

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 020**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12R 1/42 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2014 PCT/EP2014/001099**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14173542**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2014 E 14721208 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2988762**

54 Título: **Vectores basados en Salmonella para inmunoterapia del cáncer dirigida al gen WT1 del tumor de Wilms**

30 Prioridad:

25.04.2013 EP 13002245

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

05.07.2018

73 Titular/es:

**VAXIMM AG (100.0%)
Hochbergerstrasse 60c
4057 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**LUBENAU, HEINZ y
SPRINGER, MARCO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 675 020 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

Vectores basados en *Salmonella* para inmunoterapia del cáncer dirigida al gen WT1 del tumor de Wilms

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una cepa mutante atenuada de *Salmonella* que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión eucariota que codifica la Proteína 1 del tumor de Wilms. En particular, la presente invención se refiere al uso de dicha cepa mutante atenuada de *Salmonella* en inmunoterapia contra el cáncer.

Antecedentes de la invención

10 El gen 1 del tumor de Wilms (WT1) codifica un factor de transcripción del dedo de zinc implicado en la diferenciación y proliferación celular. Éste se expresa altamente en una amplia variedad de neoplasias que incluyen varios tipos de neoplasias hematológicas y varios tumores sólidos. Por el contrario, la expresión del tejido normal de WT1 en adultos está restringida a células de las gónadas, útero, riñón, mesotelio y células progenitoras CD34+ en varios tipos de tejidos. WT1 se propuso al principio como un gen supresor de tumores. Sin embargo, pruebas más recientes apuntan hacia funciones oncogénicas de este factor de transcripción; Wt-1 afecta negativamente a la
15 diferenciación y promueve la proliferación de células progenitoras. Además, WT1 sobreexpresado es inmunogénico; se han observado células T específicas de WT1 así como anticuerpos anti-WT1 de IgG en pacientes con cáncer. Por tanto, WT1 es un candidato prometedor para el desarrollo de vacunas contra el cáncer.

20 Se han presentado ensayos clínicos en seres humanos con vacunas WT1 basadas en fragmentos del péptido de WT1 restringida a HLA (antígenos leucocitarios humanos). Osada et al., Clin Cancer Res 2009;15:2789-2796, divulga una Vacuna de Adenovirus que codifica a WT1.

Para el conocimiento del inventor, no se había presentado una vacuna contra el cáncer de bacterias vivas dirigidas a WT1. Además, no se había descrito ninguna vacuna oral contra el cáncer dirigida a WT1.

25 Los derivados atenuados de *Salmonella enterica* son vehículos de transporte atractivos de antígenos heterólogos para el sistema inmunológico de mamíferos, ya que las cepas de *S. enterica* se pueden suministrar de manera potencial a través de vías de inmunización mediante mucosas, es decir, de manera oral o nasal, que ofrecen ventajas de simplicidad y seguridad en comparación con la administración parenteral. Además, las cepas de *Salmonella* producen fuertes respuestas inmunológicas humorales y celulares a nivel de los compartimentos tanto sistémicos como mucosales. Los costes de preparación de los lotes son relativamente bajos y las formulaciones de vacunas bacterianas vivas son altamente estables. La atenuación se puede realizar mediante la delección de varios
30 genes, que incluyen genes virulentos, reguladores, y metabólicos.

Se ha demostrado que varias cepas atenuadas de *Salmonella typhimurium* por mutaciones *aro* son vehículos de administración seguros y eficaces en modelos animales.

35 En WO 03/073995 se describen métodos para administrar construcciones de ADN que codifican antígenos, en particular proteínas del receptor VEGF, a través de cepas de *Salmonella typhimurium* vivas atenuadas en células diana de ratón. Niethammer et al., (Nature Medicine 2002, 8(12), 1369) demostró que la cepa SL7207 de *S. typhimurium aroA* alberga un vector de expresión que codifica el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular murino (VEGFR-2 o FLK-1), el cual es esencial para la angiogénesis tumoral, es funcional como una vacuna contra el cáncer.

40 Sin embargo sólo hay una cepa serovar de *Salmonella enterica* atenuada, denominada *Salmonella enterica* serovar typhi Ty21a (abreviado: *S. typhi* Ty21a), que se haya aceptado para el uso en seres humanos y que se distribuye bajo el nombre comercial de Vivotif® (Berna Biotech Ltd., una empresa de Crucell, Suiza; autorización de comercialización número PL 15747/0001 con fecha del 16 de Diciembre de 1996).

45 Esta vacuna oral viva bien tolerada contra la fiebre tifoidea se obtuvo del aislado de la cepa bacteriana virulenta *S. typhi* Ty2 de tipo salvaje mediante mutagénesis química y alberga un gen *ga/E* con una mutación con pérdida funcional, así como otras mutaciones menos definidas. Se ha autorizado como vacuna tifoidea en muchos países después de demostrar ser eficaz y segura en ensayos clínicos.

50 WT1 es un antígeno tumoral prometedor para el desarrollo de vacunas contra el cáncer. Las principales limitaciones de las vacunas de péptidos WT1 previamente disponibles son la restricción de HLA y la administración parenteral. Hasta el momento no se ha conseguido la enorme necesidad de mejorar los métodos terapéuticos contra el cáncer en base a la focalización hacia el WT1.

Objetivos de la invención

En vista de la técnica anterior, es un objetivo de la presente invención proporcionar una nueva vacuna oral contra el cáncer dirigida a WT1. Tal vacuna contra el cáncer dirigida a WT1 ofrecería importantes ventajas para mejorar las opciones de tratamiento para pacientes con cáncer.

Compendio de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a una cepa mutante atenuada de Salmonella que comprende al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión eucariota que codifica la Proteína del Tumor de Wilms (WT1).

5 La cepa de Salmonella atenuada de la presente invención ha demostrado presentar actividad antitumoral en un modelo murino expuesto a células de leucemia murinas. Según el conocimiento del inventor, esta nueva cepa de Salmonella atenuada es la primera vacuna bacteriana viva contra el cáncer dirigida a WT1. Además, la cepa de Salmonella atenuada de la presente invención es la primera vacuna contra el cáncer oral dirigida a WT1. Ya que WT1 se sobreexpresa en una gran variedad de neoplasias hematológicas y tumores sólidos, la cepa de Salmonella atenuada de la presente invención tiene un gran potencial como vacuna universal contra el cáncer.

10 En un primer estudio, la vacuna según la presente invención (VXM06) ha demostrado prolongar la supervivencia de manera eficaz de los ratones que portan células de leucemia implantadas de manera intraperitoneal. Estos resultados indican que la vacunación con VXM06 puede conducir a una respuesta inmunológica y al desarrollo de una memoria inmunológica contra células tumorales que sobreexpresan WT1. Es notable y sorprendente que la nueva vacuna VXM06 sea eficaz a concentraciones relativamente bajas. La cepa mutante de Salmonella atenuada de la presente memoria se puede aplicar en monoterapia o en combinación con una segunda cepa mutante atenuada de Salmonella que comprende una molécula de ADN que codifica un segundo antígeno tumoral. Además, la cepa mutante atenuada de la presente invención se puede administrar en combinación con quimioterapia, radioterapia, o terapia biológica contra el cáncer. El tratamiento con VXM06 puede ser también eficaz, si el paciente ha desarrollado una resistencia a la quimioterapia (pacientes quimio-refractarios). La nueva cepa de Salmonella atenuada de la presente invención puede, por lo tanto, ser útil en nuevos métodos de terapia contra el cáncer mejorados.

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella es de las especies Salmonella enterica. En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella es Salmonella Typhi Ty21a.

25 Según la invención, el casete de expresión es un casete de expresión eucariota.

En realizaciones particulares, WT1 es WT1 humano.

En realizaciones particulares, WT1 está truncado. En realizaciones particulares, se elimina el dominio del dedo de zinc de WT1. En realizaciones particulares, el WT1 truncado tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en SEQ ID NO:1.

