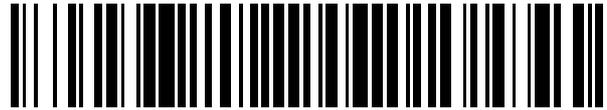


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 199**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2009 PCT/US2009/037027**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2009 WO09114735**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2009 E 09719482 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2249645**

54 Título: **Vacunas de ADN y procedimientos de prevención de rechazo tras un trasplante**

30 Prioridad:

**12.03.2008 US 36004 P**

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

**06.02.2018**

73 Titular/es:

**LOMA LINDA UNIVERSITY (100.0%)  
24888 Prospect Street  
Loma Linda, CA 92350, US**

72 Inventor/es:

**LI, FENGCHUN y  
ESCHER, ALAN, P.**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 653 199 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

Vacunas de ADN y procedimientos de prevención de rechazo tras un trasplante.

## 5 ANTECEDENTES

10 [0001] La prevención del rechazo de órganos en la clínica se basa actualmente en la administración de cócteles de inmunosupresores (Tacrolimus, Rapamicina, MMF, AZA, corticosteroides). Los fármacos son eficaces para la prevención del rechazo agudo, pero no previenen el rechazo crónico. Además, debido a que estos fármacos interfieren con respuestas no específicamente inmunitarias, su uso crónico expone a los pacientes a altos riesgos de padecer cáncer e infección. Otras estrategias que se están sometiendo a ensayo son un bloqueo coestimulador y un quimerismo de la médula ósea. Sin embargo, "el rechazo crónico de aparición tardía, así como la toxicidad de algunos de estos regímenes, se mantienen como limitaciones significativas que obstaculizan la aplicación clínica" (Ochiai y col., Front Biosci. 2007, 12: 4248-53). El documento WO 2006/124375 describe plásmidos que codifican proteínas pro-apoptóticas para el tratamiento de trastornos inflamatorios mediados por el sistema inmunológico.

## RESUMEN

20 [0002] La invención se define por las reivindicaciones. Estos aspectos/ejemplos de la presente descripción que constituye la invención se definen por las reivindicaciones. Un ejemplo de la presente descripción comprende un procedimiento de prevención, retraso de la aparición o tratamiento del rechazo de un aloinjerto o de un trasplante alogénico. El procedimiento comprende: (A) la selección de un receptor en necesidad de un injerto o trasplante de un donante de aloinjerto o de trasplante alogénico; (B) el injerto de un tejido o el trasplante de un órgano sólido del donante al receptor; y (C) la administración al receptor de una o más de una dosis de una vacuna de ADN. La vacuna de ADN se selecciona del grupo que consiste en: una vacuna de tres plásmidos individuales y de dos plásmidos. El primer plásmido comprende (a) un polinucleótido que codifica una proteína pro-apoptótica; y (b) un promotor que controla la expresión del polinucleótido que codifica la proteína pro-apoptótica. El segundo plásmido comprende: (a) una secuencia de polinucleótidos que codifica un autoantígeno o antígeno del donante; (b) un promotor que controla la expresión de la secuencia de polinucleótidos que codifica el autoantígeno o el antígeno del donante; y (c) una pluralidad de motivos CpG, en la que los motivos CpG están metilados suficientemente para disminuir la respuesta inmunitaria del receptor a motivos CpG no metilados. El tercer plásmido comprende: (a) una secuencia de polinucleótidos que codifica un autoantígeno o un antígeno del donante; (b) un promotor que controla la expresión de la secuencia de polinucleótidos que codifica el autoantígeno o el antígeno del donante; (c) un polinucleótido que codifica una proteína pro-apoptótica; (d) un promotor que controla la expresión del polinucleótido que codifica la proteína pro-apoptótica; y (e) una pluralidad de motivos CpG, en la que los motivos CpG están metilados suficientemente para disminuir la respuesta inmunitaria del receptor a motivos CpG no metilados. La vacuna de dos plásmidos comprende una combinación del primer plásmido y el segundo plásmido.

40 [0003] En algunos ejemplos de la presente descripción, los tejidos injertados u órganos trasplantados se seleccionan del grupo que consiste en injertos cutáneos, trasplantes de células de los islotes, y trasplantes de órganos parciales o completos. En ejemplos adicionales del procedimiento, los trasplantes de órganos parciales o completos se seleccionan del grupo que consiste en corazones, pulmones, riñones e hígados.

45 [0004] En un ejemplo del procedimiento, la vacuna de ADN es uno o más de un plásmido que comprende una pluralidad de motivos CpG metilados, en la que uno o más de un plásmido es resistente a la digestión por la enzima de restricción HpaII. En un ejemplo preferido, la vacuna de ADN es uno o más de un plásmido que comprende una pluralidad de motivos CpG, en la que los motivos CpG de uno o más de un plásmido se metilan por medio de la metilasa SssI.

50 [0005] En un ejemplo de la presente descripción, el promotor capaz de expresar el polinucleótido que codifica el autoantígeno o el antígeno del donante, o el promotor capaz de expresar el polinucleótido que codifica la proteína pro-apoptótica, o ambos, el promotor capaz de expresar el polinucleótido que codifica el autoantígeno o el antígeno del donante y el promotor capaz de expresar el polinucleótido que codifica la proteína pro-apoptótica mantienen su función promotora tras la metilación.

55 [0006] En otro ejemplo del presente procedimiento, el tercer plásmido comprende además una secuencia de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), en el que la secuencia IRES es la SEQ ID NO:3 del virus EMC, para permitir la traducción del polinucleótido que codifica el autoantígeno o el antígeno del donante, y el polinucleótido que codifica la proteína pro-apoptótica del mismo transcrito.

60 [0007] En un ejemplo de la presente descripción, la vacuna de ADN comprende el primer plásmido y el segundo plásmido en una relación comprendida entre 1/1.000 y 1.000/1. En un ejemplo preferido, la vacuna de ADN comprende el primer plásmido y el segundo plásmido en una relación comprendida entre 1/100 y 100/1. En un ejemplo particularmente preferido, la vacuna de ADN comprende el primer plásmido y el segundo plásmido en una

relación comprendida entre 1/10 y 10/1.

- 5 **[0008]** En ejemplos específicos de la presente descripción, el autoantígeno o el antígeno del donante se selecciona del grupo que consiste en anhidrasa carbónica II, colágeno, CYP2D6 (citocromo P450, familia 2, subfamilia Device 400, polipéptido 6), descarboxilasa de ácido glutámico, descarboxilasa de ácido glutámico secretada 55, SEQ ID NO:1, insulina, proteína básica de mielina y SOX-10 (caja SRY que contiene el gen 10) o cualquier autoantígeno relevante que está presente tanto en el receptor del trasplante como del aloinjerto del donante.
- 10 **[0009]** En ejemplos específicos adicionales, la proteína pro-apoptótica se selecciona del grupo que consiste en BAX, SEQ ID NO:2, una caspasa modificada, receptor del factor de necrosis tumoral, receptor de muerte 3 (DR3), receptor de muerte 4 (DR4), receptor de muerte 5 (DR5) y un receptor FAS.
- 15 **[0010]** En un ejemplo del procedimiento, la vacuna de ADN se administra en una dosis eficaz, en la que una dosis eficaz es una cantidad suficiente para prevenir, retrasar la aparición, o tratar el rechazo de un aloinjerto o de un trasplante alogénico por parte del receptor.
- 20 **[0011]** En otro ejemplo del procedimiento, la vacuna de ADN se administra en una dosis eficaz, en la que una dosis eficaz es una cantidad suficiente para inducir una respuesta tolerogénica específica del donante.
- 25 **[0012]** En ejemplos preferidos, la vacuna de ADN es (a) administrada en una pluralidad de dosis; (b) la dosis de la vacuna de ADN es de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal del receptor a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del receptor; y/o (c) la dosis se administra semanalmente entre dos veces y 100 veces.
- 30 **[0013]** En algunos ejemplos, la vacuna de ADN se administra por una vía epidérmica, intradérmica, intramuscular, intranasal, intravenosa, intraperitoneal u oral. En un ejemplo preferido, la vacuna de ADN se administra por una inyección proximal al lugar del aloinjerto o trasplante alogénico.
- 35 **[0014]** En un ejemplo, el procedimiento comprende además la etapa de administración de una dosis de uno o más de un agente inmunosupresor antes, el día de y/o después del injerto o trasplante. Como un experto en la materia apreciará, con referencia a la presente descripción, la dosis de uno o más de un agente inmunosupresor puede administrarse simultáneamente, separadamente o secuencialmente.
- 40 **[0015]** En ejemplos específicos, uno o más de un agente inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en corticosteroides, glucocorticoides, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, azatioprina, metotrexato, ciclosporina, micofenolato mofetilo, ácido micofenólico, tacrolimus, sirolimus, everolimus, mizoribina, leflunomida, desoxispergualina, brequinar, azodicarbonamida, análogos de vitamina D, globulina antilinfocítica, globulina antitumoral, anticuerpos monoclonales anti-CD3, anticuerpos anti-receptor de interleucina-2 (anti-CD25), anticuerpos anti-CD52, anticuerpos anti-CD20, reactivos anti-factor de necrosis tumoral e inhibidores de LFA-1.
- 45 **[0016]** En un ejemplo preferido, el procedimiento incluye la etapa de la administración de una dosis única de globulina antilinfocítica, a una dosificación de aproximadamente 1,6 mg/20 g de peso corporal, el día del injerto o trasplante.
- 50 **[0017]** En otro ejemplo preferido, el procedimiento incluye la etapa de la administración de rapamicina a una dosificación de 0,05 a 15 mg/día.
- 55 **[0018]** Un ejemplo de la presente descripción proporciona un procedimiento de prevención, retardo de la aparición o tratamiento del rechazo de un aloinjerto o un trasplante alogénico, que comprende las etapas de: (a) la selección de un receptor de injerto o trasplante y un donante de aloinjerto o de trasplante alogénico; (B) el injerto de un tejido o trasplante de un órgano sólido del donante al receptor; y (C) la inducción de una respuesta inmunitaria específica del donante que eleva la actividad de linfocitos T reguladora mediante la administración al receptor de una o más de una dosis de una vacuna de ADN que comprende un primer plásmido y un segundo plásmido. El primer plásmido comprende: (a) un polinucleótido que codifica una proteína pro-apoptótica; y (b) un promotor que controla la expresión del polinucleótido que codifica la proteína pro-apoptótica. El segundo plásmido comprende: (a) una secuencia de polinucleótidos que codifica un autoantígeno o un antígeno del donante; (b) un promotor que controla la expresión de la secuencia de polinucleótidos que codifica el autoantígeno o el antígeno del donante; y (c) una pluralidad de motivos CpG, en la que los motivos CpG están metilados suficientemente para disminuir la respuesta inmunitaria del receptor a motivos CpG no metilados.
- 60 **[0019]** En una versión de este ejemplo, la administración de los plásmidos eleva la expresión de IL-4 (interleucina 4). En otra versión de este ejemplo, la administración de los plásmidos induce, además, una respuesta tolerogénica específica del donante. En otra versión de este ejemplo, la administración de los plásmidos eleva la expresión del receptor Fc inhibidor, FcγIIb y IL-1ra. En otra versión de este ejemplo, la administración de los

plásmidos reduce una respuesta autoinmunitaria. En una versión alternativa de este ejemplo, la administración de los plásmidos reduce la expresión de Tnfa (factor de necrosis tumoral) e Ifny (interferón gamma). Como un experto en la materia apreciará con referencia a la presente descripción, versiones alternativas del procedimiento pueden incluir etapas alternativas en las que el primer plásmido y el segundo plásmido se administran simultánea o secuencialmente.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0020] Estas características, aspectos y ventajas de la presente descripción se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción, reivindicaciones adjuntas y dibujos anexos en los que:

La Figura 1 muestra representaciones esquemáticas de los plásmidos descritos en esta invención, incluyendo vectores plasmídicos pSG5 y pND2, un plásmido que contiene un polinucleótido que codifica una decarboxilasa de ácido glutámico secretada 55 (SGAD55) operativamente unida a un promotor SV40 (pSG5-sgad55), un plásmido que contiene un polinucleótido que codifica una proteína pro-apoptótica (hBAX) operativamente unido a un promotor HCMV (pND2-hBAX), y un plásmido que contiene un polinucleótido que codifica SGAD55 y hBAX operativamente unido a un promotor SV40 (pSG5-sga55-bax).

La Figura 2 muestra los efectos de la vacunación de ADN en la supervivencia del aloinjerto cutáneo. Los receptores C57BL/6 de misma edad, 7 semanas vida, (N = 8-14) recibieron injertos cutáneos de un donante BALB/c en un régimen mínimo de supresión inmunológica (IS) que finalizó el día 28, y recibieron una inyección i.d. semanal de 50 µg de la vacuna indicada. Las vacunas BAX y sGAD son ADN plasmídico metilado sin CpG que codifica solo BAX y sGAD, respectivamente. La vacuna de ADN MsGAD consiste en ADN plasmídico metilado con CpG que codifica solo sGAD. La vacuna MsGAD-BAX consiste en una relación 4:1 de ADN plasmídico MsGAD:BAX. A y B muestran la supervivencia del aloinjerto después de la inmunización con vacunas no metiladas y metiladas, respectivamente. #,  $P < 0,003$  en comparación con el vector e IS solo (Mann-Whitney), @,  $P < 0,005$  en comparación con el vector metilado (Mvector) e IS solo, ♦,  $P < 0,04$  en comparación con sGAD en A, ★,  $P < 0,04$  en comparación con los controles del vector metilado, no metilado e IS solo (Kaplan-Meier).

La Figura 3 muestra los resultados del análisis de la expresión génica cuantitativa en la piel y GLs de ratones receptores. Los ratones C57BL/6 bajo inmunosupresión mínima recibieron injertos cutáneos de BALB/c y se inmunizaron con la vacuna de ADN BAX o MsGAD-BAX. Los aloinjertos cutáneos recientes (A) y los ganglios linfáticos (GLs) recientes (B) se tomaron 2 semanas después del trasplante para el análisis por qPCR. Además, los GL se estimularon con autoantígenos, de donantes o de terceros (C3H) para análisis (C). Los resultados se muestran como múltiplo de la expresión génica relativa a ratones C57BL/6 no vacunados bajo inmunosupresión mínima (control). En A y B, @,  $P < 0,05$  comparado con el control. En C, #, @,  $P < 0,05$  en comparación con células estimuladas con autoantígenos y de terceros, respectivamente.

La Figura 4 muestra los resultados de la transferencia adoptiva de células inmunes de GLs mezclados y de bazo. El donante de la transferencia adoptiva (C57BL/6) recibió un injerto cutáneo de BALB/c e inmunosupresión mínima. Los esplenocitos y las células de ganglios linfáticos de drenaje se aislaron en el día 14, y se inyectaron i.p. en el día -2 en receptores de transferencia adoptiva (C57BL/6, N = 4-5) que reciben injertos cutáneos de donantes (BALB/c, D) o de terceros (C3H, T) en el día 0. Los receptores también recibieron irradiación 3 Gy en el día -3, y diariamente rapamicina i.p. @,  $P < 0,05$  en comparación con terceros.

La Figura 5 muestra los resultados de las reacciones de linfocitos mezclados en las que se aislaron células de GL de los receptores que reciben injertos cutáneos del donante y un régimen inmunológico durante 2 semanas, y  $4 \times 10^5$  células de GL se mezclaron con  $4 \times 10^5$  de esplenocitos tratados con mitomicina de ratones donantes BALB/c o de terceros C3H en presencia de 2 o 5 µg/ml de IL-2. @,  $P < 0,05$  en comparación con los antígenos de terceros.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0021] Como se utiliza en esta descripción, excepto cuando el contexto requiera lo contrario, el término "comprende" y variaciones del término, tales como "que comprende", "comprende" y "comprendido" no tienen por objeto excluir otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

[0022] Como se utiliza en esta descripción, los términos "injerto" y "trasplante" se utilizan indistintamente y se refieren a un órgano o tejido tomado del cuerpo e injertado en otra área del mismo individuo o de un individuo diferente.

[0023] Como se utiliza en esta descripción, el término "aloinjerto" comprende un injerto de tejido entre individuos de la misma especie pero de genotipo dispar; los tipos de donantes incluyen cadavéricos, parientes vivos, y sin emparentar vivos.

**[0024]** Como se utiliza en esta descripción, el término “alogénico” se refiere a individuos de la misma especie pero de diferente constitución genética.

**[0025]** Como se utiliza en esta descripción, la expresión “trasplante alogénico” denota un trasplante de un aloinjerto.

**[0026]** Como se utiliza en esta descripción, la expresión “vacuna de ADN” comprende secuencias de ADN que codifican proteínas inmunogénicas ubicadas en plásmidos contruidos apropiadamente, que incluyen promotores fuertes, que cuando se inyectan en un animal son absorbidos por las células y las proteínas inmunogénicas se expresan y provocan una respuesta inmunitaria.

**[0027]** Como se utiliza en esta descripción, el término “autoantígeno” comprende un antígeno endógeno que estimula la producción de autoanticuerpos, como en una reacción autoinmunitaria, así como parte de dichos antígenos endógenos, o antígenos endógenos modificados que provocan la misma respuesta que el antígeno endógeno completo, como se entenderá por los expertos en la materia con referencia a esta descripción. Por ejemplo, en el contexto de esta descripción, descarboxilasa del ácido glutámico secretada 55 y BAX humanizado son ambos autoantígenos.

**[0028]** Como se utiliza en esta descripción, la expresión “antígeno del donante” comprende un antígeno de un aloinjerto que se trasplantó en el receptor para tomar el lugar de células o tejidos defectuosos o ausentes, tales como, por ejemplo, los injertos cutáneos y los trasplantes de células de los islotes, y trasplantes de órganos parciales o completos, incluyendo corazones, pulmones, riñones e hígados trasplantados, y que estimula la producción de anticuerpos que producen una reacción inmunitaria, así como parte de dichos antígenos del donante, o antígenos del donante modificados que provocan la misma respuesta que el antígeno donante completo, como se entenderá por los expertos en la materia con referencia a esta descripción. Por ejemplo, en el contexto de esta descripción, la descarboxilasa de ácido glutámico secretada 55 es un antígeno del donante para injertos cutáneos y trasplante de células de los islotes.

**[0029]** Los ejemplos de una proteína pro-apoptótica incluyen BAX (SEQ ID NO:2), una caspasa modificada, receptor del factor de necrosis tumoral, receptor de muerte 3 (DR3), receptor de muerte 4 (DR4), receptor de muerte 5 (DR5) y un receptor FAS. Como se utiliza en esta descripción, el término “hBAX” y “BAX” son intercambiables.

**[0030]** Como se entenderá por aquellos expertos en la materia con referencia a esta descripción, cuando se hace referencia a una proteína codificada por una secuencia de polinucleótidos, la proteína incluye “sustituciones conservadoras” en las que un aminoácido es sustituido con otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera que un experto en la materia de la química peptídica espera que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido se mantenga sin cambios sustanciales. Una sustitución conservadora se produce cuando un residuo de aminoácidos se reemplaza con otro que tiene una cadena lateral similar. Los residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares son conocidos en la técnica e incluyen familias con cadenas secundarias básicas (p. ej., lisina (Lys/K), arginina (Arg/R), histidina (His/H)), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico (Asp/Device 400), ácido glutámico (Glu/E)), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina (Gly/G), asparagina (Asn/N), glutamina (Gln/Q), serina (Ser/S), treonina (Thr/T), tirosina (Tyr/Y), cisteína (Cys/C)), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina (Ala/A), valina (Val/V), leucina (Leu/L), isoleucina (Ile/I), prolina (Pro/P), fenilalanina (Phe/F), metionina (Met/M), triptófano (Trp/W)), cadenas laterales β-ramificadas (por ejemplo, treonina (Thr/T), valina (Val/V), isoleucina (Ile/I)) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina (Tyr/Y), fenilalanina (Phe/F), triptófano (Trp/W), histidina (His/H)).

**[0031]** Como se utiliza en esta descripción, un motivo CpG es una región de polinucleótido caracterizada por dinucleótidos que contienen residuos de citoquina en la secuencia CG. Como aquellos con experiencia en la materia entenderán con referencia a esta descripción, los ADN bacterianos que contienen motivos CpG no metilados, estimulan el sistema inmunitario en mamíferos para iniciar una secuencia de reacciones que conduzcan a una reacción inmunitaria y a la inflamación. Sin embargo, los motivos CpG metilados pueden aplicarse para aliviar o inhibir la estimulación inmunitaria no deseada y la inflamación por ADN bacteriano.

