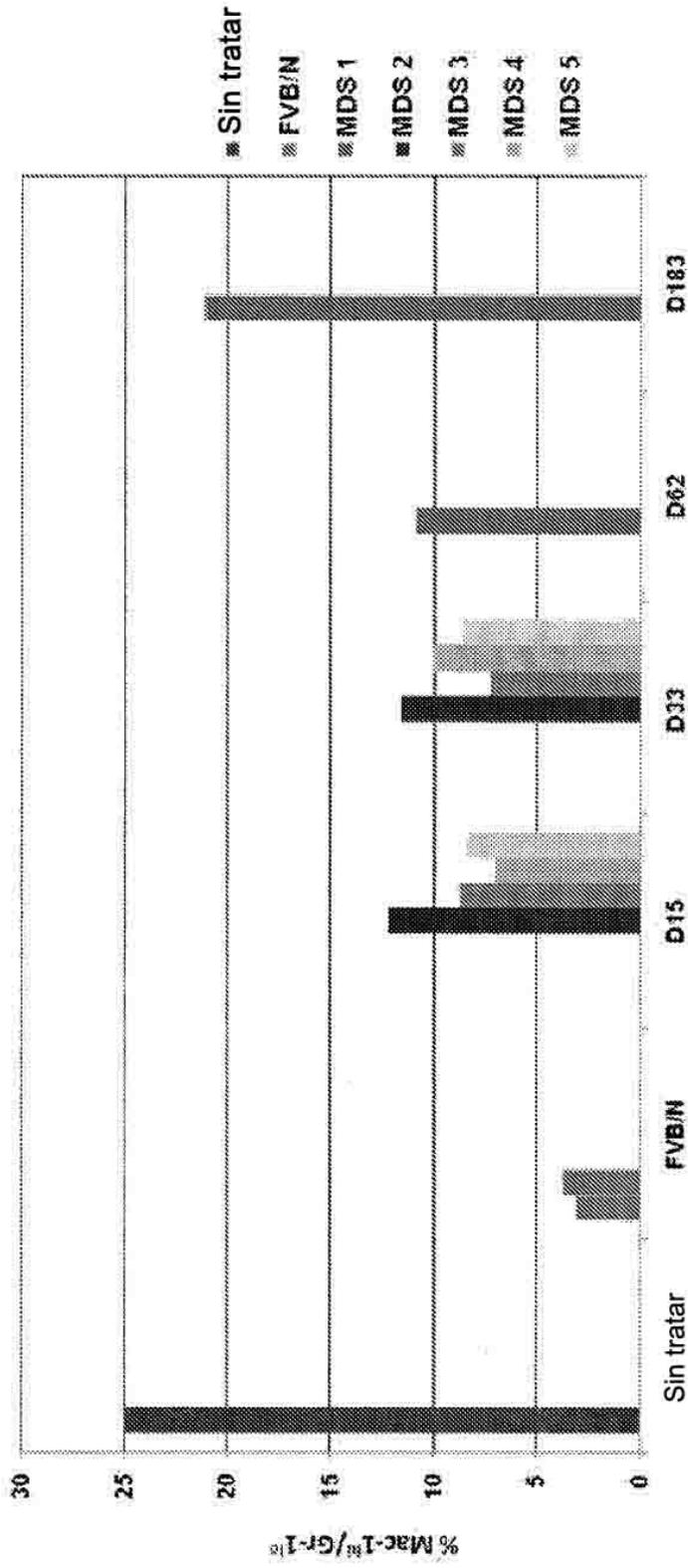


FIG.8

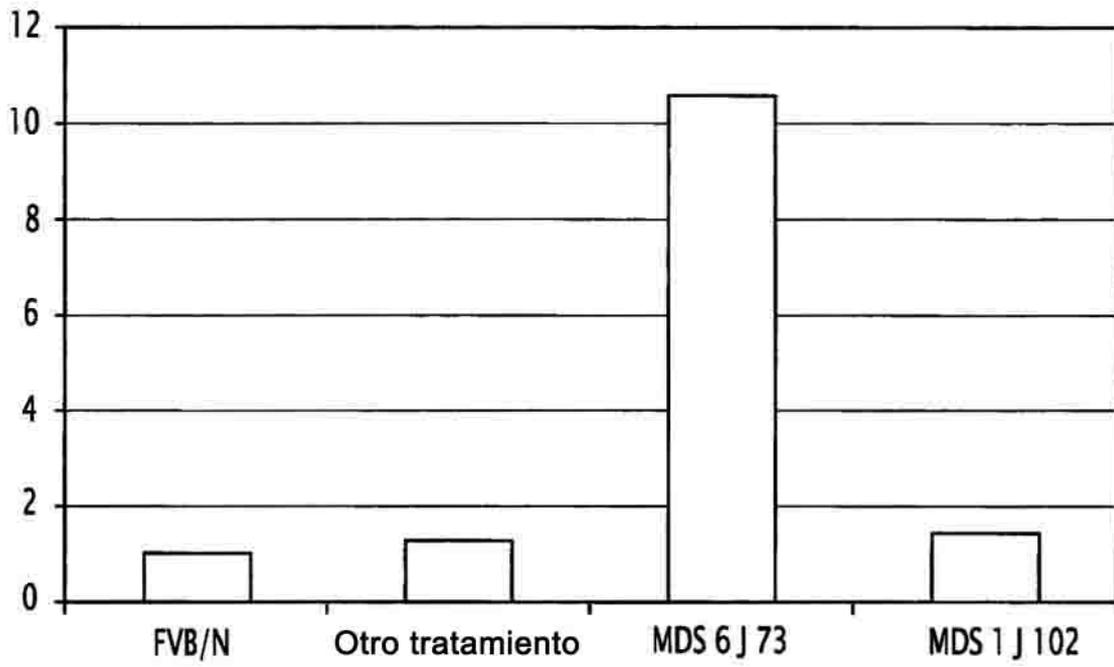


