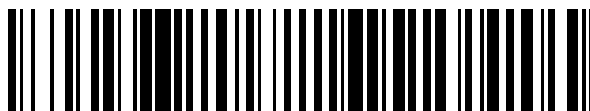


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 020**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 9/50 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2007 PCT/US2007/021414**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2008 WO08054612**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2007 E 07867206 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2069378**

54 Título: **Composición de ADN para inducir una respuesta inmunitaria contra macrófagos asociados a tumor**

30 Prioridad:

06.10.2006 US 849927 P

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

10.03.2017

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
10550 NORTH TORREY PINES ROAD
LA JOLLA, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**REISFELD, RALPH, A.;
XIANG, RONG y
LUO, YUNPING**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 605 020 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

Composición de ADN para inducir una respuesta inmunitaria contra macrófagos asociados a tumor.

5 Derechos gubernamentales

La presente invención se llevó a cabo con el apoyo del gobierno de los Estados Unidos bajo las subvenciones nº DAMD17-02-0137 y nº DAMD17-02-0562 del Department of Defense, así como las subvenciones nº W81XWH-05-1-0091 y nº W81XWH-05-1-0318 del Congressionally Directed Medical Research Program. El gobierno posee
10 determinados derechos en la presente invención.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones de ácido desoxirribonucleico (ADN) que codifican un polipéptido
15 que comprende una pluralidad de fragmentos de legumina. Asimismo, la presente invención se refiere a un artículo de fabricación que comprende dichas composiciones de ADN.

Antecedentes de la invención

Los macrófagos asociados a tumor (MAT) se relacionan con la progresión tumoral y la metástasis. Una nueva
20 estrategia antitumoral es la inmunización contra moléculas sobreexpresadas por los MAT para de esta manera remodelar el microambiente tumoral, que atrae a dichos macrófagos y media en la función de los mismos (ver Oosterling et al., J. Pathol. 207:147-155, 2005; Emens et al., Endocr. Relat. Cancer 12:1-17, 2005). Los TAM consisten principalmente de una población de macrófagos M2 polarizada (CD206⁺, F4/80⁺) con poca citotoxicidad
25 para las células tumorales debido a su producción limitada de óxido nítrico y citocinas proinflamatorias (ver Mills et al., J. Immunol. 164:6166-6173, 2000).

Los MAT también presentan una capacidad de presentación de antígenos pobre y suprimen eficazmente la
30 activación de las células T. De hecho, estos macrófagos de fenotipo M2 de hecho estimulan la proliferación de las células T y la metástasis mediante la secreción de un amplio abanico de factores de crecimiento y proangiogénicos, así como metaloproteinasas, y por su participación en circuitos de señalización que regulan la función de los fibroblastos en el estroma tumoral (Mantovani et al., Novartis. Found. Symp. 256:137-145, 2004).

Actualmente los efectos anti-MAT inducidos por inhibidores de molécula pequeña se informa que contribuyen a la
35 supresión tumoral (ver Lewis et al., Am. J. Pathol. 167:627-635, 167, y Mantovani et al., Eur. J. Cancer 40:1660-1667, 2004). Por ejemplo, yondelis, un agente antineoplásico, presenta un efecto citotóxico selectivo sobre los MAT, reduciendo significativamente de esta manera su producción de IL6 y CCL2, contribuyendo a la supresión del crecimiento sobre los tumores humanos asociados a inflamación (ver Allavena et al., Cancer Res. 65:2964-2971, 2005). Otro ejemplo similar es un compuesto bisfosfonato, el ácido zoledrónico, que suprime la secreción de MMP9
40 por los MAT, inhibiendo de esta manera la actividad metaloproteína tumoral y reduciendo la asociación del VEGF con sus receptores de tirosina quinasa sobre las células endoteliales proliferantes (ver Giraudo et al., J. Clin. Invest. 114:623-633, 2004).

En un modelo experimental diferente, se ha demostrado que la quimiocina CCL5 resulta importante en el
45 reclutamiento de los MAT. Un antagonista de esta quimiocina redujo la infiltración tumoral y enlenteció el crecimiento tumoral (ver Robinson et al., Cancer Res. 63:8360-8365, 2003). Por lo tanto, aunque la terapéutica dirigida con MAT es todavía un enfoque relativamente nuevo, los resultados clínicos iniciales son esperanzadores, ya que sugieren que la utilización de los MAT como dianas podría complementar regímenes de tratamiento del cáncer más convencionales.

50 La legumina es una ramificación evolutiva totalmente nueva de la familia C13 de cisteína proteasas (ver Ishii, Methods Enzymol. 244:604-615, 1994) y está bien conservada en plantas y mamíferos, incluyendo seres humanos. La legumina fue identificada por primera vez en plantas como enzima de procesamiento de proteínas de reserva durante la germinación de semillas y posteriormente se identificó en parásitos y después en mamíferos. La
55 legumina es una cisteína endopeptidasa ácida robusta con una especificidad notablemente restringida que requiere de manera absoluta una asparagina en el sitio P1 de la secuencia de su sustrato (ver Chen et al., J. Biol. Chem. 272:8090-8098, 1997).

En la presente solicitud, la selección de la legumina como diana para la terapia tumoral se basa en el hecho de que
60 el gen codificante de dicha endopeptidasa se ha encontrado que se encuentra altamente regulada positivamente en muchos tejidos tumorales murinos y humanos, aunque ausente o sólo presente a niveles muy bajos en todos los tejidos normales a partir de los que aparecen dichos tumores. Resulta importante que la sobreexpresión de la legumina se produce bajo condiciones de estrés tales como la hipoxia tumoral, que conduce a una progresión tumoral incrementada, angiogénesis y metástasis. Luo et al. (Journal of Clinical Investigations 116:2132-2141, 2006)
65 describen una vacuna de ADN codificante de una legumina de longitud completa y menciona que dicha vacuna es capaz de inducir un LTC.

La legumaína es una endopeptidasa diana particularmente preferida para las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, debido a la observación de que la legumaína se sobreexpresa intensamente en los MAT en los tejidos tumorales mamarios murinos, tal como confirma el perfilado de expresión génica y la inmunohistoquímica. Los MAT presentan una expresión particularmente abundante de legumaína en el estroma tumoral. En contraste, los macrófagos clásicos de fenotipo M1, que llevan a cabo importantes funciones de vigilancia inmunitaria y de presentación de antígenos, no expresan legumaína. En consecuencia, la utilización como diana de MAT que expresan legumaína no interfiere con las funciones biológicas de los macrófagos (M1), incluyendo la citotoxicidad y la presentación de antígenos. La presente invención proporciona composiciones de ADN para inducir una respuesta inmunitaria contra los MAT que sobreexpresan legumaína y que resultan útiles para el tratamiento de tumores y metástasis tumorales.

Sumario de la invención

Una composición de ADN de la presente invención comprende un constructo minigén de ADN que codifica un polipéptido inmunógeno que comprende una pluralidad de fragmentos de legumaína, cada uno de los cuales está precedido por los tres aminoácidos AAY, expresándose el polipéptido en células asociadas a tumor y uniéndose los fragmentos inmunógenos entre sí en serie mediante dichos tres aminoácidos AAY entre cada fragmento sucesivo en el polipéptido, en el que el polipéptido es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra las células asociadas a tumor, y es expresable en células inmunitarias, y en el que el constructo minigén de ADN se incorpora en un portador farmacéuticamente aceptable, en el que dichos fragmentos inmunógenos presenta una secuencia de aminoácidos según SECID nº 16, nº 17 y nº 18. El constructo de ADN incluye elementos estructurales que facilitan la expresión del polipéptido en células inmunitarias de un sujeto en el que ha sido administrado el constructo de ADN. El constructo de ADN se incorpora en un portador farmacéuticamente aceptable de manera que pueda administrarse en un paciente. La composición puede codificar un único fragmento inmunógeno de la endopeptidasa (por ejemplo un epítipo de legumaína), un polipéptido que comprende dos o más fragmentos inmunógenos de la endopeptidasa (es decir, un polipéptido inmunógeno), una proteína endopeptidasa completa, o cualquier porción de la misma que induzca una respuesta inmunitaria en el sujeto. El constructo de ADN puede codificar legumaína humana que presenta la secuencia de residuos aminoácidos que consiste de SEC ID nº 2, una proteína que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 80% respecto a SEC ID nº 2 (por ejemplo la legumaína humana, la legumaína porcina o la legumaína de ratón), o un fragmento inmunógeno de la misma, y que es expresable en células inmunitarias de un sujeto en el que se administra el constructo de ADN. Los constructos de ADN de la invención resultan útiles para inhibir el crecimiento tumoral y las metástasis tumorales.

El constructo de ADN puede ser un constructo de ADN desnudo, preferentemente en forma de un plásmido. Dichos constructos de ADN desnudo pueden incorporarse en un vehículo de administración de liposomas, un vehículo de administración polimérico, o administrarse mediante electroporación, una pistola génica y similar, si se desea. En algunas realizaciones preferidas, el constructo de ADN se incorpora en un vector vírico atenuado o en un vector bacteriano atenuado.

En una forma de realización preferida, el constructo de ADN se incorpora en un vector bacteriano atenuado, tal como un *Salmonella typhimurium* atenuado, por ejemplo la cepa doblemente atenuada (AroA-, dam-) de *Salmonella typhimurium*.

Opcionalmente, la composición de ADN puede comprender además un constructo de ADN codificante de una proteína efectora inmunitaria, tal como una citocina. Entre las citocinas preferidas se incluyen CCL21, IL-2 y CD40LT.

El polipéptido inmunógeno codificado por el minigén de ADN de la presente invención es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra las células asociadas a tumor y es expresable en células inmunitarias, en las que el constructo minigén de ADN se incorpora en un portador farmacéuticamente aceptable. Los fragmentos inmunógenos se unen entre sí en serie con un péptido conector entre cada fragmento sucesivo en el polipéptido. Los péptidos conectores indicados posteriormente en la presente memoria presentan una longitud de por lo menos tres residuos aminoácidos y comprende la secuencia de aminoácidos AAA o AAY. Tal como se utiliza posteriormente en la presente memoria, la expresión "péptido conector" se refiere a una secuencia de por lo menos dos residuos aminoácidos, preferentemente de por lo menos tres residuos aminoácidos, que forma una secuencia de residuos aminoácidos que difiere de la endopeptidasa natural al unirse con los fragmentos inmunógenos de la endopeptidasa. Típicamente la combinación de péptidos conectores y fragmentos inmunógenos de la endopeptidasa comprenderá un polipéptido de longitud inferior a aproximadamente 100 residuos aminoácidos, más preferentemente de una longitud comprendida entre aproximadamente 19 y aproximadamente 62 aminoácidos (por ejemplo entre dos y aproximadamente cinco fragmentos inmunógenos de 8 a 10 aminoácidos cada uno, unidos entre sí mediante uno a cuatro péptidos conectores de tres aminoácidos cada uno). Los constructos de minigén de ADN indicados en la presente memoria pueden codificar fragmentos inmunógenos de la legumaína humana (SEC ID nº 2).

Las composiciones de ADN de la presente invención pueden actuar como vacunas con diana en macrófagos asociados a tumor que expresan una cisteína endopeptidasa, tal como la legumaína, proporcionando una diana

altamente selectiva para la inmunoterapia del cáncer mediada por células T. El enfoque de utilizar como diana una endopeptidasa tal como la legumaína, que es expresada por los macrófagos asociados a tumor presenta varias ventajas respecto a terapias dirigidas contra antígenos que únicamente se expresan en las células tumorales mismas. Por ejemplo, la legumaína se expresa a nivel elevado en los MAT y, de esta manera, no resulta perjudicada por a expresión regulada negativamente de antígeno del CMH, como ocurre frecuentemente en las células tumorales. Además, las células tumorales con frecuencia se convierten en crecientemente resistentes a la eliminación mediada por las células T debido a defectos en las rutas de señalización de la apoptosis, la regulación positiva de las proteínas antiapoptóticas o los efectos inmunosupresores sobre los linfocitos T citotóxicos (LTC). La utilización como diana de los MAT que expresan legumaína permite producir una composición terapéutica para tratar varias neoplasias malignas diferentes, en contraste con terapias que incluyen antígenos que se expresan únicamente en tipos tumorales específicos.

Las composiciones de ADN indicadas en la presente memoria pueden utilizarse para romper la tolerancia a las células T periféricas contra el autoantígeno de la legumaína mediante la administración de su ADNc o ADN codificante de uno o más fragmentos inmunógenos del mismo, como composición de ADN oral con un vector de administración bacteriano atenuado (por ejemplo una cepa atenuada de *Salmonella typhimurium*). En dichas realizaciones, la composición de ADN se pone en contacto con células presentadoras de antígeno (CPA) en un órgano linfóide secundario, es decir, parches de Peyer del intestino delgado. En un enfoque profiláctico, la respuesta inmunitaria antitumoral mediada por células T inducida por la vacunación con una composición de ADN de la invención inhibió el crecimiento tumoral en múltiples modelos tumorales murinos. Las presentes composiciones de ADN también suprimen significativamente la diseminación de metástasis pulmonares establecidas en un modelo terapéutico de carcinoma de colon CT26.

Una composición de ADN preferida comprende un portador *Salmonella* atenuado, tal como una cepa doblemente atenuada de *S. typhimurium*, por ejemplo la cepa denominada RE 88, que incluye las mutaciones *dam*- y *AroA*-, y se encuentra disponible de Remedyne Corporation (Goleta, CA). El portador *Salmonella* atenuado puede transfectarse de manera que incluye el constructo de ADN codificante de la endopeptidasa (por ejemplo la legumaína) o un polipéptido codificante de un fragmento inmunógeno de la misma. La endopeptidasa o polipéptido es expresable en células inmunitarias de un mamífero en el que se administra. Las bacterias por sí mismas no expresan la legumaína o el polipéptido, sino que llevan el ADN a las células inmunitarias, tales como macrófagos y células dendríticas (CD), que a su vez expresan endopeptidasa o el polipéptido que comprende el fragmento inmunógeno de la misma. Dichas composiciones pueden proporcionar efectos antitumorales prolongadas en modelos murinos. Además, los experimentos de reducción in vivo del número de células T señalan a la participación de las células T CD8⁺ pero no las CD4⁺ en la respuesta inmunogénica asociada a composiciones codificantes de legumaína y codificantes de polipéptidos que comprenden fragmentos inmunógenos de la legumaína. El efecto citotóxico observado mediado por las células T CD8⁺ in vitro se dirigía específicamente contra los MAT diana que sobreexpresan el antígeno legumaína.

Las composiciones de ADN indicadas en la presente memoria también pueden incorporar constructos de ADN que codifican moléculas efectoras inmunitarias como adyuvantes para la composición. Entre dichas moléculas efectoras inmunitarias se incluyen, por ejemplo, IL-2, un inductor de la proliferación de las células T, CCL21, una quimiocina que quimioatrae las células dendríticas maduras y células T no expuestas, así como CD40LT, un inductor conocido de la maduración de las células dendríticas. Los ácidos nucleicos codificantes de la proteína efectora inmunitaria preferentemente se incorporan en un plásmido. La legumaína y los constructos de ADN de proteína efectora inmunitaria pueden incorporarse en el mismo plásmido o en dos plásmidos separados. La respuesta de LTC inducida contra los MAT puede inhibir el crecimiento de una diversidad de tumores y no es específica de un tipo tumoral particular.

La presente memoria da a conocer además un método de inhibición del crecimiento tumoral y de las metástasis tumorales en un mamífero, que comprende administrar en un mamífero una composición de ADN de la invención en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria contra los MAT que expresan legumaína.

La presente memoria da a conocer un régimen terapéutico de combinación eficaz que combina quimioterapia y el tratamiento con una composición de ADN de la invención. En dicha realización de método, se administran en el paciente diversos agentes quimioterápicos, tales como la doxorrubicina, el paclitaxel y/o la ciclofosfamida, que no provocan la supresión de la médula ósea al administrarlos a la dosis máxima tolerable (DMT), conjuntamente con una composición de ADN de la invención que comprende un constructo de ADN que codifica una endopeptidasa expresada por MAT en el mamífero, que sobreexpresa una endopeptidasa tal como la legumaína, y la administración posterior en el mamífero de una cantidad eficaz antitumoral de un agente quimioterápico antitumoral.

Preferentemente, el mamífero tratado es un ser humano. En las realizaciones del método indicadas en la presente memoria, las composiciones de ADN pueden administrarse entéricamente, tal como mediante la administración oral, o por vía parenteral, tal como mediante inyección o infusión intravenosa. Preferentemente, las composiciones se administran por vía oral. Las composiciones pueden envasarse en recipientes sellados y etiquetarse con información útil para que el médico administre eficazmente la composición.

Las composiciones de ADN indicadas en la presente memoria resultan útiles para el tratamiento y la prevención de varios estados de enfermedad. Por ejemplo, un paciente que sufre de cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón y similares puede beneficiarse de la inmunización con las composiciones de la presente invención. Las composiciones de la presente invención resultan útiles además para investigar el papel de la legumaína en diversas formas de cáncer.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. La legumaína se expresa a nivel elevado sobre los macrófagos asociados a tumor en el estroma tumoral. (A) La expresión de la legumaína sobre los MAT era claramente evidente, tal como se muestra en el Panel A. Se visualizaron macrófagos infiltrantes de tumor mediante la tinción con H/E, tal como indican las flechas. La expresión de legumaína está señalada por la doble tinción con anticuerpo anti-legumaína en combinación con anticuerpo anti-CD68 (magnificación: x35). (B) Se confirmó la expresión incrementada de legumaína sobre los MAT mediante análisis de citometría de flujo con poblaciones doble positivo de macrófagos M2 CD206⁺/F4/80⁺ que se habían aislado a partir de tejido tumoral fresco. (C) La citometría de flujo de múltiples colores demostró la regulación positiva del marcador CD206 de macrófagos M2 sobre células RAW tras el cultivo con IL-4, IL-10 e IL-13 (10 ng/ml). Se demostró que la legumaína se expresaba a nivel elevado sobre las células RAW positivas F4/80⁺/CD206⁺ cultivadas con IL-4, IL-10 e IL-13, tal como se indica en la foto superior en comparación con células RAW de tipo salvaje ilustradas en la foto inferior. (D) Confirmación de la expresión de legumaína sobre células RAW mediante transferencia western tras la estimulación con IL-4, IL-13 e IL-10 individualmente o en combinación.

Figura 2. La utilización como diana de las células expresantes de legumaína resulta en la supresión de la progresión tumoral. (A) Esquema de una composición de ADN de la invención construida con el vector esquelético pCMV/myc/cyto en el que se ha fusionado el gen de la legumaína con el extremo C-terminal de la poliubiquitina mutante. Se insertó el fragmento completo y se demostró la expresión de proteína mediante transferencia western. (B) Modelo profiláctico: se diseñó el programa de vacunación para tres inmunizaciones a intervalos de 1 semana seguido de un reto i.v. con aproximadamente 2x10⁵ células de cáncer de pulmón de células no pequeñas D121, aproximadamente 5x10⁴ células de cáncer de colon CT26 y la inyección en almohadilla adiposa mamaria de aproximadamente 7x10³ células de cáncer de mama 4T1. Se determinaron los pesos de los pulmones 24 días (D121 o CT-26) o 30 días (4T1) después del reto de células tumorales y se analizaron en cada grupo. Las diferencias entre los dos grupos de control (PBS y/o vector vacío) y el grupo de tratamiento fueron estadísticamente significativas, **P<0,005. Peso pulmonar normal=0,2 g. (C) Modelo terapéutico: grupos de ratones BALB/c (n=8) recibieron una inyección en la almohadilla adiposa mamaria de aproximadamente 7x10³ células de cáncer de mama 4T1 y posteriormente fueron vacunados tres veces, los días 3, 7 y 11, con PBS, vector vacío o la composición de ADN pLegumaína, respectivamente, y los tumores primarios se extirparon el día 12. El gráfico de supervivencia representa resultados para 8 ratones en cada uno de los grupo de tratamiento y de control. La diferencia entre el grupo de control de vector vacío y el grupo de tratamiento fue estadísticamente significativa, **P<0,005.

Figura 3. La población de MAT en el estroma tumoral se redujo por los LTC específicos CD8⁺ inducidos por la composición de ADN basada en legumaína. (A) Las células de macrófagos RAW presentan un nivel elevado de expresión de legumaína tras el cultivo con 10 ng/ml de IL-4, IL-10 e IL-13, y sirven de células diana en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas. Los esplenocitos aislados de ratones inmunizados con la composición de pLegumaína eliminaron eficazmente las células RAW tratadas con dichas citocinas in vitro a diferentes proporciones de células efectoras:diana, aunque no consiguieron inducir la eliminación citotóxica de células RAW no estimuladas que no presentaban expresión de legumaína, **P<0,005 en comparación con los grupos de control. (B) La citometría de flujo detectó el porcentaje de poblaciones de MAT con marcadores de macrófago específicos (CD206 y F4/80) en tejido tumoral tras la vacunación. Se demostró la reducción del porcentaje de poblaciones de MAT en células de tejido tumoral aisladas de ratones tratados con la composición de ADN de la invención. No se observó una reducción de las poblaciones de MAT aisladas de ratones tratados con el vector vacío o con pLegumaína tras la reducción del número de células T CD8⁺ (**P<0,005). (C) Se confirmaron los resultados de la citometría de flujo mediante tinción inmunohistoquímica evaluada mediante microscopía confocal. La población de MAT en el estroma tumoral se redujo drásticamente tras la vacunación. Magnificación: x5 (H/E), x35 (control, vector vacío y pLegumaína).

Figura 4. Respuesta de células T CD8⁺ específica restringida a antígeno del CMH de clase I contra células expresantes de legumaína. (A) Los gráficos de FACS muestran que el tratamiento con ADN incrementa la expresión de las moléculas coestimuladoras por parte de las CD. Los linfocitos de los parches de Peyer obtenido 3 días después de la vacunación se tiñeron con anticuerpo anti-CD11 marcado con FITC en combinación con anticuerpo anti-CD80 conjugado con PE, anticuerpo anti-CMH de clase I o anticuerpo anti-CD40 (*P<0,05, en comparación con los grupos de control). (B) La

liberación de INF-gamma intracitoplasmático de células T CD8⁺ se midió mediante análisis de FACS. **P<0,005, en comparación con los grupos de control. (C) Se verificó la producción de INF-gamma específico al nivel de células individuales mediante ELISPOT. Lo anterior se observó para linfocitos de ratones inmunizados re-estimulados con células de tejido tumoral 4T1 legumaína⁺ o células 4T1 legumaína⁻, tal como ilustra el número de puntos inmunológicos formados por pocillo, **P<0,005 en comparación con el grupo de tratamiento sin estimulación; ###P<0,005 en comparación con los grupos de control. (D) Los esplenocitos aislados de ratones tratados resultaron eficaces en la eliminación de los MAT según el ensayo de liberación de ⁵¹Cr (*P<0,01, en comparación con los grupos de control). Los experimentos de inhibición con anticuerpos contra los antígenos H2Kd/H2Dd CMH de clase I mostraron que la lisis de las células tumorales mediada por las células T se encontraba restringida a antígenos de CMH de clase I. La reducciones in vivo de las células T CD4⁺ o CD8⁺ indicaron que los linfocitos aislados de ratones vacunados, que presentaban después reducciones de las células T CD8⁺, no conseguían inducir la eliminación citotóxica de las células diana. La reducción del número de células T CD4⁺ no anuló la eliminación citotóxica de estas mismas células diana. *P<0,01 en comparación con el grupo de PBS o de vector vacío.

Figura 5. La anulación de los MAT resulta en una reducción de la liberación de los factores de crecimiento, en la migración de las células tumorales y en la metástasis. (A) La composición de ADN de la invención reduce la liberación de factores de crecimiento por los MAT. Se recolectó tejido de tumor mamario 4T1 y suero de ratón 12 días después de las vacunaciones y el reto de células tumorales. Tras el cultivo durante 24 o 48 horas, se recolectaron los sobrenadantes de las células de tejido tumoral y se midieron mediante ELISA las concentraciones de FCT-beta, FNT-alfa y FCEV en suero o sobrenadantes. Se observaron diferencias significativas entre el grupo de tratamiento y los grupos de control. *P<0,01, **P<0,005. (B) Se llevó a cabo la tinción inmunohistoquímica para determinar la expresión de dichos factores de crecimiento en el microambiente tumoral. Los grupos de tratamiento de vacuna mostraron que se había reducido la liberación de FCEV, FCT-beta y MMP-9 tras una reducción de los MAT, en comparación con los grupos de vector vacío. (C) Se llevó a cabo un ensayo de migración transpocillo para determinar la migración de las células tumorales tras la vacunación. El número de células migrantes se redujo marcadamente tras la vacunación. ***P<0,001 en la comparación con el grupo de vector vacío. (D) Se llevaron a cabo experimentos in vivo para determinar la capacidad de los ratones de formar metástasis tumorales. Los ratones fueron tratados con la vacuna dentro del contexto terapéutico tal como se ha indicado anteriormente. Se midieron las puntuaciones de metástasis tumoral y los pesos de pulmones 25 días después de la extirpación de los tumores primarios. Las puntuaciones de metástasis se expresan como % de superficie pulmonar cubierta por focos metastásicos fusionados: 0=nula; 1=<5%, 2=5% a 50%, 3≥50%. Las diferencias de pesos de pulmón entre los grupos de ratones tratados con vacuna y todos los grupos de control fueron estadísticamente significativas (**P<0,005).