**[0032]** Las células apoptóticas se procesan de forma rutinaria por las células presentadoras de antígenos (APCs) similares a las células dendríticas (DCs) para establecer y mantener la tolerancia específica del antígeno. Las vacunas de ADN pueden inducir células apoptóticas directamente *in vivo*, y permitir la modificación por ingeniería genética de las células apoptóticas inducidas. A diferencia del uso de inmunosupresores y un bloqueador coestimulador, esto es una estrategia de “arriba a abajo” que tiene el potencial para inducir una inmunorregulación específica a través de la modulación fisiológica de la función de APC. En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona el uso de tres diferentes construcciones de ADN plasmídico, y combinaciones de las mismas, ya que las vacunas de ADN aumentan la supervivencia de los aloinjertos. Los ejemplos específicos de cada una de las construcciones causan un incremento de la supervivencia de la piel injertada cuando se inyectan en ratones que reciben aloinjertos cutáneos.

- 5 **[0033]** Según un ejemplo de la presente descripción, se proporciona un procedimiento de prevención, retraso de la aparición o tratamiento del rechazo de un aloinjerto o de un trasplante alogénico. En un ejemplo, el procedimiento comprende, primero, la selección de un receptor en necesidad de un injerto o trasplante y de un donante de aloinjerto o trasplante alogénico. La selección puede hacerse utilizando procedimientos estándar como será entendido por los expertos en la materia con referencia a esta descripción.
- 10 **[0034]** Según un ejemplo, el procedimiento comprende además injertar un tejido o trasplantar un órgano sólido del donante al receptor para tomar el lugar de células o tejidos defectuosos o ausentes. Los tejidos injertados u órganos trasplantados pueden incluir injertos cutáneos, trasplantes de células de los islotes, y trasplantes de órganos parciales o completos incluyendo corazones, pulmones, riñones e hígados trasplantados.
- 15 **[0035]** Según un ejemplo, el procedimiento comprende además la administración al receptor de una vacuna de ADN que comprende uno o más polinucleótidos que codifican (1) una proteína pro-apoptótica, (2) un autoantígeno o antígeno del donante, o (3) una proteína pro-apoptótica y un autoantígeno o antígeno del donante.
- 20 **[0036]** En un ejemplo, una vacuna de ADN para su uso en la presente descripción comprende un plásmido, el plásmido comprende un polinucleótido que codifica una proteína pro-apoptótica bajo el control de un promotor capaz de expresar el polinucleótido que codifica la proteína pro-apoptótica.
- 25 **[0037]** En otro ejemplo, una vacuna de ADN para su uso en la presente descripción comprende un plásmido, el plásmido comprende un polinucleótido que codifica un autoantígeno o un antígeno del donante operativamente unido a un promotor capaz de controlar la expresión del polinucleótido que codifica el autoantígeno o el antígeno del donante, en el que el plásmido comprende una pluralidad de motivos CpG, y en el que al menos una parte de la pluralidad de motivos CpG está metilada. En un ejemplo preferido, los motivos CpG están metilados suficientemente para inhibir la respuesta inmunitaria del receptor al ADN plasmídico no metilado. En un ejemplo particularmente preferido, el plásmido es resistente a la digestión por medio de la endonucleasa de restricción HpaII, que digiere ADN sin metilar pero no metilado. En otra realización, los motivos CpG están metilados por la metilasa SssI.
- 30 **[0038]** En otro ejemplo, el plásmido que comprende un polinucleótido que codifica un autoantígeno o un antígeno del donante puede comprender además un polinucleótido que codifica una proteína pro-apoptótica bajo el control de un promotor capaz de expresar el polinucleótido que codifica la proteína pro-apoptótica.
- 35 **[0039]** En un ejemplo preferido, el promotor capaz de expresar el polinucleótido que codifica el autoantígeno o el antígeno del donante, y el promotor capaz de expresar el polinucleótido que codifica la proteína pro-apoptótica, son un único promotor.
- 40 **[0040]** En un ejemplo preferido, el promotor capaz de expresar el polinucleótido que codifica el autoantígeno o el antígeno del donante, o el promotor capaz de expresar el polinucleótido que codifica la proteína pro-apoptótica, o ambos, el promotor capaz de expresar el polinucleótido que codifica el autoantígeno o el antígeno del donante, y el promotor capaz de expresar el polinucleótido que codifica la proteína pro-apoptótica, mantienen su función promotora después de la metilación.
- 45 **[0041]** En otro ejemplo, el plásmido comprende una secuencia de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), para permitir la traducción del polinucleótido que codifica el autoantígeno o el antígeno del donante y el polinucleótido que codifica la proteína pro-apoptótica del mismo transcrito.
- 50 **[0042]** En otro ejemplo, la vacuna de ADN de la presente descripción comprende un primer plásmido y un segundo plásmido, o una composición que comprende un primer plásmido y un segundo plásmido. El primer plásmido comprende un polinucleótido que codifica un autoantígeno o un antígeno del donante bajo el control de un promotor capaz de expresar el polinucleótido que codifica el autoantígeno o el antígeno del donante. El segundo plásmido comprende un polinucleótido que codifica una proteína pro-apoptótica bajo el control de un promotor capaz de expresar el polinucleótido que codifica la proteína pro-apoptótica. El primer plásmido comprende una pluralidad de motivos CpG, y al menos una parte de la pluralidad de motivos CpG está metilada.
- 55 **[0043]** En un ejemplo preferido, el promotor capaz de expresar el polinucleótido que codifica el autoantígeno o el antígeno del donante mantiene su función promotora después de la metilación. En otro ejemplo, el segundo plásmido comprende una pluralidad de motivos CpG, y al menos parte de la pluralidad de motivos CpG está metilada.
- 60 **[0044]** En un ejemplo preferido, el promotor capaz de expresar el polinucleótido que codifica una proteína pro-apoptótica mantiene su función promotora después de la metilación.
- [0045]** En un ejemplo, la vacuna de ADN comprende el primer plásmido y el segundo plásmido en una relación comprendida entre 1/1.000 y 1.000/1. En otro ejemplo, la composición comprende el primer plásmido y el

segundo plásmido en una relación comprendida entre 1/100 y 100/1. En otro ejemplo, la composición comprende el primer plásmido y el segundo plásmido en una relación comprendida entre 1/10 y 10/1.

5 **[0046]** En un ejemplo de la presente descripción, el receptor es un mamífero. En otro ejemplo, el receptor es un ser humano.

10 **[0047]** En otro ejemplo, el autoantígeno se selecciona del grupo que consiste en anhidrasa carbónica II, colágeno, CYP2D6 (citocromo P450, familia 2, subfamilia Device 400, polipéptido 6), descarboxilasa de ácido glutámico, descarboxilasa de ácido glutámico secretada 55, SEQ ID NO:1, insulina, proteína básica de mielina y SOX-10 (caja de SRY que contiene el gen 10).

15 **[0048]** En otro ejemplo, la proteína pro-apoptótica se selecciona del grupo que consiste en BAX, SEC ID NO:2, una caspasa modificada, receptor del factor de necrosis tumoral, receptor de muerte 3 (DR3), receptor de muerte 4 (DR4), receptor de muerte 5 (DR5) y un receptor FAS.

**[0049]** En un ejemplo preferido, la secuencia del sitio interno de entrada al ribosoma es un sitio interno de unión al ribosoma del virus EMC, SEQ ID NO:3.

20 **[0050]** El procedimiento comprende la administración al receptor de una o más de una dosis de una vacuna de ADN según la presente descripción. En un ejemplo preferido, la vacuna de ADN se administra en una pluralidad de dosis. En otro ejemplo preferido, la dosis está comprendida entre aproximadamente 0,001 mg/Kg de peso corporal del receptor y aproximadamente 100 mg/Kg de peso corporal del receptor. En otro ejemplo preferido, la dosis está comprendida entre aproximadamente 0,01 mg/Kg de peso corporal del receptor y aproximadamente 10 mg/Kg de peso corporal del receptor. En otro ejemplo preferido, la dosis está comprendida entre aproximadamente 0,1 mg/Kg de peso corporal del receptor y aproximadamente 1 mg/Kg de peso corporal del receptor. En otro ejemplo preferido, la dosis es de aproximadamente 0,05 mg/Kg de peso corporal del receptor. En un ejemplo preferido, el receptor es un ser humano y la dosis está comprendida entre aproximadamente 0,5 mg y 5 mg. En otro ejemplo preferido, el receptor es un ser humano y la dosis está comprendida entre aproximadamente 1 mg y 4 mg. En otro ejemplo preferido, el receptor es un ser humano y la dosis está comprendida entre aproximadamente 2,5 mg y 3 mg. En otro ejemplo preferido, la dosis se administra semanalmente entre 2 veces y aproximadamente 100 veces. En otro ejemplo preferido, la dosis se administra semanalmente entre 2 veces y aproximadamente 20 veces. En otro ejemplo preferido, la dosis se administra semanalmente entre 2 veces y aproximadamente 10 veces. En otro ejemplo preferido, la dosis se administra semanalmente 4 veces. En otro ejemplo preferido, la dosis se administra sólo una vez.

35 **[0051]** La administración de una o más de una dosis de una vacuna de ADN al receptor se puede lograr por cualquier vía adecuada, como los expertos en la materia entenderán con referencia a esta descripción. En un ejemplo, la administración al receptor de una o más de una dosis de una sustancia o una composición se realiza mediante una vía seleccionada del grupo que consiste en epidérmica, intradérmica, intramuscular, intranasal, intravenosa y oral. En un ejemplo preferido, la vacuna de ADN se administra proximal al sitio del aloinjerto o trasplante alogénico. Por ejemplo, el ADN plasmídico no tiene que ser inyectado en un injerto cutáneo, pero se puede inyectar directamente por vía intradérmica al receptor.

40 **[0052]** Cuando el procedimiento comprende la administración de un primer plásmido y un segundo plásmido, el primer plásmido y el segundo plásmido pueden administrarse secuencial o simultáneamente, como será entendido por los expertos en la materia con referencia a esta descripción.

50 **[0053]** Cuando el procedimiento comprende la administración de un primer plásmido y un segundo plásmido, el procedimiento puede comprender además la inducción de una respuesta inmunitaria específica del donante que eleva la actividad de tipo Th2, que puede incluir la inducción de la expresión de *Il-4* en el aloinjerto.

**[0054]** Cuando el procedimiento comprende la administración de un primer plásmido y un segundo plásmido, el procedimiento puede comprender, además, la inducción de la expresión de *Fcα1b* en el aloinjerto.