30 En realizaciones particulares, la molécula de ADN recombinante comprende el gen de resistencia al antibiótico kanamicina, el ori pMB1, y un casete de expresión eucariota que codifica WT1 humano, particularmente el WT1 humano truncado, bajo el control de un promotor de CMV. En realizaciones particulares, la molécula de ADN recombinante es una plásmido denominado pVAX10.hWT1 y tiene la secuencia de ácidos nucleicos como se encuentra en SEQ ID NO:2.

35 En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella es para su uso como un medicamento.

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella es para su uso como una vacuna.

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella es para su uso en inmunoterapia contra el cáncer.

40 En realizaciones particulares, la inmunoterapia contra el cáncer comprende la administración de una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella que comprende al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión que codifica un antígeno tumoral y/o un antígeno del estroma tumoral. En realizaciones particulares, dicha una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella es/son Salmonella typhi Ty21a que comprende un casete de expresión eucariota. En realizaciones particulares, dicha una o más cepas de Salmonella comprende o comprenden una cepa o cepas mutantes atenuadas de Salmonella que codifica el VEGFR-2 humano.

45 En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se co-administra con dicha una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella.

En realizaciones particulares, la inmunoterapia contra el cáncer se combina con quimioterapia, radioterapia o terapia biológica contra el cáncer.

50 En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra durante el ciclo de tratamiento de quimioterapia o radioterapia o durante la terapia biológica contra el cáncer.

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra antes del ciclo de tratamiento de quimioterapia o radioterapia o antes de la terapia biológica contra el cáncer.

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra después del ciclo de tratamiento de quimioterapia o radioterapia o después de la terapia biológica contra el cáncer.

5 En otras realizaciones, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra antes y durante al menos un ciclo de tratamiento de quimioterapia o radioterapia y de la terapia biológica contra el cáncer. En casos donde se lleven a cabo más de una terapia de quimioterapia, radioterapia y terapia biológica contra el cáncer, la cepa mutante atenuada de Salmonella se puede administrar antes o durante, o antes y durante al menos una de estas terapias, particularmente durante al menos dos de estas terapias.

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra por vía oral.

10 En realizaciones particulares, el cáncer se selecciona de leucemia, particularmente de leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia linfocítica aguda (LLA), y de tumores sólidos, particularmente de cáncer de pulmón, cáncer de mama, esófago, colon, colorrectal, gástrico, colangiocarcinoma, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, sarcoma sinovial, angiosarcoma, osteosarcoma, cáncer de tiroides, cervical, endometrial, cáncer de ovario, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de próstata.

15 En realizaciones particulares, la dosis única es de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{11} , particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{10} , más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^9 , más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 , más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC).

20 En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella es para el uso en inmunoterapia personalizada contra el cáncer que comprende la etapa de evaluar el patrón de expresión del antígeno tumoral y/o el patrón de expresión del antígeno del estroma de un paciente.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se puede entender más fácilmente en referencia a la siguiente descripción detallada y a los ejemplos incluidos en la ella.

25 En un aspecto, la presente invención se refiere a una cepa mutante atenuada de Salmonella que comprende al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión eucariota que codifica la proteína tumoral de Wilms (WT1).

Según la invención, la cepa atenuada de Salmonella funciona como el portador bacteriano de la molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión que codifica la proteína tumoral de Wilms (WT1) para la administración de dicha molécula de ADN recombinante a una célula diana.

30 En el contexto de la presente invención, el término "atenuado" se refiere a una cepa bacteriana de virulencia reducida en comparación con la cepa bacteriana parental, que no alberga la mutación atenuante. Las cepas bacterianas atenuadas han perdido preferiblemente su virulencia pero conservan su capacidad para inducir inmunidad protectora. La atenuación puede lograrse mediante la eliminación de varios genes, incluidos la virulencia, los genes reguladores y metabólicos. Las bacterias atenuadas pueden encontrarse de forma natural o pueden producirse artificialmente en el laboratorio, por ejemplo, mediante la adaptación a un nuevo medio o cultivo celular o pueden producirse mediante tecnología de ADN recombinante.

En el contexto de la presente invención, el término "cepa mutante" se refiere a una cepa bacteriana que alberga una mutación en su genoma. En este contexto, el término "mutación" se refiere a un cambio en una secuencia de ácido nucleico, que incluye mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, translocaciones e inversiones.

40 En el contexto de la presente invención, el término "comprende" o "que comprende" significa "que incluye, pero no se limita a". El término está destinado a ser de composición abierta, para especificar la presencia de determinadas características, elementos, números enteros, etapas o componentes, pero no para excluir la presencia o adición de una o más características, elementos, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos. El término "que comprende" incluye, por tanto, los términos más restrictivos "que consiste en" y "que consiste esencialmente en". En una realización, el término "que comprende" tal como se usa a lo largo de la solicitud y en particular dentro de las reivindicaciones, se puede reemplazar por el término "que consiste en".

45 En el contexto de la presente invención, el término "molécula de ADN recombinante" se refiere a una construcción de ADN modificada genéticamente, compuesta preferiblemente de fragmentos de ADN de origen diferente. La molécula de ADN recombinante puede ser un ácido nucleico lineal, o preferiblemente, un plásmido de ADN recombinante circular generado al introducir un marco de lectura abierto que codifica WT1 en un plásmido de vector de expresión.

En el contexto de la presente invención, el término "casete de expresión" se refiere a una unidad de ácido nucleico que comprende al menos el gen WT1 bajo el control de secuencias reguladoras que controlan su expresión. El casete de expresión comprendido en la cepa mutante atenuada de Salmonella puede mediar preferiblemente la

transcripción del marco de lectura abierto incluido que codifica WT1 en una célula diana. Los casetes de expresión comprenden normalmente un promotor, al menos un marco de lectura abierto, y una señal de terminación de la transcripción.

5 La proteína 1 del tumor de Wilms del factor de transcripción del dedo de zinc está codificada por el gen WT1. Contiene cuatro motivos de dedo de cinc en el extremo C y un dominio de unión a ADN rico en prolina/glutamina en el extremo N-terminal. Se han caracterizado bien varias variantes de transcripción, resultantes del splicing alternativo en dos exones codificantes. WT1 juega un papel esencial en el desarrollo del sistema urogenital y está involucrado en la proliferación y diferenciación celular. El gen WT1 se aisló como el gen responsable de una neoplasia renal infantil, el tumor de Wilms. Está altamente expresado en una amplia variedad de neoplasias que incluyen varios tipos de neoplasias hematológicas y varios tumores sólidos. Por el contrario, la expresión tisular normal de WT1 en adultos está restringida a células de las gónadas, útero, riñón, mesotelio y células progenitoras en varios tipos de tejidos. Debido a su perfil de expresión, sus funciones oncogénicas y su potencial inmunogénico, el antígeno tumoral WT1 es un candidato prometedor para el desarrollo de vacunas contra el cáncer.

15 En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella es de la especie Salmonella enterica. En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella es Salmonella typhi Ty21a. La cepa S. typhi Ty21a atenuada es el componente activo de Typhoral L®, también conocido como Vivotif® (fabricado por Berna Biotech Ltd., una compañía de Crucell, Suiza). Actualmente es la única vacuna oral viva con licencia contra la fiebre tifoidea. Esta vacuna ha sido ampliamente probada y ha demostrado ser segura con respecto a la toxicidad del paciente, así como a la transmisión a terceros (Wahdan et al., J. Infectious Diseases 1982, 145:292-295). La vacuna tiene licencia en más de 40 países. El número de autorización de comercialización de Typhoral L® es PL 15747/0001 con fecha del 16 de diciembre de 1996. Una dosis de vacuna contiene al menos 2×10^9 unidades formadoras de colonias S. typhi Ty21a viables, y al menos 5×10^9 células S. typhi Ty21a no viables.

20 Una de las propiedades bioquímicas de la cepa bacteriana Ty21a de Salmonella typhi es su incapacidad para metabolizar galactosa. La cepa bacteriana atenuada tampoco es capaz de reducir el sulfato a sulfuro, lo que la diferencia de la cepa Salmonella typhi Ty2 de tipo salvaje. Con respecto a sus características serológicas, la cepa Ty21a de Salmonella typhi contiene el antígeno O9 que es un polisacárido de la membrana externa de la bacteria y carece del antígeno O5, que es a su vez un componente característico de Salmonella typhimurium. Esta característica serológica respalda la lógica para incluir la prueba respectiva en un panel de pruebas de identidad para la liberación de lotes.