FIG.9

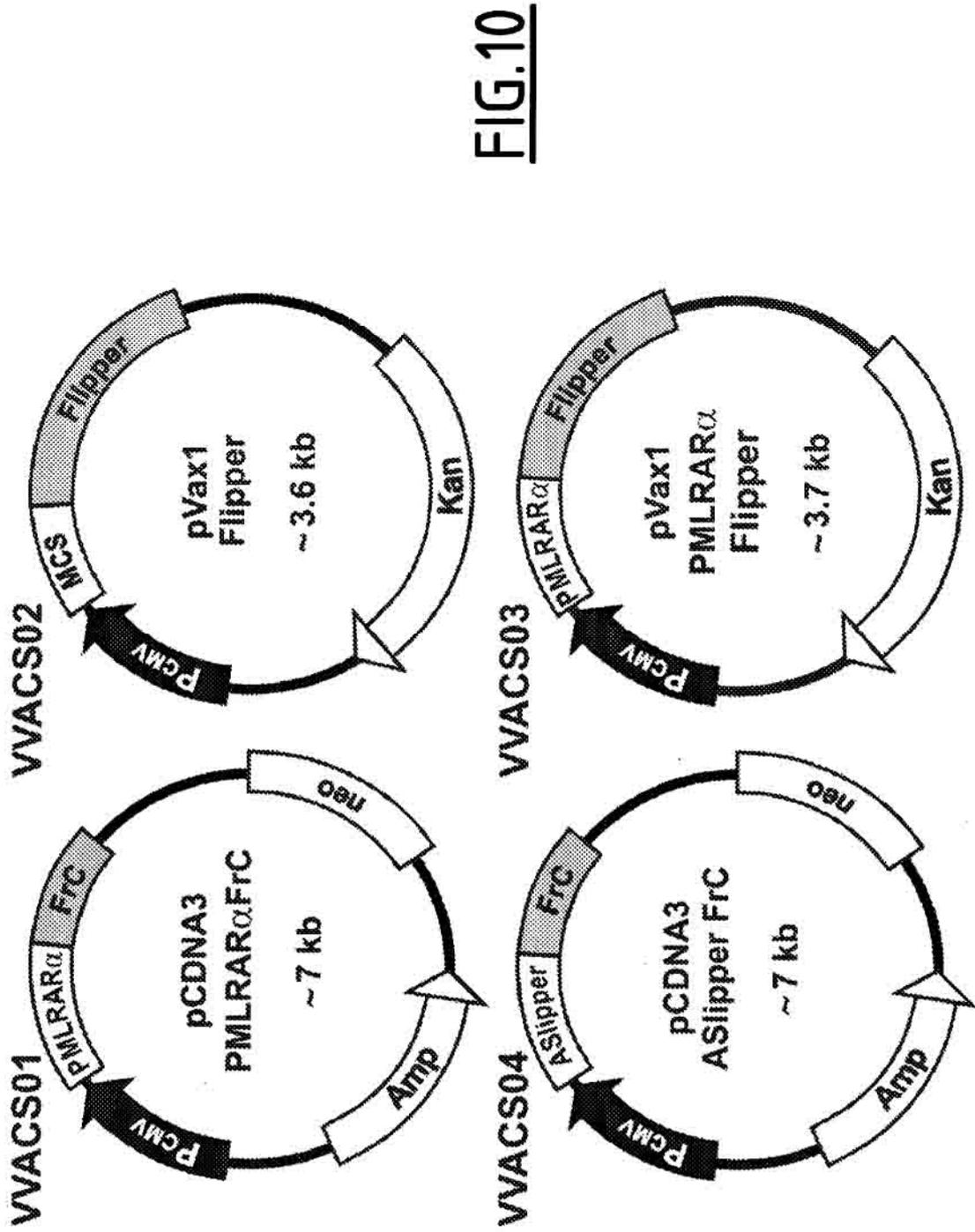


FIG.10

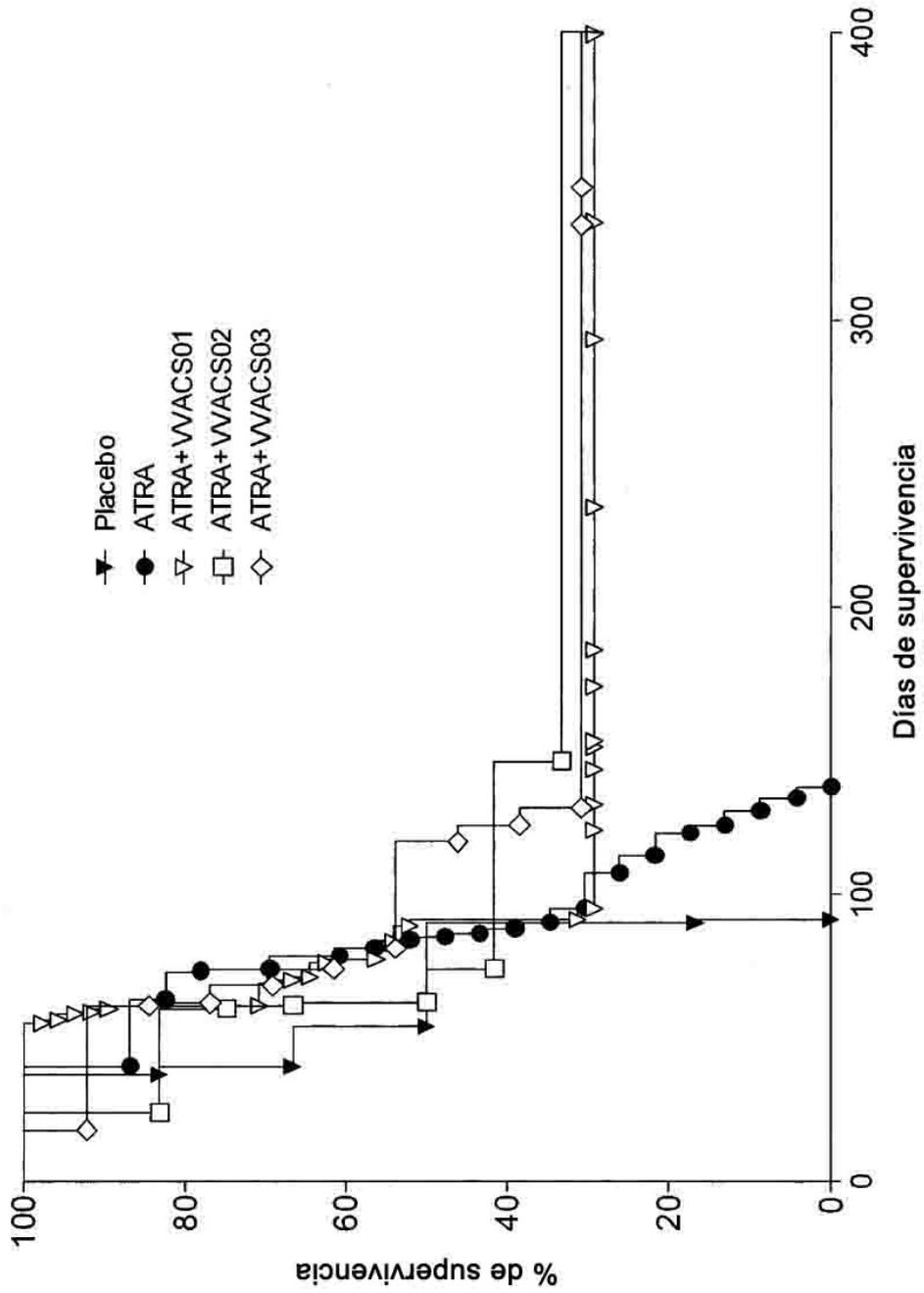