Figura 6. La eliminación de los MAT resulta en una reducción de la angiogénesis tumoral. Supresión de la angiogénesis inducida por el FCEV: se vacunaron ratones BALB/c con *S. typhimurium* transfectada con vector vacío, pLegumaína o pLegumaína tras la reducción de células T CD8⁺ o CD4⁺ in vivo, respectivamente. Una semana después de la última vacunación, se implantó Matrigel s.c. en la línea media del abdomen de los ratones. Se indujo la vascularización con FCEV o FCFb. (A) Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital 6 días después de la implantación de tapón de Matrigel. Además, la sección de los tapones de Matrigel teñidos con tinción tricrómica de Masson indicaban crecimiento de vasos sanguíneos en los tapones de Matrigel, tal como se señala mediante flechas (magnificación: x5). (B) La cuantificación del crecimiento de vasos se llevó a cabo tras la tinción in vivo del endotelio con isolectina B4 marcada con FITC y la evaluación mediante fluorimetría. Se produjo una reducción de la neovascularización inducida por el FCEV sólo tras la vacunación con el vector codificante de legumaína pero no después de la vacunación con el vector vacío o con plegumaína tras la reducción del número de células T CD8⁺. **P<0,005, *P<0,01 en comparación con el grupo de tratamiento de legumaína. (C). La tinción histoquímica se llevó a cabo y se evaluó mediante microscopía confocal. Las secciones transversales de tapones de Matrigel se tiñeron para determinar el tipo celular que creía o que migraba hacia el interior de dichos tapones. Las imágenes indican que las células endoteliales con el marcador CD31 o los macrófagos con el marcador CD68 crecieron o migraron hacia el interior de los tapones de Matrigel tal como señalan las flechas (magnificación: x35). La tinción de H/E sirvió de control (magnificación: x5).

Figura 7. La línea celular 4T1 se transfectó establemente con un retrovirus que alojaba el plásmido de legumaína y después se utilizó como células diana para los esplenocitos de ratones inmunizados (panel A, las fotos a la izquierda presentan una magnificación de 5x; las fotos a la derecha presentan una magnificación de 35x), las imágenes se obtuvieron 2 días después de la transfección y las células positivas se indican mediante flechas. Los datos del ensayo de liberación de ⁵¹Cr se muestran en el Panel B. Los esplenocitos aislados a partir de ratones inmunizados con la composición de ADN de pLegumaína resultaron eficaces para eliminar las células 4T1 transfectadas con legumaína (*P<0,01, en comparación con los grupos de control de vector vacío). La eliminación mediada por células T

específica de tumor era específica para la legumaína, ya que las células 4T1 normales, que no presentaban expresión de legumaína, no resultaron lisadas.

Figura 8. Muestra la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico codificante de la legumaína humana (SEC ID nº 1).

Figura 9. Muestra la secuencia de residuos aminoácidos (SEC ID nº 2) de la legumaína humana.

Figura 10. Muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 3) de un ácido nucleico codificante de la legumaína murina.

Figura 11. Muestra la secuencia de residuos aminoácidos (SEC ID nº 4) de la legumaína murina.

Figura 12. Muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 5) de un ácido nucleico codificante de la IL-2 humana.

Figura 13. Muestra la secuencia de residuos aminoácidos de la IL-2 humana (SEC ID nº 6).

Figura 14. Muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 7) de un ácido nucleico codificante de CCL21 humana.

Figura 15. Muestra la secuencia de residuos aminoácidos de CCL21 humana (SEC ID nº 8).

Figura 16. Muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 9) de un ácido nucleico codificante de CD40L humano.

Figura 17. Muestra la secuencia de residuos aminoácidos de CD40L humano (SEC ID nº 10).

Figura 18. Muestra la secuencia de nucleótidos de la legumaína murina ubiquitinada (SEC ID nº 11).

Figura 19. Muestra la secuencia de residuos aminoácidos de la legumaína murina ubiquitinada (SEC ID nº 12).

Figura 20. Muestra la secuencia de residuos aminoácidos de las secuencias de epítipo de la legumaína murina.

Figura 21. Muestra una representación esquemática de plásmidos codificantes de minigenes de legumaína que comprenden fragmentos inmunógenos de la legumaína.

Figura 22. Demuestra que la composición de minigén pCMV-Kb/Kd protege a ratones frente al reto con células de carcinoma mamario D2F2. Se inmunizaron grupos de ratones BALB/c (n=8) 3 veces a intervalos de 1 semana con *Salmonella typhimurium* RE-88 doblemente atenuada que alojaba los vectores indicados. Los ratones se retaron 1 semana después de la última inmunización mediante la inyección i.v. de 2×10^5 células de carcinoma mamario D2F2. A. Esquema del protocolo experimental. B. Volumen tumoral medio de ratones 5 a 25 días después del reto de células tumorales. C. Peso tumoral de los ratones 25 días después del reto celular, *P<0,05 en comparación con el grupo de control de vector vacío.

Figura 23. Demuestra que la vacuna de minigén pKd evita la metástasis del carcinoma mamario D2F2 en ratones BALB/c singénicos. Se inmunizaron grupos de ratones (n=8) 3 veces a intervalos de 1 semana mediante sonda con *Salmonella typhimurium* RE-88 que alojaba los vectores indicados. Los ratones se retaron 2 semanas después de la última inmunización mediante la inyección i.v. de 1×10^5 células de carcinoma mamario D2F2. A. Esquema del protocolo experimental. B. Puntuación media de metástasis pulmonar de ratones de cada grupo experimental 25 días después del reto de células tumorales. Se establecieron las puntuaciones de metástasis tumoral en los pulmones mediante estimación del % del área cubierta por las metástasis fusionadas de la manera siguiente: 0, ninguna metástasis; 1: <20%; 2: 20% a 50% y 3: >50%, representados por símbolos individuales para cada grupo de tratamiento. *P<0,05 en comparación con el grupo de control de vector vacío.

Figura 24. Ilustra la liberación de IFN- γ en células T específicas de legumaína inducida por la composición de minigén pCMV-Kb/Kd. A. La expresión de legumaína por células 4T1 recién recolectadas procedentes de tejidos tumorales se utilizaron como células estimuladoras. Se llevó a cabo citometría de flujo para indicar el grado de expresión de la legumaína en dichas células B. Se verificó la producción de IFN- γ al nivel de células individuales mediante ELISPOT, reestimulando linfocitos de los ratones inmunizados con células tumorales 4T1 legumaína⁺ recién recolectadas de tejido tumoral o células en cultivo de tejido 4T1 legumaína⁻. La liberación de IFN- γ está indicada por el número de inmunopuntos formados por cada pocillo. *P<0,05, en comparación con grupos de ratones los linfocitos de los cuales no resultaron estimulados por las células tumorales legumaína⁺. #P<0,05, en la comparación con grupos de control.

Figura 25. Ilustra la eliminación de CTL específica de las células macrófagos positivas para legumaína inducida por la composición de minigén pCMV-Kb/Kd. A. Se identificó la expresión de legumaína por la línea celular de macrófagos RAW tras el cultivo con IL-4, IL-10 e IL-13. Se llevó a cabo un análisis de transferencia western para indicar la expresión de legumaína sobre dichas células. B. Se sacrificaron grupos de ratones BALB/c inmunizados (n=4) 2 semanas después de la última inmunización y los esplenocitos aislados a partir de ellos se estimularon con células 4T1 legumaína⁺ irradiadas, durante 5 días. A continuación, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad con células RAW legumaína⁻ de tipo salvaje (panel inferior) o con células RAW legumaína⁺ como células diana (panel superior). *P<0,05, en la comparación con el grupo de control de vector vacío, utilizando células RAW legumaína⁺ como células diana.

Figura 26. Ilustra la supresión de la angiogénesis en ratones BALB/c singénicos inducida por la composición de minigén pCMV-Kb/Kd. A. Resultado del ensayo de Matrigel. Se implantó Matrigel en los ratones vacunados con vector vacío, o con vacunas pCMV-Db/Dd o pCMV-Kb/Kd. La medición de la concentración de hemoglobina Hb) en los tapones Matrigel se llevó a cabo para cuantificar el crecimiento de los vasos sanguíneos. La concentración media de Hb de los tapones de Matrigel de cada grupo de ratones se ilustra mediante el gráfico de columnas (n=4, media + SD). * P<0,05, en la comparación con el grupo de control de vector vacío. B. Tinción tricrómica de Masson de secciones de Matrigel preparadas 7 días después de la implantación de tapones de Matrigel. Las flechas indican los vasos sanguíneos en el tapón de Matrigel.

Descripción detallada de formas de realización preferidas

La presente invención proporciona una composición de ADN, con diana en células asociadas a tumor, tales como macrófagos asociados a tumor (MAT). La composición de ADN comprende un constructo de minigén de ADN que codifica un polipéptido inmunógeno que comprende una pluralidad de fragmentos de legumaína, cada uno de los cuales está precedido por los tres aminoácidos AAY, expresándose el polipéptido en células asociadas a tumor, uniéndose entre sí en serie los fragmentos inmunógenos mediante dichos tres aminoácidos AAY entre cada fragmento sucesivo en el polipéptido, en el que el polipéptido es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra las células asociadas a tumor, y es expresable en las células inmunitarias, y en el que el constructo de minigén de ADN se incorpora en un portador farmacéuticamente aceptable, en el que dichos fragmentos inmunógenos presentan una secuencia de aminoácidos según SEC ID n° 16, n° 17 y n° 18.

La expresión "constructo de ADN" tal como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas se refiere a una estructura de ADN que codifica una proteína o polipéptido de interés, tal como legumaína o un fragmento de legumaína inmunógeno (epítipo), denominado colectivamente "ADN de legumaína", así como proteínas, tales como IL-2, CCL21, CD40L y similares. Preferentemente, cada fragmento inmunógeno presenta una longitud comprendida entre aproximadamente 8 y 10 residuos aminoácidos. Entre los constructos de ADN se incluye cualquier ADN que pueda transcribirse en las células diana, incluyendo ADN lineal y ADN plasmídico, así como ADN que ha sido incorporado en el material genético de una célula o virus. Preferentemente, el constructo de ADN es un ADN que ha sido incorporado en un vector de administración vírico o bacteriano, por ejemplo un vector vírico o bacteriano atenuado que es no patógeno. Al tratar un sujeto con una composición de la invención, el ADN de legumaína se administra en células inmunitarias (por ejemplo macrófagos y células dendríticas), que a continuación expresan la proteína o polipéptido, incluyendo un fragmento inmunógeno del mismo. Los portadores víricos o bacterianos del ADN de legumaína no expresan ellos mismos la legumaína.

El constructo de ADN indicado en la presente memoria es un constructo de minigén que codifica un polipéptido inmunógeno que comprende una pluralidad (por ejemplo 2 a 5) de fragmentos inmunógenos de una endopeptidasa que se expresa a nivel elevado en los MAT (por ejemplo legumaína). Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "minigén" se refiere a constructos de ADN que codifican múltiples porciones (fragmentos) de una proteína de interés, que se unen entre sí, preferentemente mediante péptidos pequeños de por lo menos tres aminoácidos. De esta manera, los minigenes codifican polipéptidos que incluyen porciones inmunogénicas de la proteína de interés, pero que no codifican la proteína de interés entera. Preferentemente, un constructo de minigén codifica un polipéptido que comprende entre aproximadamente 2 y 5 fragmentos inmunógenos (es decir, secuencias peptídicas de regiones de epítipo de la proteína), preferentemente unidos entre sí mediante péptidos de enlace. El minigén puede incluir además secuencias que codifican secuencias líder y/o otras secuencias que resultan útiles para facilitar la expresión o transporte del polipéptido.

Tal como se ha indicado anteriormente, los fragmentos inmunógenos en el polipéptido preferentemente se unen entre sí mediante un conector o péptido espaciador entre cada fragmento. El péptido conector preferentemente comprende por lo menos tres residuos aminoácidos (por ejemplo AAA o AAY). Preferentemente, el constructo de ADN codificante de un fragmento inmunógeno de legumaína codifica además una secuencia líder, tal como una secuencia líder de retículo endoplasmático (RE), conectada con el extremo N-terminal del polipéptido codificado por el constructo de ADN mediante un péptido conector. En el caso de que el constructo de ADN codifique un polipéptido que comprenda dos o más fragmentos de legumaína inmunógenos, la secuencia líder preferentemente

se une al primer fragmento inmunógeno desde el extremo N-terminal del mismo. Preferentemente, los fragmentos inmunógenos de la endopeptidasa consisten de aproximadamente 8 a 10 residuos aminoácidos contiguos de una o más regiones epitópicas de la misma.

- 5 Los fragmentos inmunógenos de endopeptidasas tales como legumaína, incluyendo la legumaína humana, pueden identificarse mediante métodos bien conocidos de la técnica, tales como el programa HLA Binding Predictions proporcionado por la Bioinformatics & Molecular Analysis Section (BIMAS) del National Institutes of Health (NIH) en el sitio de internet del NIH.
- 10 Las composiciones de ADN de la presente invención estimulan la formación de LTC que son activos contra los macrófagos asociados a tumor que expresan la endopeptidasa. Dichos macrófagos asociados a tumor son la diana selectivamente de los LTC que se producen en respuesta a la inmunización con las composiciones de ADN de la invención. La eliminación o anulación de los MAT modifica el microambiente tumoral, resultando en la supresión del crecimiento tumoral y las metástasis tumorales.
- 15 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "inmunidad" se refiere a la protección inmunitaria a largo plazo frente a la forma virulenta del agente infeccioso o antígeno tumoral. El término "inmunización" se refiere a la exposición a un antígeno de un agente patológico derivado de una fuente no virulenta, que resulta en inmunidad frente al patógeno en el sujeto tratado.
- 20 Un constructo de ADN útil en una composición de ADN indicada en la presente memoria preferentemente comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende legumaína (por ejemplo legumaína humana) o fragmentos inmunógenos de legumaína, y que se encuentra operablemente ligado a elementos reguladores necesarios para la expresión génica en células inmunitarias. En una forma de realización preferida, el
- 25 constructo de ADN codifica una proteína legumaína humana de longitud completa (SEC ID nº 2) o un polipéptido que comprende un elevado grado de homología, de por lo menos aproximadamente 80%, con la misma (por ejemplo la legumaína porcina, la legumaína de ratón, y similares) o un fragmento inmunógeno de la misma, y que puede inducir una respuesta inmunitaria contra células que sobreexpresan legumaína.
- 30 En una forma de realización particularmente preferida, el constructo de ADN comprende un minigén codificante de 2 a 5 fragmentos inmunógenos de la legumaína (por ejemplo la legumaína humana) unidos mediante péptidos conectores de tres aminoácidos (por ejemplo AAA o AAY) con un péptido conector entre cada fragmento inmunógeno.
- 35 Entre los constructos de ADN útiles, incluyendo los constructos de minigén, preferentemente se incluyen elementos reguladores necesarios para la expresión de nucleótidos. Entre dichos elementos se incluyen, por ejemplo, un promotor, un codón de inicio, un codón de parada y una señal de poliadenilación. Además, con frecuencia se requieren intensificadores para la expresión de una secuencia que codifica una proteína diana inmunogénica. Tal como es conocido de la técnica, dichos elementos preferentemente se encuentran ligados operablemente a la
- 40 secuencia que codifica la proteína deseada. Preferentemente se seleccionan elementos reguladores que son operables en las especies en las que deben administrarse. Preferentemente, el constructo de ADN se encuentra en forma de un plásmido o se incorpora en un vector vírico o bacteriano. El constructo de ADN codificante de legumaína inicialmente puede incorporarse en un vector bacteriano mediante transfección, utilizando métodos bien conocidos de la técnica. A continuación, las bacterias transformadas pueden cultivarse para proporcionar una
- 45 reserva preparada de bacterias, que incluye ADN de legumaína en el material genético de las bacterias. Los cultivos de dichas bacterias transformadas proporcionan una fuente disponible para las composiciones de ADN de la presente invención.
- 50 Los codones de inicio y los codones de parada preferentemente se incluyen como parte de una secuencia de nucleótidos que codifica la endopeptidasa o polipéptido inmunógeno en una composición de ADN de la presente invención. Los codones de inicio y de terminación deben encontrarse en el mismo marco que la secuencia codificante.
- 55 Los promotores y señales de poliadenilación incluidos en una composición de la presente invención preferentemente se seleccionan para ser funcionales dentro de las células del sujeto que debe inmunizarse.
- Entre los ejemplos de promotores útiles en las composiciones de la presente invención, especialmente en la producción de una composición de DAN de vacuna genética para el ser humano se incluyen, aunque sin limitación, los promotores del virus 40 del simio (SV40), el promotor del virus del tumor mamario de ratón (VTMR), el promotor del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tal como la repetición terminal larga (RTL) del VIH, el virus de Moloney, el citomegalovirus (CMV), tal como el promotor temprano inmediato del CMV, el virus de Epstein Barr (VEB), el virus del sarcoma de Rous (VSR), así como promotores de genes humanos, tales como la actina humana, la miosina humana, la hemoglobina humana, la creatina muscular humana y la metalotioneína humana.
- 60
- 65 Entre los ejemplos de señales de poliadenilación útiles en las composiciones de ADN de la presente invención, especialmente en la producción de una composición de ADN para el ser humano, se incluyen, aunque sin limitación,

señales de poliadenilación de SV40 y señales de poliadenilación de RTL.

Además de los elementos reguladores requeridos para la expresión del ADN, también pueden incluirse otros elementos en la molécula de ADN. Entre dichos elementos adicionales se incluyen intensificadores. El intensificador puede ser, por ejemplo, actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana e intensificadores víricos, tales como los del CMV, el VSR y el VEB.

Las secuencias reguladoras y codones generalmente son dependientes de la especie, de manera que con el fin de maximizar la producción de proteína, las secuencias reguladoras y codones preferentemente se seleccionan para que resulten eficaces en la especie que debe ser inmunizada. El experto ordinario en la materia podrá producir constructos de ADN que sean funcionales en una especie sujeta dada.

Los constructos de ADN útiles en las presentes composiciones pueden ser de ADN "desnudo", tal como se define en Restifo et al., Gene Therapy 7:89-92, 2000. Preferentemente, el constructo de ADN se encuentra en forma de un plásmido o ADN que se incorpora en el material genético de un virus atenuado o bacteria atenuada. Entre los vehículos o portadores de administración útiles se incluyen microcápsulas biodegradables, complejos inmunoestimuladores (ISCOM) y liposomas para constructos de ADN desnudo y diversos tampones fisiológicamente aceptables para virus o bacterias vivos atenuados manipulados genéticamente.

Entre los ejemplos de vectores bacterianos vivos atenuados adecuados que pueden transformarse para incorporar un constructo de ADN FAP se incluyen *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, especies de *Shigella*, especies de *Bacillus*, especies de *Lactobacillus*, *Bacille Calmette-Guerin* (BCG), *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, especies de *Campylobacter*, especies de *Listeria* o cualquier otro vector bacteriano adecuado, tal como es conocido de la técnica. Preferentemente, el vector es un vector *Salmonella typhimurium* vivo atenuado, particularmente en el caso de que la composición esté destinada a la administración oral. Entre las *Salmonella typhimurium* vivas atenuadas preferidas se incluyen las cepas AroA-, tales como SL7207, o las cepas doblemente atenuadas AroA- *dam*-, tal como RE88.

Los métodos de transformación de vectores bacterianos vivos con un constructo de ADN exógeno se encuentran bien descritos en la técnica. Ver, por ejemplo, Joseph Sambrook y David W. Russell, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001 (Sambrook y Russell). Tras la transformación, el material genético exógeno se incorpora en el material genético de la bacteria, de manera que las bacterias se reproducen y el ADN exógeno se replica conjuntamente con el ADN nativo del organismo. De esta manera, una vez se ha transformado la bacteria, los procesos de reproducción normales del organismo proporcionan un fácil suministro del ADN exógeno.

Entre los vectores víricos preferidos se incluyen bacteriófagos, virus herpes, adenovirus, virus adenoasociados, virus Sindbis, virus polio, virus Vaccinia y virus de la viruela aviar. Los métodos de transformación de vectores víricos con un constructo de ADN exógeno también se encuentran bien descritos en la técnica. Ver Sambrook y Russell, anteriormente.

Las vesículas unilamelares o multilamelares son vehículos liposomas portadores útiles, que presentan una porción de membrana formada de material lipofílico y una porción acuosa interior. La porción acuosa se utiliza para contener el material polinucleótido que debe administrarse en la célula diana. Resulta generalmente preferido que los materiales formadores de liposoma presenten un grupo catiónico, tal como un grupo de amonio cuaternario, y uno o más grupos lipofílicos, tales como grupos alquilo saturados o insaturados que presentan entre aproximadamente 6 y aproximadamente 30 átomos de carbono. Se describe un grupo de materiales adecuados en la publicación de patente europea nº 0187702, y se comenta adicionalmente en la patente US nº 6.228.844 de Wolff et al. Se describen en la literatura muchos otros compuestos de lípido catiónico formadores de liposoma adecuados. Ver, por ejemplo, L. Stamatatos et al., Biochemistry 27:3917-3925, 1988, y H. Eibl et al., Biophysical Chemistry 10:261-271, 1979. Alternativamente, puede utilizarse una microesfera, tal como una microesfera biodegradable de poliláctido-coglicólido. Se encapsula o de otro modo, se acompleja, un constructo de ácidos nucleicos con el liposoma o microesfera para la administración del ácido nucleico en un tejido, tal como es conocido de la técnica.

Entre otros vehículos portadores útiles se incluyen microesferas poliméricas que comprenden materiales poli(ortoéster) biodegradables, tal como se indica en Wang et al., Nat. Mater. 3(3):190-6, 2004. Epub. 15 de feb., 2004.

Preferentemente, las composiciones de ADN comprenden constructos de ADN que comprenden fragmentos inmunógenos de legumina humana o un homólogo funcional de la misma. Los homólogos funcionales de la legumina preferentemente comparten una identidad de secuencia de residuos aminoácidos de por lo menos aproximadamente 80% con la legumina humana, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 90%, todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 95%, respecto a la legumina humana.

GenBank es una base de datos de secuencias genéticas del National Institutes of Health (NIH), que es una colección anotada de todas las secuencias de ADN disponibles públicamente. GenBank es parte de la International

Nucleotide Sequence Database Collaboration, un esfuerzo combinado del DNA DataBank of Japan (DDBJ), el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (LEBM) y el GenBank en el National Center for Biotechnology Information.

La secuencia de ácidos nucleicos de un ácido nucleico codificante de la legumaína humana, SEC ID nº 1 (figura 8) ha sido publicada en GenBank nº de acceso BC026250. La secuencia de residuos aminoácidos correspondiente de la legumaína humana es SEC ID nº 2 (figura 9).

La secuencia de ácidos nucleicos de un ADN codificante de la legumaína murina, SEC ID nº 3, se muestra en la figura 10. La secuencia de residuos aminoácidos correspondiente de la legumaína murina es SEC ID nº 4 (figura 11).

Chen et al., J. Biological Chem. 272(12):8090-8098, 1997, han informado de la estructura y caracterización de la legumaína porcina, que presenta una identidad de secuencia de aproximadamente 83 por ciento respecto a la legumaína humana.

Debido a la degeneración inherente del código genético, pueden utilizarse en la práctica de la invención otras secuencias de ADN que codifican la secuencia de aminoácidos de la legumaína humana. Entre dichas secuencias de ADN se incluyen las que también son capaces de hibridarse con la legumaína humana.

Entre las secuencias de ADN que codifican la legumaína humana y que pueden utilizarse según la invención, se incluyen ácidos nucleicos que presentan delecciones, adiciones o sustituciones de diferentes residuos nucleótidos respecto a los presentes en SEC ID nº 1, que resultan en una secuencia que codifica el mismo producto génico de legumaína. Las moléculas de ADN codificantes de homólogos funcionalmente equivalentes de la legumaína humana también pueden utilizarse en las composiciones de ADN de la presente invención.

El producto génico codificado por el ácido nucleico también puede contener delecciones, adiciones o sustituciones de residuos aminoácidos dentro de la secuencia de residuos aminoácidos de la legumaína, que resultan en un cambio silencioso, produciendo de esta manera una legumaína funcionalmente equivalente. Dichas sustituciones de aminoácidos pueden realizarse basándose en las similitudes de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, entre los aminoácidos cargados negativamente se incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico; entre los aminoácidos positivamente cargados se incluyen lisina y arginina; los aminoácidos con grupos de cabeza polar no cargados que presentan valores de hidrofiliidad similares se incluyen los siguientes: leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Tal como se utiliza en la presente memoria, una legumaína funcionalmente equivalente se refiere a una proteína que incluye uno o más epítopos, que al ser reconocidas por las células T, permiten a estas mismas células T reconocer los epítopos de legumaína expresados sobre las células expuestas de legumaína. En formas de realización preferidas, una legumaína funcionalmente equivalente presenta una secuencia de residuos aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 80% respecto a la secuencia de residuos aminoácidos de la legumaína humana (SEC ID nº 2), por ejemplo una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 90%, o una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 95%.

Los constructos de ADN codificantes de legumaína pueden manipularse con el fin de alterar la secuencia codificante de legumaína (respecto al ADN de legumaína nativa, SEC ID nº 1) para una diversidad de fines, incluyendo, aunque sin limitación, alteraciones que modifican el procesamiento y la expresión del producto génico de legumaína. Por ejemplo pueden introducirse mutaciones en el ADN utilizando técnicas que son bien conocidas, por ejemplo la mutagénesis dirigida a sitio, para insertar nuevos sitios de restricción, para alterar los patrones de glucosilación, fosforilación, etc.

En una forma de realización preferida, la composición de ADN de la invención comprende un constructo de ADN codificante de un polipéptido inmunógeno que comprende una pluralidad de fragmentos inmunógenos de legumaína humana y un constructo de ADN operablemente codificante de por lo menos una proteína efectora inmunitaria, ambas expresables en células inmunitarias. Tal como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, la expresión "proteína efectora inmunitaria" se refiere a una proteína que participa en la regulación de una ruta del sistema inmunitario. Preferentemente, la proteína efectora inmunitaria es una citocina.