25 En el contexto de la presente invención, el término "casete de expresión eucariota" se refiere a un casete de expresión que permite la expresión del marco de lectura abierto en una célula eucariota. Se ha demostrado que la cantidad de antígeno heterólogo requerida para inducir una respuesta inmunológica adecuada puede ser tóxica para la bacteria y dar como resultado la muerte celular, la sobre-atenuación o la pérdida de expresión del antígeno heterólogo. El uso de un casete de expresión eucariota que no se expresa en el vector bacteriano, sino sólo en la célula diana, puede superar este problema de toxicidad, y la proteína expresada puede presentar un patrón de glucosilación eucariota.

30 Un casete de expresión eucariota comprende secuencias reguladoras que son capaces de controlar la expresión de un marco de lectura abierto en una célula eucariota, preferiblemente un promotor y una señal de poliadenilación. Los promotores y las señales de poliadenilación incluidos en las moléculas de ADN recombinante comprendidas por la cepa mutante atenuada de Salmonella de la presente invención se seleccionan preferiblemente para que sean funcionales dentro de las células del sujeto a inmunizar. Ejemplos de promotores adecuados, especialmente para la producción de una vacuna de ADN para seres humanos, incluyen, pero no se limitan a, promotores de citomegalovirus (CMV), tales como el potente promotor temprano inmediato de CMV, virus de simio 40 (SV40), virus de tumor mamario de ratón (MMTV), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), tal como el promotor de Repetición Terminal Larga (LTR) del VIH, virus Moloney, virus Epstein Barr (EBV), y del virus del sarcoma de Rous (RSV), así como promotores de genes humanos, tales como actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana, y metalotioneína humana. En una realización particular, el casete de expresión eucariota contiene el promotor de CMV. En el contexto de la presente invención, el término "promotor de CMV" se refiere al promotor potente de citomegalovirus temprano inmediato.

35 Ejemplos de señales de poliadenilación adecuadas, especialmente para la producción de una vacuna de ADN para seres humanos, incluyen, pero no se limitan a, el sitio de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH), señales de poliadenilación de SV40, y señales de poliadenilación de LTR. En una realización particular, el casete de expresión eucariota incluido en la molécula de ADN recombinante comprendida por la cepa mutante atenuada de Salmonella de la presente invención, comprende el sitio de poliadenilación BGH.

40 Además de los elementos reguladores requeridos para la expresión del gen WT1 heterólogo, como un promotor y una señal de poliadenilación, también se pueden incluir otros elementos en la molécula de ADN recombinante. Dichos elementos adicionales incluyen potenciadores. El potenciador puede ser, por ejemplo, el potenciador de actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana y potenciadores virales, tales como los de CMV, RSV y EBV.

Las secuencias reguladoras y los codones son generalmente dependientes de las especies, por lo que para maximizar la producción de proteínas, las secuencias reguladoras y los codones se seleccionan preferiblemente para que sean eficaces en las especies a inmunizar. El experto en la materia puede producir moléculas de ADN recombinante que son funcionales en una especie dada del sujeto.

5 En realizaciones particulares, WT1 es WT1 humana.

En este contexto, el término “aproximadamente” o “alrededor” significa dentro de 80% a 120%, alternativamente dentro de 90% a 110%, que incluye dentro de 95% a 105% de un valor o intervalo dado.

10 La proteína puede ser de origen natural, por ejemplo, un homólogo de WT1 de una especie diferente, o una proteína modificada genéticamente, por ejemplo, un derivado de WT1 modificado por ingeniería genética. Se sabe que el uso de codones es diferente entre especies. Por lo tanto, cuando se expresa una proteína heteróloga en una célula diana, puede ser necesario, o al menos útil, adaptar la secuencia de ácido nucleico al uso del codon de la célula diana. Los métodos para diseñar y construir derivados de una proteína dada son bien conocidos por cualquier experto en la técnica.

15 El WT1 humano puede contener una o más mutaciones que comprenden además, una delección y/o sustitución de uno o más aminoácidos. Los métodos y algoritmos para determinar la identidad de secuencia, que incluyen la comparación de una proteína parental y su derivado que tiene delecciones, adiciones y/o sustituciones con respecto a una secuencia parental, son bien conocidos por los expertos en la técnica. A nivel del ADN, las secuencias de ácido nucleico que codifican WT1 humano pueden diferir en mayor medida debido a la degeneración del código genético.

20 En realizaciones particulares, WT1 está truncado. En realizaciones particulares, se elimina el dominio del dedo de cinc de WT1. En realizaciones particulares, el WT1 truncado tiene la secuencia de aminoácidos que se encuentra en la SEQ ID NO:1.

25 El dominio del dedo de zinc en el extremo C terminal de WT1 comprende cuatro motivos de dedo de cinc. El WT1 truncado de la secuencia de aminoácidos que se encuentra en SEQ ID NO:1 representa los aminoácidos 1 a 371 de UniProt ref P19544-7. La eliminación del dominio del dedo de zinc minimiza el riesgo de reactividad cruzada inmunológica con otros dedos de zinc que contienen factores de transcripción. Además, el WT1 truncado que carece del dominio del dedo de zinc tiene un mayor potencial inmunogénico que el WT1 de longitud completa. Además, la eliminación de los motivos del dedo de zinc, que son esenciales para la unión al ADN, anula el potencial oncogénico de WT1, minimizando por tanto el riesgo de oncogénesis.

30 En realizaciones particulares, la molécula de ADN recombinante comprende el gen de resistencia al antibiótico kanamicina, el ori pMB1, y un casete de expresión eucariota que codifica WT1 humano, particularmente WT1 humano truncado, bajo el control de un promotor de CMV. En realizaciones particulares, la molécula de ADN recombinante es un plásmido denominado pVAX10.hWT1 y tiene la secuencia de ácido nucleico como se encuentra en SEQ ID NO:2.

35 En realizaciones particulares, la molécula de ADN recombinante se deriva del plásmido de expresión pVAX1™ disponible comercialmente (Invitrogen, San Diego, California). Este vector de expresión se modificó reemplazando el origen de replicación de pUC de alta copia por el origen de replicación de pMB1 de copia baja de pBR322. La modificación de copia baja se realizó para reducir la carga metabólica y hacer la construcción más estable. La estructura del vector de expresión generado se denominó pVAX10. La inserción de WT1 truncado humano en esta estructura del vector de expresión a través de *NheI/XhoI* produjo el plásmido de expresión pVAX10.hWT1 que tiene la secuencia de ácido nucleico como se encuentra en SEQ ID NO:2. El plásmido de expresión pVAX10.hWT1 se representa esquemáticamente en la Figura 3.

40 En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella es para uso como un medicamento.

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella es para uso como una vacuna.

45 En el contexto de la presente invención, el término “vacuna” se refiere a un agente que es capaz de inducir una respuesta inmunológica en un sujeto tras la administración. Una vacuna puede preferiblemente prevenir, mejorar o tratar una enfermedad. Una vacuna de acuerdo con la presente invención comprende una cepa mutante atenuada de Salmonella, preferiblemente *S. typhi* Ty21a. La vacuna de acuerdo con la presente invención comprende además al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión eucariota que codifica WT1, preferiblemente seleccionado de WT1. Preferiblemente, dicho WT1 está truncado, particularmente se elimina el dominio del dedo de zinc.

50 La cepa mutante de Salmonella atenuada viva según la presente invención que comprende una molécula de ADN recombinante que codifica WT1 se puede usar como vehículo para la administración oral de esta molécula de ADN recombinante. Tal vector de administración que comprende una molécula de ADN que codifica un antígeno heterólogo, tal como WT1, se denomina vacuna de ADN.