FIG.11

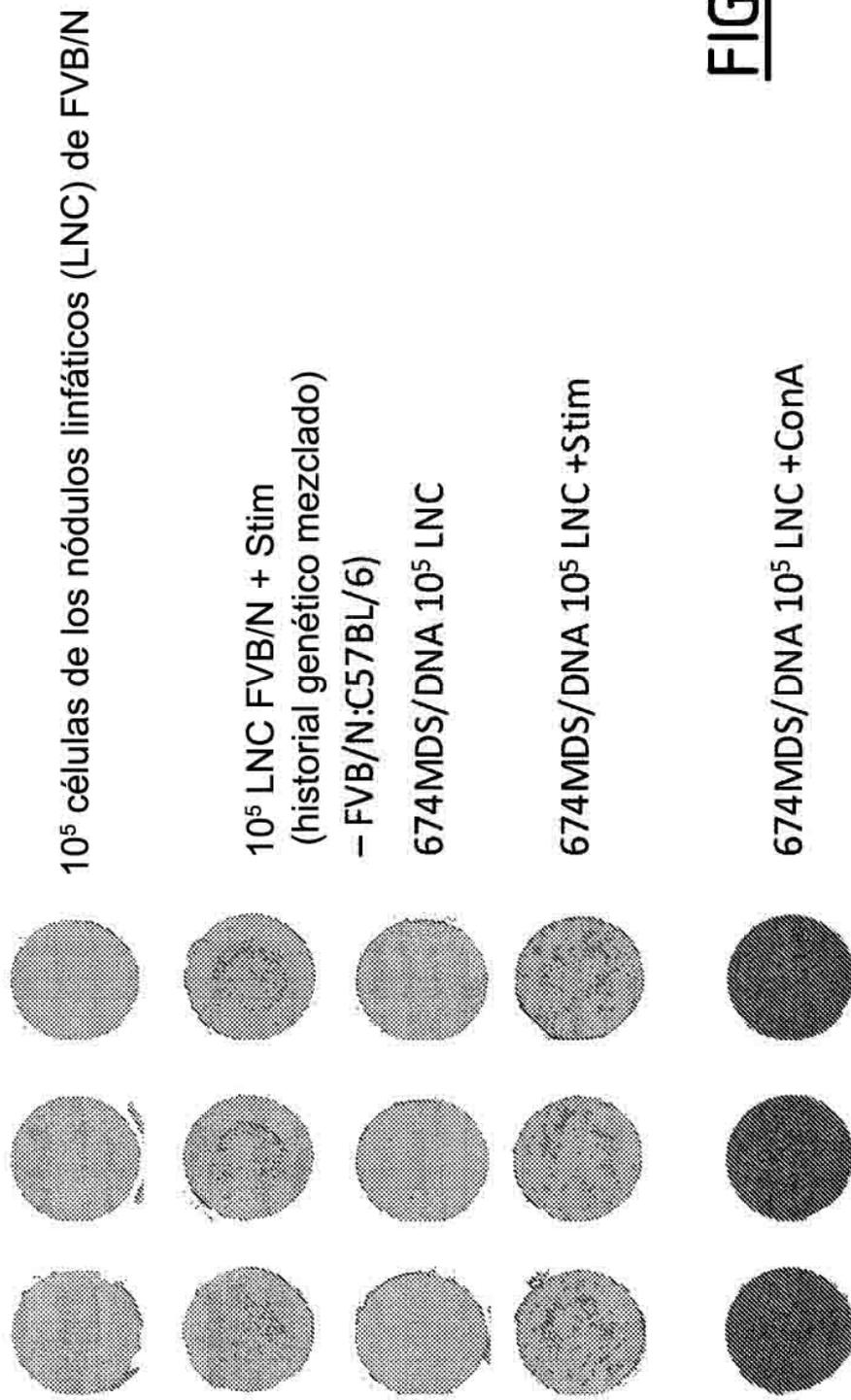
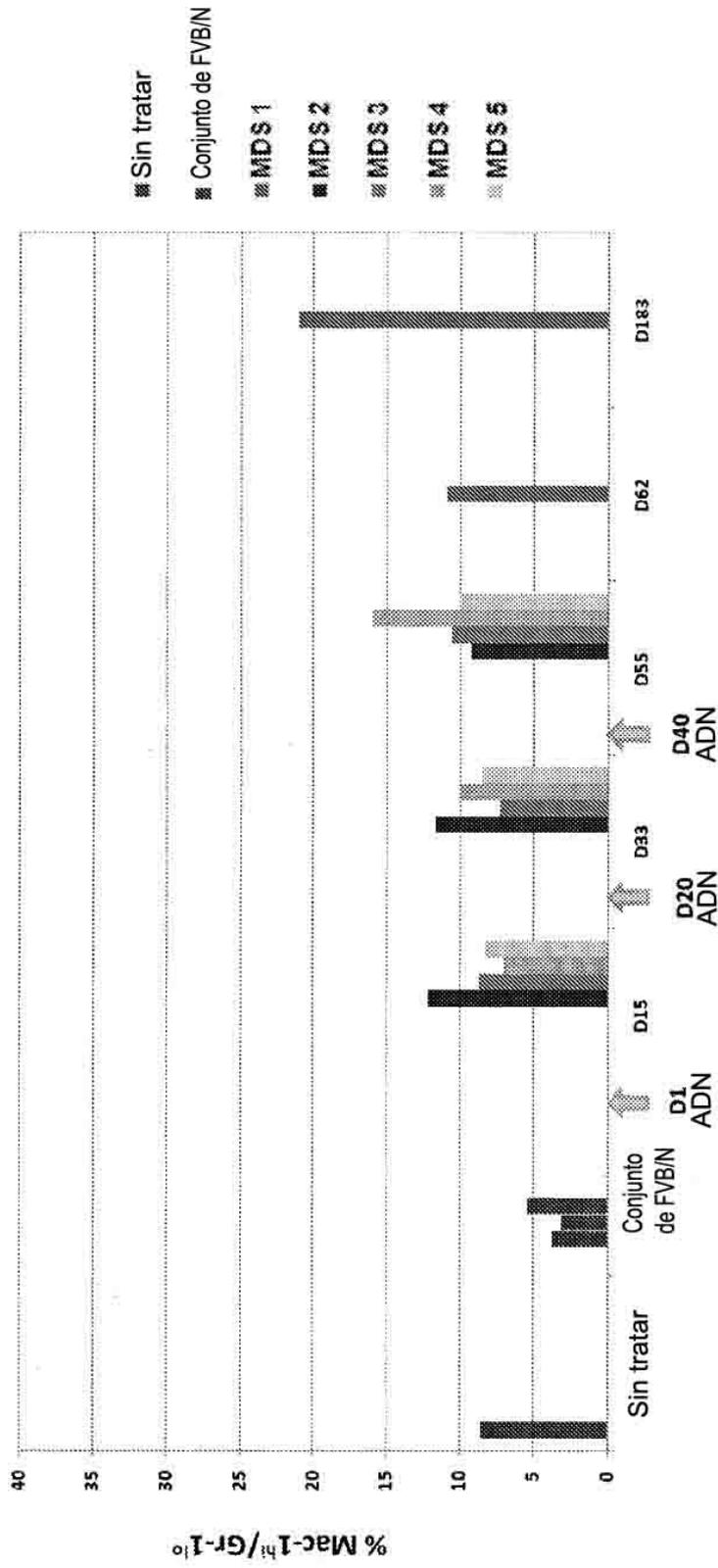


FIG.12

Stim = 0,2510⁶ blastos de 676 HBSS SMD
CTA MDS/DNA - MDS MDS/DNA - MDS MDS/DNA - MDS MDS/DNA



Días después de la primera inyección de ADN

FIG.13