Las citocinas son proteínas y polipéptidos producidos por células que pueden afectar al comportamiento de otras células, tal como la proliferación celular, la diferenciación celular, la regulación de las respuestas inmunitarias, la hematopoyesis y las respuestas inflamatorias. Las citocinas han sido clasificadas en varias familias, incluyendo quimiocinas, hematopoyetinas, inmunoglobulinas, factores de necrosis tumoral y una diversidad de moléculas no asignadas. Ver generalmente el Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, edición revisada, Oxford University Press, 2000, y C.A. Janeway, P. Travers, M. Walport y M. Schlomchik, Immunobiology, quinta edición, Garland Publishing, 2001 (en lo sucesivo, "Janeway y Travers"). Se presenta una clasificación breve de las citocinas en Janeway y Travers, apéndice III, páginas 677 a 679.

Entre las hematopoyetinas se incluyen, por ejemplo, la eritropoyetina, la interleuquina-2 (IL-2, una proteína de 133

aminoácidos producida por las células T y que participa en la proliferación de las células T), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-13, IL-15 (una proteína de tipo IL-2 de 114 aminoácidos, que estimula el crecimiento del epitelio intestinal, las células T y las células NK), el factor estimulante de colonias de granulocitos (FEC-G), el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (FEC-GM), la oncostatina M (OSM) y el factor inhibidor de la leucemia (FIL).

Entre los interferones se incluyen, por ejemplo, IFN- α , IFN- β e IFN- γ (una proteína homodimérica de 143 aminoácidos producida por las células T y las células NK, que participa en la activación de los macrófagos, una expresión incrementada de las moléculas del CMH y componentes de procesamiento de antígenos, intercambio de clase de Ig y supresión de TH2).

Entre las inmunoglobulinas se incluyen, por ejemplo, B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), las cuales coestimulan las respuestas de células T.

La familia del factor de necrosis tumoral (FNT) incluye, por ejemplo, FNT- α , FNT- β (linfotoxina), la linfotoxina- β (LT- β), ligandos de CD40, ligando Fas, ligando de CD27, ligando de CD30, ligando de 4-1BB, Trail y ligando de OPG.

Las funciones biológicas del ligando de CD40 (CD40L), en particular su interacción con CD40 expresado sobre las células presentadoras de antígeno durante la coestimulación de la activación de las células T, son bien conocidas de la técnica. CD40 es una glucoproteína de 48 kDa que se expresa sobre la superficie de todas las células B maduras, la mayoría de las neoplasias malignas de células B maduras y en algunas leucemias linfocíticas agudas de células B tempranas, pero no se expresa sobre las células plasmáticas; Clark, *Tissue Antigens* 35:33-36, 1990. CD40L, una proteína membranal de tipo II de aproximadamente 35 kDa, se expresa sobre la superficie de las células T al reconocer un antígeno. Los elementos de la familia del TNF son biológicamente más activos al expresarse en forma de homotrímeros. CD40L no es ninguna excepción a este respecto y puede expresarse como homotrímero (CD40LT) mediante modificación de un motivo de cremallera de leucinas de 33 aminoácidos fusionado con el extremo N-terminal del dominio extracelular completo de dicho ligando. Gurunathan et al., *J. Immunol.* 161:4563, 1998, ha informado de que el ADN de CD40LT incrementa las respuestas inmunitarias celulares, tales como la inducción de IFN- γ y la actividad de las células T citotóxicas al vacunar ratones con ADN codificante del antígeno β -galactosidasa de modelo altamente inmunógeno.

El CD40LT es un factor importante en la activación de las células T necesario para inducir una inmunidad protectora eficaz contra los autoantígenos tumorales. Una vez los complejos de antígeno del CMH de clase I:péptido son incorporados por las células dendríticas (CD) y presentados a las células T no expuestas, se envía la primera señal de antígeno a través de los receptores de las células T (RCT), seguido de la regulación positiva de CD40LT. Sobre la superficie de las células T, seguidamente CD40LT induce una actividad coestimuladora de las CD a través de interacciones CD40-CD40LT. Sensibilizadas de esta manera, estas células presentadoras de antígeno pueden expresar las moléculas coestimuladoras B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), que envían una segunda señal coestimuladora a las células T a través de la interacción con CD28, un suceso necesario para la activación completa de las células T para producir concurrentemente las citocinas proinflamatorias INF- γ e IL12, y llevar a cabo funciones efectoras.

Entre las diversas citocinas que no han sido asignadas a una familia particular se incluyen, por ejemplo, el factor β de crecimiento tumoral (FCT- β), IL-1 α , IL-1 β , IL-1 RA, IL-10, IL-12 (factor estimulante de las células asesinas naturales; un heterodímero que presenta una cadena de 197 aminoácidos y una cadena de 306 aminoácidos, que participa en la activación de las células NK y en la inducción de la diferenciación de las células T en células de tipo TH1), el factor inhibidor de macrófagos (FIM), IL-16, IL-17 (un factor inductor de la producción de citocinas, que induce la producción de citocinas en epitelios, endotelios y fibroblastos) e IL-18.

Las quimiocinas son una familia de citocinas que son proteínas y polipéptidos quimioatrayentes relativamente pequeños, que estimulan la migración y activación de diversas células, tales como la migración de los leucocitos (por ejemplo fagocitos y linfocitos). Las quimiocinas desempeñan un papel en la inflamación y en otras respuestas inmunitarias. Las quimiocinas han sido clasificadas en varias familias, entre ellas las quimiocinas C, las quimiocinas CC, las quimiocinas CXC y las quimiocinas CX3C. Los nombres se refieren al número y espaciado del residuo o residuos de cisteína en las moléculas; las quimiocinas C presentan una cisteína, las quimiocinas CC presentan dos cisteínas contiguas, las CXC presentan dos cisteínas separadas por un único residuo aminoácido y las quimiocinas CX3C presentan dos cisteínas separadas por tres residuos aminoácidos. Las quimiocinas interactúan con varios receptores de quimiocina presentes sobre las superficies celulares. Ver Janeway y Travers, apéndice IV, página 680.

Además, las quimiocinas pueden presentar actividad inmunomoduladora y se han relacionado en las respuestas inmunitarias contra el cáncer. Por ejemplo, la 6Cquina murina/QLS, un análogo del ratón de la quimiocina de tejido linfode secundario humano (QLS), ahora denominada comúnmente CCL21, se ha informado que induce una respuesta antitumoral en una línea celular de tumor carcinoma de colon C-26. Ver Vicari et al., *J. Immunol.* 165(4):1992-2000, 2000. La CCL21 humana y su contrapartida murina, 6Cquina/QLS, se clasifican como quimiocinas CC, que interactúan con el receptor de quimiocina CCR7. La 6Cquina/QLS murina (CCL21_{mu}) también ha sido informada por Vicari et al. como ligando para el receptor de quimiocina CXCR3. La CCL21 humana, la CCL21_{mu} murina y una diversidad de otras quimiocinas se han relacionado con la regulación de diversas células

del sistema inmunológico, tales como las células dendríticas, las células T y las células asesinas naturales (NK).

Mig e IP-10 son quimiocinas CXC que interactúan con el receptor CXCR3, que se asocia a las células T activadas. La linfotactina es una quimiocina C, que interactúa con el receptor XCR1 asociado a las células T y a las células NK. La fractalquina es una quimiocina CX3C, que interactúa con el receptor de CX3CRI que está asociado a las células T, monocitos y neutrófilos.

Entre las proteínas efectoras inmunitarias particularmente preferidas codificadas por las composiciones de ADN de la presente invención se incluyen las citocinas IL-2 (una hematopoyetina), CCL21 (una quimiocina), así como ligandos de CD40, tales como el trímero de ligandos de CD40 (CD40LT), una citocina de la familia de FNT.

Las secuencias de ADN y de proteína para la IL-2 humana han sido publicadas en GenBank, nº de acceso BC070338. Las secuencias de ADN y de proteína de la IL-2 murina se encuentran en GenBank, nº de acceso NM 008366.

La secuencia de ácidos nucleicos codificante de la IL-2 humana se presenta en la figura 12 (SEC ID nº 5) y su secuencia de residuos aminoácidos correspondiente (SEC ID nº 6) se proporciona en la figura 13.

Las secuencias de ADN y de proteína de la CCL21 humana han sido publicadas en GenBank, nº de acceso AB002409.

La secuencia de ácidos nucleicos codificante de la CCL21 humana se presenta en la figura 14 (SEC ID nº 7) y su secuencia de residuos aminoácidos correspondiente (SEC ID nº 8) se proporciona en la figura 15.

El ligando de CD40 humano (CD40L) es una proteína de 261 aminoácidos que existe en forma de un trímero (CD40LT) en su forma más activa. La secuencia de ADN codificante de la CD40L humana (también conocida como CD154) ha sido publicada en GenBank, nº de acceso NM 000074 (figura 16, SEC ID nº 9). La secuencia de proteína correspondiente de CD40L se muestra en la figura 17 (SEC ID nº 10).

Los aspectos de utilización de la presente invención implican administrar en un mamífero una composición de ADN que comprende un constructo de ADN codificante de legumaina, que es expresable en las células inmunitarias del mamífero. Preferentemente, el mamífero es un ser humano. La composición puede administrarse por vía oral, intramuscular, intranasal, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica o tópica, dependiendo de la forma de administración particular en la que se prepare la composición. Preferentemente, la composición se prepara en una forma de dosis administrable por vía oral, tal como una solución, suspensión, emulsión, cápsula, tableta y similar.

Una composición de ADN de la invención puede utilizarse para proporcionar la inhibición a largo plazo del crecimiento tumoral y/o de las metástasis tumorales en un paciente tratado con la composición. La composición de ADN puede administrarse conjuntamente con un agente quimioterápico antitumoral. La composición de ADN puede administrarse conjuntamente con el agente quimioterápico en una forma de administración combinada, o la composición y el agente quimioterápico pueden administrarse en formas de administración separadas y en intervalos de administración separados y adaptados a la farmacología del agente quimioterápico que se administra.

Entre los agentes quimioterápicos que resultan útiles en combinación con las composiciones de DAN de la presente invención se incluyen agentes antitumorales tales como doxorrubicina, paclitaxol, una ciclofosfamida, etopósido, 5-fluorouracilo, metotrexato y similares.

Las composiciones de ADN de la presente invención se formulan preferentemente con portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agua, solución salina, dextrosa, glicerol y similares, y combinaciones de los mismos para ayudar en la formulación y administración de la composición. Las composiciones pueden contener además sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, tampones y otras sustancias auxiliares que son bien conocidas en las técnicas farmacéuticas.

Las composiciones de la presente invención preferentemente se administran por vía oral en un mamífero, tal como un ser humano, como solución o suspensión en un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden administrarse a una concentración de ADN comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 microgramos por mililitro, basado en el peso de ADN que codifica la legumaina. Una forma de administración particularmente preferida para una composición de ADN es una suspensión de bacterias atenuadas transfectadas con legumaina en una solución tampón adecuada, que puede formularse para la administración oral. La dosis apropiada de la composición dependerá del sujeto que debe vacunarse, de la actividad de la composición y en parte del criterio del médico que administra o solicita la administración de la composición.

La dosis que debe administrarse en el mamífero y el programa de administración en el caso de que deba utilizarse más de una administración, variará según el mamífero y según la forma de administración. Las cantidades de administración y programas de administración eficaces pueden determinarse empíricamente mediante estudios clínicos de dosis-respuesta, tal como es bien conocido de la técnica. Las dosis y programa de administración se

seleccionan para proporcionar una cantidad suficiente de expresión de legumaína en las células inmunitarias para inducir una respuesta inmunitaria en el mamífero contra los macrófagos asociados a tumor que expresan legumaína. Preferentemente, la dosis de la composición administrada en el mamífero sujeto induce la expresión de una cantidad suficiente de antígeno legumaína en las células inmunitarias del mamífero para sostener una respuesta inmunitaria contra los macrófagos asociados a tumor presentadores de legumaína que continuará durante un periodo de por lo menos un mes, por ejemplo por lo menos 6 meses o por lo menos aproximadamente un año. En algunas formas de realización preferidas, la dosis de células transformadas con legumaína que se administra en el paciente es de aproximadamente 1×10^8 células transfectadas con aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,8 μg de ADN de legumaína.

Las composiciones de la presente invención pueden envasarse en recipientes convenientemente esterilizados, tales como ampollas, botellas o viales, en formas de administración multidosis o unitaria. Los envases preferentemente se sellan herméticamente después de rellenarse con una composición de ADN de la invención. Preferentemente, las composiciones se envasan en un recipiente que presenta una etiqueta adherida al mismo, la cual identifica la composición e incluye una notificación en una forma prescrita por una agencia gubernamental, tal como la Food and Drug Administration estadounidense, que refleja la autorización de la composición bajo la legislación apropiada, información sobre las dosis, y similares. La etiqueta preferentemente contiene información sobre la composición que resulta útil para el profesional de la salud que administra la composición en el paciente. El envase preferentemente contiene además material informativo impreso relacionado con la administración de la composición, instrucciones, indicaciones y cualesquiera advertencias requeridas necesarias.

Los ejemplos a continuación se proporcionan con el fin de ilustrar adicionalmente las características y formas de realización de la presente invención.

Materiales y métodos.

Animales, cepas bacterianas y líneas celulares. Se obtuvieron ratones BALB/c y C57BL/6 hembra, de 6 a 8 semanas de edad, de The Scripps Research Institute Rodent Breeding Facility. La cepa de *S. typhimurium* doblemente atenuada RE88 (*aroA*-, *dam*-) se obtuvo de Remedyne Corporation, Goleta, CA. La línea celular de cáncer de colon CT-26 murina fue amablemente proporcionada por Dr. I. J. Fidler (MD Anderson Cancer Center) y las células de carcinoma pulmonar de células no pequeñas D121 murina se obtuvieron del Dr. L. Eisenbach (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel). La células de carcinoma mamario 4T1 murino se obtuvieron de la Dr. Suzanne Ostrand-Rosenberg (University of Maryland).

Análisis inmunohistoquímicos. Los análisis inmunohistoquímicos se llevaron a cabo en tejidos de tumor 4T1 y secciones de tapón de Matrigel. Se identificó la expresión de legumaína de los macrófagos en secciones de tejido de tumor 4T1 con mAb anti-CD68 de ratón biotinilado (BD Bioscience Pharmingen), siendo la estreptavidina conjugada con GFP el reactivo informador secundario. Se preparó antisuero de conejo anti-legumaína mediante inmunización con legumaína humana purificada producida en *E. coli* (Ishii, Methods Enzymol. 244:604-615, 1994). La reacción se visualizó con estreptavidina conjugada con rojo Texas. Además, se fijaron secciones de tejido de tumor 4T1 y secciones de tapón de Matrigel y se tiñeron con anticuerpos de MMP-9, FCEV, FCT-beta y F4/80 (eBioscience, San Diego, CA) en sección de tejido de tumor 4T1, mientras que se utilizaron los anticuerpos de CD68 y de CD31 (BD Bioscience Pharmingen) en secciones de tapón de Matrigel. Todas las secciones de tejido se visualizaron con rojo Texas o estreptavidina conjugada con GFP como el reactivo informador secundario, y los portaobjetos se analizaron con escaneo láser mediante microscopía confocal (Bio-Rad Laboratories). Todas las imágenes se capturaron con un sistema de cámara digital color enfriado SPOTTM (Diagnostic Instruments Inc.).

Inmunización y reto de células tumorales. Modelo profiláctico: ratones BALB/c o C57BL/6, se dividieron cada uno en tres grupos experimentales ($n=8$) y se inmunizaron con PBS, vector vacío o *S. typhimurium* transfectado con pUb-legumaína. Todos los ratones se retaron mediante inyección intravenosa (i.v.) con aproximadamente 5×10^4 células CT-26 (BALB/c), aproximadamente 2×10^5 células D121 (C57BL/6) o inyección de almohadilla adiposa de glándula mamaria con aproximadamente 7×10^3 células 4T1 (BALB/c), 1 semana después de la última inmunización, con el fin de inducir metástasis pulmonares experimentales o espontáneas. Los pesos de los pulmones en los grupos experimentales y de control se determinaron 24 días después del reto de células tumorales. Modelo terapéutico: los ratones BALB/c se dividieron en tres grupos experimentales ($n=8$) y en primer recibieron una inyección en la almohadilla adiposa de aproximadamente 7×10^3 célula 4T1 el día 0 y después se inmunizaron 3 veces con la composición de ADN de la invención a partir de los días 3, 7 y 11. Tras 24 días, se extirpó el tumor primario para determinar los pesos de pulmón de los ratones y las puntuaciones de metástasis, o las tasas de supervivencia de los ratones.

Reducción *in vivo* del número de células T CD4^+ o CD8^+ . Citotoxicidad y ensayos ELISPOT. Se llevó a cabo la reducción del número de células T CD4^+ o CD8^+ *in vivo* tal como se ha indicado anteriormente (Ceredig et al., Nature 314:98-100, 1985). Se midió la citotoxicidad y se calculó mediante un ensayo estándar de liberación de ^{51}Cr tal como se ha informado anteriormente (Zhou et al., Blood 106:2026-2032, 2005). Se llevaron a cabo ensayos ELISPOT con un kit ELISPOT (BD Bioscience Pharmingen) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Ensayo de angiogénesis en Matrigel *in vivo*. Se utilizó Matrigel para evaluar la supresión de la angiogénesis tras la vacunación. Brevemente, se inyectó por vía subcutánea (s.c.) en ratones BALB/c 2 semanas después de la última vacunación, en la región esternal, Matrigel con reducción de factor de crecimiento (BD Bioscience) que contenía FCEV o bFCF-2 (aproximadamente 200 ng/tapón) y células de tumor 4T1 (aproximadamente 5×10^3 /tapón) que habían sido previamente irradiadas con 1.000 Gray (aproximadamente 100.000 rad) de radiación gamma. El endotelio se tiñó 6 días después de la implantación del Matrigel mediante inyección i.v. con lectina I de *Bandiera simplofica* (isoelectina B4), conjugada con fluoresceína (Vector Laboratories). Lo anterior se llevó a cabo conjuntamente con la tinción del endotelio de los animales de control. Aproximadamente 30 días después, se sacrificaron los ratones, se extrajeron los tapones de Matrigel y se evaluó la fluorescencia mediante fluorimetría. Además, se extrajeron los tapones de Matrigel 6 días después de la implantación del Matrigel, se fijaron en solución de Bouin durante 24 horas y después se incluyeron en parafina. Se realizaron secciones de todos los tejidos, se montaron sobre portaobjetos y se tiñeron con tinción tricrómica de Masson. Todas las imágenes se capturaron con un sistema de cámara digital color enfriada SPOT TM tal como se ha indicado anteriormente.

Citometría de flujo (FACS). Se midieron los marcadores de activación de las células T mediante análisis de citometría de flujo de dos colores con un analizador FACSCALIBUR® de BD Biosciences. Se determinaron los marcadores de las células DC mediante tinción de linfocitos recién aislados de ratones vacunados con éxito y ratones de control con anticuerpo anti-CD11c en combinación con anti-CD40 conjugado con FITC, CD80 y anticuerpos contra antígeno CMH de clase II. Los macrófagos que portaban niveles elevados de CD206 y F4/80 se cuantificaron mediante análisis de flujo de dos colores. Se aislaron las células tumorales de los ratones BALB/c vacunados con éxito y después se tiñeron con anticuerpo anti-CD206 conjugado con PE (Cell Science, Inc.), anticuerpo anti-F4/80 conjugado con APC y anticuerpo anti-legumina conjugado con FITC, seguido de análisis de FACS. Todos los anticuerpos se obtuvieron de Pharmingen, San Diego, CA. Se determinó la liberación de IFN- γ al nivel intracelular en linfocitos de los parches de Peyer obtenidos 3 días después la inmunización de una vez y se tiñeron con anticuerpo anti-CD8 etiquetado con APC. Se fijaron las células, se permeabilizaron y posteriormente se tiñeron con anticuerpo anti-IFN- γ etiquetado con APC para detectar la expresión intracelular de IFN- γ .

Ensayo de migración. Se llevaron a cabo ensayos de migración celular mediante la utilización de cámaras de Boyden modificadas (Transwell, Corning Inc., Corning, NY). Se recolectaron las células tumorales del tejido tumoral de grupos tratados o de control de ratones para llevar a cabo un ensayo de migración transpocillo. Tras cultivar durante 4 horas, las células sobre la superficie inferior de los pocillos se fijaron con paraformaldehído al 1%, se tiñeron con cristal violeta al 1% y se contaron (Shi et al., Mol. Cancer Res. 2:395-402, 2004).

Análisis estadísticos. Se determinó la significancia estadística de los resultados diferenciales en grupos experimentales y controles utilizando pruebas t de Student. Los resultados se consideraron significativos en el vaso de que los valores de P de dos colas fuesen $<0,05$. Se utilizó el análisis de Kaplan-Meier para evaluar la supervivencia de los ratones.

Ejemplo 1

Construcción de vectores, expresión de proteínas y transformación de *S. typhimurium* con plásmidos de ADN. Se prepararon dos constructos basados en un vector pCMV, que se encuentra disponible comercialmente de Invitrogen, Carlsbad, CA. El constructo pUb-legumina incluía legumina murina de longitud completa poliubiquitinada. El ADN de legumina murina de longitud completa presenta la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 10, SEC ID nº 3 (la secuencia de residuos aminoácidos de la legumina murina se muestra en la figura 11, SEC ID nº 4). A modo de control se utilizó un constructo de vector vacío. Se recolectó la legumina murina a partir de células de cáncer mamario 4T1 utilizando ARN total como molde mediante PCR. Se estableció un vector de expresión basado en el vector pCMV-cyto (Invitrogen) que contenía la secuencia poliubiquitinada clonada delante de la secuencia de la legumina. La secuencia de ácidos nucleicos de la legumina murina poliubiquitinada se muestra en la figura 18 (SEC ID nº 11). La secuencia de residuos aminoácidos de la legumina murina ubiquitinada se muestra en la figura 19 (SEC ID nº 12). La expresión proteica de legumina se demostró mediante transferencia western con un anticuerpo policlonal de conejo anti-legumina murina, así como un anticuerpo anti-beta-actina murina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) como control de carga. Se detectó la proteína específica con un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con PRP (Bio-Red Laboratories). Se transdujo *Salmonella typhimurium* atenuada con plásmidos de vacuna de ADN mediante electroporación tal como se indica en Luo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100:8850-8855, 2003, y Xiang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:5492-5497, 2000.

Ejemplo 2

Fragmentos de legumina murina inmunógenos. Se prepararon dos plásmidos, comprendiendo cada uno un minigén de legumina codificante de tres fragmentos de legumina inmunógenos unidos entre sí mediante un espaciador de tres aminoácidos (AAY) entre cada fragmento, mediante la inserción del minigén de legumina en un plásmido MCS pCMV/myc/ER, que se encuentra disponible comercialmente de Invitrogen, Carlsbad, CA (ver las figura 20 y 21). El vector incluye un segmento codificante de un péptido de señal del RE, un epítipo myc y una señal de retención en el RE (ver la figura 21). La inserción del minigén se llevó a cabo entre un sitio BssH II en el segmento péptido de señal del RE y un sitio Xho I, tal como se muestra en la figura 21. El primer plásmido de minigén de legumina (pCMV-

Db/Db, también denominado pH-2Dd en las figuras) comprende un espaciador AAY, el fragmento de legumaína inmunógeno legu₁₃₇, un espaciador AAY, el fragmento de legumaína inmunógeno legu₂₃₈, un espaciador AAY, un fragmento de legumaína inmunógeno legu₂₂₃. El segundo plásmido de minigén de legumaína (pCMV-Kb/Kd, también denominado pH-2Kd en las figuras) comprende un espaciador AAY, el fragmento de legumaína inmunógeno legu₄₀₅, un espaciador AAY, el fragmento de legumaína inmunógeno legu₁₈₀, un espaciador AAY, y el fragmento de legumaína inmunógeno legu₂₂₉. La figura 20 muestra las secuencias de residuos aminoácidos de los fragmentos de legumaína inmunógenos, así como las puntuaciones de unión al CMH de clase I y el número de identificador de secuencia (SEC ID nº) para cada fragmento. Se verificó la expresión de los péptidos mediante transferencia western de las células COS-7 transfectadas con anticuerpo monoclonal anti-myc (Invitrogen). Tras verificar la expresión de los péptidos, se introdujo un codón de parada inmediatamente delante de las secuencias del epítipo myc del vector. Cada uno de los vectores plásmido de minigén resultantes (pCMV-Db/Dd y pCMV-Kb/Kd) se verificó mediante secuenciación de los nucleótidos y después se transfectó en bacterias *S. typhimurium* RE88 atenuadas mediante electroporación, proporcionando composiciones de ADN de la invención codificantes de minigenes de legumaína. Tal como se indica en detalle posteriormente, estas composiciones resultaron eficaces para atacar el carcinoma mamario 4T1 y D2F2 en ratones Balb/c. La respuesta protectora tumoral observada estaba mediada por células T CD8, que eliminaron específicamente las células macrófagos asociadas a tumor legumaína⁺, resultando en una marcada supresión de la angiogénesis tumoral.

Inmunización oral y reto de células tumorales. Se trataron grupos de ratones BALB/c (n=8) 3 veces a intervalos de 1 semana mediante sonda oral con 100 µl de PBS que contenía aproximadamente 5x10⁸ UFC de *S. typhimurium* doblemente atenuado que incluían vector vacío, el plásmido pCMV-Db/Dd o el plásmido pCMV-Kb/Kd. Los ratones se retaron i.v. o s.c. con líneas celulares de carcinoma D2F2 dos semanas antes del último tratamiento.