La inmunización genética podría ser ventajosa con respecto a la vacunación convencional. El ADN diana puede detectarse durante un período de tiempo considerable actuando, por tanto, como un depósito del antígeno. Los motivos de secuencia en algunos plásmidos, como las islas GpC, son inmunoestimuladores y pueden funcionar como adyuvantes promovidos por la inmunoestimulación debida a LPS y otros componentes bacterianos.

- 5 Al contrario de las vacunas peptídicas que sólo pueden mediar la inmunidad contra un pequeño fragmento de la proteína WT1, la vacunación genética puede dar como resultado la inmunidad contra una amplia variedad de epítomos presentes en toda la longitud de la proteína WT1 codificada.

Además de esto, la vacuna peptídica WT1, que se ha usado en la mayoría de los ensayos clínicos, tiene una aplicación limitada debido a la restricción HLA de los péptidos, es decir, su capacidad de unión a moléculas HLA de células presentadoras de antígeno (APCs). Por el contrario, la vacuna de ADN de la presente invención no está restringida por HLA.

Los vectores bacterianos vivos producen sus propios factores inmunomoduladores, tales como lipopolisacáridos (LPS) *in situ* que pueden constituir una ventaja sobre otras formas de administración, tales como la microencapsulación. Además, el uso de la vía natural de entrada resulta ser beneficioso ya que muchas bacterias, como Salmonella, salen al lumen intestinal a través de las células M de las placas de Peyer y migran finalmente a los ganglios linfáticos y al bazo, permitiendo por tanto dirigir las vacunas a sitios inductivos del sistema inmunológico. La cepa vacunal de Salmonella typhi, Ty21a, ha demostrado tener un excelente perfil de seguridad. Al salir al lumen intestinal a través de las células M, las bacterias son absorbidas por las células fagocíticas, como los macrófagos y las células dendríticas. Estas células son activadas por el patógeno y comienzan a diferenciarse, y probablemente migren hacia los nódulos linfáticos y el bazo. Debido a sus mutaciones atenuantes, las bacterias de la cepa S. typhi Ty21 no son capaces de persistir en estas células fagocíticas pero mueren en este momento. Las moléculas de ADN recombinante se liberan y posteriormente se transfieren al citosol de las células inmunes fagocíticas, ya sea a través de un sistema de transporte específico o mediante una fuga endosómica. Finalmente, las moléculas de ADN recombinante ingresan en el núcleo, donde se transcriben, lo que conduce a la expresión de WT1 en el citosol de las células fagocíticas. Las células T citotóxicas específicas contra WT1 son inducidas por las células presentadoras de antígeno activado.

No hay datos disponibles hasta la fecha que indiquen que S. typhi Ty21a puede entrar en el torrente sanguíneo de manera sistémica. La cepa de la vacuna viva atenuada de Salmonella typhi Ty21a permite, por tanto, dirigirse de manera específica al sistema inmunológico mientras que muestra un excelente perfil de seguridad.

Los derivados atenuados de Salmonella enterica son atractivos como vehículos para la administración de antígenos heterólogos al sistema inmunológico de mamíferos, ya que las cepas de S. enterica pueden administrarse potencialmente a través de las mucosas de inmunización, es decir, por vía oral o nasal, lo que ofrece ventajas de simplicidad y seguridad en comparación con la administración parenteral. Además, las cepas de Salmonella provocan fuertes respuestas inmunológicas humorales y celulares a nivel de los compartimentos tanto sistémicos como mucosales.

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella es para uso en inmunoterapia contra el cáncer.

En realizaciones particulares, la inmunoterapia contra el cáncer comprende además la administración de una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella que comprenden al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión que codifica un antígeno tumoral y/o un antígeno del estroma tumoral. En realizaciones particulares, dicha una o más cepas mutantes adicionales de Salmonella es/son Salmonella typhi Ty21a que comprende un casete de expresión eucariota. En realizaciones particulares, dicha una o más cepas adicionales de Salmonella comprende o comprenden una cepa mutante atenuada de Salmonella que codifica VEGFR-2 humana.

La combinación de la cepa mutante atenuada de Salmonella de la presente invención con una segunda cepa mutante atenuada que comprende una molécula de ADN que codifica un segundo antígeno tumoral, puede tener efectos antitumorales sinérgicos. En particular, la selección simultánea de diferentes antígenos tumorales puede minimizar el riesgo de escape del tumor. La combinación de inmunoterapia contra el cáncer basada en WT1 con inmunoterapia basada en VEGFR-2 puede ser especialmente efectiva, ya que las células tumorales que sobreexpresan WT1 y la vasculatura del tumor son atacadas al mismo tiempo.

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se co-administra con una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella.

En el contexto de la presente invención, el término "co-administración" o "co-administrar" significa la administración de dos cepas mutantes atenuadas de Salmonella diferentes dentro de tres días consecutivos, más particularmente en dos días consecutivos, más particularmente en el mismo día, más particularmente dentro de las 12 horas. Más particularmente, en el contexto de la presente invención, el término "co-administración" se refiere a la administración simultánea de dos cepas mutantes atenuadas de Salmonella diferentes.

En realizaciones particulares, la inmunoterapia contra el cáncer se combina con quimioterapia, radioterapia o terapia biológica contra el cáncer. Para la cura del cáncer, la erradicación completa de las células madre del cáncer puede ser esencial. Para una eficacia máxima, puede ser beneficiosa una combinación de diferentes métodos terapéuticos.

5 En el contexto de la presente invención, el término “terapia biológica contra el cáncer” o “inmunoterapia contra el cáncer” se refiere a la estimulación del sistema inmunológico del paciente para atacar células tumorales malignas o el estroma tumoral. Los enfoques de terapia biológica contra el cáncer incluyen el suministro de antígenos tumorales, el suministro de anticuerpos terapéuticos como fármacos, la administración de citoquinas inmunoestimuladoras, y la administración de células inmunológicas.

10 Agentes quimioterapéuticos que se pueden usar en combinación con la cepa mutante atenuada de Salmonella de la presente invención pueden ser, por ejemplo: gemcitabina, amifostina (ethyol), cabazitaxel, cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, docetaxel, mecloretamina, estreptoizocina, ciclofosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina), doxorubicina liposomal (doxil), ácido folínico, gemcitabina (gemzar), daunorrubicina, daunorrubicina liposomal (daunoxome), procarbazona, ketoconazol, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5 -fluorouracilo (5-FU), vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleucina, asparraginasas, busulfán, carboplatino, cladribina, camptotecina, CPT-11, 10-hidroxi-7-etil-camptotecina (SN38), dacarbazina, floxuridina, fludarabina, hidroxiurea, ifosfamida, idarrubicina, mesna, interferón alfa, interferón beta, irinotecán, mitoxantrona, topotecán, leuprolida, megestrol, melfalán, mercaptopurina, oxaliplatino, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, plicamicina, estreptoizocina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo, y combinaciones de los mismos.

15
20

Los agentes quimioterapéuticos más preferidos según la invención en combinación con VXM06 son cabazitaxel, carboplatino, oxaliplatino, cisplatino, ciclofosfamida, docetaxel, gemcitabina, doxorubicina, paclitaxel (taxol), irinotecán, vincristina, vinblastina, vinorelbina, ácido folínico, 5-fluorouracilo y bleomicina, especialmente gemcitabina.

25 Puede ser también favorable dependiendo de la aparición de posibles efectos secundarios, incluir el tratamiento con antibióticos o agentes anti-inflamatorios.

30 En caso de que se produzcan efectos adversos que se asemejen a reacciones de hipersensibilidad mediadas por histamina, leucotrienos o citoquinas, hay opciones de tratamiento disponibles para la fiebre, anafilaxia, inestabilidad de la presión sanguínea, broncoespasmo y disnea. Las opciones de tratamiento en caso de auto-agresión derivada de células T no deseadas se derivan de esquemas de tratamiento estándar en la enfermedad aguda y crónica de injerto contra huésped aplicada después del trasplante de células madre. La ciclosporina y los glucocorticoides se proponen como opciones de tratamiento.