55 **[0055]** Cuando el procedimiento comprende la administración de un primer plásmido y un segundo plásmido, el procedimiento puede comprender además la disminución de la expresión de genes *Tnf-α* e *Ifn-γ* pro-inflamatorios.

**[0056]** En un ejemplo, el procedimiento comprende además la administración de una dosis de uno o más de un agente inmunosupresor antes, el día de, y/o después del injerto o trasplante.

60 **[0057]** Cuando el procedimiento comprende la administración de uno o más de un agente inmunosupresor, uno o más de un agente inmunosupresor se puede administrar simultáneamente, separadamente o secuencialmente.

**[0058]** En un ejemplo, uno o más de un agente inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en corticosteroides, glucocorticoides, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina (6-MP), azatioprina (AZA), ciclosporina, metotrexato, micofenolato mofetilo (MMF), ácido micofenólico (MPA), tacrolimus (FK506), sirolimus ([SRL] rapamicina), everolimus (Certican), mizoribina, leflunomida, desoxiespergualina, brequinar, azodicarbonamida, análogos de vitamina D, tales como MC1288 y bisindolilmaleimida VIII, globulina antilinfocítica, globulina antitimocítica (ATG), anticuerpos monoclonales anti-CD3, (Muromonab-CD3, Orthoclone OKT3), anticuerpos anti-receptor de interleucina (IL)-2 (anti-CD25), (Daclizumab, Zenapax, basiliximab, Simulect), anticuerpos anti-CD52, (Alemtuzumab, Campath-1H), anticuerpos anti-CD20 (Rituximab, Rituxan), reactivos anti-factor de necrosis tumoral (TNF) (Infliximab, Remicade, Adalimumab, Humira) e inhibidores de LFA-1 (Efalizumab, Raptiva).

**[0059]** Las dosificaciones de los agentes inmunosupresores variarán dependiendo del individuo a tratar, la vía de administración, y la naturaleza y gravedad de la afección a tratar. Por ejemplo, una dosis inicial de aproximadamente 2 a 3 veces de la dosis de mantenimiento adecuada puede administrarse aproximadamente 4 a 12 horas antes del trasplante, seguido de una dosificación diaria de 2 a 3 veces de la dosis de mantenimiento de una a dos semanas, antes de que disminuya gradualmente a una tasa de aproximadamente 5 % a la semana para alcanzar la dosis de mantenimiento.

**[0060]** El experto en la materia puede determinar las dosificaciones que proporcionan una cantidad terapéutica de un agente inmunosupresor en un nivel que es tolerado. En un ejemplo preferido, el procedimiento comprende además la administración de una dosis única de globulina antilinfocítica de aproximadamente 1,6 mg/20 g de peso corporal en el día del injerto o trasplante. En otro ejemplo preferido, la rapamicina se puede aplicar a un intervalo de dosificación de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 15 mg/kg/día, más preferiblemente de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 5 mg/kg/día y más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 mg/kg/día. Idealmente, la administración de dosis de uno o más de un agente inmunosupresor puede ser limitada después del tratamiento eficaz con la vacuna de ADN.

**[0061]** En un ejemplo, el procedimiento comprende además, después de la administración de la vacuna de ADN, el seguimiento del receptor respecto al rechazo del aloinjerto del trasplante. En un ejemplo preferido, el receptor se controla para el rechazo del aloinjerto o trasplante después de disminuir o interrumpir la administración de agentes inmunosupresores.

**[0062]** La descripción en los Ejemplos relacionados con los plásmidos que contienen GAD se incluye meramente para referencia/comparación.

## EJEMPLO 1

### Construcciones de ADN plasmídico, metilación y amplificación

**[0063]** Los siguientes ejemplos fueron diseñados para ensayar si nuestra estrategia de vacunación de ADN pro-apoptóticas es aplicable a la prevención del rechazo sólido de aloinjertos. Nuestro modelo sugiere que la inyección de ADN plasmídico que codifica BAX cerca del aloinjerto causaría un reclutamiento de APCs después de la inducción de células apoptóticas, las APC procesarían antígenos del donante en condiciones tolerogénicas, y se induciría una respuesta protectora, inmunorreguladora.

**[0064]** Con el fin de comparar la eficacia de diferentes vacunas de ADN para prevenir, retardar la aparición o tratar el rechazo de aloinjerto o trasplante de órgano según la presente invención, se prepararon varios plásmidos. Con referencia ahora a la Figura 1, se muestran, respectivamente, una representación esquemática de pSG5, pND2, pSG5-SGAD55, y pND2-hBAX.

**[0065]** El plásmido pSG5 fue adquirido en Stratagene (San Diego, CA, EE.UU.). Los plásmidos restantes se produjeron utilizando técnicas estándar. El plásmido pND2-BAX lleva un ADNc BAX bajo el control transcripcional del promotor CMV, y el plásmido pSG5-SGAD55 lleva una construcción de ADNc que codifica una forma secretada de GAD65 bajo el control transcripcional del promotor SV-40.

**[0066]** Con referencia a la Figura 1, las abreviaturas que se muestran son estándares, como será entendido por los expertos en la materia con referencia a esta descripción, incluyendo: AMP (gen de resistencia a ampicilina de selección en *E. coli*); BGH pA (secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina); origen ColE1 (origen de replicación en *E. coli*); origen f1 (origen de replicación para fago filamentoso f1 para generar ADN monocatenario); hBAX (ADNc bax humano), SEQ ID NO:2; promotor HCMV (promotor del citomegalovirus); intrón HCMV (intrón de citomegalovirus); SCM (sitio de clonación múltiple); origen pUC (origen de replicación para *E. coli* del plásmido pUC); sgad55 (construcción de ADNc GAD secretada), SEQ ID NO:1; promotor SV40 (promotor del virus del simio 40); SV40 pA (secuencia de poliadenilación del virus del simio 40); y T7 (promotor T7).

**[0067]** Los plásmidos pSG5 y PSG-SGAD55 se metilaron para producir pSG5 metilado, y pSG5-SGAD55 metilado, mediante amplificación en la cepa de *E. coli* ER1821 que lleva un plásmido que codifica la metilasa Sss/

(New England Biolabs, Beverly, MA EE.UU.). *SssI* metila el motivo dinucleótido CpG en el ADN de una manera correspondiente a metilasas de mamíferos mediante la adición covalente de un solo grupo metilo al motivo dinucleótido CpG.

5 **[0068]** Se aisló ADN plasmídico después de la amplificación en la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  o ER1821 utilizando el kit de purificación de ADN plasmídico Endofree (Qiagen, Valencia, CA). La metilación exitosa se confirmó por digestión del ADN plasmídico aislado con la enzima de restricción *HpaII* que digiere ADN sin metilar pero no metilado, en el que la resistencia a la digestión por *HpaII* indica una metilación exitosa.

## 10 EJEMPLO 2

### Supervivencia del aloinjerto cutáneo

15 **[0069]** Un modelo de trasplante de aloinjerto cutáneo se utilizó como prueba de principio, ya que es uno de los modelos más difíciles para la prevención del rechazo de órganos. Una combinación de dos de las construcciones de plásmidos (vacuna de 2 plásmidos que codifica GAD secretada, es decir, SGAD55, y BAX pro-apoptótica, con un plásmido metilado por metilasa *SssI*) se ha utilizado con éxito como una vacuna de ADN para la terapia de la diabetes tipo 1 en ratones NOD. Sin embargo, se encontró que cada una de las dos construcciones de ADN (ADN plasmídico que codifica BAX solo, o ADN plasmídico metilado por *SssI* que codifica SGAD55 solo) era ineficaz para  
20 la terapia de la diabetes por sí misma. Inesperadamente, ahora se descubre que las tres alternativas pueden prevenir el rechazo de aloinjerto cutáneo.

25 **[0070]** Los efectos de la inyección i.d. de diferentes vacunas de ADN se investigaron en ratones C57BL/6 que reciben inmunosupresión mínima y aloinjertos cutáneos de ratones BALB/c. Injertos cutáneos de la parte posterior con un espesor total de 0,7 x 0,7 cm de donantes BALB/c o de terceros C3H se trasplantaron en la parte posterior de receptores C57BL/6. Con la excepción del grupo no tratado, una inmunoglobulina anti-linfocitos ALG (1,6 mg/20 g de peso corporal) se proporcionó i.p. una vez en el día 0. Cincuenta  $\mu$ g de los siguientes ADN plasmídicos: 1) vector solo, 2) ADN que codifica BAX solo, 3) ADN metilado por *SssI* que codifica SGAD55 solo (Msgad55), o 4) ADN que  
30 codifica BAX junto con ADN metilado por *SssI* que codifica SGAD55 (Msgad55+bax), se inyectaron i.d. cerca del injerto cutáneo en el día 0, 3, 7 y luego semanalmente. La rapamicina (1 mg/kg) se inyectó i.p. diariamente a partir de los días 0-27. Los vendajes se retiraron en el día 10, y un rechazo del injerto cutáneo se definió como el 85 % de pérdida del área injertada y se confirmó por un análisis patológico.

35 **[0071]** La Figura 2A muestra que un ADN plasmídico no metilado que codifica BAX solo podría retrasar significativamente el rechazo cutáneo en comparación con los ratones que recibieron ADN vector solo, aunque no lo hizo el ADN plasmídico no metilado que codifica SGAD solo. La inyección de vector plasmídico no metilado solo no tuvo ningún efecto significativo sobre la supervivencia del aloinjerto en comparación con ratones no vacunados, inmunodeprimidos.

40 **[0072]** Además, se investigaron los efectos de la metilación por CpG de la vacuna de ADN y de la administración combinada de ADN plasmídico que codifica SGAD y BAX en la supervivencia del aloinjerto cutáneo. La metilación por CpG de la vacuna que codifica sGAD solo (MsGAD) resultó en un aumento de la supervivencia del aloinjerto (Figura 2B), que era significativa en comparación con los ratones inmunizados con la vacuna no metilada que codifica SGAD solo y el control de vectores metilados por CpG. Sin embargo, la administración combinada de  
45 ADN plasmídico metilado por CpG que codifica GAD secretada y el ADN plásmido que codifica BAX resultó en un aumento de la supervivencia sólo cuando se comparó con los ratones vacunados con los controles de vectores y los ratones no inmunizados, lo que indica un efecto antagonista de BAX.