Ensayo de citotoxicidad. Se midió la citotoxicidad mediante un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cr tal como se ha indicado anteriormente. Se calculó el porcentaje de lisis de células diana específicas mediante la fórmula [(E-S)/(T-S)] x 100, en la que E es la liberación experimental promedio, S es la liberación espontánea promedio y T es la liberación total promedio.

Ensayo ELISPOT. Se recolectaron esplenocitos 2 semanas después del reto de células tumorales D2F2 de todos los grupos experimentales de ratones BALB/c y se cultivaron durante 24 horas con células 4T1 irradiadas (1.000 Gy) o con células 4T1 obtenidas de tejido de tumor mamario 4T1 recién recolectado. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (BD Bioscience, San Jose, CA).

Evaluación de la actividad antiangiogénica. Se determinó la supresión de la angiogénesis mediante el ensayo de Matrigel indicado anteriormente. Se determinó el crecimiento de los vasos en el Matrigel mediante la medición de la concentración de hemoglobina utilizando reactivo de Drabkin (solución acuosa que contiene 1 g/l de NaHCO₃, 0,05 g/l de KCN y 0,2 g/l de K₃Fe(CN)₆). Se extrajeron los tapones de Matrigel 6 días después de la implantación del Matrigel, se fijaron en solución de Bouin (15 partes p/p en ácido pícrico acuoso saturado, 5 partes p/p de formalina acuosa al 37% y 1 parte p/p de ácido acético glacial) durante 24 horas, y se incluyeron en parafina. Se realizaron secciones de todos los tejidos, se montaron sobre portaobjetos y se tiñeron con la tinción tricrómica de Masson. Todas las imágenes se capturaron mediante un sistema de cámara digital color enfriada SPOTTM. Utilizando el enfoque de minigenes de la presente invención, las composiciones de ADN de minigén anti-MAT de ratones BALB/c singénicos suprimieron tanto el crecimiento tumoral como la angiogénesis. Se evaluaron seis péptidos inmunógenos de la legumaína como minigenes restringidos por H-2Dd-1,2,3 o H-2Kd-1,2,3, basándose en la predicción de unión de dichas moléculas de antígeno del CMH de clase I por el programa de predicción de unión de péptidos a HLA proporcionado por la Bioinformatics & Molecular Analysis Section (BIMAS) en el sitio de internet del NIH. Las secuencias de aminoácidos de dichos péptidos y las actividades de unión de los mismos, tal como las predice el software DNASTAR® (DNASTar, Inc., Madison, WI), se listan en la figura 20.

La vacuna de minigén pCMV-Kb/Kd protege a ratones frente al reto de células de tumor mamario D2F2 y evita la metástasis pulmonar. Inicialmente, las composiciones de minigén de ADN se sometieron a ensayo en un modelo de carcinoma mamario profiláctico, en el que los ratones fueron vacunados en primer lugar con la composición de minigén y después se retaron s.c. con células de carcinoma mamario D2F2 murinas (figura 22). Se observó una inhibición marcada del crecimiento tumoral en ratones BALB/c singénicos vacunados con pCMV-Kb/Kd, pero no con pCMV-Db/Dd. En contraste, todos los ratones vacunados con sólo el control de vector vacío revelaron un rápido crecimiento tumoral s.c.

La vacuna de minigén de legumaína pCMV-Kb/Kd suprimió la metástasis de D2F2 pulmonar mediante el ataque a los MAT, tal como indica la marcada inhibición de las metástasis experimentales observada en ratones BALB/c retados mediante inyección i.v. de células de carcinoma mamario D2F2 2 semanas después de la tercera vacunación. En contraste pCMV-Db/Dd no evitó las metástasis en este modelo. Los ratones vacunados con sólo el control de vector vacío revelaron un crecimiento de tumor pulmonar metastásico rápido y uniforme (figura 23).

La vacuna de minigén induce una respuesta de LTC que es capaz de eliminar las células legumaína⁺. Con el fin de delimitar la respuesta de células T específica alcanzada tras las vacunaciones de minigén, se demostró la activación de las células T mediante la liberación específica de IFN-γ por células T activadas (figura 24, panel B). Estas células

se estimularon con células recolectadas de tejido de tumor 4T1 fresco que expresada a nivel elevado legumaína, tal como indicaba el análisis de citometría de flujo (figura 24, Panel A). Resulta importante que los ensayos de citotoxicidad demostraron claramente una actividad de LTC marcada únicamente en los ratones inmunizados. Las células diana eran células de la línea celular de macrófagos murinos RAW, que había sido cultivada con las citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 para inducir la expresión de la legumaína. Lo anterior también se verificó mediante análisis de transferencia western (figura 25, Panel A, en el que se demostró que las células RAW de tipo salvaje eran negativas para legumaína. Los esplenocitos aislados a partir de los ratones de control tratados con vector vacío mostraron una eliminación de fondo similar de las células RAW, positivas o negativas para la expresión de legumaína (figura 25, Panel B). Sin embargo, los esplenocitos de los ratones tratados con pCMV-Kb/Kd indujeron una eliminación significativamente más fuerte de las células diana legumaína⁺ que contra células recolectadas de ratones tratados con pCMV-Db/Db o con el vector vacío (figura 25, Panel B). Estos datos demuestran la especificidad de la actividad de LTC inducida por el minigén pCMV-Kb/Kd y su capacidad para eliminar específicamente los macrófagos legumaína⁺.

La vacuna de minigén pCMV-Kb/Kd induce efectos antiangiogénesis. Con el fin de evaluar el grado en que la antioangiogénesis desempeña un papel clave en la protección tumoral inducida por la vacuna pCMV-Kb/Kd, se llevaron a cabo ensayos de Matrigel en los que se indujo la formación de vasos sanguíneos dentro del Matrigel por el FCF_b. La diferencia en la formación de vasos entre los diversos grupos de tratamiento se cuantificó midiendo la concentración relativa de hemoglobina (Hb) en los extractos de los tapones de Matrigel obtenidos de ratones inmunizados o ratones de control. De esta manera, los ratones tratados con la vacuna pCMV-Kb/Kd mostraron una clara reducción de la concentración relativa promedio de Hb (figura 26, Panel A). Además, al analizar secciones de Matrigel obtenidas de ratones inmunizados y de control mediante tinción tricrómica de Masson, las obtenidas de los ratones en el grupo de control de vector vacío relevaban múltiples vasos sanguíneos amplios. En contraste, los vasos sanguíneos se observaron marcadamente reducidos en las secciones de Matrigel de los ratones tratados con pCMV-Kb/Kd (figura 26, Panel B). Estos datos demuestran que la inmunización con la vacuna pCMV-Kb/Kd resultó en la reducción de la vasculatura tumoral. Conjuntamente, estos resultados indican que la composición de minigén pCMV-Kb/Kd indujo marcados efectos antiangiogénicos, los cuales ayudaron en la protección de los ratones BALB/c frente a los retos de células de tumor mamario D2F2 en un contexto profiláctico.

En experimentos independientes con células de carcinoma de células no pequeñas D121 en ratones C57/BL singénicos, tanto la composición de pCMV-Kb/Kd como la de pCMV-Db/Dd proporcionaron respuestas inmunitarias eficaces anti-MAT.

Comentario.

La legumaína sirve de diana para eliminar los MAT sobreexpresados durante la progresión tumoral. Es bien conocido que los MAT desempeñan un papel importante en la progresión tumoral y la metástasis. Por lo tanto, la utilización como diana de estos macrófagos M2 representa una nueva estrategia antitumoral. La legumaína ha sido identificada inicialmente como una molécula marcadora significativa de los MAT debido a su elevado nivel de expresión sobre dichas células en el microambiente tumoral y estroma. Los MAT han sido aislados a partir de tejido de tumor mamario 4T1 murino. La citometría de flujo (FACS) ha demostrado que la legumaína se expresa a nivel elevado sobre macrófagos M2 dobles positivos CD206 y F4/80, especialmente en comparación con los macrófagos M1 normales en el bazo (figura 1, Panel B). Este resultado también ha sido confirmado mediante análisis inmunohistoquímicos que indican que los MAT podían visualizarse mediante tinción de H/E y la sobreexpresión de la legumaína ha sido indicada adicionalmente por la doble tinción con anticuerpo anti-legumaína (Ab) (verde) en combinación con anticuerpo anti-CD68 (rojo) (figura 1, Panel A). Estos datos demuestran que los MAT infiltrantes son una subpoblación celular desproporcionadamente grande en el tejido tumoral 4T1 y que la legumaína es una diana potencialmente eficaz para eliminar los MAT.

La inducción de la expresión de la legumaína sobre los MAT por las citocinas Th2. Una línea celular de macrófagos murinos, RAW, cocultivada con dichas citocinas, ha sido utilizada para evaluar el grado en que la expresión de la legumaína sobre los MAT resulta inducida por las citocinas Th2, tales como IL-4, IL-10 e IL-13. Se ha observado un incremento significativo de la expresión CD206⁺, F4/80⁺ por estas células RAW, concurrentemente con una regulación positiva de la legumaína (figura 1, Panel C). Estos resultados han sido confirmados mediante transferencia western (figura 1, Panel D). No se han encontrado pruebas de la expresión de legumaína por las líneas celulares tumorales al cultivarlas con estas mismas citocinas. Estos resultados indican que las citocinas Th2, tales como IL-4, IL-10 e IL-13, son liberadas por las células tumorales y otras células estromales tumorales y que se acumulan en el microambiente tumoral. En este ambiente, las citocinas pueden inducir potencialmente la proliferación y transformación de los macrófagos M1 a una población con el fenotipo M2, que sobreexpresa legumaína.

La utilización como diana de los MAT suprime la progresión tumoral. El crecimiento y metástasis de los tumores están altamente coordinados con la presencia de los MAT y por lo tanto la utilización como diana de esta subpoblación de macrófagos conduce a la supresión del crecimiento tumoral y las metástasis. Se preparó un vector de expresión para una composición de ADN codificante de legumaína para inducir una respuesta inmunitaria contra dichos MAT. Se transfectaron bacterias *Salmonella typhimurium* atenuadas (cepa RE88) con un vector plásmido

codificante de legumaína con el fin de proporcionar un vehículo de administración para el ADN de la legumaína en las células inmunitarias. Se preparó una composición de control mediante la incorporación de un vector plásmido vacío en la misma cepa de bacterias atenuadas. La figura 2, Panel A, ilustra esquemáticamente un mapa de construcción del vector basado en el esqueleto del vector pCMV/myc/cyto, que incorpora ADN codificante de legumaína. El gen codificante de legumaína se fusionó con el extremo C-terminal de la poliubiquitina mutante (pLegumaína) para mejorar el procesamiento de antígenos en el proteasoma. A continuación, se insertó el fragmento completo entre los sitios de restricción PstI y NotI del plásmido. Se demostró la expresión de legumaína mediante transferencia western. En un contexto tanto profiláctico como terapéutico, la reducción del número de MAT utilizando una composición de ADN basada en legumaína de la presente invención inhibió eficazmente las metástasis espontáneas del cáncer de mama 4T1 y las metástasis de carcinomas de pulmón de células no pequeñas D121 y de colon CT26 en modelos de ratón.

En el contexto profiláctico, se inmunizaron ratones C57BL/6J tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, grupo de control 1), *S. typhimurium* atenuadas que incorporaban el vector vacío (grupo de control 2) o una composición de ADN de la invención (*S. typhimurium* atenuada transfectadas con pLegumaína; grupo de tratamiento). Una semana después de la última inmunización, estos ratones recibieron un reto por vía intravenosa (i.v.) de aproximadamente 2×10^5 células de tumor pulmonar de células no pequeñas D121. Aproximadamente 24 días después, se midieron y se analizaron las metástasis pulmonares. En los dos grupos de control, el peso pulmonar promedio era significativamente superior al del grupo de tratamiento (figura 2, Panel B). Se obtuvieron resultados similares en el modelo de tumor de colon CT26 y en el modelo de cáncer de mama 4T1 en ratones BALB/c singénicos (figura 2, Panel B).

En un contexto terapéutico, más exigente, en primer lugar se retaron ratones BALB/c con células de cáncer de mama 4T1 y después se inmunizaron tres veces con la composición de ADN a base de pLegumaína (grupo de tratamiento), PBS (control) o una composición de vector vacío (control), tal como se ha indicado anteriormente. Doce días después del reto con células de tumor 4T1, se extirpó quirúrgicamente el tumor primario. La curva de duración de vida de los grupos de control y de tratamiento indica que el 75% (6/8) de los ratones inmunizados con pLegumaína sobrevivió durante 3 meses. En contraste, todos los ratones en los grupos de control murieron dentro del primer mes (figura 2, Panel C). Estos datos indican que las composiciones de ADN basadas en legumaína de la presente invención suprimieron eficazmente el crecimiento de las células tumorales y las metástasis en los modelos de ratón de cáncer de mama 4T1, cáncer de pulmón de células no pequeñas D121 y carcinoma de colon CT-26. En combinación con la cirugía, este tratamiento efectivamente podría extender significativamente la duración de vida de los ratones mediante la inhibición de las metástasis de las células tumorales en estos muy exigentes modelos terapéuticos de tumor en el ratón.

La utilización de la legumaína como diana induce una respuesta de LTC CD8⁺ específica que reduce las oblacones de MAT en el estroma tumoral. La inmunización contra la legumaína indujo una respuesta específica de células T contra los MAT que expresan a nivel elevado dicha asparaginil endopeptidasa. La respuesta específica de células T se demostró mediante un ensayo de liberación de ⁵¹Cr, en la que los esplenocitos aislados a partir de ratones inmunizados con éxito con una composición de ADN de la invención resultaron eficaces en la eliminación de los macrófagos RAW, los cuales expresan niveles elevados de legumaína tras el cultivo con las citocinas IL-4, IL-10 e IL-13. Estos mismos esplenocitos no consiguieron inducir una destrucción citotóxica de las células que no expresaban legumaína (figura 3, panel A), indicando un grado elevado de especificidad para esta respuesta de células T contra la legumaína. Además, se obtuvo el mismo resultado mediante la utilización de células transfectadas con legumaína como diana en ensayo de liberación de ⁵¹Cr (figura 7). Además, los resultados ilustrados en la figura 3, Panel B, demuestran una drástica reducción de la población de macrófagos F4/80⁺/CD206⁺ tras el tratamiento con una composición de ADN basada en legumaína de la invención. Estos datos también fueron confirmados mediante tinción inmunohistoquímica, tal como se muestra en la figura 3, Panel C.

Los LTC CD8⁺ restringidos a CMH de clase I son específicamente activos contra los MAT. Aunque sin deseo de restringirse a ninguna teoría en particular, se cree que las bacterias transfectadas son incorporadas por los parches de Peyer en el intestino, en donde seguidamente el ADN de legumaína es incorporado en las células inmunitarias, tales como los macrófagos y las células dendríticas (CD), que seguidamente expresan el ADN de la legumaína. Las CD en los parches de Peyer de los ratones inmunizados con éxito se ha encontrado que estaban activadas 3 días después de la vacunación con pLegumaína, tal como indicaban los marcadores de activación de CD regulados positivamente, CD40, CD80 y CMH-I (figura 4, Panel A). La activación de las células T CD8⁺ se encontró además que era específica para la legumaína, tal como indica la doble tinción para INF-gamma y CD8 sobre esplenocitos obtenidos de ratones vacunados con éxito (figura 4, Panel B) y por la liberación específica de INF-gamma por las células T activadas y estimuladas con células positivas para legumaína (figura 4, Panel C). Además, la reducción inmunitaria *in vivo* de las células T CD4⁺ y CD8⁺ reveló que únicamente las células T CD8⁺ desempeñan un papel importante en la eliminación citotóxica específica de los MAT ya que sólo la reducción del número de los mismos anuló por completo este efecto de eliminación. Esta citotoxicidad específica estaba restringida al antígeno CMH de clase I, ya que la eliminación resultó específicamente inhibida por los anticuerpos anti-H-2Dd/H-2Kd (figura 4, Panel D). Conjuntamente, estos resultados indican que las composiciones de ADN basadas en legumaína de la invención en primer lugar activaron las CD en los parches de Peyer, y después estas células presentaron los péptidos de legumaína mediante la ruta del antígeno CMH de clase I al receptor de células T (RCT) sobre las células T CD8⁺

activadas, resultando en una respuesta específica de células T CD8⁺ citotóxicas que eliminaban los MAT.

La eliminación de los MAT en el estroma tumoral reduce la liberación de los factores de crecimiento tumoral y los factores proangiogénicos, así como inhibe la migración de las células tumorales y las metástasis. Los MAT pueden

influir sobre la metástasis tumoral de varias maneras, ya que secretan una amplia diversidad de factores de crecimiento tumoral, factores proangiogénicos y enzimas asociados a tumor que estimulan la angiogénesis tumoral, así como el crecimiento tumoral y la metástasis. En un esfuerzo por evaluar el grado en que la eliminación de los MAT realmente reducía la liberación de algunos de dichos factores, se recogieron suero y células de tejido tumoral de ratones vacunados y de animales de control adecuados. Se cultivaron las células tumorales recién aisladas y se recolectaron los sobrenadantes de las mismas a las 24 y a las 48 horas, respectivamente. Se llevó a cabo un ELISA para cuantificar el FNT-alfa, FCEV y FCT-beta, que indicó una reducción significativa de FNT-alfa y de FCEV, tanto en los sobrenadantes de las células tumorales como en el suero. Se redujo el FCT-beta sólo en los sobrenadantes celulares pero no en el suero (figura 5, Panel A).

La tinción inmunohistoquímica confirmó una reducción de la expresión de dichos factores en el tejido tumoral (figura 5, Panel B). Además, se observó una reducción significativa de la migración de las células tumorales al comparar los grupos de tratamiento y de control (figura 5, Panel C) en un ensayo de migración e invasión. Este resultado indica que las características de las células tumorales cambiaron tras el remodelaje inducido por la vacuna del microambiente tumoral causado por la reducción de los MAT. La capacidad de formar metástasis tumorales se confirmó en un ensayo in vivo mediante la determinación de una puntuación de metástasis y los pesos moleculares 24 días después de la extirpación del tumor primario en un contexto terapéutico. La puntuación de metástasis y los pesos de pulmón de los ratones tratados se redujeron significativamente al comparar los dos grupos de control (figura 5, Panel D).

La eliminación de los MAT en el estroma tumoral resulta en la reducción de la angiogénesis tumoral. Se observó un marcado efecto antiangiogénico tras eliminar los MAT en el estroma tumoral, lo que puede deberse en parte al hecho de que estos macrófagos M2 producen un amplio abanico de factores proangiogénicos. Los ensayos de Matrigel detectaron el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos in vivo, que se cuantificaron mediante tinción del endotelio con isolectina B4 marcada con FITC. Estos resultados demuestran claramente que el crecimiento de vasos se reducía significativamente tras la vacunación con una composición de ADN de la presente invención (figura 6, Panel B). Se observó el crecimiento de un número mucho mayor de vasos sanguíneos en los tapones de Matrigel en los ratones de control inmunizados con vector vacío que en aquellos tratados con la composición de ADN de legumina, tal como se determinó mediante obtención de imágenes digitales y tinción con tinción tricrómica de Masson (figura 6, Panel A). Además, se llevó a cabo un ensayo histológico inmunohistoquímico para evaluar el tipo de células que realmente migraban al interior de los tapones de Matrigel. Las imágenes de microscopía confocal indicaron que las células endoteliales que expresaban CD31 o macrófagos que expresaban CD68, crecían o migraban en un grado considerable al interior de los tapones de Matrigel en el grupo de control de vector vacío, pero en un grado considerablemente menor en el grupo de tratamiento (figura 6, Panel C).

Las células tumorales expresantes de legumina transgénicas son la diana de esplenocitos procedentes de ratones inmunizados con una composición de ADN de la invención. En un estudio modelo, la línea celular 4T1 se transfectó establemente con un retrovirus que incluía el plásmido de legumina y después se utilizó como célula diana (figura 7, Panel A, las fotos a la izquierda se obtuvieron a una magnificación de 5x; las fotos a la derecha, a 35x). Las imágenes fotomicrográficas se obtuvieron 2 días después de la transfección. Las células positivas se indican mediante flechas en la figura 7, Panel A. Se llevó a cabo un ensayo de liberación de ⁵¹Cr; los datos se muestran en la figura 7, Panel B. los esplenocitos aislados a partir de ratones inmunizados con la composición de ADN de pLegumina resultaron eficaces en la eliminación de las células 4T1 que se encontraban transfectadas con legumina (*P<0,01, en comparación con los grupos de control de vector vacío). La eliminación mediada por células T específica de tumor era específica para la legumina ya que las células 4T1, que no presentan expresión de legumina, no resultaron lisadas.

La presente invención proporciona un nuevo paradigma para el tratamiento tumoral, es decir, una reducción de la densidad de los MAT en el estroma tumoral reduce la liberación de factores que potencian el crecimiento tumoral y la angiogénesis, remodelando el microambiente tumoral y suprimiendo marcadamente la proliferación, vascularización y metástasis de las células tumorales. La utilización de los MAT como diana en el estroma tumoral podría presentar el problema de que la eliminación de estas células interfiriese con las funciones inmunitarias normales de estos importantes componentes del sistema inmunológico innato. Sin embargo, lo anterior no ocurre.

Los monocitos circulantes son precursores versátiles con la capacidad de diferenciarse en las diversas formas de macrófagos especializados. De hecho, el medio de citocinas afecta profundamente a la diferenciación y función de los macrófagos de los tejidos. Los macrófagos activados por los productos bacterianos y las citocinas Th1 se consideran que son del fenotipo M1, es decir, macrófagos activados clásicamente con elevada actividad bactericida y función citotóxica contra las células tumorales. En contraste, los macrófagos activados por las citocinas Th2, tales como IL-4 e IL-13, o los inmunosupresores, tales como la vitamina D3 e IL-10, se clasifican como de fenotipo M2, que se caracteriza por una función citotóxica reducida aunque presentan una actividad de remodelaje de los tejidos elevada.

Las células M1 presentan propiedades inmunoestimuladoras y defienden al huésped frente a infecciones patógenas, mientras que las células M2 atenúan las reacciones inflamatorias agudas, potencialmente secuestran los residuos celulares y secretan una diversidad de factores pro-crecimiento y de angiogénesis esenciales para la reparación de los tejidos dañados. Además, los macrófagos derivados del tejido sano o inflamado son capaces de lisar las células tumorales, expresando citocinas inmunoestimuladoras y presentan antígenos asociados a tumor que estimulan la proliferación y las funciones antitumorales de las células T y NK. Los macrófagos M2, tales como los MAT, muestran niveles reducidos de dichas actividades. Lo anterior podría ser el resultado de su exposición a moléculas antiinflamatorias derivadas del tumor tales como IL-4, IL-10, FCT-beta1 y prostaglandina E2. En efecto, Mantovani y colaboradores han sugerido que la exposición a IL-4 y a IL-10 podría inducir a que los monocitos en los tumores se desarrollen para formar macrófagos de tipo II o M2 polarizados (Mantovani et al., Trends Immunol. 23:549-555, 2002).

En la medida en que han sido investigados anteriormente, los MAT maduros diferenciados presentan un fenotipo y función similares a los de los macrófagos de tipo II (Mantovani et al., Eur. J. Cancer 40:1660-1667, 2004). Por lo tanto, las citocinas presentes en el microambiente tumoral presentan el potencial de fomentar y orientar la diferenciación de los fagocitos mononucleares reclutados. En efecto, existe un creciente número de pruebas de que los MAT se inclinan hacia los macrófagos M2 en el microambiente tumoral y producen una diversidad de factores pro-crecimiento tumoral y angiogénesis, así como moléculas inmunosupresoras. De esta manera, la presencia de MAT en el sitio tumoral y la expresión y liberación continua de sus productos podría favorecer, y no antagonizar, la progresión y metástasis tumorales.

Los MAT expresan niveles elevados de CD206, un receptor de manosa que se encuentra regulado positivamente sobre los macrófagos M2 tras la exposición a IL-4 e IL-13 (Porcheray et al., Clin. Exp. Immunol. 142:481-489, 2005). Tal como se demuestra en la presente memoria, dicha población de macrófagos expresa un nivel elevado de legumaina. Resulta importante que las citocinas Th2 IL-4, IL-10 e IL-13 regulan positivamente la expresión de CD206 y legumaina sobre la línea celular de macrófagos RAW. Este resultado se entiende mejor al considerar que los macrófagos se derivan de la sangre periférica y se diferencian en macrófagos M2 una vez alcanzar los sitios tumorales, en donde son liberados IL-4, IL-13 e IL-10 por las células tumorales y las células estromales tumorales (Stein et al., J. Exp. Med. 176:287-292, 1992). De esta manera, la utilización como diana de los macrófagos M2 que expresan legumaina no sólo favorece la supresión del crecimiento tumoral y las metástasis, sino que también mantiene las funciones normales de los macrófagos con el fenotipo M1.

La relación entre infiltración por los MAT y el pronóstico de los pacientes tumorales también ha sido señalada en varios estudios, los cuales han concluido que a mayor infiltración de macrófagos, peor pronóstico (ver, por ejemplo, Wyckoff et al., Cancer Res. 64:7022-77029, 2004). Varias líneas de evidencia indican que existe una relación simbiótica en el estroma tumoral entre las células de cáncer y los MAT, en la que las células de cáncer atraen a los MAT y sustentan su supervivencia, mientras que los MAT responden a las moléculas derivadas del tumor mediante la producción de importantes factores de crecimiento y enzimas de la matriz extracelular. A su vez, lo anterior estimula la proliferación tumoral, la angiogénesis y la invasión de los tejidos circundantes (ver, por ejemplo, Wyckoff et al., Cancer Res. 64:7022-7029, 2004). De esta manera, la atenuación de los MAT en el medio tumoral proporciona una estrategia eficaz para remodelar el estroma tumoral y alterar el microambiente tumoral.