35 En el caso improbable de infección sistémica por Salmonella typhi tipo Ty21a, se recomienda una terapia antibiótica apropiada, por ejemplo, con fluoroquinolonas que incluyen ciprofloxacino u ofloxacino. Las infecciones bacterianas del tracto gastrointestinal deben tratarse con agentes respectivos, tal como rifaximina.

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra durante la quimioterapia o el ciclo de tratamiento de radioterapia o durante la terapia biológica contra el cáncer.

40 En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra antes de la quimioterapia o del ciclo de tratamiento de radioterapia o antes de la terapia biológica contra el cáncer. Este enfoque puede tener la ventaja de que la quimioterapia o la radioterapia pueden realizarse en condiciones de mayor inmunidad frente al cáncer.

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra después de la quimioterapia o del ciclo de tratamiento de radioterapia o después de la terapia biológica contra el cáncer.

45 En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra por vía oral. La administración oral es más simple, más segura y más cómoda que la administración parenteral. Las vacunas de péptidos de WT1, que se han empleado en la mayoría de los ensayos clínicos, se administran normalmente por vía subcutánea o intradérmica, dando a menudo como resultado eritema de la piel y reacciones de inflamación local. Estos efectos adversos pueden superarse mediante la administración oral de la vacuna de ADN de la presente invención. La cepa mutante atenuada de Salmonella de la presente invención también se puede utilizar, sin embargo, mediante cualquier otra vía de administración adecuada. Preferiblemente, se administra al sujeto una dosis eficaz terapéuticamente, y esta dosis depende de la aplicación particular, del tipo de neoplasia, del peso, de la edad, del sexo y del estado de salud del sujeto, de la forma de administración y de la formulación, etc. La administración puede ser única o múltiple, según sea necesario.

50

55 La cepa mutante atenuada de Salmonella de la presente invención se puede proporcionar en forma de una disolución, una suspensión, liofilizado o cualquier otra forma adecuada. Se puede proporcionar en combinación con vehículos, diluyentes y/o excipientes aceptables farmacéuticamente. También se pueden incluir agentes para ajustar el valor de pH, tampones, agentes para ajustar la toxicidad, y similares. En el contexto de la presente invención, el

término “aceptable farmacéuticamente” se refiere a entidades moleculares y otros ingredientes de las composiciones farmacéuticas, que son tolerables fisiológicamente y que normalmente no producen reacciones adversas cuando se administran a un mamífero (por ejemplo, un ser humano). El término “aceptable farmacéuticamente” también puede significar que está aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal o que está catalogado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra Farmacopea reconocida generalmente para uso en mamíferos, y, más particularmente, en seres humanos.

En realizaciones particulares, el cáncer se selecciona de leucemia, en particular de leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia linfocítica aguda (LLA), y de tumores sólidos, particularmente de cáncer de pulmón, cáncer de mama, esófago, colon, colorrectal, gástrico, colangiocarcinoma, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, sarcoma sinovial, angiosarcoma, osteosarcoma, cáncer de tiroides, cervical, endometrial, cáncer de ovario, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de próstata.

La vacuna de la presente invención es sorprendentemente eficaz a dosis relativamente bajas. En realizaciones particulares, la dosis única es de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{11} , particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{10} , más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^9 , más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 , lo más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC). La administración de dosis bajas de esta vacuna bacteriana viva minimiza el riesgo de excreción y, por lo tanto, de transmisión a terceros.

En este contexto, el término “alrededor de” o “aproximadamente” significa dentro de un factor de 3, alternativamente dentro de un factor de 2, incluyendo dentro de un factor de 1,5 de un valor o intervalo dado.

En la presente memoria se describe también la cepa mutante atenuada de Salmonella para el uso en inmunoterapia individualizada contra el cáncer que comprende la etapa de evaluar el patrón de expresión del antígeno tumoral y/o el patrón de expresión del antígeno del estroma de un paciente.

VXM06 se puede usar bien en solitario o bien en combinación con otras vacunas contra el cáncer a base de Salmonella typhi Ty21a, que comprenden sistemas de expresión eucariotas, para el tratamiento de varios tipos de cáncer. En realizaciones particulares, VXM06 se puede usar para el tratamiento individualizado contra el cáncer específico del paciente. Para este fin, puede evaluarse en una primera etapa el patrón de expresión del antígeno tumoral y/o del antígeno estromal del paciente, por ejemplo, a través de los diagnósticos complementarios dirigidos al patrón del antígeno tumoral y/o estromal específico del paciente. Dependiendo del patrón de expresión del antígeno tumoral y/o estromal del paciente, VXM06 puede administrarse en solitario o en combinación con una o más vacunas contra el cáncer basadas en Salmonella typhi Ty21a que comprenden sistemas de expresión eucariotas. Sin embargo, las combinaciones de VXM06 con una o más vacunas adicionales contra el cáncer basadas en Salmonella typhi Ty21a, se pueden administrar también como combinaciones fijas. Estas mezclas que combinan dos o más vacunas contra el cáncer basadas en Salmonella typhi Ty21a pueden consistir en productos disponibles en el mercado. Las combinaciones, ya sean fijas o individualizadas, pueden contener VXM01 como terapia de base anti-angiogénica.

Breve descripción de las tablas y figuras

Figura 1: Secuencia de aminoácidos de WT1 humano truncado codificada por ADNc de WT1 contenida en el plásmido pVAX10.hWT1

Figura 2: Secuencia de ácido nucleico de pVAX10.hWT1

Figura 3: Mapa del plásmido de pVAX10.hWT1

Figura 4: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones portadores de leucemia FBL-3 tratados con VXM0m_vacío, VXM06m y VXM06

Figura 5: Supervivencia media de ratones portadores de leucemia FBL-3 tratados con VXM0m_vacío, VXM06m y VXM06

Tabla 1: Síntesis de genes *in vitro*: reacción de fosforilación

Tabla 2: Síntesis de genes *in vitro*: amplificación del producto de ligación - perfil de PCR

Tabla 3: Composiciones de las vacunas

Tabla 4: Evaluación de la actividad antitumoral - diseño experimental

Tabla 5: Supervivencia de ratones portadores de leucemia FBL-3 tratados con VXM0m_vacío, VXM06m y VXM06

Tabla 6: Número de animales muertos después del desafío tumoral a lo largo del tiempo

Tabla 7: Supervivencia promedio de ratones portadores de leucemia FBL-3 tratados con VXM0m_vacío, VXM06m y VXM06

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de plásmidos recombinantes pVAX10.mWT1 y

5 pVAX10.hWT1

WT1 truncado humano (1116 pb, secuencia WT1 según la secuencia de referencia UniProt P19544-7, truncado por el dominio del dedo de cinc) y WT1 truncado murino (1101 pb, secuencia WT1 según la secuencia de referencia UniProt P22561-5, truncado por el dominio del dedo de zinc) se clonaron en la cadena principal de pVAX10 derivada de pVAX10.VR2-1. Los fragmentos de ADN de WT1 se generaron por síntesis génica de doble cadena, donde los oligonucleótidos se unieron entre sí utilizando una ligasa termoestable.

10

Síntesis y diseño de oligos:

En una primera etapa, la secuencia del gen de WT1 murino truncado y de WT humano truncado se subdividieron en oligonucleótidos individuales de 40 a 50 bases utilizando el programa informático "SeqEditor" (Entelechon). Los oligonucleótidos se entrecruzaron y se correspondieron con las hebras de ADN. Después de la síntesis de los oligonucleótidos de ambas cadenas de ADN, los oligonucleótidos se diluyeron con Tris 10 mM (pH 8,5) hasta una concentración final de 50 pmol/μl.

15

Reacción quinasa:

Los oligonucleótidos sintetizados *in vitro* se fosforilaron a continuación mediante la incubación con polinucleótido quinasa T4 (PNK T4) para permitir la ligación subsiguiente de los oligonucleótidos. Se fosforilaron los oligonucleótidos de avance y retroceso.