50 **[0073]** Sin estar ligado a ningún mecanismo subyacente particular detrás de los efectos observados, se sospecha que se puede implicar una inmunorregulación específica del antígeno del donante para las construcciones que codifican BAX, basándose en nuestro modelo anterior para una estrategia de vacunación de ADN pro-apoptótica. No se sabe que el mecanismo de acción es la tercera construcción (ADN metilado por *SssI* que codifica SGAD55).

## 55 EJEMPLO 3

### Aislamiento de ARN y qPCR

60 **[0074]** Se investigaron los efectos de la vacuna MsGAD-BAX, que mostró una eficacia tanto en la prevención del rechazo de aloinjertos cutáneos como una mejora de la diabetes de nueva aparición en ratones NOD en el trabajo previo, y de la vacuna BAX en la expresión de genes elegidos en la piel de BALB/c trasplantada y los GL recién aislados de ratones C57BL/6 receptores.

**[0075]** Para el análisis inmunológico, los ganglios linfáticos de drenaje de ratones que recibieron ALG y

rapamicina sola, y de ratones tratados con la vacuna que codifica BAX y SGAD55, se tomaron 2 semanas después del trasplante. Los ganglios linfáticos se cultivaron en presencia de esplenocitos inactivados de C57/BL6 (receptor), BALB/c (donante), o DBA (terceros) como fuentes de antígenos, y se aislaron células CD4+CD25+ y CD4+CD25- para los ensayos de proliferación.

**[0076]** El análisis por PCR cuantitativa de la expresión de genes seleccionados se realizó con aloinjertos cutáneos, ganglios linfáticos cultivados, y células CD4+CD25+/CD25- aisladas de los ensayos de proliferación. Además de los genes *Il-4*, *Il-10*, *Tgf-β1*, *Tnf-α*, e *Ifn-γ*, se cuantifica la expresión de genes que codifican las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 encontradas en APC, el factor transcripcional FOXP3 se sintetizó por los linfocitos T reguladores (Tregs), y el receptor inhibidor FcγRIIB y el antagonista IL-1 citoquinas IL-1RA, que son a la vez reguladas positivamente en DCs tolerogénicas murinas.

**[0077]** El ARN total se aisló utilizando reactivo Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, CA) de aloinjerto cutáneo recién tomado y los GL de drenaje 2 semanas después del trasplante. ARN se aisló también a partir de los GL cultivados durante 3 días como se describió anteriormente. qPCR se realizó utilizando el sistema iCycler y SYBR verde (Bio Rad, Hercules, CA) con 200 ng de ARN total como plantilla y cebadores específicos para los ADNc elegidos, y para el ADNc de GAPDH como un gen constitutivo.

**[0078]** En la piel trasplantada, las diferencias más notables entre las dos vacunas fueron el aumento de la expresión de los genes *Il-4* y *FcγRIIB* y la disminución de la expresión de los genes *Tnf-α* y *Ifn-γ* en ratones inmunizados con MsGAD-BAX (Fig. 3A). En los GL, las diferencias más aparentes fueron el aumento de la expresión de los genes *Foxp3*, *Il-10*, *Tgf-β1*, y *CD86* en ratones inmunizados con BAX, y la disminución de la expresión de los genes *Tnf-α* e *Ifn-γ* en ratones inmunizados con MsGAD-BAX (Fig. 3B). El aumento de la expresión de *Cd86* también se observó en los ratones inmunizados con MsGAD-BAX, pero en una medida que fuese proporcional a la cantidad de ADNc Bax administrado. No se observó ningún cambio significativo en la expresión del gen *Cd80* (datos no mostrados). Estos datos indicaron que las dos vacunas indujeron respuestas inmunitarias claramente distintas.

**[0079]** Varios elementos de prueba indicaron que BAX y MsGAD-BAX indujeron respuestas inmunitarias específicas del donante. En primer lugar, el análisis de la expresión génica de los GL de ratones C57BL/6 que recibieron aloinjertos cutáneos de BALB/c cultivados durante 3 días reveló varias diferencias significativas cuando las células se estimularon con antígenos propios, de donante, o de terceros (Fig. 3C). En comparación con la estimulación con antígenos de terceros, las células de ratones inmunizadas con BAX y MsGAD-BAX y estimuladas con antígenos del donante mostraron un cambio significativo en la expresión en 8 y 5 de los 9 genes elegidos, respectivamente. Por el contrario, en comparación con la estimulación con antígenos propios, las células de ratones inmunizados con BAX y MsGAD-BAX y estimuladas con antígenos del donante mostraron un cambio en la expresión en 4 y 2 de los 9 genes, respectivamente. Estos resultados indicaron que el perfil de expresión génica después de la estimulación del antígeno del donante fue marcadamente diferente del perfil del antígeno de terceros y más similar al perfil del autoantígeno. Además, el hallazgo cuyos genes como *FcγRIIB* y *Il-1ra*, que son regulados positivamente en DCs tolerogénicas, se indujeron sólo cuando se estimularon con antígenos del donante corroboró la noción de una respuesta tolerogénica específica del donante.

#### EJEMPLO 4

##### Transferencia de células adoptivas

**[0080]** Se aislaron células del bazo y ganglios linfáticos (GLs) axilar de drenaje y cervicales 2 semanas después del trasplante de injerto cutáneo del donante y se suspendieron en TFS;  $5 \times 10^6$  células totales por receptor se inyectaron i.p. en el día -2, e irradiación TBI 3 Gy fue dada en el día -3. Los injertos cutáneos de la parte posterior del donante o de terceros se trasplantaron en el día 0, y rapamicina (1 mg/kg) se administró diariamente por i.p.

**[0081]** Los resultados de los experimentos de transferencia adoptiva indicaron que los esplenocitos y las células de GLs de ratones C57BL/6 que recibieron injertos cutáneos de BALB/c e inmunizaron con MsGAD-BAX podrían transferir la supervivencia del donante, pero no de injertos de terceros (Fig. 4). En contraste, las células de ratones inmunizados con BAX no impidieron significativamente el rechazo de cualquier injerto de donante o de terceros.

#### EJEMPLO 5

##### MLR

**[0082]** GLs se dispersaron y se estimularon con esplenocitos tratados con mitomicina C de ratones C57BL/6, BALB/c, y C3H durante 5 días con 2 o 5 µg/ml de IL-2 para MLR utilizando 2 µM de células de GL marcadas con CFSE. Los resultados de MLR utilizando células de GL marcadas con CSFE cultivadas con esplenocitos inactivados de antígenos de donante y de terceros también indicaron una respuesta inmunitaria específica del donante para

5 cada vacuna. En presencia de 2 µg/ml de IL-2, las células de GL de ratones no vacunados, inmunodeprimidos no mostraron una diferencia significativa en la supresión cuando se estimula con los antígenos del donante o de terceros (Fig. 5A). En contraste, las células de GL de ratones inmunizados con BAX o MsGAD-BAX mostraron una diferencia significativa en su respuesta al antígeno de terceros en comparación con el antígeno del donante. El cultivo con 5 µg/ml de IL-2 no restauró la proliferación y acentuó estas diferencias (Fig. 5B).

## Conclusión

10 [0083] Los ejemplos específicos de la presente descripción descrita en esta invención abordan los problemas de la prevención del rechazo de aloinjertos sin tener que conocer la identidad de los antígenos del donante, y de reducir la necesidad de inmunosupresores que se sabe que tienen efectos secundarios graves a largo plazo. Nuestros resultados indican que la vacunación de ADN "pro-apoptótica" se puede aplicar con éxito al trasplante de órganos sólidos. La inyección de ADN BAX parece inducir una respuesta inmunorreguladora específica del donante, que contribuye al aumento de la supervivencia del injerto.

15 [0084] Una explicación de los efectos observados es que la vacunación con ADN plasmídico que codifica BAX induce a las células apoptóticas a que recluten células presentadoras de antígeno. Las células presentadoras de antígeno procesan las células apoptóticas tolerogénicas junto con antígenos del donante y protegen el aloinjerto, lo más probable a través de múltiples mecanismos inmunitarios. Sin embargo, teniendo en cuenta que la expresión de *Foxp3*, *Il-10* y *Tgf-β1* fue consistentemente mayor en animales no vacunados inmunodeprimidos, otros mecanismos de tolerancia inducida por nuestra estrategia de vacunación de ADN es probable que desempeñen un papel en la expresión de la supervivencia del injerto. Inesperadamente, la inyección de un metilado por *SssI* que codifica SGAD55 solo podría prolongar la supervivencia del injerto. La misma vacuna no fue eficaz para el tratamiento de la diabetes tipo en nuestros estudios anteriores. Por consiguiente, el mecanismo subyacente para la supervivencia del injerto utilizando esta estrategia queda por determinar.

20 [0085] Nuestros datos indican que tanto las vacunas BAX como MsGAD-BAX inducen una respuesta inmunitaria específica del donante, aunque a través de dos mecanismos diferentes. La vacuna BAX causó cambios en la expresión génica principalmente en los GL recientes, muy probablemente debido al reclutamiento de APCs a GL después de la inducción mediada por ADN plasmídico de la apoptosis. El aumento de la expresión de *Cd86* asociado con la administración del ADNc *bax* no estaba vinculado con la expresión concomitante *Cd80*, lo que indica la inducción de *Cd86*. La molécula *CD86* es el principal ligando para *CD28* y promueve la inflamación. Significativamente, las células de GL de ratones inmunizados con BAX mostraron un aumento muy alto de la expresión de los genes *Tnf-α* e *lfn-γ* cuando son estimuladas con antígenos propios, cuestión que no se observó con las células estimuladas con antígenos del donante o con células de ratones inmunizados con MsGAD-BAX y estimuladas con antígenos propios. Estos resultados sugieren que la inducción de células apoptóticas del receptor cerca del aloinjerto podría haber simplificado la respuesta autoinmunitaria que es conocida por inducirse por un aloinjerto cutáneo a través de una alorespuesta indirecta.

30 [0086] Además, los GL recientes y las células de GL de ratones inmunizados con BAX estimuladas con antígeno de terceros mostraron un aumento de la expresión de *Foxp3*, *Il-10*, y *Tgf-β1*, que se asocia con la actividad de linfocitos T reguladores CD4+CD25+. Sin embargo, es poco probable que estas células fuesen responsables solo del aumento de la supervivencia del injerto, ya que la transferencia adoptiva de células de bazo y de GL de ratones inmunizados con BAX no evitó el rechazo de aloinjertos de donante o de terceros. Más bien, estos resultados sugieren que la vacuna BAX promovió la supervivencia del injerto a través de un mecanismo diferente, similar a la delección clonal. No obstante, esta eficacia de la vacuna puede mejorarse utilizando la metilación por CpG del ADN plasmídico para reducir la inflamación resultante de la interacción entre el ADN plasmídico bacteriano y TLR-9, y mediante la inyección del ADN fuera del medio inflamatorio inducido por el aloinjerto.