Las composiciones de ADN de la presente invención indujeron una repuesta robusta de LTC contra dicha legumaina, que es una asparaginil endopeptidasa que funciona como proteína de estrés y se sobreexpresa a nivel elevado en los MAT. La respuesta inmunitaria anti-legumaina se demuestra que es específica de las células T CD8⁺ y restringida al antígeno CMH-I de clase I. Resulta importante que la presente invención demuestra que tras la inmunización con la composición de ADN basada en legumaina de la invención, la densidad de los macrófagos doble positivos CD206⁺ y F4/80⁺, es decir los MAT, se redujo drásticamente. Además, se demuestra que se encuentran presentes a niveles bajos una diversidad de factores, tales como FCEV, MMP-9 y FCT-beta, los cuales son liberados por los MAT, tanto en el sobrenadante de las células tumorales en cultivo como en el suero de ratón. Es bien conocido que el FCEV y la metaloproteína MMP-9 desempeñan funciones importantes durante la formación de la vasculatura tumoral y el inicio de la angiogénesis tumoral. Los MAT son significativos a este respecto, ya que producen FCEV y MMP-9. La angiogénesis progresivamente intensificada se asocia a la expresión regulada positiva del FCEV y las proteasa extracelulares, tales como MMP-9, mientras que es conocido que el FCT-beta es un factor de crecimiento importante que participa en la migración de las células tumorales hacia los vasos sanguíneos. De hecho, el FCT-beta puede proporcionar señales proliferativas y antiapoptóticas a las células tumorales, así como activar los activadores del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPa), los cuales podrían contribuir a la degradación de la matriz extracelular, que resulta necesaria para que se produzca la invasión vascular.

Resulta significativo que la presente invención demuestra que una vez los MAT han sido eliminados en el tejido tumoral por linfocitos T citotóxicos (LTC) CD8⁺ específicos, las células tumorales modifican su carácter convirtiéndose en menos malignas y menos invasivas. La formación de una neovasculatura en los tejidos tumorales también resultó drásticamente reducida por el tratamiento con una composición de ADN de la presente invención. Además, se informa que los MAT participan en la supresión y tolerancia inmunitarias en el microambiente tumoral y podrían inhibir las respuestas de células T mediante la inducción de la apoptosis de las células T mediante la

regulación positiva de NO, las PG, la liberación de FNT-alfa y la actividad de arginasa (ver, por ejemplo, Saio et al., J. Immunol. 167:5583-5593, 2001). Tras la eliminación de los MAT, la actividad específica de las células T CD8⁺ resultó marcadamente regulada positivamente, indicando además que el enfoque anti-MAT de la presente invención proporciona una estrategia eficaz para romper la tolerancia inmunitaria contra los tumores.

En el modelo de metástasis del carcinoma mamario de ratón espontáneo 4T1, se obtuvo un incremento inesperadamente significativo de la duración de vida, en el que el 75% (6 de 8) de los ratones sobrevivieron hasta 3 meses tras la inoculación de células tumorales 4T1 en la glándula mamaria, tras la resección quirúrgica del tumor primario seguida del tratamiento con la composición de ADN basada en legumaína de la invención. Todavía más inesperadamente, el 62% (5 de 8) de los ratones no reveló ninguna metástasis pulmonar en absoluto. Se obtuvieron resultados similares en contextos profilácticos en los otros dos modelos tumorales, es decir, el carcinoma pulmonar de células no pequeñas D121 y el carcinoma de colon CT-26. Estos datos confirmatorios adicionales demuestran que la utilización como diana de los MAT para remodelar el microambiente tumoral es una estrategia antitumoral potencialmente universal que suprime la invasión y metástasis de las células tumorales mediante la reducción de la concentración de los factores liberados por los MAT que de otra manera fomentarían el crecimiento y metástasis tumorales.

En el Ejemplo 2, se utilizó un vector de expresión de mamífero con una señal de RE (pCMV/Myc/RE) para la construcción de una composición de minigén de ADN de la presente invención. El péptido de señal de RE dirige la proteína al interior del compartimiento secretorio. El vector incluye además un péptido C-terminal que conserva la proteína en el retículo endoplasmático (RE). Los péptidos codificados por la composición de ADN se procesaron en el RE de las células inmunitarias en el intestino y después se unieron a sitios de unión de antígeno CMH de clase I para ser finalmente presentados por los receptores de células T, que indujeron una respuesta de células T específica de legumaína contra los MAT en los ratones que expresaban legumaína. Estos constructos crean vacunas de minigén eficaces que pueden inducir una respuesta de células T CD8⁺ eficaz contra tumores de diferentes órganos en modelos de tumor de ratón.

Algunos experimentos adicionales con células de carcinoma de células no pequeñas D121 en ratones C57/BL singénicos han demostrado que los constructos de minigén tanto pCMV-Db/Dd como pCMV-Kb/Kd proporcionan una respuesta inmunitaria anti-MAT eficaz. En contraste, los resultados con las células D2F2 en ratones BALB/c indica que el constructo pCMV-Kb/Kd era considerablemente más eficaz que el constructo pCMV-Db/Dd o que el constructo pCMV-Kb/Kd. Una posible explicación para este resultado es que se predice que existe un número mucho mayor de péptidos legumaína que se unen a H-2Dd/Kd con afinidad más alta que los que se unen a moléculas de H-2Dd/Kb. Según la Bioinformatics & Molecular Analysis Section (BIMAS) del NIH, las puntuaciones predictivas de los péptidos legumaína que se unen a H-2Dd y a H-2Kd son considerablemente más altas que las puntuaciones correspondientes para H-2Db y H-2Kb, mientras que la puntuación de unión de H-2Kd es la más alta (figura 20).

Considerando que el repertorio de receptores de células T es prácticamente ilimitado, podría existir un número mucho más alto de complejos de péptido-H-2Dd/Kd que podría ser reconocido por los LTC en los ratones BALB/c. Además, el péptido H-2D presenta un índice de antigenicidad mucho más alta que dos de los tres péptidos H-2K (figura 20). Basándose en estos datos, la antigenicidad es menos predictiva que la puntuación de unión del CMH con respecto a la respuesta inmunitaria anti-MAT. Las composiciones de minigén basadas en legumaína de la presente invención indujeron una protección eficaz frente a los tumores mediante el ataque a los MAT en modelos de tumor mamario. La protección tumoral inducida por las vacunas de minigén basadas en Kd condujeron a un ataque a los MAT en el microambiente del carcinoma mamario D2F2 en ratones BALB/c singénicos. Se encontró que esta respuesta inmunitaria protectora estaba mediada por las células T CD8⁺, las cuales eliminan específicamente los MAT legumaína⁺, y también resultó en una supresión marcada de la angiogénesis tumoral. Resulta importante que los constructos de minigén de ADN de la invención demostraron una eficacia similar como vacuna codificante del gen de legumaína completo. De manera similar, los constructos basados tanto en Dd como en Kd proporcionaron respuestas anti-MAT en un modelo de cáncer D121 en ratones C57/BL. Conjuntamente, estos resultados representan la primera composición de minigén anti-legumaína eficaz contra los MAT y que dicha estrategia puede resultar particularmente útil para individuos con diferente fondo genético y proporcionar de esta manera una alternativa simple, más segura y flexible a la estrategia de vacuna de gen completo en el tratamiento del cáncer de mama.

Listado de secuencias

<110> REISFELD, Ralph A. XIANG, Rong LUO, Yunping

<120> COMPOSICIÓN DE ADN PARA INDUCIR UNA RESPUESTA INMUNITARIA CONTRA MACRÓFAGOS ASOCIADOS A TUMOR

<130> TSRI 1215.1PCT

<150> US 60/849,927

<151> 2006-10-06

<160> 21

5 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 1302

<212> DNA

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

atgggtttgga aagtagctgt attcctcagt gtggccctgg gcattgggtgc cgttcctata 60
gatgatcctg aagatggagg caagcactgg gtggtgatcg tggcagggttc aaatggctgg 120
tataattata ggcaccaggc agacgcgtgc catgcctacc agatcattca ccgcaatggg 180
attcctgacg aacagatcgt tgtgatgatg tacgatgaca ttgcttactc tgaagacaat 240
cccactccag gaattgtgat caacaggccc aatggcacag gtgtctatca gggagtcccg 300
aaggactaca ctggagagga tgttacccca caaaatttcc ttgctgtggt gagaggcgat 360
gcagaagcag tgaaggggcat aggatccggc aaagtcctga agagtggccc ccaggatcac 420
gtgttcattt acttcaactga ccattggatct actggaatac tggtttttcc caatgaagat 480
cttcatgtaa aggacctgaa tgagaccatc cattacatgt acaaacacaa aatgtaccga 540
aagatgggtg tctacattga agcctgtgag tctgggtcca tgatgaacca cctgccggat 600
aacatcaatg tttatgcaac tactgctgcc aaccccagag agtcgtccta cgctgttac 660
tatgatgaga agaggtccac gtacctgggg gactggtaca gcgtcaactg gatggaagac 720
tcggacgtgg aagatctgac taaagagacc ctgcacaagc agtaccacct ggtaaaatcg 780
cacaccaaca ccagccacgt catgcagtat ggaaacaaaa caatctccac catgaaagtg 840
atgcagtttc aggttatgaa acgcaaagcc agttctcccg tccccctacc tccagtcaca 900
caccttgacc tcacccccag ccctgatgtg cctctcacca tcatgaaaag gaaactgatg 960
aacaccaatg atctggagga gtccaggcag ctacaggagg agatccagcg gcatctggat 1020
gccaggcacc tcattgagaa gtcagtgcgt aagatcgtct ccttgcctggc agcgtccgag 1080
getgaggtgg agcagctcct gtccgagaga gccccgctca cggggcacag ctgctaccca 1140
gaggccctgc tgcacttccg gaccactgc ttcaactggc actccccac gtacgagtat 1200
gcgttgagac atttgtacgt gctgggtcaac ctttgtgaga agccgtatcc acttcacagg 1260
ataaaattgt ccatggacca cgtgtgcctt gggtcactatt aa 1302

```

15

<210> 2

<211> 433

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 2

```

Met Val Trp Lys Val Ala Val Phe Leu Ser Val Ala Leu Gly Ile Gly
 1           5           10          15
Ala Val Pro Ile Asp Asp Pro Glu Asp Gly Gly Lys His Trp Val Val
          20          25          30
Ile Val Ala Gly Ser Asn Gly Trp Tyr Asn Tyr Arg His Gln Ala Asp

```

ES 2 605 020 T3

35 40 45
 Ala Cys His Ala Tyr Gln Ile Ile His Arg Asn Gly Ile Pro Asp Glu
 50 55 60
 Gln Ile Val Val Met Met Tyr Asp Asp Ile Ala Tyr Ser Glu Asp Asn
 65 70 75 80
 Pro Thr Pro Gly Ile Val Ile Asn Arg Pro Asn Gly Thr Gly Val Tyr
 85 90 95
 Gln Gly Val Pro Lys Asp Tyr Thr Gly Glu Asp Val Thr Pro Gln Asn
 100 105 110
 Phe Leu Ala Val Leu Arg Gly Asp Ala Glu Ala Val Lys Gly Ile Gly
 115 120 125
 Ser Gly Lys Val Leu Lys Ser Gly Pro Gln Asp His Val Phe Ile Tyr
 130 135 140
 Phe Thr Asp His Gly Ser Thr Gly Ile Leu Val Phe Pro Asn Glu Asp
 145 150 155 160
 Leu His Val Lys Asp Leu Asn Glu Thr Ile His Tyr Met Tyr Lys His
 165 170 175
 Lys Met Tyr Arg Lys Met Val Phe Tyr Ile Glu Ala Cys Glu Ser Gly
 180 185 190
 Ser Met Met Asn His Leu Pro Asp Asn Ile Asn Val Tyr Ala Thr Thr
 195 200 205
 Ala Ala Asn Pro Arg Glu Ser Ser Tyr Ala Cys Tyr Tyr Asp Glu Lys
 210 215 220
 Arg Ser Thr Tyr Leu Gly Asp Trp Tyr Ser Val Asn Trp Met Glu Asp
 225 230 235 240
 Ser Asp Val Glu Asp Leu Thr Lys Glu Thr Leu His Lys Gln Tyr His
 245 250 255
 Leu Val Lys Ser His Thr Asn Thr Ser His Val Met Gln Tyr Gly Asn
 260 265 270
 Lys Thr Ile Ser Thr Met Lys Val Met Gln Phe Gln Gly Met Lys Arg
 275 280 285
 Lys Ala Ser Ser Pro Val Pro Leu Pro Pro Val Thr His Leu Asp Leu
 290 295 300
 Thr Pro Ser Pro Asp Val Pro Leu Thr Ile Met Lys Arg Lys Leu Met
 305 310 315 320
 Asn Thr Asn Asp Leu Glu Glu Ser Arg Gln Leu Thr Glu Glu Ile Gln
 325 330 335
 Arg His Leu Asp Ala Arg His Leu Ile Glu Lys Ser Val Arg Lys Ile
 340 345 350
 Val Ser Leu Leu Ala Ala Ser Glu Ala Glu Val Glu Gln Leu Leu Ser
 355 360 365
 Glu Arg Ala Pro Leu Thr Gly His Ser Cys Tyr Pro Glu Ala Leu Leu
 370 375 380
 His Phe Arg Thr His Cys Phe Asn Trp His Ser Pro Thr Tyr Glu Tyr
 385 390 395 400
 Ala Leu Arg His Leu Tyr Val Leu Val Asn Leu Cys Glu Lys Pro Tyr
 405 410 415
 Pro Leu His Arg Ile Lys Leu Ser Met Asp His Val Cys Leu Gly His
 420 425 430
 Tyr

<210> 3

<211> 1308

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 3

10 atgacctgga gagtggctgt gcttctcagc ctggtgctgg gtgctggtgc cgttcccgtc 60

```

ggtgtggacg atccccagga tggaggcaag cactgggtgg tgattgtggc gggctccaat 120
ggctggtata attaccgaca ccaggcagac gcatgccacg cctaccagat catccaccgg 180
aacgggattc ctgacgagca gatcatagtg atgatgtatg acgacattgc caactctgaa 240
gaaaacccta ccccagggtg tgtgatcaac cgacctaacg gcacagatgt atacaaggga 300
gtcctgaagg actacaccgg agaggatgtg actccagaga atttcctcgc cgtgctgaga 360
ggtgacgcag aagctgtgaa gggcaaaggg tctggaaaag tcttgaagag tggcccccca 420
gatcatgtct tcatttactt caccgaccac ggagccaccg ggatcctggg gtttcctaata 480
gatgatcttc atgtcaagga cctgaataag actattcgct acatgtatga acacaaaatg 540
taccagaaga tgggtgttcta cattgaagct tgtgagtcct gctccatgat gaaccacctg 600
cccgacgaca tcaacgttta tgcaactact gcggccaacc ccaaggagtc atcttatgcc 660
tgctactacg acgaggagag gggcacttac ctgggtgact ggtacagcgt caactggatg 720
gaagactccg atgtggagga cctgaccaa gagacccttc acaagcagta ccacctgggtc 780
aagtcaccaca ccaacaccag ccatgtcatg caatatggga acaaactctat ctctaccatg 840
aaagtgatgc agtttcaggg aatgaagcac agagccagtt ccccatcttc cctgcctccg 900
gtcacacacc ttgacctcac cccagccctt gacgtgcccc tgacctctt gaagaggaag 960
ctgctgagaa ccaacgacgt gaaggaatcc cagaatctca ttgggcagat ccagcaatgt 1020
ctggatgcca ggcacgtcat tgagaagtct gtgcacaaga tcgtttccct gctggcgagg 1080
tttggggaaa ctgctgagag acatctgtca gagaggacca tgctcacagc acatgactgc 1140
taccaggagg ctgtaaccca cttccgcaca cactgcttta actggcactc tgtcacgtac 1200
gagcatgcct tgcggtactt gtatgtgctg gccaatctct gtgaggcacc atatccgatt 1260
gacaggatag agatggccat ggacaaagtg tgtcttagtc actactga 1308

```

<210> 4

<211> 435

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

```

Met Thr Trp Arg Val Ala Val Leu Leu Ser Leu Val Leu Gly Ala Gly
1          5          10          15
Ala Val Pro Val Gly Val Asp Asp Pro Glu Asp Gly Gly Lys His Trp
20          25          30
Val Val Ile Val Ala Gly Ser Asn Gly Trp Tyr Asn Tyr Arg His Gln
35          40          45
Ala Asp Ala Cys His Ala Tyr Gln Ile Ile His Arg Asn Gly Ile Pro
50          55          60
Asp Glu Gln Ile Ile Val Met Met Tyr Asp Asp Ile Ala Asn Ser Glu
65          70          75          80
Glu Asn Pro Thr Pro Gly Val Val Ile Asn Arg Pro Asn Gly Thr Asp
85          90          95
Val Tyr Lys Gly Val Leu Lys Asp Tyr Thr Gly Glu Asp Val Thr Pro
100          105          110
Glu Asn Phe Leu Ala Val Leu Arg Gly Asp Ala Glu Ala Val Lys Gly
115          120          125
Lys Gly Ser Gly Lys Val Leu Lys Ser Gly Pro Arg Asp His Val Phe
130          135          140
Ile Tyr Phe Thr Asp His Gly Ala Thr Gly Ile Leu Val Phe Pro Asn
145          150          155          160
Asp Asp Leu His Val Lys Asp Leu Asn Lys Thr Ile Arg Tyr Met Tyr
165          170          175
Glu His Lys Met Tyr Gln Lys Met Val Phe Tyr Ile Glu Ala Cys Glu
180          185          190
Ser Gly Ser Met Met Asn His Leu Pro Asp Asp Ile Asn Val Tyr Ala
195          200          205
Thr Thr Ala Ala Asn Pro Lys Glu Ser Ser Tyr Ala Cys Tyr Tyr Asp
210          215          220
Glu Glu Arg Gly Thr Tyr Leu Gly Asp Trp Tyr Ser Val Asn Trp Met
225          230          235          240
Glu Asp Ser Asp Val Glu Asp Leu Thr Lys Glu Thr Leu His Lys Gln
245          250          255

```

10

Tyr His Leu Val Lys Ser His Thr Asn Thr Ser His Val Met Gln Tyr
 260 265 270
 Gly Asn Lys Ser Ile Ser Thr Met Lys Val Met Gln Phe Gln Gly Met
 275 280 285
 Lys His Arg Ala Ser Ser Pro Ile Ser Leu Pro Pro Val Thr His Leu
 290 295 300
 Asp Leu Thr Pro Ser Pro Asp Val Pro Leu Thr Ile Leu Lys Arg Lys
 305 310 315 320
 Leu Leu Arg Thr Asn Asp Val Lys Glu Ser Gln Asn Leu Ile Gly Gln
 325 330 335
 Ile Gln Gln Phe Leu Asp Ala Arg His Val Ile Glu Lys Ser Val His
 340 345 350
 Lys Ile Val Ser Leu Leu Ala Gly Phe Gly Glu Thr Ala Glu Arg His
 355 360 365
 Leu Ser Glu Arg Thr Met Leu Thr Ala His Asp Cys Tyr Gln Glu Ala
 370 375 380
 Val Thr His Phe Arg Thr His Cys Phe Asn Trp His Ser Val Thr Tyr
 385 390 395 400
 Glu His Ala Leu Arg Tyr Leu Tyr Val Leu Ala Asn Leu Cys Glu Ala
 405 410 415
 Pro Tyr Pro Ile Asp Arg Ile Glu Met Ala Met Asp Lys Val Cys Leu
 420 425 430
 Ser His Tyr
 435

<210> 5

<211> 814

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 5

atcactctct ttaatcacta ctcacagtaa cctcaactcc tgccacaatg tacaggatgc 60
 aactcctgtc ttgcattgca ctaagtcttg cacttgtcac aaacagtgc cctacttcaa 120
 gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta cagatgattt 180
 tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca ttttaagttt 240
 acatgcccaa gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa gaactcaaac 300
 ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tcacttaaga cccaggggact 360
 taatcagcaa tatcaacgta atagtcttgg aactaaaggg atctgaaaca acattcatgt 420
 gtgaatatgc tgaatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg attacctttt 480
 gtcaaagcat catctcaaca ctgacttgat aattaagtgc ttcccaacta aaacgtatca 540
 ggcccttctat ttattttaaatt attttaaatt tatatttatt gttgaatgta tggtttgcta 600
 cctattgtaa ctattattct taatcttaaa actataaata tggatctttt atgattcttt 660
 ttgtaagccc taggggctct aaaaatgggtt cacttattta tcccaaaaata tttattatta 720
 tgttgaatgt taaatatagt atctatgtag attggtagt aaaactattt aataaatttg 780
 ataaatataa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 814

10

<210> 6

<211> 153

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20 25 30
 Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
 50 55 60
 Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 65 70 75 80
 Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 85 90 95
 Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 100 105 110
 Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 115 120 125
 Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
 130 135 140
 Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 145 150

20

ES 2 605 020 T3

<210> 7
 <211> 852
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 7

```

cttgcagctg cccacctcac cctcagctct ggccctcttac tcaccctcta ccacagacat 60
ggctcagtea ctggctctga gctcctcttat cctgggttctg gccttttgca tccccaggac 120
ccaaggcagt gatggagggg ctcaggactg ttgcctcaag tacagccaaa ggaagattcc 180
cgccaaggtt gtccgcagct accggaagca ggaaccaagc ttaggctgct ccatcccagc 240
tatcctgttc ttgccccgca agcgcctctca ggcagagcta tgtgcagacc caaaggagct 300
ctgggtgcag cagctgatgc agcatctgga caagacacca tccccacaga aaccagccca 360
gggctgcagg aaggacaggg gggcctccaa gactggcaag aaaggaaaagg gctccaaagg 420
ctgcaagagg actgagcggg cacagacccc taaagggcca tagcccagtg agcagcctgg 480
agccctggag accccaccag cctcaccaac gcttgaagcc tgaacccaag atgcaagaag 540
gaggctatgc tcagggggccc tggagcagcc accccatgct ggcccttgcca cactctttct 600
cctgctttaa ccaccccatc tgcattccca gctctaccct gcatggctga gctgccaca 660
gcaggccagg tccagagaga ccgaggaggg agagtctccc agggagcatg agaggaggca 720
gcaggactgt ccccttgaag gagaatcatc aggaccctgg acctgatacg gctccccagt 780
acaccccacc tcttccttgt aaatatgatt tatacctaac tgaataaaaa gctgttctgt 840
cttcccaccc gc                                     852
  
```

10

<210> 8
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 8

```

Met Ala Gln Ser Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Ala Phe
 1          5          10          15
Gly Ile Pro Arg Thr Gln Gly Ser Asp Gly Gly Ala Gln Asp Cys Cys
 20          25          30
Leu Lys Tyr Ser Gln Arg Lys Ile Pro Ala Lys Val Val Arg Ser Tyr
 35          40          45
Arg Lys Gln Glu Pro Ser Leu Gly Cys Ser Ile Pro Ala Ile Leu Phe
 50          55          60
Leu Pro Arg Lys Arg Ser Gln Ala Glu Leu Cys Ala Asp Pro Lys Glu
 65          70          75          80
Leu Trp Val Gln Gln Leu Met Gln His Leu Asp Lys Thr Pro Ser Pro
 85          90          95
Gln Lys Pro Ala Gln Gly Cys Arg Lys Asp Arg Gly Ala Ser Lys Thr
100          105          110
Gly Lys Lys Gly Lys Gly Ser Lys Gly Cys Lys Arg Thr Glu Arg Ser
115          120          125
Gln Thr Pro Lys Gly Pro
  
```

20

<210> 9
 <211> 1816
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 9

```

cttctctgcc agaagatacc atttcaactt taacacagca tgatcgaaac atacaacca 60
acttctcccc gatctgcggc cactggactg cccatcagca tgaaaatttt tatgtattta 120
cttactgttt ttcttatcac ccagatgatt gggtcagcac tttttgctgt gtatcttcat 180
agaaggttgg acaagataga agatgaaagg aatcttcatg aagattttgt attcatgaaa 240
acgatacaga gatgcaacac aggagaaaaga tcctttatcct tactgaactg tgaggagatt 300
aaaagccagt ttgaaggctt tgtgaaggat ataattgttaa acaaagagga gacgaagaaa 360
gaaaacagct ttgaaatgca aaaaggatgat cagaatcctc aaattgcggc acatgtcata 420
agtgaaggcca gcagtaaaac aacatctgtg ttacagtggg ctgaaaaagg atactacacc 480
atgagcaaca acttggttaac cctggaaaat gggaaacagc tgaccgttaa aagacaagga 540
ctctattata tctatgccca agtcaccttc tgttccaatc gggagccttc gagtcaagct 600
ccatttatag ccagcctctg cctaaagtcc cccggtagat tcgagagaat cttactcaga 660
gctgcaataa cccacagtcc cgccaaacct tgcgggcaac aatccattca cttgggagga 720
gtatttgaat tgcaaccagg tgcttcggtg tttgtcaatg tgactgatcc aagccaagtg 780
agccatggca ctggcttcac gtcccttggc ttactcaaac tctgaacagt gtcaccttgc 840
aggctgtggg ggagctgacg ctgggagtct tcataataca gcacagcggg taagcccacc 900
ccctgttaac tgcctattta taaccctagg atcctcctta tggagaacta tttattatac 960
actccaaggg atgtagaact gtaataagtg aattacaggt cacatgaaac caaaacgggc 1020
cctgctccat aagagcttat atatctgaag cagcaacccc actgatgcag acatccagag 1080
agtcctatga aaagacaagg ccattatgca caggttgaat tctgagtaaa cagcagataa 1140
cttgccaagt tcagttttgt ttctttgctg gcagtgcttt tccatggata atgcatttga 1200
tttatcagtg aagatgcaga agggaaatgg ggagcctcag ctcacattca gttatgggtg 1260
actctgggtt cctatggcct tgttggaggg ggccaggctc tagaacgtct aacacagtgg 1320
agaaccgaaa cccccccccc cccccccgccc accctctcgg acagttattc attctctttc 1380
aatctctctc tctccatctc tctctttcag tctctctctc tcaacctctt tcttccaatc 1440
tctctttctc aatctctctg ttcccttttg tcagtctctt ccttccccca gtctctcttc 1500
tcaatcccc tttctaacac acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac 1560
acacacacac acacacacac agagtcaggc cgttgctagt cagttctctt ctttccaccc 1620
tgtccctatc tctaccacta tagatgaggg tgaggagtag ggagtgcagc cctgagcctg 1680
cccactcctc attacgaaat gactgtattt aaaggaaatc tattgtatct acctgcagtc 1740
tccattgttt ccagagtga cttgtaatta tcttgttatt tattttttga ataataaaga 1800
cctcttaaca ttaaaa 1816

```

5 <210> 10
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 10