20

La preparación de la reacción se resume en la siguiente Tabla 1:

Volumen	Ingrediente
10 μl	Mezcla del cebador
10 μl	Tampón de polinucleótido quinasa T4 (PNK) 10x
10 μl	ATP (25 mM)
68 μl	Agua estéril
2 μl	PNK T4 (10 U/μl)

25

La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 37°C en un baño de agua. A continuación, la polinucleótido quinasa T4 se inactivó mediante una etapa de calentamiento de cinco minutos a 95°C y después se enfrió inmediatamente en hielo hasta el tratamiento posterior.

Se emplearon 12,5 μl de la mezcla de quinasas directamente para la ligación (20 U de ADN ligasa Taq, 35 μl de volumen de reacción (New England Biolabs, M0208S).

30

La etapa de desnaturalización a 95°C se continuó mediante enfriamiento progresivo (1°C/min). Durante este proceso, los oligonucleótidos complementarios se unen a una cadena doble de ADN. El proceso se realizó en un termociclador (Ciclador Personal, Biometra). Por adición de ADN ligasa Taq termoestable, el extremo 5'-PO₄ de los oligonucleótidos se unieron con el extremo 3'-OH libre del siguiente oligonucleótido. Mediante repetidas etapas de desnaturalización y renaturalización, se liberaron oligonucleótidos desemparejados. Al final del programa, la mezcla se enfrió a 4°C.

Amplificación de los productos de ligación por PCR:

35

Se amplificaron 5 μl de los productos de ligación obtenidos (aproximadamente 1,1 kb) por PCR en un volumen de 50 μl con cebadores flanqueantes como se representa en la Tabla 2 siguiente:

nº	etapa	temperatura	tiempo	Nº de ciclos
1	desnaturalización	95°C	5 min	1
2	desnaturalización	95°C	30 s	30x
3	re-asociación	57°C	30 s	
4	elongación	72°C	90 s	
5	extra-elongación	72°C	5 min	1
6	enfriamiento	4°C	∞	1

La mezcla de PCR contenía los siguientes componentes: 0,2 - 0,5 µM de cada cebador, Tris-Cl 20 mM, pH 8,8, KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, MgSO₄ 2 mM, Triton X-10 0,1%, dNTP 25 mM (cada uno), polimerasa Vent_R 2 U.

5 Los fragmentos de ADN sintetizados in vitro (WT1 truncado humano y murino, aproximadamente 1,1 kb cada uno) se clonaron en la cadena principal de pVAX10 mediante *NheI/XhoI* (se reemplazó la región codificante de VEGFR-2 del plásmido recombinante pVAX10.VR2-1 por el WT1 truncado humana o murino). Para el control de calidad, se secuenciaron y alinearon los plásmidos enteros con la secuencia de referencia respectiva después de la transformación en *E. coli*. Ambas secuencias demostraron estar libres de errores. Los plásmidos resultantes se denominaron pVAX10.mWT1 y pVAX10.hWT1.

10 Ejemplo 2: Transformación de cepas de Salmonella atenuada con los plásmidos recombinantes:

Se transformó *S. typhi* Ty21a con el plásmido pVAX10.hWT1. *S. typhimurium* SL7207 (aroA) se transformó con el plásmido pVAX10.mWT1. La transformación se realizó mediante electroporación.

Preparación de células competentes de Salmonella:

15 Se inocularon cultivos de glicerol de *S. typhi* Ty21a y *S. typhimurium* SL7207 en placas LB (peptona de soja [ACF] libre de componente animal). Las placas se incubaron a 37°C durante la noche. Se empleó una colonia de cada una para el precultivo líquido nocturno. Se incubaron 3 ml de medio LB (peptona de soja ACF) inoculados con una colonia cada uno a 37°C y 180 rpm durante la noche. Para preparar células competentes, se inocularon 2 x 300 ml de medio LB (peptona de soja ACF) con 3 ml de cultivo de una noche y se incubaron a 37°C y 180 rpm hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5. Los cultivos se pusieron en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, las bacterias se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 xg a 4°C y cada sedimento se resuspendió en 500 mL de H₂O_{dest} fría con hielo. Después de una nueva etapa de centrifugación, los gránulos bacterianos se lavaron dos veces en glicerol helado al 10%. Ambas paletas se pusieron juntas en 2 ml de glicerol al 10% y finalmente se congelaron en alícuotas de 50 µl en hielo seco. El glicerol empleado no contenía ningún ingrediente animal (Sigma Aldrich, G5150).

Transformación de células competentes de Salmonella:

25 Para cada reacción de transformación, se descongeló una alícuota de 50 µl de células competentes en hielo durante 10 minutos. Después de añadir 3-5 µl de ADN del plásmido (pVAX10.hWT1 para células *S. typhi* Ty21a competentes y pVAX10.mWT1 para células *S. typhimurium* SL7207 competentes) las mezclas se incubaron en hielo durante cinco minutos. Posteriormente, las mezclas se transfirieron a cubetas pre-enfriadas (1 mm de espesor). El impulso eléctrico se llevó a cabo a 12,5 kV/cm. Inmediatamente después, se añadió 1 ml de medio LB (peptona de soja ACF) a las células, las células se transfirieron a un tubo Eppendorf de 2 ml y se agitaron durante 1 hora a 37°C. Después de un corta etapa de centrifugación en una centrifuga de banco (16600 rcf, 20s), el sedimento bacteriano se resuspendió en 200 µl de medio libre de antibiótico LB (peptona de soja ACF). Las mezclas se aplicaron con una espátula Drigalski sobre placas LB (peptona de soja ACF) que contenía kanamicina (concentración = 25 µg/ml o 50 µg/ml). Las placas se incubaron a 37°C durante la noche.

35 Preparación plasmídica de clones recombinantes de Salmonella:

40 Se incubaron tres clones de cada cepa de Salmonella recombinante durante la noche en 3 ml de medio LB (peptona de soja ACF) que contenía kanamicina (50 µg/ml) a 37°C. El cultivo bacteriano luego se sedimentó por centrifugación (16600 rcf, 30 s). El aislamiento del plásmido se realizó utilizando el Kit Plasmídico NucleoSpin de Macherey-Nagel. El ADN plasmídico se eluyó de las columnas de gel de sílice con 50 µl de agua. Se utilizó como control 5 µl del eluido en electroforesis en gel de agarosa.

Para el almacenamiento a largo plazo, se produjeron cultivos de 1 ml de glicerol de los clones positivos. Para este fin, se agregaron 172 µl de glicerol (sin ingredientes de origen animal) a un medio de 828 µl de crecimiento

logarítmico de 3 ml en un microtubo de tornillo de 1 ml bajo. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su posterior uso.

Secuenciación completa del ADN plasmídico recombinante aislado de Salmonella:

5 Se inocularon 3 ml de medio LB-Kan líquido (peptona de soja ACF) con una colonia de Salmonella recombinante (*S. typhi* Ty21a que alberga pVAX10.hWT1 y *S. typhimurium* SL7207 que alberga pVAX10.mWT1) y se incubaron durante la noche a 37°C y 180 rpm. El cultivo de una noche se sedimentó por centrifugación a 1300 rpm durante 30 s en una centrífuga de banco (Biofuge pico, Heraeus). El aislamiento del plásmido se realizó con el Kit Plasmídico NucleoSpin de Macherey-Nagel. Después de la lisis alcalina y de la precipitación del ADN genómico de alto peso molecular y de los componentes celulares, el ADN plasmídico se cargó en columnas con una membrana de sílice. 10 Después de una etapa de lavado, los plásmidos se eluyeron de la columna con 50 µl de agua estéril y se secuenciaron. Las secuencias se compararon con la secuencia de referencia respectiva a través de los alineamientos de los clones específicos, es decir, las secuencias plasmídicas de cada clon de Salmonella se alinearon con la secuencia de referencia. Todas las secuencias están en línea con las respectivas secuencias de referencia. Las cepas de Salmonella recombinante se denominaron VXM06 (*S. typhi* Ty21a que alberga el plásmido pVAX10.hWT1) y VXM06m (*S. typhimurium* SL7207 que alberga el plásmido pVAX10.mWT1). 15

Ejemplo 3: evaluación de la actividad antitumoral de VXM06 y VXM06m en el modelo de ratón de leucemia singénica