35 [0087] A diferencia de BAX, la vacuna MsGAD-BAX indujo la expresión en el aloinjerto de *Il-4*, que indica una actividad tipo Th2, y de *FcγIIb*, que está regulado positivamente en DCs tolerogénicas. Además, la vacuna MsGAD-BAX causó la disminución de la expresión de los genes *Tnf-α* e *lfn-γ* pro-inflamatorios en tanto GL cutáneos trasplantados como recientes, no pareció promover la autoinmunidad, e indujo células que transfieren la supervivencia del injerto de manera específica del donante. Notablemente, GAD se encuentra en la piel, que se confirmó en aloinjertos cutáneos utilizando qPCR (datos no mostrados), y está regulado positivamente en los tejidos inflamados. Por lo tanto, el polipéptido sGAD puede actuar como un autoantígeno regulador que evita el rechazo de aloinjertos. En efecto, la mayor evidencia de que la autoinmunidad desempeña un papel en el rechazo de aloinjertos proviene de experimentos en los que la administración de autoantígenos presentes en el injerto del donante puede prevenir el rechazo de aloinjertos de pulmón o corazón, o acelerar el rechazo cuando se inyectan con un adyuvante de Freund en el receptor. Nuestro hallazgo de que la expresión de *Il-4* se incrementó en un aloinjerto cutáneo corrobora la idea de que esta citoquina puede ser un elemento clave en el procedimiento.

40 [0088] En conclusión, la inducción mediada por ADN plasmídico de las células apoptóticas receptoras y la administración de un autoantígeno asociado con un aloinjerto forman la base de una nueva estrategia de vacunación

de ADN que se dirige a la autoinmunidad inducida por aloinjertos para prevenir el rechazo del trasplante. Esta estrategia, que es fácilmente susceptible a la manipulación a niveles molecular y celular para una mejora adicional, proporciona un medio prometedor para controlar el rechazo crónico en el que se cree que la autoinmunidad inducida por aloinjertos desempeña un papel importante.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Loma Linda University  
ESCHER, Alan P.

10

LI, Fengchun

<120> VACUNAS DE ADN Y PROCEDIMIENTOS DE PREVENCIÓN DE RECHAZO TRAS UN TRANSPLANTE

<130> 14102-7PCT

15

<150> documento US 61/036.004

<151> 2008-03-12

<160> 3

20

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 1638

<212> ADN

25

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 653 199 T3

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatc gcactaagtc ttgcacttgt cacaaacagt 60  
 gcacctactt acgcgtttct ccatgcaaca gacctgctgc cggcgtgtga tggagaaagg 120  
 cccactttgg cgtttctgca agatgttatg aacattttac ttcagtatgt ggtgaaaagt 180  
 ttcgatagat caaccaaagt gattgatttc cattatccta atgagcttct ccaagaatat 240  
 aattgggaat tggcagacca accacaaaat ttggaggaaa ttttgatgca ttgccaaaca 300  
 actctaaaat atgcaattaa aacagggcat cctagatact tcaatcaact ttctactggc 360  
 ttggatatgg ttggattagc agcagactgg ctgacatcaa cagcaaatac taacatgttc 420  
 acctatgaaa ttgctccagt atttgtgctt ttggaatatg tcacactaaa gaaaatgaga 480  
 gaaatcattg gctggccagg gggctctggc gatgggatat tttctcccgg tggcgcata 540  
 tctaacaatg atgccatgat gatcgcacgc ttttaagatg tcccagaagt caaggagaaa 600  
 ggaatggctg ctcttcccag gctcattgcc ttcacgtctg aacatagtca tttttctctc 660  
 aagaagggag ctgcagcctt agggattgga agagacagcg tgattctgat taaatgtgat 720  
 gagagagga aatgattcc atctgatctt gaaagaagga ttcttgaagc caaacagaaa 780  
 gggtttgctc ctttcctcgt gagtgcaca gctggaacca ccgtgtacgg agcatttgac 840  
 cccctcttag ctgtcgtgca catttgcaaa aagtataaga tctggatgca tgtggatgca 900  
 gcttggggtg ggggattact gatgtcccga aaacacaagt ggaaactgag tggcgtggag 960  
 agggccaact ctgtgacgtg gaatccacac aagatgatgg gagtcccttt gcagtggctc 1020  
 gctctcctgg ttagagaaga gggattgatg cagaattgca accaaatgca tgcctoctac 1080  
 ctctttcagc aagataaaca ttatgacctg tcctatgaca ctggagacaa ggccttacag 1140  
 tgcggacgcc acgttgatgt ttttaacta tggtgatgt ggagggcaa ggggactacc 1200  
  
 gggtttgaag cgcattgtga taaatgtttg gagttggcag agtatttata caacatcata 1260  
 aaaaaccgag aaggatatga gatggtgttt gatgggaagc ctgaggacac aatgtctgc 1320  
 ttctggtaca ttcctccaag cttgcgtact ctggaagaca atgaagagag aatgagtcgc 1380  
 ctctcgaagg tggctccagt gattaaagcc agaatgatgg agtatggaac cacaatggtc 1440  
 agctaccaac ccttgggaga caaggtcaat ttcttccgca tggcatctc aaaccagcg 1500  
 gcaactcacc aagacattga cttcctgatt gaagaaatag aacgccttgg acaagattta 1560  
 taataacctt gctaccaag ctgtccact tctctagta gcgacctcga gcggccgctc 1620  
 gagggggggc ccggtacc 1638

<210> 2  
 <211> 579  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

ES 2 653 199 T3

atggacgggt ccggggagca gccagagggc ggggggcca ccagctctga gcagatcatg 60  
aagacagggg cccttttgc ttagggtttc atccaggatc gagcagggcg aatggggggg 120  
gaggcaccgg agctggcctt ggaccgggtg cctcaggatg cgtccaccaa gaagctgagc 180  
gagtgtctca agcgcacatg ggacgaactg gacagtaaca tggagctgca gaggatgatt 240  
gccgccgtgg acacagactc ccccagagag gtctttttcc gaggggcagc tgacatgttt 300  
tctgacggca acttcaactg gggccgggtt gtgcgccctt tctactttgc cagcaaactg 360  
gtgctcaagg ccctgtgcac caaggtgccg gaactgatca gaaccatcat gggctggaca 420  
ttggacttcc tccgggagcg gctgttgggc tggatccaag accaggggtg ttgggacggc 480  
ctcctctcct actttgggac gccacagtg cagaccgtga ccatctttgt ggcgggagtg 540  
ctcaccgctt cgctcaccat ctggaagaag atgggctga 579

<210> 3

<211> 619

5 <212> ADN

<213> virus de la encefalomiocarditis

<400> 3

tctagataat acgactcact atagggcgaa ttccccctct ccctcccccc cccctaactg 60  
tactggccga agccgcttgg aataaggccg gtgtgctgtt gtctatatgt tattttccac 120  
catattgccg tcttttgca atgtgagggc ccggaaacct ggccctgtct tcttgacgag 180  
cattcctagg ggtctttccc ctctcgcaa agaatgcaa ggtctgttga atgtcgtgaa 240  
ggaagcagtt cctctggaag cttcttgaag acaaacaacg tctgtagcga ccctttgcag 300  
gcagcggaac cccccacctg gcgacaggtg cctctgcggc caaaagccag gtgtataaga 360  
tacacctgca aaggcggcac aaccccagtg ccacgttgtg agttggaata gttgtgaaa 420  
gagtcaaatg gctctcctca agcgtattca acaaggggct gaaggatgcc cagaaggtac 480  
ccattgtat gggatctgat ctggggcctc ggtgcacatg ctttacatgt gtttagtcga 540  
ggttaaaaaa cgtctaggcc cccaaccac ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga 600  
ttattatatt gcctctaga 619

**REIVINDICACIONES**

1. Una vacuna de ADN para su uso en la prevención, el retraso de la aparición o el tratamiento del rechazo de un aloinjerto de un trasplante alogénico, en la que la vacuna de ADN es un plásmido que comprende (a) un polinucleótido que codifica BAX; y (b) un promotor que controla la expresión del polinucleótido que codifica BAX, y en el que dicho uso comprende:
- 5 (A) la selección de un receptor en necesidad de un injerto o trasplante y de un donante de aloinjerto o de trasplante alogénico;
- 10 (B) el injerto de tejido del donante al receptor; y
- (C) la administración al receptor de una o más de una dosis de la vacuna de ADN, en la que el tejido injertado es un injerto cutáneo.
2. La vacuna de ADN de la reivindicación 1, en la que la vacuna de ADN se administra en una dosis eficaz, en la que una dosis eficaz es una cantidad suficiente para prevenir, retrasar la aparición o tratar el rechazo de un aloinjerto o de un trasplante alogénico por parte del receptor.
- 15 3. La vacuna de ADN de la reivindicación 1, en la que la vacuna de ADN se administra en una dosis eficaz, en la que una dosis eficaz es una cantidad suficiente para inducir una respuesta tolerogénica específica del donante.
- 20 4. La vacuna de ADN de la reivindicación 1, en la que la vacuna de ADN se administra en una pluralidad de dosis.
5. La vacuna de ADN de la reivindicación 1, en la que la dosis de la vacuna de ADN es de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal del receptor a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del receptor.
- 25 6. La vacuna de ADN de la reivindicación 1, en la que la dosis se administra semanalmente entre dos veces y 100 veces.
- 30 7. La vacuna de ADN de la reivindicación 1, en la que la vacuna de ADN se administra por vía epidérmica, intradérmica, intramuscular, intranasal, intravenosa, intraperitoneal u oral.
8. La vacuna de ADN de la reivindicación 1, en la que la vacuna de ADN se administra mediante una inyección proximal al sitio del aloinjerto o del trasplante alogénico.
- 35 9. La vacuna de ADN de la reivindicación 1, que comprende además la administración de una dosis de uno o más de un agente inmunosupresor antes, el día de, y/o después del injerto o trasplante.
- 40 10. La vacuna de ADN de la reivindicación 9, en la que la dosis de uno o más de un agente inmunosupresor se administra simultáneamente, separadamente o secuencialmente.
- 45 11. La vacuna de ADN de la reivindicación 9, en la que uno o más de un agente inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en corticosteroides, glucocorticoides, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, azatioprina, metotrexato ciclosporina, micofenolato mofetilo, ácido micofenólico, tacrolimus, sirolimus, everolimus, mizoribina, leflunomida, desoxispergualina, brequinar, azodicarbonamida, análogos de vitamina D, globulina antilinfocítica, globulina antitimocítica, anticuerpos monoclonales anti-CD3, anticuerpos anti-receptor de interleucina-2 (anti-CD25), anticuerpos anti-CD52, anticuerpos anti-CD20, reactivos anti-factor de necrosis tumoral e inhibidores de LFA-1.
- 50 12. La vacuna de ADN de la reivindicación 9, que comprende la administración de una dosis única de globulina antilinfocítica, a una dosificación de aproximadamente 1,6 mg/20 g de peso corporal, el día del injerto o trasplante.
- 55 13. La vacuna de ADN de la reivindicación 9, que comprende la administración de rapamicina a una dosificación de 0,05 a 15 mg/día.