```

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
 1           5           10           15
Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
      20           25           30
Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
      35           40           45
Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
      50           55           60
Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
      65           70           75           80
Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
      85           90           95
Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu

```

[illegible]

<210> 11
<211> 1533
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Legumaína murina ubiquitinada sintética

<400> 11

atgcagatct	tctgtaagac	cctgaccggc	aagaccatca	ccctagaggt	ggagcccagt	60
gacaccatcg	agaacgtgaa	ggccaagatc	caggataaag	agggcatccc	ccctgaccag	120
cagaggatga	tctttgccgg	caagcagctg	gaagatggcc	gcaccctctc	tgattacaac	180
atccaggaag	agtcaacccct	gcaccttggtc	cttcgcctga	gaggtggcac	ctggagagtg	240
gctgtgcttc	tcagcctggg	gctgggtgct	ggtgcggttc	ccctcggtg	ggacgatccc	300
gaggatggag	gcaagcactg	ggtgggtgatt	gtggcgggct	cgaatggctg	gtataattac	360
cgacaccagg	cagacgcattg	ccacgcctac	cagatcatcc	accggaacgg	gattcctgac	420
gagcagatca	tagtgatgat	gtatgacgac	attgccaaact	ctgaagaaaa	ccctacccca	480
ggtgttgtga	tcaaacggacc	tacaaggcaca	gatgtataca	agggagtgct	gaaggactac	540
accggagagg	atgtgatactc	agaaagatttc	ctgcgcgtgc	tgagagggtga	cgcgaagct	600
gtgaagggca	aagggtctgg	aaaagtcttg	aagagtggtc	cccgagatca	tgcttctatt	660
tacttcaccg	accacggagc	caccgggatc	ctgggtgttc	ctaattgatga	tcttcatgtc	720
aaggacctga	ataagactat	tcgctacatg	tatgaacaca	aatgtacca	gaagatggtg	780
ttctacattg	aagcttgtga	gtctggtccc	atgatgaacc	acctgcccga	cgacatcaac	840
gtttatgcaa	ctactgcggc	caaccccga	gagtcattct	atgcctgcta	ctacgacgag	900
gagaggggca	cttacctggg	tgactggtac	agcgtcaact	ggatggaaga	ctccgatgtg	960
gaggacctga	ccaaagagac	ccttcacaag	cagtaccacc	tggtcaagtc	ccacaccaac	1020
accagccatg	tcatgcaata	tgggaacaaa	tctatctcta	ccatgaaagt	gatgcagttt	1080
cagggataga	agcacagagc	cagttccccc	atctccctgc	ctccggtcac	acaccttgac	1140
ctcaccccca	gccctgacgt	gccccagacc	atcttgaaga	ggaagctgct	gagaaccaac	1200
gcggtgaagg	aatcccagaa	tctcattggg	cagatccagc	aatttctgga	tgccaggcac	1260
gtcattgaga	agtctgtgca	caagatcggt	tccttctgtg	cgggatttgg	ggaaactgct	1320
gagagacatc	tgtcagagag	gaccatgctc	acagcacatg	actgctacca	ggaggctgta	1380
accacttcc	gcacacagct	ctttaactgg	cactctgtca	cgtacgagca	tgcccttgcg	1440
tacttgtagt	tgtctgccaa	tctctgtgag	gcaccatata	cgattgacag	gatagagatg	1500
gccatggaca	aagtgtgtct	taqtactaac	tga			1530

<210> 12
<211> 510
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Legumaína murina ubiquitinada sintética

<400> 12

```

Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
 1          5          10          15
Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
          20          25          30
Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys
          35          40          45
Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu
          50          55          60
Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Thr Trp Arg Val
65          70          75          80
Ala Val Leu Leu Ser Leu Val Leu Gly Ala Gly Ala Val Pro Val Gly
          85          90          95
Val Asp Asp Pro Glu Asp Gly Gly Lys His Trp Val Val Ile Val Ala
          100          105          110
Gly Ser Asn Gly Trp Tyr Asn Tyr Arg His Gln Ala Asp Ala Cys His
          115          120          125
Ala Tyr Gln Ile Ile His Arg Asn Gly Ile Pro Asp Glu Gln Ile Ile
          130          135          140
Val Met Met Tyr Asp Asp Ile Ala Asn Ser Glu Glu Asn Pro Thr Pro
145          150          155          160
Gly Val Val Ile Asn Arg Pro Asn Gly Thr Asp Val Tyr Lys Gly Val
          165          170          175
Leu Lys Asp Tyr Thr Gly Glu Asp Val Thr Pro Glu Asn Phe Leu Ala
          180          185          190
Val Leu Arg Gly Asp Ala Glu Ala Val Lys Gly Lys Gly Ser Gly Lys
          195          200          205
Val Leu Lys Ser Gly Pro Arg Asp His Val Phe Ile Tyr Phe Thr Asp
          210          215          220
His Gly Ala Thr Gly Ile Leu Val Phe Pro Asn Asp Asp Leu His Val
225          230          235          240
Lys Asp Leu Asn Lys Thr Ile Arg Tyr Met Tyr Glu His Lys Met Tyr
          245          250          255
Gln Lys Met Val Phe Tyr Ile Glu Ala Cys Glu Ser Gly Ser Met Met
          260          265          270
Asn His Leu Pro Asp Asp Ile Asn Val Tyr Ala Thr Thr Ala Ala Asn
          275          280          285
Pro Lys Glu Ser Ser Tyr Ala Cys Tyr Tyr Asp Glu Glu Arg Gly Thr
          290          295          300
Tyr Leu Gly Asp Trp Tyr Ser Val Asn Trp Met Glu Asp Ser Asp Val
305          310          315          320
Glu Asp Leu Thr Lys Glu Thr Leu His Lys Gln Tyr His Leu Val Lys
          325          330          335
Ser His Thr Asn Thr Ser His Val Met Gln Tyr Gly Asn Lys Ser Ile
          340          345          350
Ser Thr Met Lys Val Met Gln Phe Gln Gly Met Lys His Arg Ala Ser
          355          360          365
Ser Pro Ile Ser Leu Pro Pro Val Thr His Leu Asp Leu Thr Pro Ser
          370          375          380
Pro Asp Val Pro Leu Thr Ile Leu Lys Arg Lys Leu Leu Arg Thr Asn
385          390          395          400
Asp Val Lys Glu Ser Gln Asn Leu Ile Gly Gln Ile Gln Gln Phe Leu
          405          410          415
Asp Ala Arg His Val Ile Glu Lys Ser Val His Lys Ile Val Ser Leu
          420          425          430
Leu Ala Gly Phe Gly Glu Thr Ala Glu Arg His Leu Ser Glu Arg Thr
          435          440          445
Met Leu Thr Ala His Asp Cys Tyr Gln Glu Ala Val Thr His Phe Arg
          450          455          460
Thr His Cys Phe Asn Trp His Ser Val Thr Tyr Glu His Ala Leu Arg
465          470          475          480
Tyr Leu Tyr Val Leu Ala Asn Leu Cys Glu Ala Pro Tyr Pro Ile Asp
          485          490          495
Arg Ile Glu Met Ala Met Asp Lys Val Cys Leu Ser His Tyr
          500          505          510

```

5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Ser Gly Pro Arg Asp His Val Phe Ile
1 5

5 <210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

10 <400> 14

Leu Pro Pro Val Thr His Leu Asp Leu
1 5

15 <210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

20 <400> 15

Tyr Asp Glu Glu Arg Gly Thr Tyr Leu
1 5

25 <210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

30 <400> 16

Arg Tyr Leu Tyr Val Leu Ala Asn Leu
1 5

35 <210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 17

40 Met Tyr Gln Lys Met Val Phe Tyr Ile
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT

45 <213> Mus musculus

<400> 18

Thr Tyr Leu Gly Asp Trp Tyr Ser Val
1 5

50 <210> 19
<211> 18
<212> PRT
<213> Mus musculus

55 <400> 19

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Ala
1 5 10 15
His Ser

```

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus
5
<400> 20

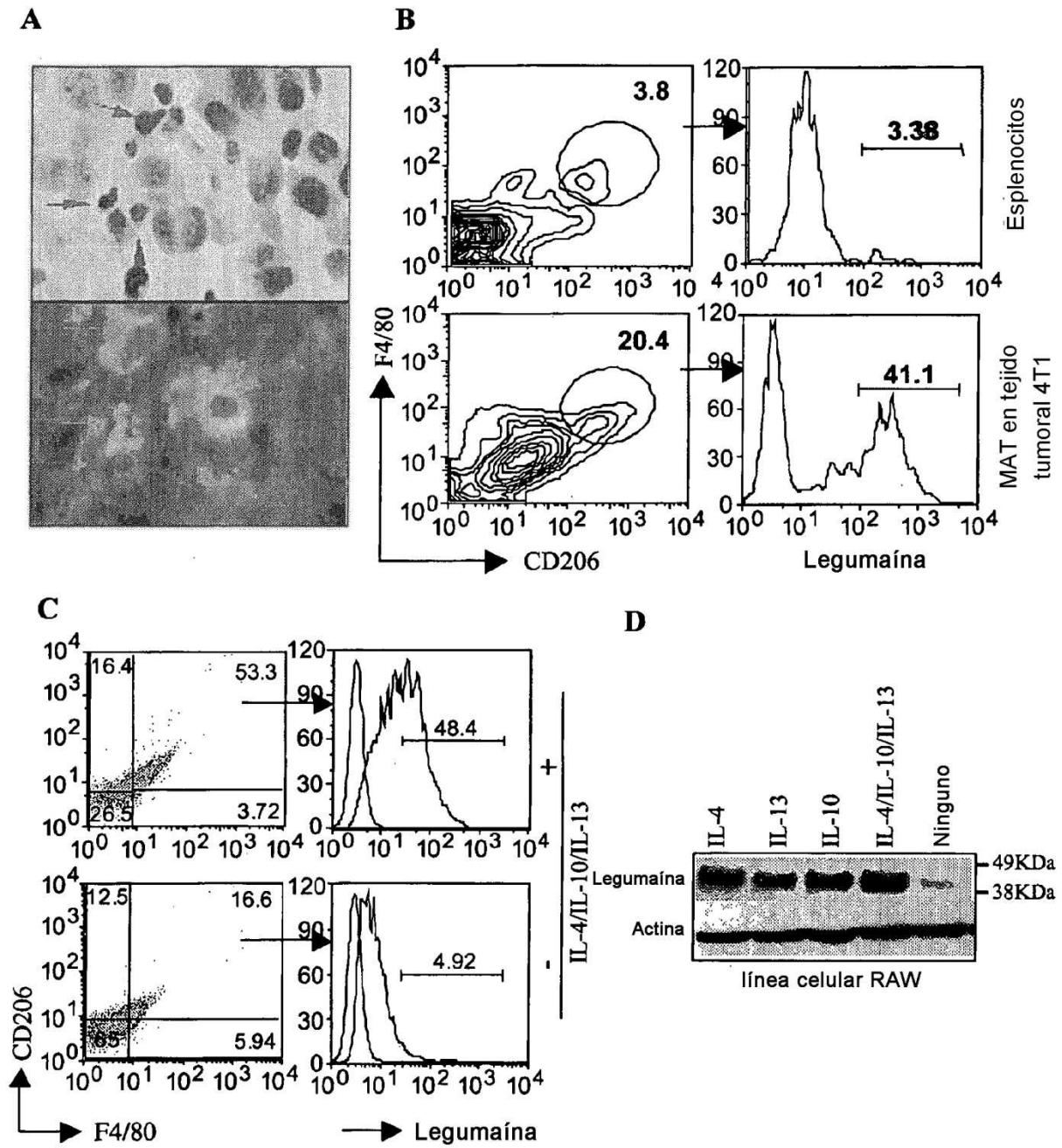
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1           5           10
10
<210> 21
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus
15
<400> 21