Se evaluó la eficacia de VXM06 y VXM06m en un modelo de ratón C57/BL6J de leucemia singénica durante un período de 43 días (con la administración de dosis en días alternos durante 4 ocasiones seguidas de la inoculación de células de leucemia en el día 17). Dos grupos, cada uno compuesto por 10 ratones machos (n=10) recibieron VXM06 (*S. typhi* Ty21a que contiene pVAX10.hWT1 que codifica WT1 humano truncado) o VXM06m (*S. typhimurium* que contiene pVAX10.mWT1 que codifica WT1 murino truncado) a dosis de 10¹⁰ UFC/ocasión. Un grupo de control constituido de manera similar recibió VXM0m_vacio (control del vector de *S. typhimurium* sin plásmido de expresión) a la misma dosis que los grupos tratados. Durante el estudio, se llevaron a cabo investigaciones sobre el peso corporal, la mortalidad y la supervivencia. Antes de este estudio principal, se realizó un estudio piloto durante 14 días en ratones macho C57B16 (n=5 por grupo) sin vacunación utilizando 5,0 x 10⁶ y 3,0 x 10⁷ células FBL-3, después de lo cual se juzgó la primera concentración celular como óptima para el estudio de vacunación principal. 20 25

Vacunas de ADN:

30 Se almacenaron VXM06, VXM06m y el vector vacío de *S. typhimurium* (VXM0m_vacio) sin plásmido de expresión, a ≤ -80°C hasta su uso. Los viales que no se usan en la vacunación no se congelaron de nuevo, sino que se descartaron posteriormente. Las vacunas de ADN bajo investigación se caracterizan en la siguiente Tabla 3:

Elemento de ensayo	Lote	Concentración	Cantidad
VXM0m_vacio	VXM01m-e.1-01/2010	10 ¹¹ UFC/ml	0,7 ml/vial (10 viales)
VXM06m	VXM06m-031.1-01/2012	10 ¹¹ UFC/ml	0,7 ml/vial (10 viales)
VXM06	VXM06-031.1-01/2012	10 ¹¹ UFC/ml	0,7 ml/vial (10 viales)

Vía de administración del fármaco:

35 Se aplicaron 100 µl de VXM0m_vacio, VXM06m y VXM06 por animal y aplicación. Después de descongelar los elementos de ensayo, la aplicación se realizó dentro de los 30 min. Todas las sustancias de ensayo se administraron por sonda oral (por vía oral, P.O) a través de una cánula con un volumen de inyección de 100 µl/ratón.

Independientemente de los grupos de animales, cada animal recibió un tampón de aplicación antes de la dosis para neutralizar el medio ácido en el estómago antes de la dosis (100 µg/animal/aplicación para todos los grupos de dosis). Este tampón contenía 2,6 g de hidrogenocarbonato de sodio, 1,7 g de ácido L-ascórbico, 0,2 g de lactosa monohidratada y 100 ml de agua potable. Las aplicaciones previas a la dosis se realizaron hasta 30 minutos antes de la aplicación de los elementos de ensayo. 40

Cultivo de células:

Las células FBL-3 de leucemia de ratón que sobreexpresan WT1 requerían pases para asegurar la viabilidad y alcanzar la cantidad requerida de células.

Se recogieron las células tumorales que crecían exponencialmente, se mezclaron con azul de tripano (a la dilución recomendada 1:1) para la determinación de la viabilidad, y se contaron manualmente empleando una cámara de recuento bajo un microscopio óptico. Las células FBL-3 se lavaron y resuspendieron en medio RPMI libre de suero para las inyecciones en ratones C57BU6.

5 Vacunación e inoculación de células tumorales:

Condiciones de inyección celular para inyección intraperitoneal (I.P.): viabilidad celular $\geq 97\%$; $5,0 \times 10^6$ células/500 μ l/ratón.

Se numeraron los animales (30 ratones C57BL/6, 4-6 semanas, macho, ≈ 20 g cada uno, Charles River, Francia), con una marca única de identificación en la oreja de los animales; el peso corporal se midió dos veces por semana.

10 Se vacunaron diez ratones cada uno ($n = 10$ machos) con VXM0m_vacío, VXM06m y VMX06. La vacunación se llevó a cabo mediante sonda oral de 10^{10} UFC/aplicación los días 1, 3, 5 y 7. En el día 17, las células tumorales FBL-3 se inocularon en ratones mediante vía I.P. El diseño experimental se resume en la siguiente Tabla 4:

Grupo	Animales	Células tumorales	Tratamiento	Dosis (UFC/adm)	Vía de administración	Programa de tratamiento
1	10	5×10^6	VXM0m_vacío	10^{10} (en 100 μ l)	PO	Q2Dx4 (D1, D3, D5, D7)
2	10	5×10^6	VXM06m	10^{10} (en 100 μ l)	PO	Q2Dx4 (D1, D3, D5, D7)
3	10	5×10^6	VXM96	10^{10} (en 100 μ l)	PO	Q2Dx4 (D1, D3, D5, D7)

Resultados:

15 En la siguiente Tabla 5 se enumeran los datos de supervivencia para los tres grupos de tratamiento:

Día	Grupo 1; VXM0m_vacío	Grupo 2; VXM06m	Grupo 3; VMX06
	Supervivencia	Supervivencia	Supervivencia
-3	10	10	10
1	10	10	10
5	9	9	10
7	9	9	10
12	9	9	10
15	9	9	10
19	9	8	10
22	9	8	10
26	9	8	10
29	5	7	9
33	0	4	4
36	0	1	3
40	0	1	1
43	0	0	0

ES 2 675 020 T3

Se realizó un examen clínico diario de todos los animales: comportamiento, signos de sufrimiento (caquexia, devenir y dificultades para moverse o alimentarse).

El número de animales muertos después de la exposición tumoral se enumera en la siguiente Tabla 6:

Tiempo	Supervivencia	Muertes	Tratamiento
1	9	0	VXM0m_vacío
12	6	3	VXM0m_vacío
15	2	4	VXM0m_vacío
16	0	2	VXM0m_vacío
1	8	0	VXM06m
12	7	1	VXM06m
14	6	1	VXM06m
16	4	2	VXM06m
19	1	3	VXM06m
26	0	1	VXM06m
1	10	0	VXM06
12	9	1	VXM06
14	8	1	VXM06
15	6	2	VXM06
16	4	2	VXM06
19	3	1	VXM06
v21	2	1	VXM06
22	1	1	VXM06
26	0	1	VXM06

5 La Figura 4 representa las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones que portan leucemia FBL-3 tratada con VXM0m_vacío, VXM06m y VXM06. Los ratones tratados con VXM06m y VXM06 sobrevivieron más tiempo en comparación con los ratones de control (hasta 26 días). Alrededor del 40% de los ratones que recibieron VXM06m y VXM06 sobrevivieron más que los tratados con VXM0m_vacío. La mediana y la mediana de supervivencia de los tres grupos de ensayo se

10 representan en la siguiente Tabla 7:

Ratones	VXM0m_vacío 9	VXM06m 8	VXM06 10
	Tiempo de supervivencia		
1	12	12	12
2	12	14	14
3	12	16	15
4	15	16	15
5	15	19	16
6	15	19	16

7	15	19	19
8	16	26	21
9	16		22
10			26
Mediana	15	17,5	16
Media	14,2	17,6	17,6
SD	1,6	4,0	4,1
SEM	0,5	1,4	1,3
Var.	2,6	15,7	16,6

La Figura 5 representa la supervivencia media de los ratones portadores de leucemia FBL-3 tratados con VXM0m_vacío, VXM06m y VXM06. Los ratones tratados con VXM06m y VXM06 sobrevivieron más tiempo en comparación con los ratones control.

- 5 Este estudio demostró la eficacia de los constructos VXM06 y VXM06m para dirigirse a células de leucemia que sobreexpresan WT1 en un modelo de ratón. Los ratones de control tratados con el vector vacío sobrevivieron durante hasta 16 días después de la exposición a células tumorales (véase la figura 4). Por el contrario, los ratones tratados con VXM06m o con VXM06 mostraron una supervivencia prolongada en comparación con los ratones vacunados con el vector de control VXM0m_vacío (hasta 26 días para ambos elementos de ensayo).
- 10 Aproximadamente el 40% de los ratones que recibieron VXM06m o VXM06 sobrevivieron más tiempo que aquellos en el grupo de control tratados con VXM0m_vacío.