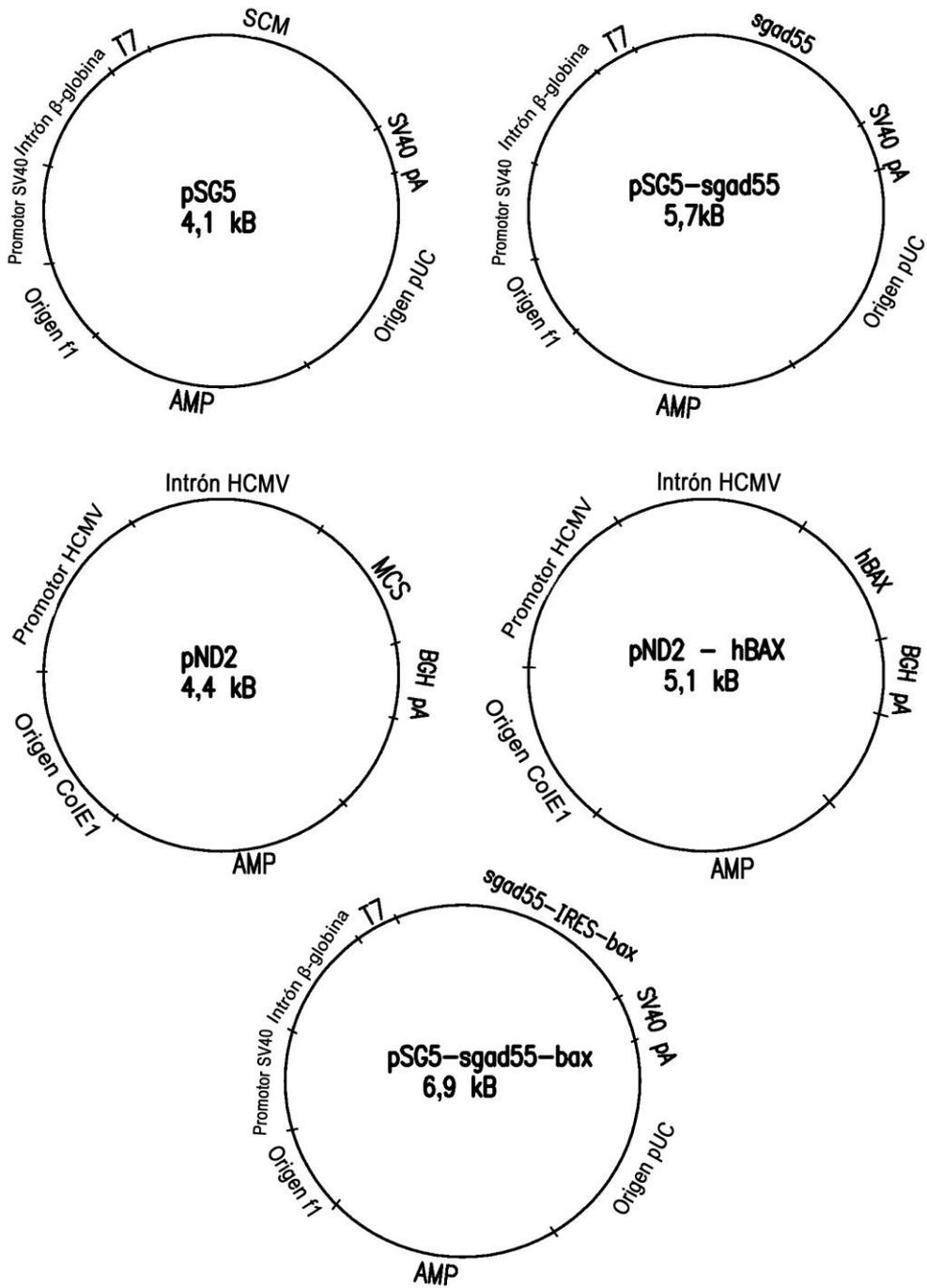


FIG. 1

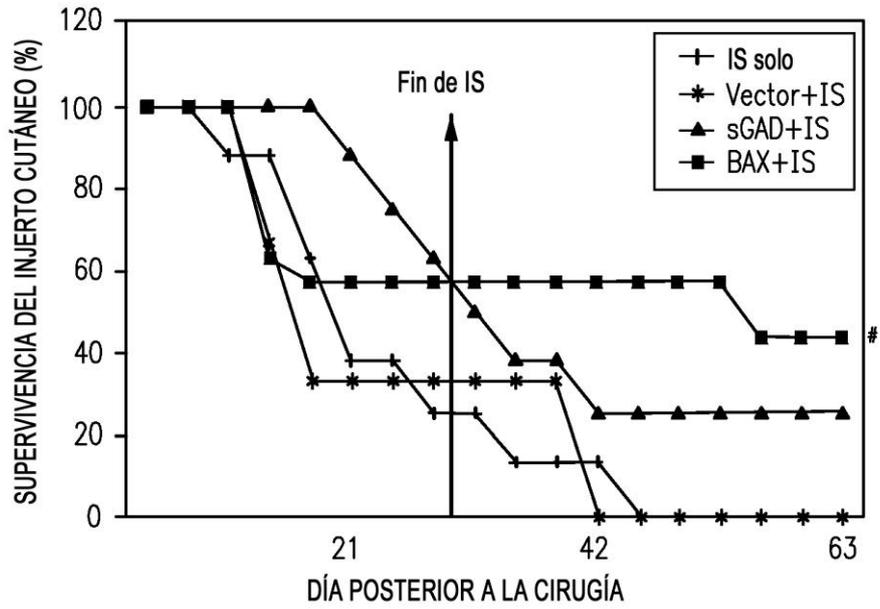


FIG. 2A

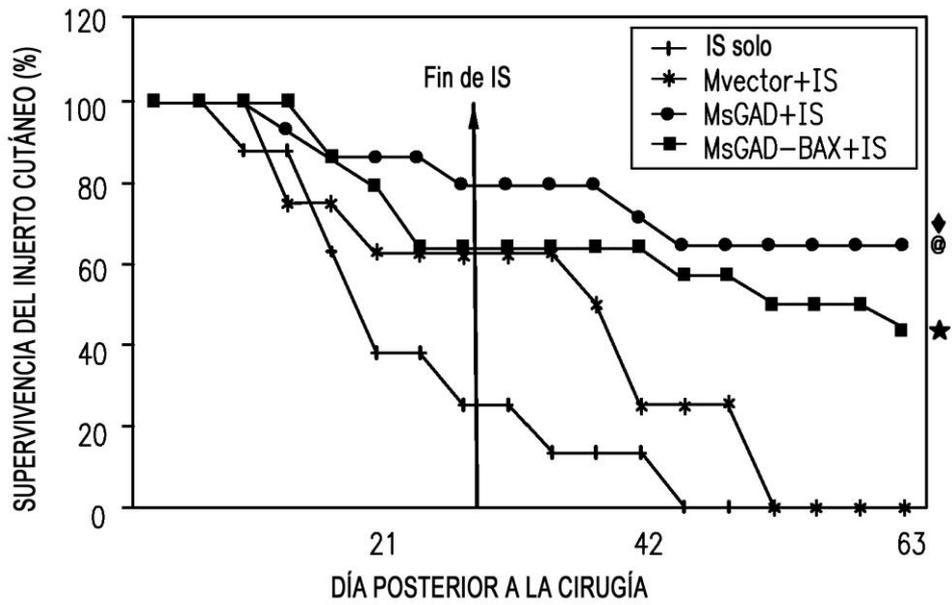


FIG. 2B

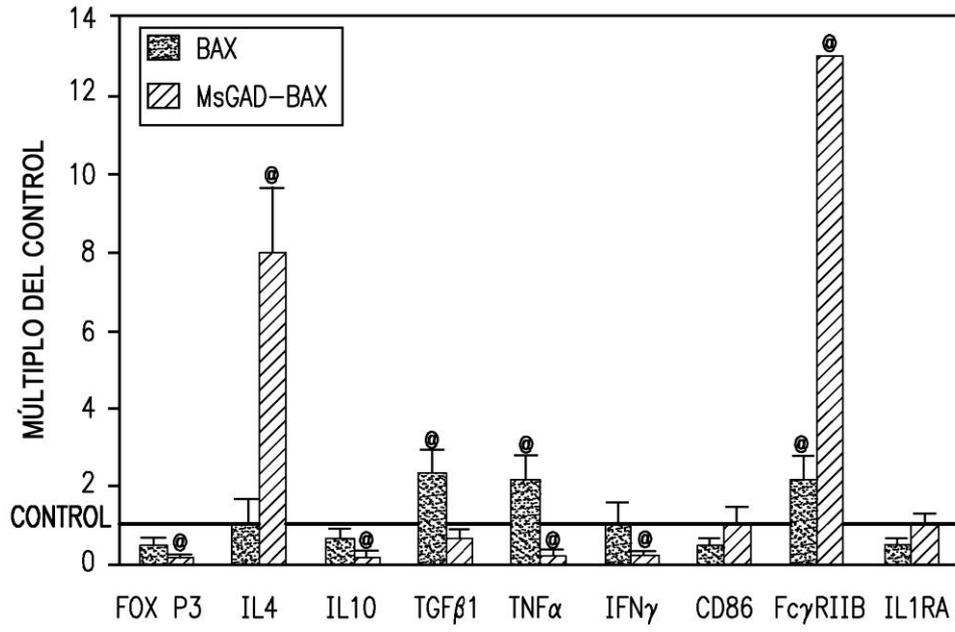


FIG. 3A