Ser Glu Lys Asp Glu Leu
1           5

```

REIVINDICACIONES

1. Composición de ADN que comprende un constructo de minigén de ADN que codifica un polipéptido que comprende una pluralidad de fragmentos de legumina, consistiendo dicha pluralidad en tres fragmentos inmunógenos de legumina, estando cada uno de los cuales precedido por los tres aminoácidos AAY, estando los fragmentos inmunógenos unidos entre sí en serie mediante dichos tres aminoácidos AAY entre cada fragmento sucesivo en el polipéptido, en la que el polipéptido puede inducir una respuesta inmunitaria contra las células asociadas a tumor y es expresable en las células inmunitarias, y en la que el constructo de minigén de ADN se incorpora en un portador farmacéuticamente aceptable, en la que dichos fragmentos inmunógenos presentan una secuencia de aminoácidos según SEC ID nº 16, nº 17 y nº 18.
2. Composición de ADN según la reivindicación 1, en la que el constructo de minigén de ADN es un constructo de ADN desnudo.
3. Composición de ADN según la reivindicación 2, en la que el ADN desnudo se encuentra en forma de un plásmido.
4. Composición de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el constructo de ADN se incorpora en un vector vírico atenuado o en un vector bacteriano atenuado.
5. Composición de ADN según la reivindicación 4, en la que dicho vector atenuado es una *Salmonella typhimurium* AroA-, dam- atenuada.
6. Composición de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además un constructo de ADN que codifica una proteína efectora inmunitaria expresable en las células inmunitarias.
7. Composición de ADN según la reivindicación 6, en la que la proteína efectora inmunitaria es una citocina.
8. Composición de ADN según la reivindicación 7, en la que la proteína efectora inmunitaria es CCL21, IL-2 o CD40LT.
9. Composición de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el constructo de minigén de ADN codifica además una secuencia de péptido líder de retículo endoplasmático unida al extremo N del polipéptido.
10. Composición de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la utilización en la inhibición del crecimiento tumoral o las metástasis tumorales en un mamífero.
11. Composición de ADN para la utilización según la reivindicación 10, en la que el mamífero es un ser humano.
12. Composición de ADN para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, en la que la composición se administra por vía oral.
13. Artículo de fabricación que comprende una composición de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 envasada en un recipiente estéril, sellado herméticamente, presentando el recipiente una etiqueta fijada al mismo, portando la etiqueta un material impreso que identifica la composición y que proporciona una información útil para un individuo que administra dicha composición a un paciente.



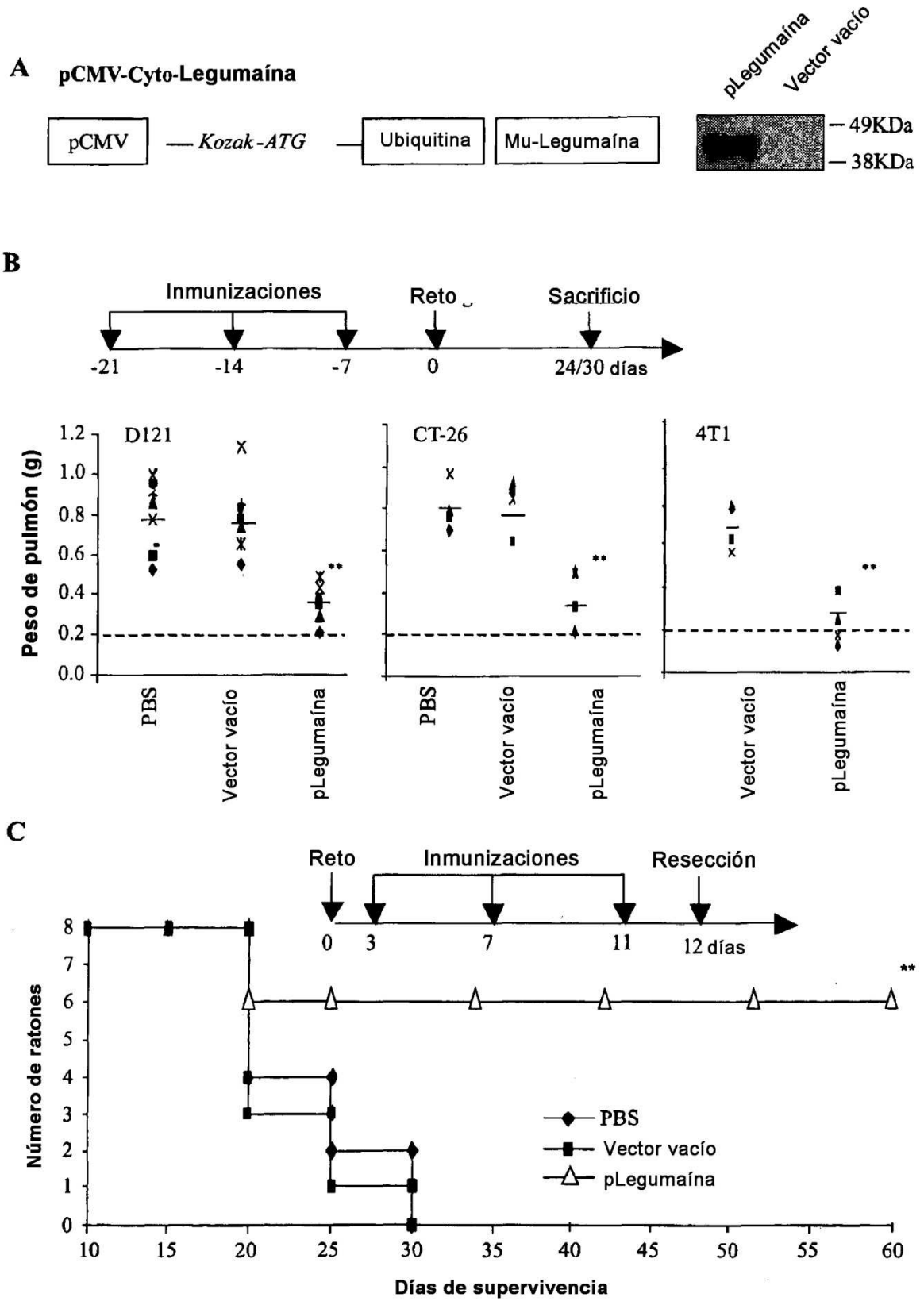


FIG. 2

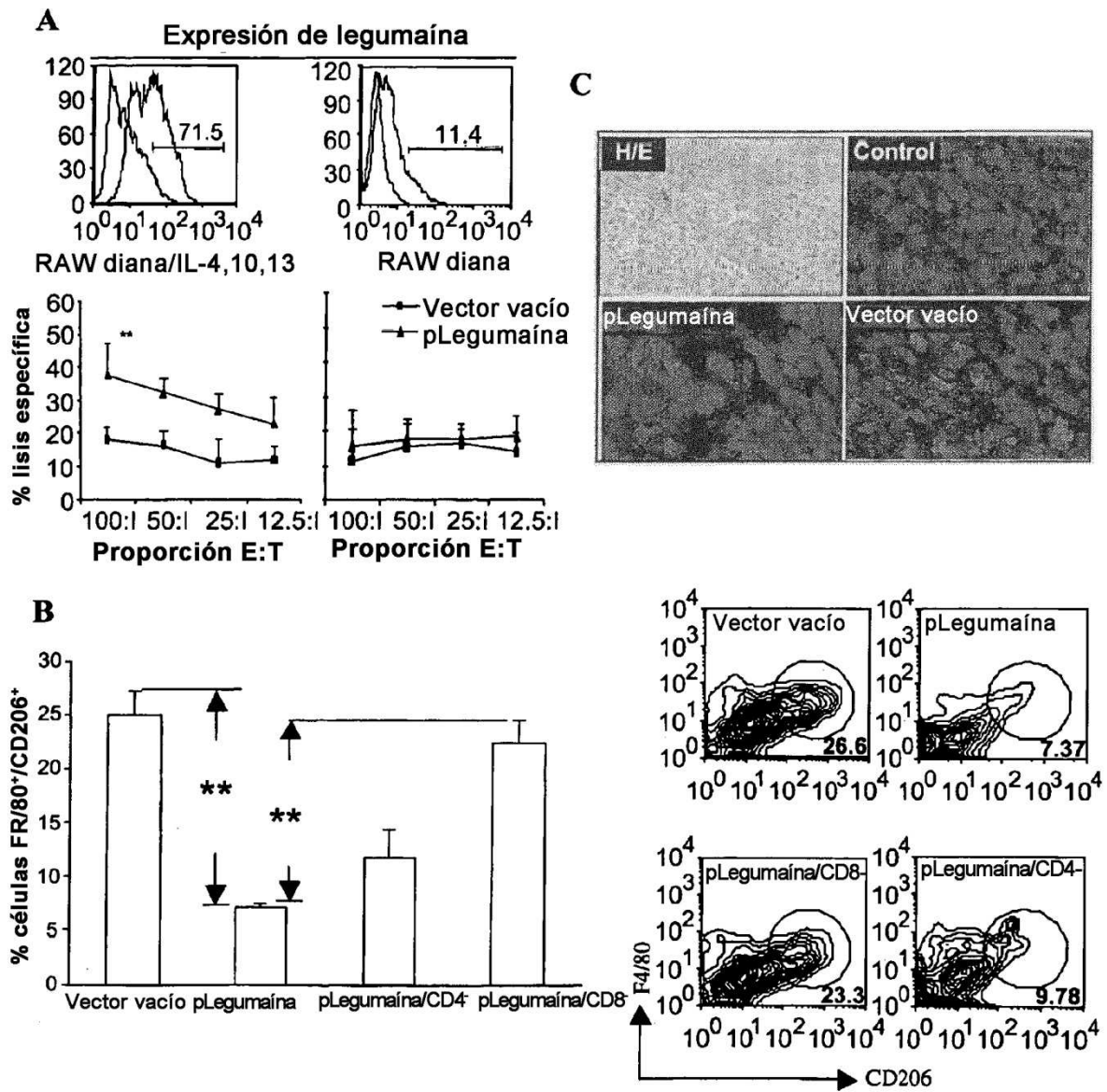
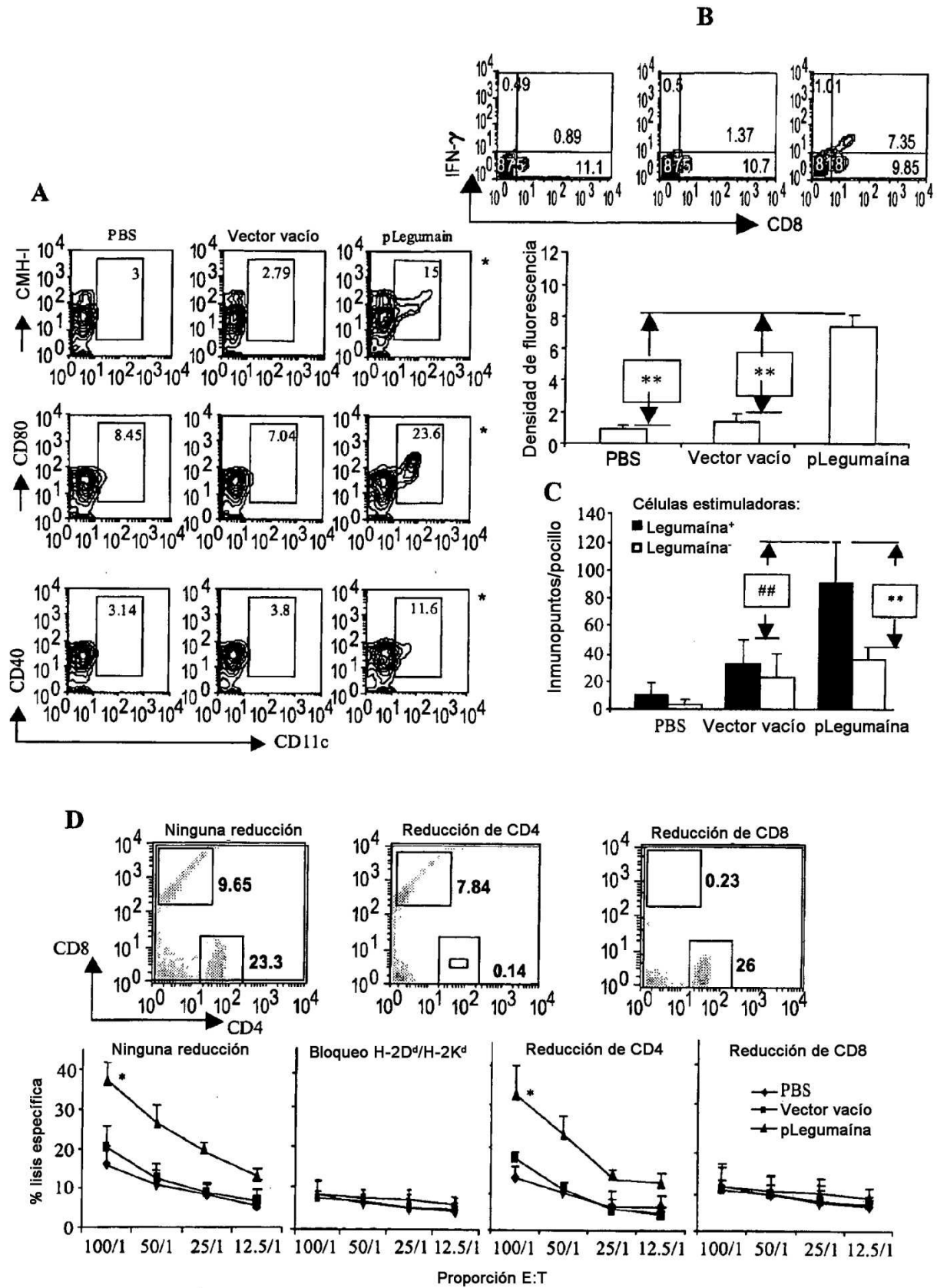


FIG. 3



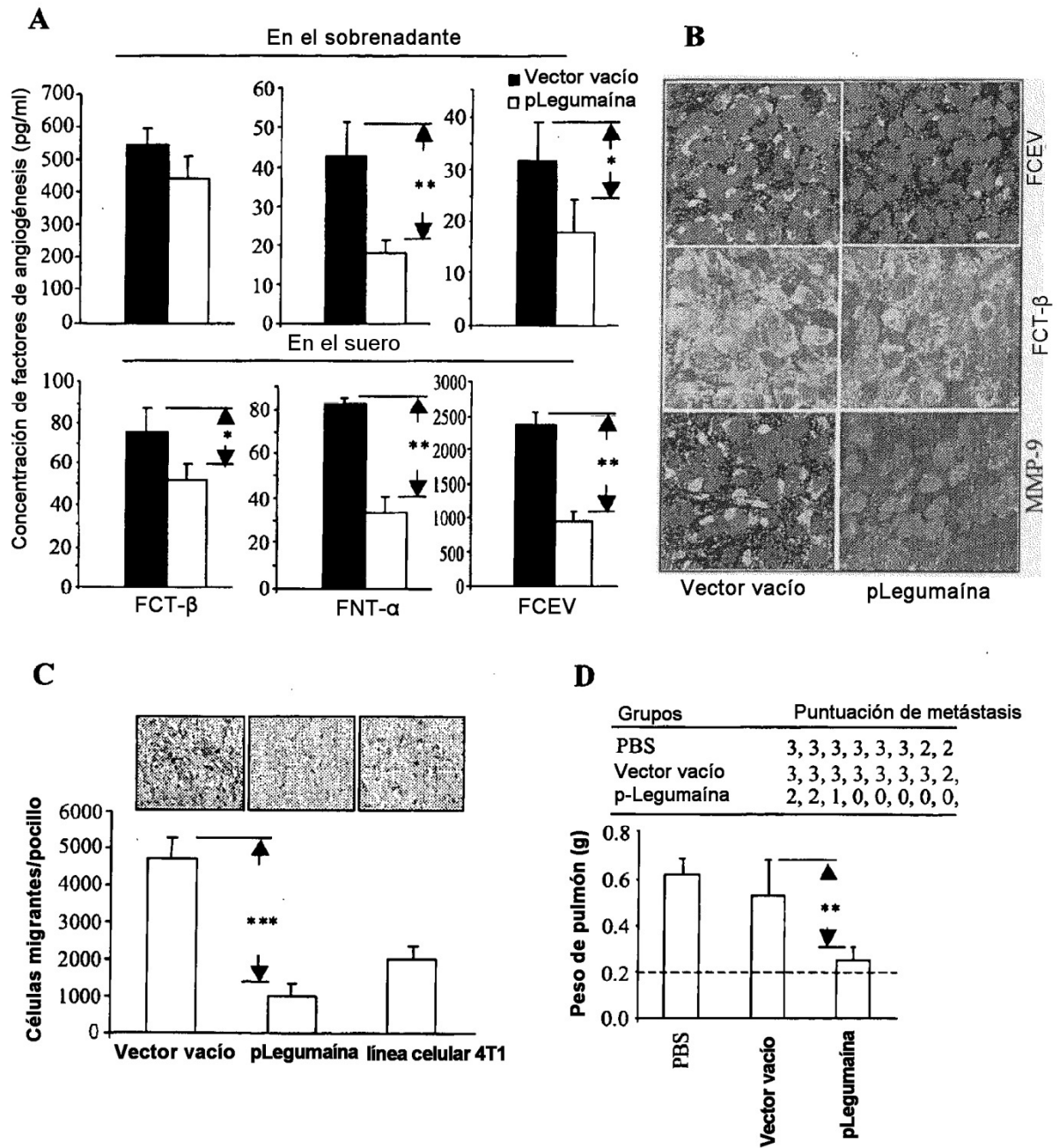


FIG. 5

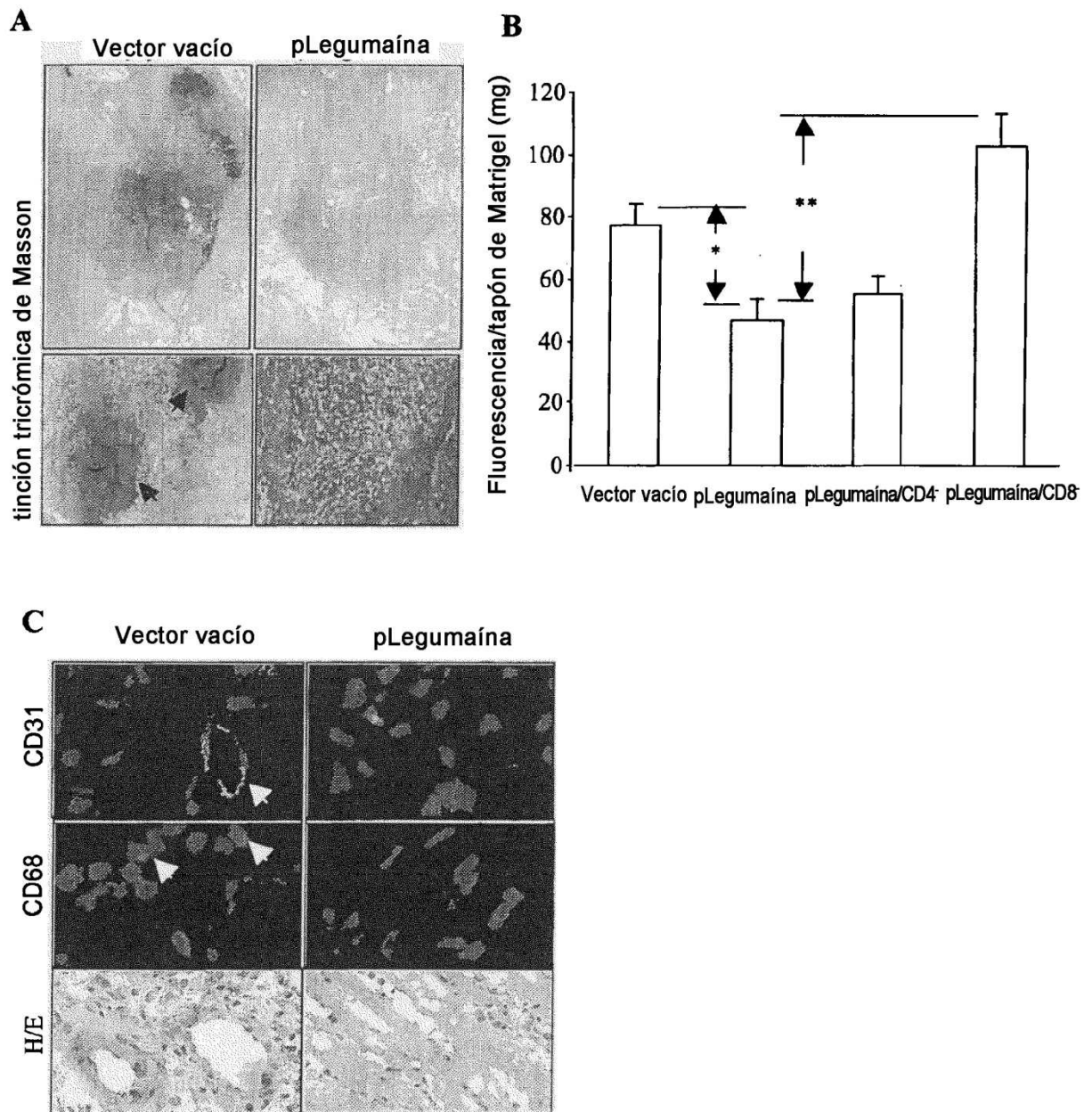
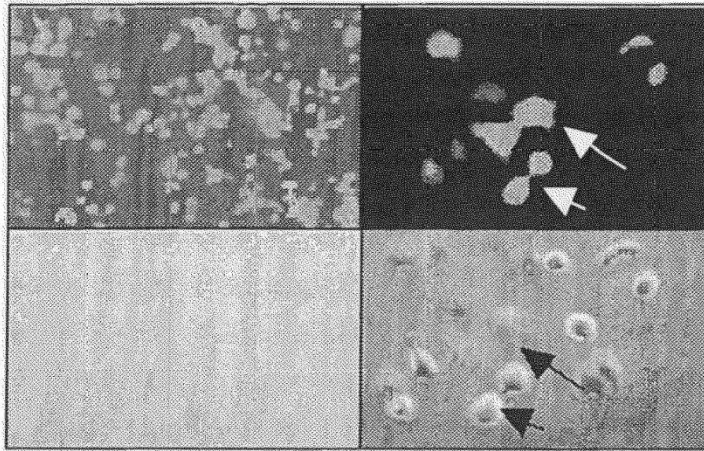


FIG. 6

A

células 4T1 transfectadas con Legumaína-GFP



B

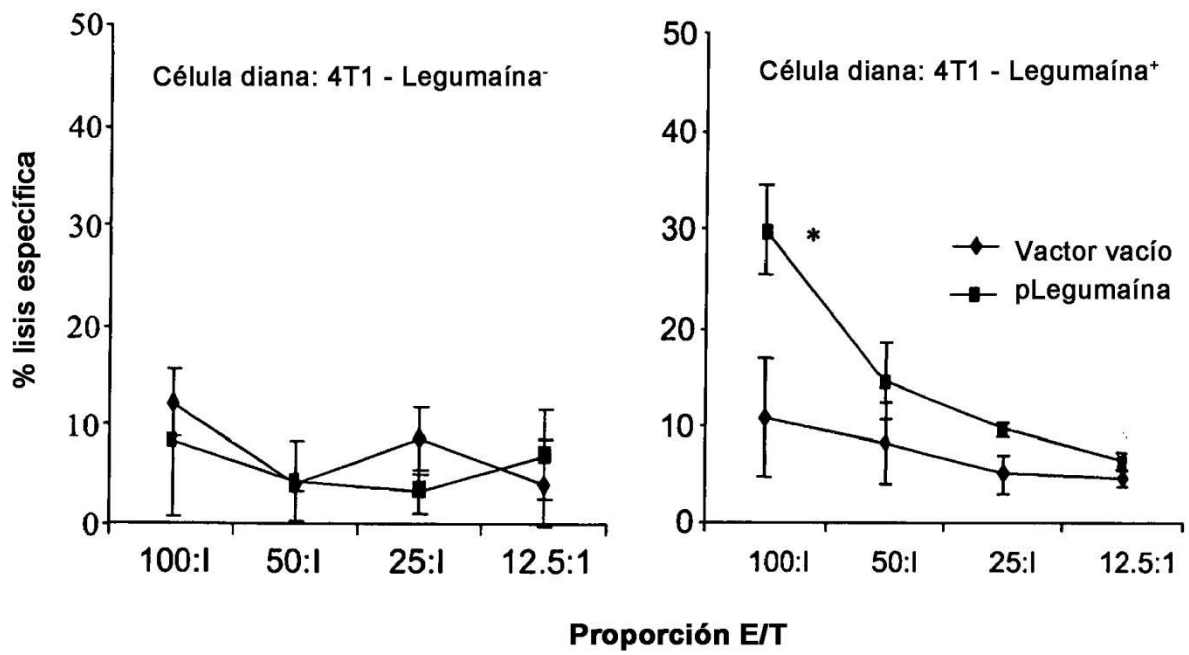


FIG. 7

atggtttgga	aagtagctgt	attcctcagt	gtggccctgg	gcattggtgc	cgttcctata	60
gatgatcctg	aagatggagg	caagcactgg	gtggtgatcg	tggcagggtc	aaatggctgg	120
tataattata	ggcaccaggc	agacgcgtgc	catgcctacc	agatcattca	ccgcaatggg	180
attcctgacg	aacagatcgt	tgtgatgatg	tacgatgaca	ttgcttactc	tgaagacaat	240
cccactccag	gaattgtgat	caacaggccc	aatggcacag	gtgtctatca	gggagtcccg	300
aaggactaca	ctggagagga	tgttaccoca	caaaatttcc	ttgctgtgtt	gagaggcgat	360
gcagaagcag	tgaagggcat	aggatccggc	aaagtccctga	agagtggccc	ccaggatcac	420
gtgttcattt	acttcactga	ccatggatct	actggaatac	tggtttttcc	caatgaagat	480
cttcatgtaa	aggacctgaa	tgagaccatc	cattacatgt	acaaacacaa	aatgtaccga	540
aagatggtgt	tctacattga	agcctgtgag	tctgggtcca	tgatgaacca	cctgccggat	600
aacatcaatg	tttatgcaac	tactgctgcc	aaccccagag	agtcgtccta	cgctgtttac	660
tatgatgaga	agagggtccac	gtacctgggg	gactggtaca	gcgtcaactg	gatggaagac	720
tcggacgtgg	aagatctgac	taaagagacc	ctgcacaagc	agtaccacct	ggtaaaatcg	780
cacaccaaca	ccagccacgt	catgcagtat	ggaaacaaaa	caatctccac	catgaaagtg	840
atgcagtttc	agggtatgaa	acgcaaagcc	agttctcccg	tccccctacc	tccagtcaca	900
caccttgacc	tcacccccag	ccctgatgtg	cctctcacca	tcatgaaaag	gaaactgatg	960
aacaccaatg	atctggagga	gtccaggcag	ctcacggagg	agatccagcg	gcactctggat	1020
gccaggcacc	tcattgagaa	gtcagtgcgt	aagatcgtct	ccttgctggc	agcgtccgag	1080
gctgaggtgg	agcagctcct	gtccgagaga	gccccgctca	cggggcacag	ctgctaccca	1140
gaggccctgc	tgcacttccg	gacccactgc	ttcaactggc	actccccac	gtacgagtat	1200
gcgttgagac	atthgtacgt	gctggtcaac	ctthgtgaga	agcgttatcc	acttcacagg	1260
ataaaattgt	ccatggacca	cgtgtgcctt	ggtcactatt	aa		1302

(SEC ID n° 1) Legumaina humana

FIG. 8

MVWKVAVFLSVALGIGAVPIDDPEDGGKHWVVIVAGSNGWYNYRH
 QADACHAYQIIHRNGIPDEQIVVMYDDIAYSEDNPTPGIVINRPNGTGVYQGVPKDYT
 GEDVTPQNFLAVLRGDAEAVKGIGSGKVLKSGPQDHVFIYFTDHGSTGILVFPNEDLHV
 KDLNETIHYMYKHKMYRKMVFYIEACESGSMNHLPDNINVYATTAANPRESSYACYD
 EKRSTYLGDWYSVNW MEDSDVEDLTKETLHKQYHLVKSHNTSHVMQYGNKTISTMKVM
 QFQGMKRKASSPVPLPPVTHLDLTPSPDVPLTIMKRKLMNTNDLEESRQLTEEIQRHLD
 ARHLIEKSVRKIVSLLAASEAEVEQLLSERAPLTGHSCYPEALLHFRTHCFNWHSPTYE
 YALRHLYVLVNLCEKPYPLHRIKLSMDHVCLGHY

(SEC ID n° 2) Legumaina humana

FIG. 9

ATGACCTGGAGAGTGGCTGTGCTTCTCAGCCTGGTGCTGGGTGCTGGTGCCGTTCCC
 GTCGGTGTGGACGATCCCGAGGATGGAGGCAAGCACTGGGTGGTGATTGTGGCGGGC
 TCCAATGGCTGGTATAATTACCGACACCAGGCAGACGCATGCCACGCCTACCAGATC
 ATCCACCGGAACGGGATTCTTGACGAGCAGATCATAGTGATGATGTATGACGACATT
 GCCAACTCTGAAGAAAACCTACCCCAGGTGTTGTGATCAACCGACCTAACGGCACA
 GATGTATACAAGGGAGTCCTGAAGGACTACACCGGAGAGGATGTGACTCCAGAGAAT
 TTCCTCGCCGTGCTGAGAGGTGACGCAGAAGCTGTGAAGGGCAAAGGGTCTGGAAAA
 GTCTTGAAGAGTGGCCCCCGAGATCATGTCTTCATTTACTTCACCGACCACGGAGCC
 ACCGGGATCCTGGTGTTTCTTAATGATGATCTTCATGTCAAGGACCTGAATAAGACT
 ATTCGCTACATGTATGAACACAAAATGTACCAGAAGATGGTGTTCTACATTGAAGCT
 TGTGAGTCTGGCTCCATGATGAACCACCTGCCCCGACGACATCAACGTTTATGCAACT
 ACTGCGGCCAACCCCAAGGAGTCATCTTATGCCTGCTACTACGACGAGGAGAGGGGC
 ACTTACCTGGGTGACTGGTACAGCGTCAACTGGATGGAAGACTCCGATGTGGAGGAC
 CTGACCAAAGAGACCCTTCACAAGCAGTACCACCTGGTCAAGTCCCACACCAACACC
 AGCCATGTGCAATATGGGAACAAATCTATCTCTACCATGAAAGTGATGCAGTTT
 CAGGGAATGAAGCACAGAGCCAGTTCCCCCATCTCCCTGCCTCCGGTCACACACCTT
 GACCTCACCCCCAGCCCTGACGTGCCCCCTGACCATCTTGAAGAGGAAGCTGCTGAGA
 ACCAACGACGTGAAGGAATCCCAGAATCTCATTGGGCAGATCCAGCAATTTCTGGAT
 GCCAGGCACGTCATTGAGAAGTCTGTGCACAAGATCGTTTCCCTGCTGGCGGGATTT
 GGGGAAACTGCTGAGAGACATCTGTGAGAGAGGACCATGCTCACAGCACATGACTGC
 TACCAGGAGGCTGTAACCCACTTCCGCACACACTGCTTTAACTGGCACTCTGTCACG
 TACGAGCATGCCTTGCGGTACTTGTATGTGCTGGCCAATCTCTGTGAGGCACCATAT
 CCGATTGACAGGATAGAGATGGCCATGGACAAAGTGTGTCTTAGTCACTACTGA

(SEC ID n° 3) Legumaina murina

FIG. 10

MTWRVAVLLSLVLGAGAVPVGVDDEPEDGGKHWVIVAGSNGWYNYRHQADACHAYQII
 HRNGIPDEQIIVMMYDDIANSEENPTPGVVINRPNGTDVYKGVLDYTGEDVTPENFLAVL
 RGDAEAVKKGSGKVLKSGPRDHVFIYFTDHGATGILVFPNDDLHVKDLNKTIRYMYEHK
 MYQKMVFYIEACESGSMNHLPPDDINVIYATTAANPKESSYACYDEERGTYLGDWYSVN
 WMEDSDVEDLTKETLHKQYHLVKSHNTNTSHVMQYGNKSISTMKVMQFQGMKHRASSPIS
 LPPVTHLDLTPSPDVPLTILKRKLLRTNDVKESQNLIGQIQFLDARHVIEKSVHKIVSLLAG
 FGETAERHLSERTMLTAHDCYQEA VTHFRTHCFNWHSVTYEHALRYLYVLANLCEAPYPI
 DRIEMAMDKVCLSHY

(SEC ID n° 4) Legumaina murina

FIG. 11

```

1  atcactctct ttaatcacta ctcacagtaa cctcaactcc tgccacaatg tacaggatgc
61 aactcctgtc ttgcattgca ctaagtcttg caottgtcac aaacagtgca cctacttcaa
121 gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcattttact gctggattta cagatgattt
181 tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgtcaca ttttaagttt
241 acatgcccaa gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa gaactcaaac
301 ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tcacttaaga cccagggact
361 taatcagcaa tatcaacgta atagttctgg aactaaaggg atctgaaaca acattcatgt
421 gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg attacctttt
481 gtcaaagcat catctcaaca ctgacttgat aattaagtgc ttcccactta aaacgtatca
541 ggccttctat ttattttaa atttaaattt tatatttatt gttgaatgta tggtttgota
601 cctattgtaa ctattattct taatcttaaa actataaata tggatctttt atgattcttt
661 ttgtaagccc taggggctct aaaatggttt cacttattta tcccaaaata tttattatta
721 tgttgaatgt taaatatagt atctatgtag attgggttagt aaaactattt aataaatttg
781 ataaatataa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaa

```

(SEC ID n° 5) ADN de IL-2 humana

FIG. 12

MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNY
 KNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP
 RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

(SEC ID n° 6) IL-2 humana

FIG. 13

```

1  cttgcagctg cccacctcac cctcagctct ggctctttac tcacctcta ccacagacat
61 ggctcagtca ctggctctga gcctccttat cctggttctg gcctttggca tccccaggac
121 ccaaggcagt gatggagggg ctcaggactg ttgcctcaag tacagccaaa ggaagattcc
181 cgccaagggt gtccgcagct accggaagca ggaaccaagc ttaggctgct ccatcccagc
241 tatcctgttc ttgccccgca agcgtcttca ggcagagcta tgtgcagacc caaaggagct
301 ctgggtgcag cagctgatgc agcatctgga caagacacca tccccacaga aaccagccca
361 gggctgcagg aaggacaggg gggcctccaa gactggcaag aaaggaaagg gctccaaagg
421 ctgcaagagg actgagcggg cacagacccc taaagggcc tagcccagtg agcagcctgg
481 agccctggag accccaccag cctcaccaac gcttgaagcc tgaacccaag atgcaagaag
541 gaggetatgc tcagggggccc tggagcagcc accccatget ggctttgcca cactctttct
601 cctgctttta ccaccccatc tgcattccca gctctaccct gcatggctga gctgcccaca
661 gcaggccagg tccagagaga ccgaggaggg agagtctccc agggagcatg agaggaggca
721 gcaggactgt ccccttgaag gagaatcatc aggaccctgg acctgatacg gctccccagt
781 acaccccacc tcttccttgt aaatatgatt tatacctaac tgaataaaaa gctgttctgt
841 cttcccaccc gc

```

(SEC ID n° 7) ADN de CCL21 humana

FIG. 14

```

MAQSLALSLLILVLAFGIPRTQGS DGAQDCCLKYSQRKIPAKVVRSYRKQ
EPSLGCSIPAILFLPRKRSQAELCADPKELWVQQLMQHLDKTPSPQKPAQG
CRKDRGASKTGKKGKSGKCKRTERSQTPKGP

```

(SEC ID n° 8) CCL21 humana

FIG. 15

```

1  cttctctgcc agaagatacc atttcaactt taacacagca tgatcgaaac atacaaccaa
61  acttctcccc gatctgcggc cactggactg cccatcagca tgaaaatttt tatgtattta
121 cttactgttt ttcttatcac ccagatgatt gggtcagcac tttttgctgt gtatcttcat
181 agaaggttgg acaagataga agatgaaagg aatcttcatg aagattttgt attcatgaaa
241 acgatacaga gatgcaacac aggagaaaga tccttatcct tactgaactg tgaggagatt
301 aaaagccagt ttgaaggctt tgtgaaggat ataatgttaa acaaagagga gacgaagaaa
361 gaaaacagct ttgaaatgca aaaaggatgat cagaatcctc aaattgoggc acatgtcata
421 agtgaggcca gcagtaaaac aacatctgtg ttacagtggg ctgaaaaagg atactacacc
481 atgagcaaca acttggtaac cctggaaaat gggaaacagc tgaccgttaa aagacaagga
541 ctctattata tctatgcccc agtcaccttc tgttccaatc gggaagcttc gagtcaagct
601 ccattttatag ccagcctctg cctaaagtcc cccggtagat tcgagagaat cttactcaga
661 gctgcaaata cccacagttc cgccaaacct tgccgggcaac aatccattca cttgggagga
721 gtatttgaat tgcaaccagg tgcttcgggtg tttgtcaatg tgactgatcc aagccaagtg
781 agccatggca ctggcttcac gtcctttggc ttactcaaac tctgaacagt gtcaccttgc
841 aggctgtggt ggagctgacg ctgggagctc tcataataca gcacagcggg taagcccacc
901 ccctgttaac tgcctattta taaccctagg atcctcctta tggagaacta tttattatac
961 actccaaggc atgtagaact gtaataagtg aattacaggt cacatgaaac caaaacgggc
1021 cctgctccat aagagcttat atatctgaag cagcaacccc actgatgcag acatccagag
1081 agtcctatga aaagacaagg ccattatgca cagggtgaat tctgagtaaa cagcagataa
1141 cttgccaaagt tcagttttgt ttctttgctg gcagtgtctt tccatggata atgcatttga
1201 tttatcagtg aagatgcaga agggaaatgg ggagcctcag ctcacattca gttatggttg
1261 actctggggt cctatggcct tgttggaggg ggccaggctc tagaacgtct aacacagtgg
1321 agaaccgaaa ccccccccc ccccccgcc accctctcgg acagttatto attctcttct
1381 aatctctctc tctccatctc tctctttcag tctctctctc tcaacctctt tcttccaatc
1441 tctctttctc aatctctctg tttccctttg tcagtctctt ccctccccc gtctctcttc
1501 tcaatcccc tttctaacac acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac
1561 acacacacac acacacacac agagtcaggc cgttgctagt cagttctctt ctttccaccc
1621 tgtccctatc tctaccacta tagatgaggg tgaggagtag ggagtgcagc cctgagcctg
1681 cccactcctc attacgaaat gactgtattt aaaggaaatc tattgtatct acctgcagtc
1741 tccattgttt ccagagtga cttgtaatta tcttggttatt tattttttga ataataaaga
1801 cctcttaaca ttaaaa

```

(SEC ID n° 9) ADN de CD40L humano

FIG. 16

```

MIETYNQTSP RSAATGLPIS MKIFMYLLTV FLITQMIGSA LFAVYLHRRL DKIEDERNLH
EDFVFMKTIQ RCNTGERSLS LLNCEEIKSQ FEGFVKDIML NKEETKKENS FEMQKGDQNP
QIAAHVISEA SSKTTSVLQW AEKGYTMSN NLVTLENGKQ LTVKRQGLYY IYAQVTFCSN
REASSQAPFI ASLCLKSPGR FERILLRAAN THSSAKPCGQ QSIHLGGVFE LQPGASVFN
VTDPSQVSHG TGFTSFGLLK L

```

(SEC ID n° 10) CD40L humano

FIG. 17

ATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACCGGCAAGACCATCACCCCTAGAGGTGGAGCCCAGTGACACCATCGAG
AACGTGAAGGCCAAGATCCAGGATAAAGAGGGGCATCCCCCCTGACCAGCAGAGGCTGATCTTTGCCGGCAAG
CAGCTGGAAGATGGCCGCACCCCTCTCTGATTACAACATCCAGAAGGAGTCAACCCTGCACCTGGTCCTTCGC
CTGAGAGGTGGCACCTGGAGAGTGGCTGTGCTTCTCAGCCTGGTGTGGGTGCTGGTGCCGTTCCCGTCGGT
GTGGACGATCCCGAGGATGGAGGCAAGCACTGGGTGGTGATTGTGGCGGGCTCCAATGGCTGGTATAATTAC
CGACACCAGGCAGACGCATGCCACGCCTACCAGATCATCCACCGGAACGGGATTCTTGACGAGCAGATCATA
GTGATGATGTATGACGACATTGCCAACTCTGAAGAAAACCCTACCCAGGTGTTGTGATCAACCGACCTAAC
GGCACAGATGTATACAAGGGAGTCTGAAGGACTACACCGGAGAGGATGTGACTCCAGAGAATTTCCCTCGCC
GTGCTGAGAGGTGACGCAGAAGCTGTGAAGGGCAAAGGGTCTGGAAAAGTCTTGAAGAGTGGCCCCGAGAT
CATGTCTTCATTTACTTCACCGACCACGGAGCCACCGGGATCCTGGTGTTTCCCTAATGATGATCTTCATGTC
AAGGACCTGAATAAGACTATTTCGCTACATGTATGAACACAAAATGTACCAGAAGATGGTGTTCTACATTGAA
GCTTGTGAGTCTGGCTCCATGATGAACCACCTGCCCGACGACATCAACGTTTATGCAACTACTGCGGCCAAC
CCCAAGGAGTCATCTTATGCCTGCTACTACGACGAGGAGAGGGGCACCTTACCTGGGTGACTGGTACAGCGTC
AACTGGATGGAAGACTCCGATGTGGAGGACCTGACCAAAGAGACCCTTCACAAGCAGTACCACCTGGTCAAG
TCCCACACCAACACCAGCCATGTCTATGCAATATGGGAACAAATCTATCTCTACCATGAAAGTGATGCAGTTT
CAGGGAATGAAGCACAGAGCCAGTTCCCCCATCTCCCTGCCTCCGGTCACACACCTTGACCTACCCCCAGC
CCTGACGTGCCCCTGACCATCTTGAAGAGGAAGCTGCTGAGAACCAACGACGTGAAGGAATCCCAGAATCTC
ATTGGGCAGATCCAGCAATTTCTGGATGCCAGGCACGTCATTGAGAAGTCTGTGCACÀAGATCGTTTCCCTG
CTGGCGGGATTTGGGGAACTGCTGAGAGACATCTGTGACAGAGGACCATGCTCACAGCACATGACTGCTAC
CAGGAGGCTGTAACCCACTTCCGCACACACTGCTTTAACTGGCACTCTGTACGTACGAGCATGCCTTGCGG
TACTTGATGTGCTGGCCAATCTCTGTGAGGCACCATATCCGATTGACAGGATAGAGATGGCCATGGACAAA
GTGTGTCTTAGTCACTACTGA

(SEC ID n° 11) Legumaina murina ubiquitinada

FIG. 18

MQIFVKLTGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKEST
LHLVLRRLRGGTWRVAVLLSLVLGAGAVPVGVDDPEDGGKHWVIVAGSNGWYNRYRHQADACHAYQI
IHRNGIPDEQIIIVMMYDDIANSEENPTPGVVINRPNGTDVYKGVLDYTGEDVTPENFLAVLRGDA
EAVKKGSGKVLKSGPRDHVFIYFTDHGATGILVFPNDDLHVKDLNKTIRYMYEHKMYQKMVFYIE
ACESGSMNHLPPDDINVYATTAANPKESSYACYDEERGTYLGDWYSVNWMEGSDVEDLTKETLHK
QYHLVKSHNTNTSHVMQYGNKSISTMKVMQFQGMKHRASSPISLPPVTHLDLTPSPDVPLTILKRKL
LRTNDVKESQNLIGQIQFLDARHVIEKSVHKIVSLLAGFGETAERHLSERTMLTAHDCYQEAVTH
FRTHCFNWSVTYEHALRYLYVLANLCEAPYPIDRIEMAMDKVCLSHY

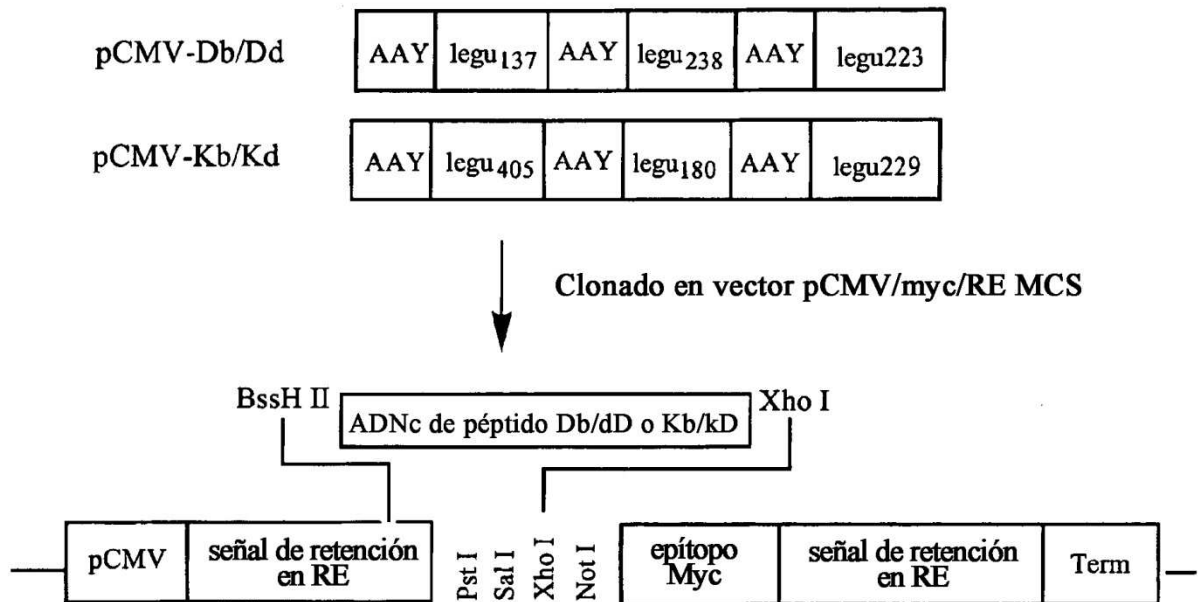
(SEC ID n° 12) Legumaina murina ubiquitinada

FIG. 19

CMH-I				
Nombre del péptido*	Secuencia	SEC ID n°	(puntuación de unión) Índice antigénico	tipo de H-2
Legu137	SGPRDHVFI	13	9/240	1,7
Legu238	LPPVTHLDL	14	7/20	1,7
Legu223	YDEERGTYL	15	-/6	1,7
Legu405	RYLYVLANL	16	1/4800	0,4
Legu180	MYQKMVFYI	17	1/2400	0,8
Legu229	TYLGDWYSV	18	-/1200	1,7
				H-2Db1/Dd1
				H-2Db2/Dd2
				H-2Db2/Dd2
				H-2Kb1/Kd1
				H-2Kb2/Kd2
				H-2Kb3/Kd3

*el número indica la posición del primer residuo del péptido (basada en la legumaína murina de longitud completa)

FIG. 20



péptido de señal RE = M G W S C I I L F L V A T A T A H S (SEC ID nº 19)

epítipo Myc = E Q K L I S E E D L (SEC ID nº 20)

señal de retención en RE = S E K D E L (SEC ID nº 21)

FIG. 21

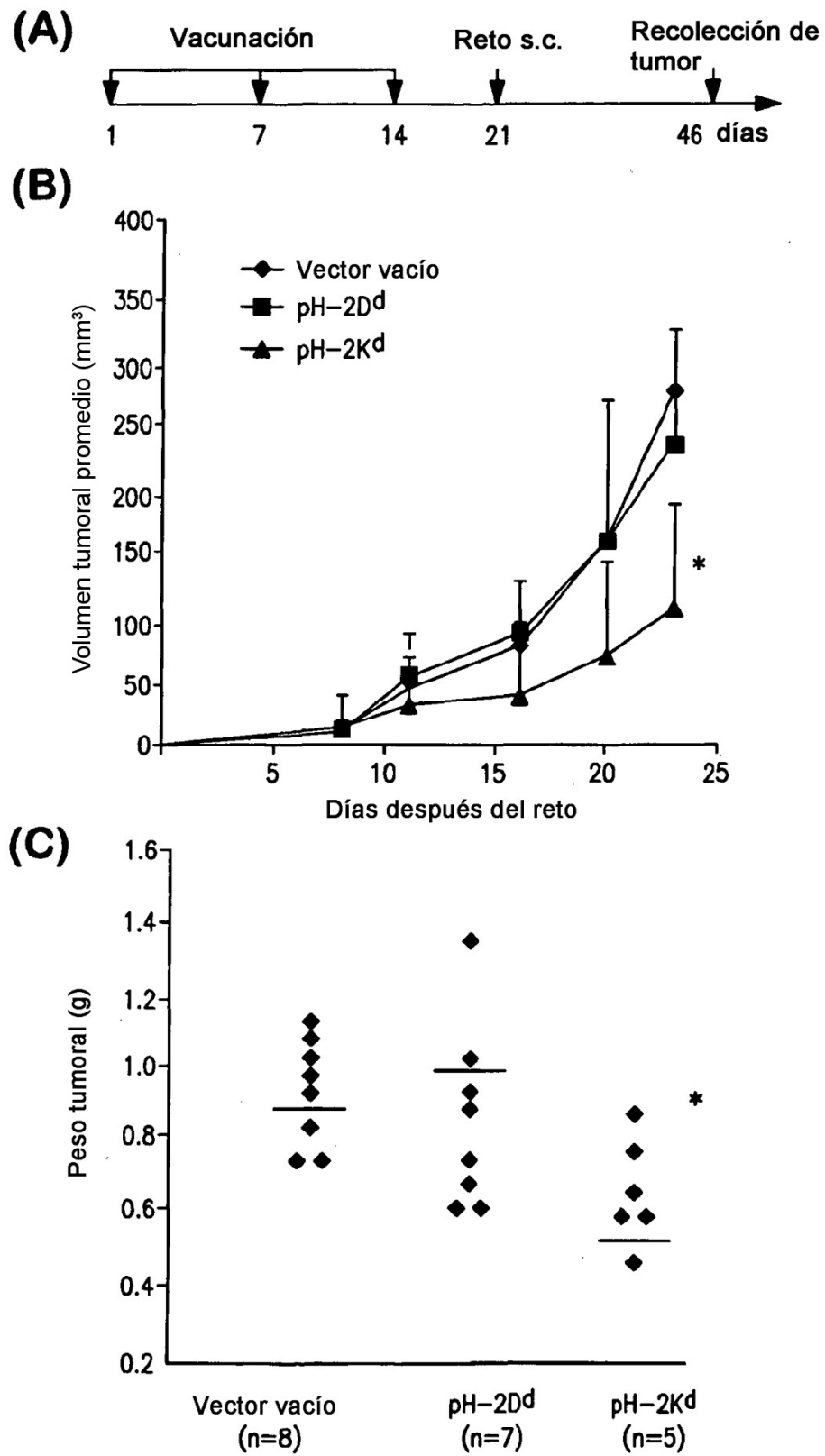


FIG. 22

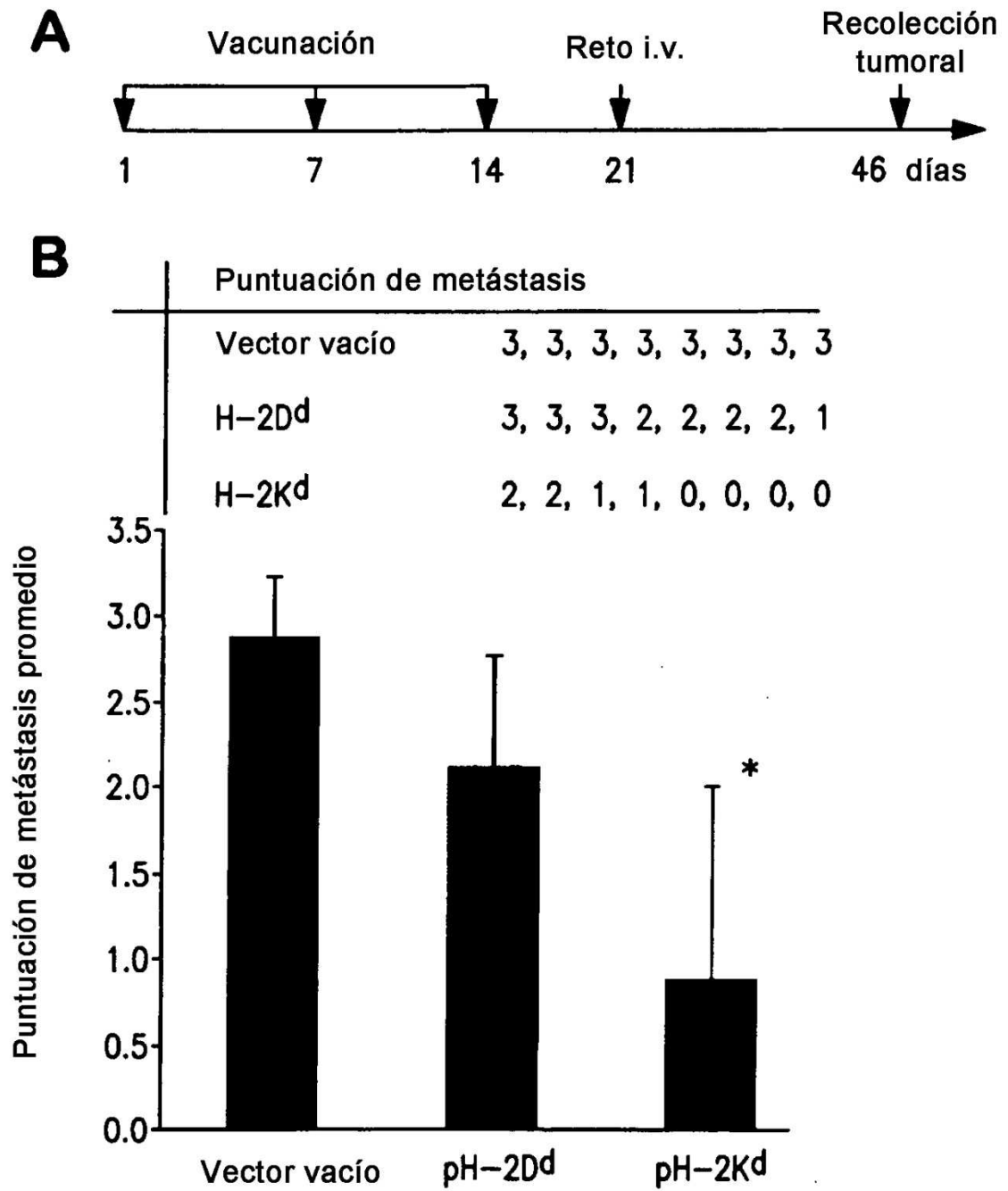


FIG. 23

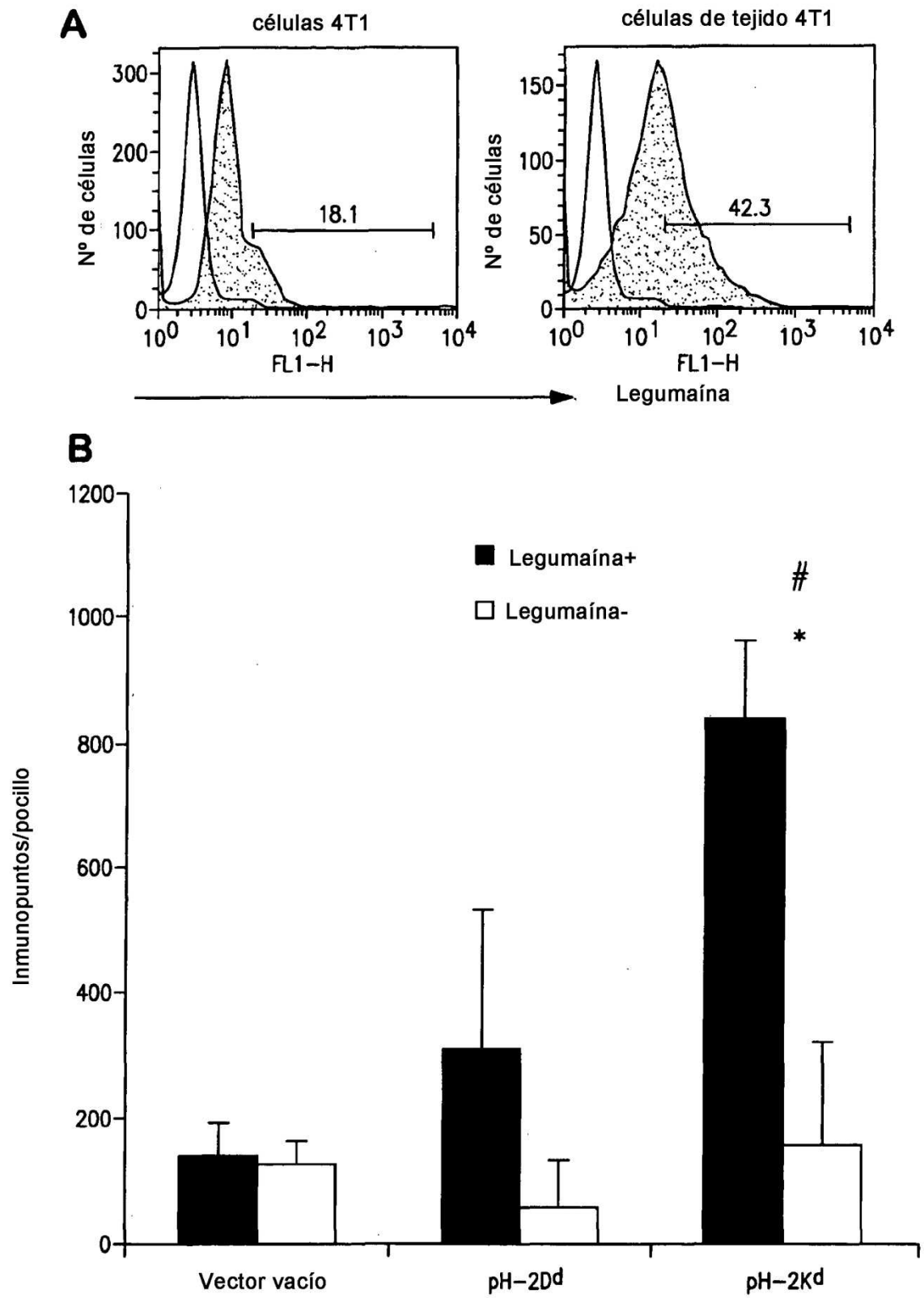


FIG. 24

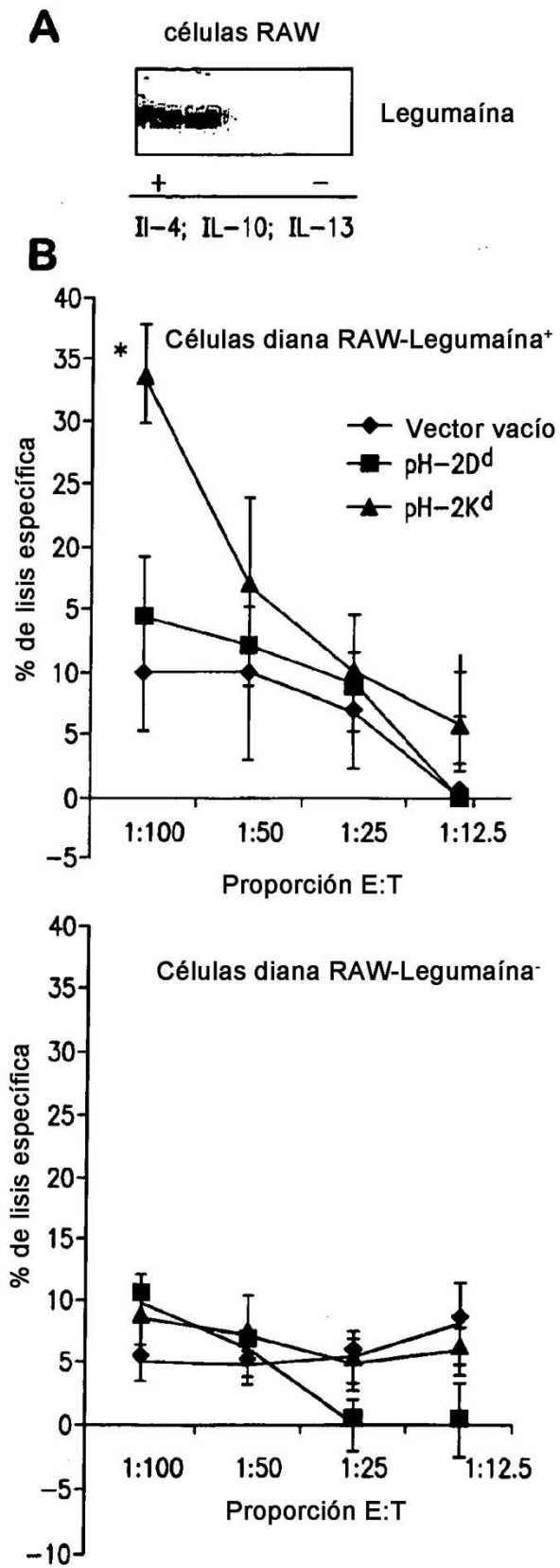


FIG. 25

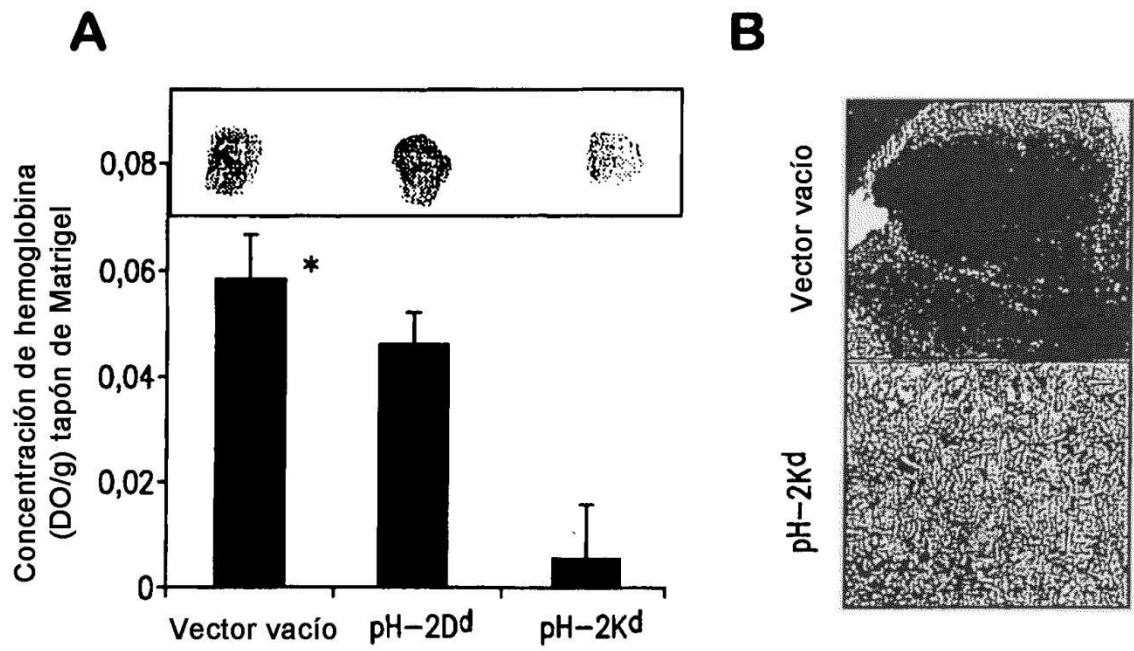


FIG. 26