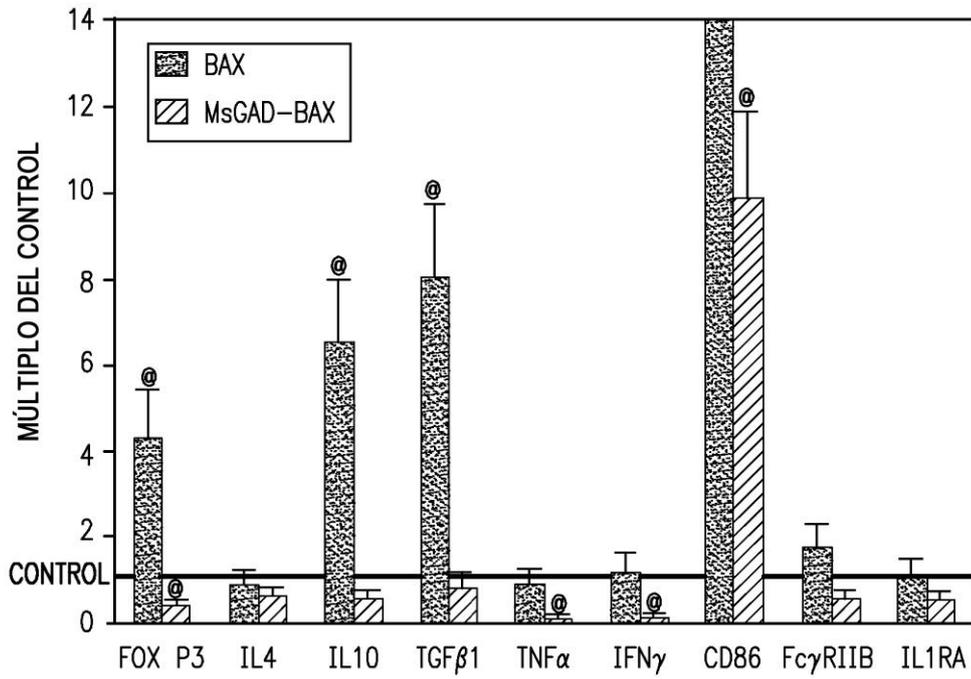


FIG. 3B

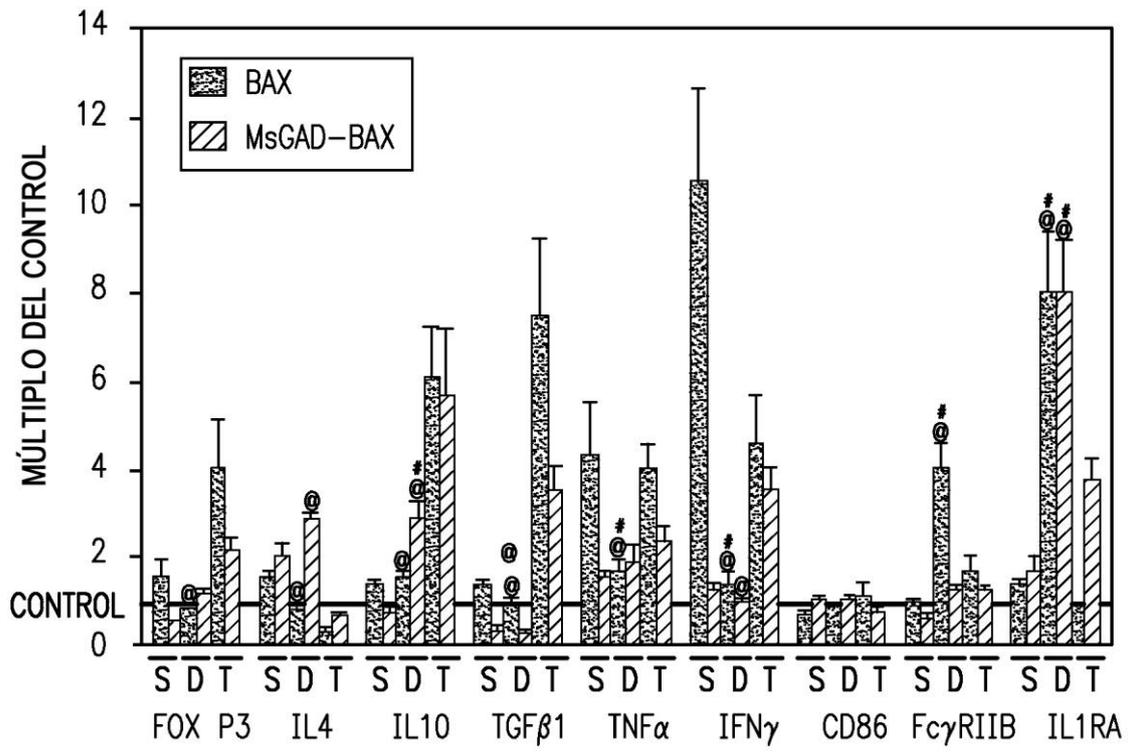


FIG. 3C

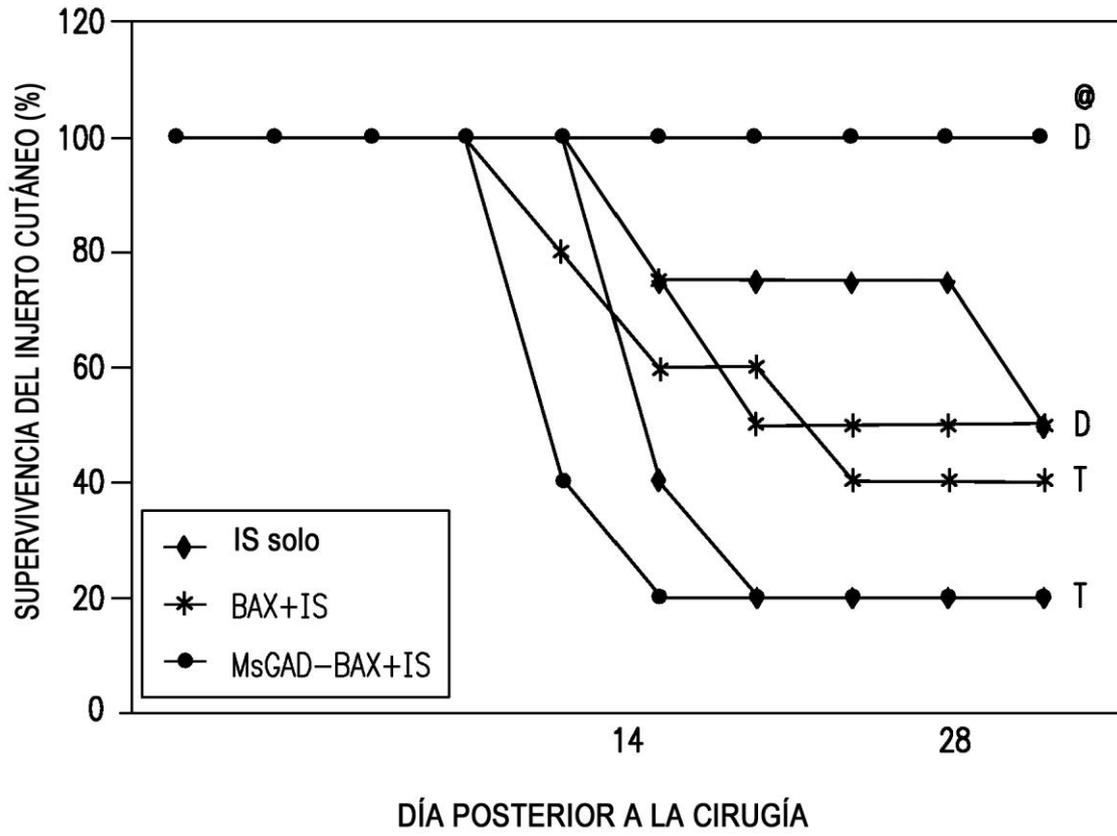


FIG. 4

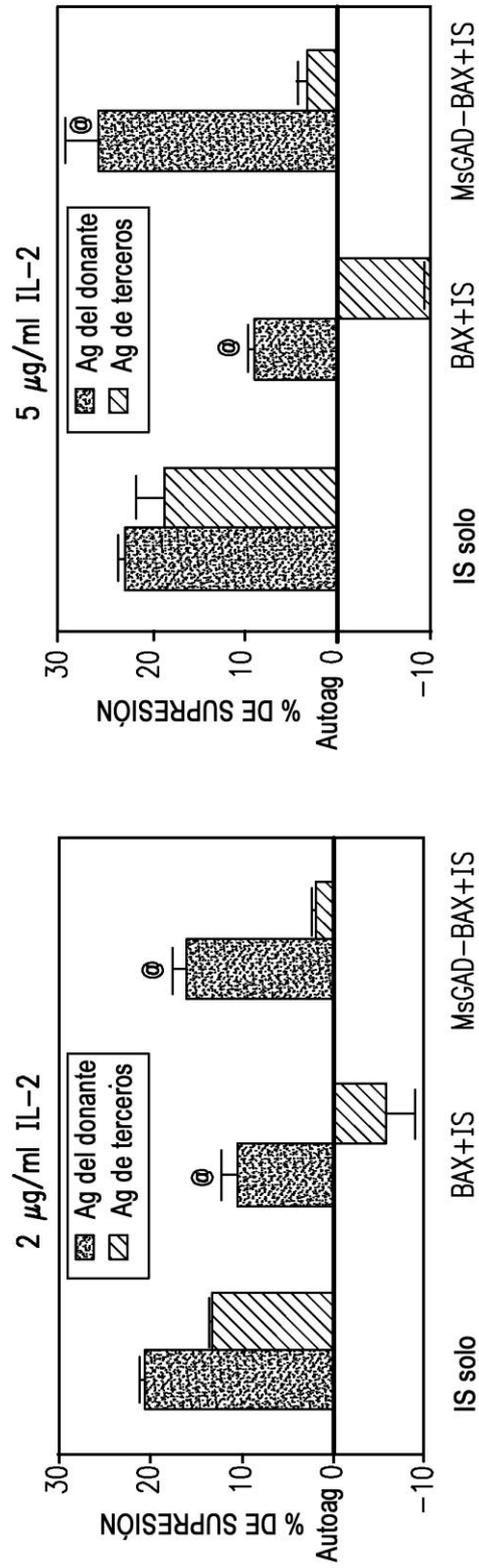


FIG. 5