15 En resumen, VXM06m y VXM06 mostraron un efecto farmacodinámico sobre la supervivencia de los animales de ensayo en este modelo de ratón C57B16 de leucemia singénica. Se observó un efecto farmacodinámico similar de los dos compuestos VXM06m y VXM06 en comparación con el vector vacío. Estos resultados muestran que estas vacunas fueron capaces de desencadenar una respuesta contra WT1 en un modelo de leucemia de ratón inmunocompetente que da como resultado una mayor supervivencia de los animales en comparación con los animales tratados con el vector vacío.

Lista de secuencias

- <110> Vaximm AG
- 20 <120> Nueva vacuna de ADN dirigida a la inmunoterapia contra el cáncer
- <130> 109579P855PC
- <140>
- <141> 2014-04-24
- <160> 2
- 25 <170> Patentin versión 3.5
- <210> 1
- <211> 371
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 30 <400> 1

ES 2 675 020 T3

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
1 5 10 15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
20 25 30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
35 40 45

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro
50 55 60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
65 70 75 80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
85 90 95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
100 105 110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
115 120 125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
130 135 140

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
145 150 155 160

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
165 170 175

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
180 185 190

ES 2 675 020 T3

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205
 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
 245 250 255
 Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
 260 265 270
 Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
 275 280 285
 His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
 290 295 300
 Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
 305 310 315 320
 Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 325 330 335
 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 340 345 350
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 355 360 365
 Gln Leu Lys
 370

<210> 2

<211> 4616

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico del plásmido pVAX10.hWT1

<400> 2

ES 2 675 020 T3

tgggcttttg ctggcctttt gtcacatgt tcttgactct tcgcatgta cgggccagat	60
atacgcgttg acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag	120
ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaattggc ccgcctggct	180
gaccgcccaa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc	240
caatagggac tttcattga cgtcaatggg tggactatth acggtaaact gcccacttgg	300

ES 2 675 020 T3

cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat 360
 ggcccccttg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttctact tggcagtaca 420
 tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcgggt ttggcagtac atcaatgggc 480
 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga 540
 gtttgttttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat 600
 tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggaggctta tataagcaga gctctctggc 660
 taactagaga acccactgct tactggctta tcgaaattaa tacgactcac tatagggaga 720
 cccaagctgg ctagcatgga cttctcttgg ctgcaggacc cggcttccac gtgtgtcccg 780
 gagccggcgt ctacgacac gctccgctcc gggcctgggt gcctacagca gccagagcag 840
 cagggagtcc gggacccggg cggcatctgg gccaaagttag gcgccgccga ggccagcgt 900
 gaacgtctcc agggccggag gagccgcggg gcgtccgggt ctgagccgca gcaaatgggc 960
 tccgacgtgc gggacctgaa cgcgctgctg cccgccgtcc cctccctggg tggcggcggc 1020
 ggctgtgccc tgcctgtgag cggcgcggcg cagtgggcgc cgggtctgga ctttgcgcc 1080
 ccgggcgctt cggcttacgg gtcggtgggc ggccccgcgc cgcaccggc tccgcgccca 1140
 cccccgccgc cgcgcctca ctcttctatc aaacaggagc cgagctgggg cggcgcggag 1200
 ccgacagagg agcagtgcct gagcgccttc actgtccact ttccggcca gttactggc 1260
 acagccggag cctgtcgcta cgggcccttc ggtcctctc cgcagcca ggcgtcatcc 1320
 ggccaggcca ggatgtttcc taacgcgccc tacctgccc gctgcctgga gagccagccc 1380
 gctattcgca atcagggtta cagcacggtc accttcgacg ggacgcccag ctacggtcac 1440
 acgccctgc accatgcggc gcagttcccc aaccactcat tcaagcatga ggatcccatg 1500
 ggccagcagg gctcgctggg tgagcagcag tactcgggtc cgcggcggt ctatggctgc 1560
 cacacccca cgcagagctg caccggcagc caggctttgc tgcagggac gccctacagc 1620
 agtgacaatt tataccaaat gacatcccag cttgaatgca tgacctggaa tcagatgaac 1680
 ttaggagcca ccttaaaggg agttgctgct gggagctcca gctcagtga atggacagaa 1740
 gggcagagca accacagcac agggtagcag agcgataacc acacaacgcc catcctctgc 1800
 ggagcccaat acagaataca cagcacggt gtcttcagag gcattcagt actcagctct 1860
 agagggcccg tttaaaccg ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct 1920
 gttgtttgcc cctccccctg gccttctctg accctggaag gtgccactcc cactgtcctt 1980
 tcctaataaa atgaggaaat tgcacgcat tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg 2040
 ggtggggtgg ggcaggacag caagggggag gattgggaag acaatagcag gcatgctggg 2100
 gatgcggtgg gctctatggc ttctactggg cggttttatg gacagcaagc gaaccggaat 2160
 tgccagctgg ggcgccctct ggtaagggtg ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt 2220
 tctcggccc aaggatctga tggcgcagg gatcaagctc tgatcaagag acaggatgag 2280
 gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg 2340

ES 2 675 020 T3

agaggctatt	cggctatgac	tgggcacaac	agacaatcgg	ctgctctgat	gccgccgtgt	2400
tccggctgtc	agcgcagggg	cgcccgggtc	tttttgtaa	gaccgacctg	tccggtgccc	2460
tgaatgaact	gcaagacgag	gcagcgcggc	tatcgtggct	ggccacgacg	ggcgttcctt	2520
gcgcagctgt	gctcgacgtt	gtcactgaag	cgggaagggg	ctggctgcta	ttgggcgaag	2580
tgccggggca	ggatctcctg	tcatctcacc	ttgctcctgc	cgagaaagta	tccatcatgg	2640
ctgatgcaat	gcggcggctg	catacgcttg	atccggctac	ctgcccattc	gaccaccaag	2700
cgaaacatcg	catcgagcga	gcacgtactc	ggatggaagc	cggctctgtc	gatcaggatg	2760
atctggacga	agagcatcag	gggctcgcgc	cagccgaact	gttcgccagg	ctcaaggcga	2820
gcatgcccga	cggcgaggat	ctcgtcgtga	cccatggcga	tgctgcttg	ccgaatatca	2880
tggtggaaaa	tggccgcttt	tctggattca	tcgactgtgg	ccggctgggt	gtggcggacc	2940
gctatcagga	catagcgttg	gtacccctg	atattgctga	agagcttggc	ggcgaatggg	3000
ctgaccgctt	cctcgtgctt	tacggtatcg	ccgctcccga	ttcgcagcgc	atcgccttct	3060
atcgccttct	tgacgagttc	ttctgaatta	ttaacgctta	caatttcctg	atgcggtatt	3120
ttctccttac	gcatctgtgc	ggtatttcac	accgcataca	ggtggcactt	ttcggggaaa	3180
tgtgcgcgga	accctatatt	gtttatTTTT	ctaaatacat	tcaaataatg	atccgctcat	3240
gagacaataa	ccctgataaa	tgcttcaata	atagcacgtg	ctaaaacttc	atTTTTaatt	3300
taaaaggatc	taggtgaaga	tcctTTTTga	taatctcatg	acaaaaatcc	cttaacgtga	3360
gttttcgttc	actgagcgt	cagaccccca	tcagtacca	aacaggaaaa	aaccgccctt	3420
aacatggccc	gctttatcag	aagccagaca	ttaacgcttc	tggagaaact	caacgagctg	3480
gacgcggatg	aacaggcaga	catctgtgaa	tcgcttcacg	accacgctga	tgagctttac	3540
cgcagctgcc	tcgcgcgttt	cggatgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccg	3600
gagacggca	cagcttgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagcccg	tcagggcgcg	3660
tcagcgggtg	ttggcgggtg	tcggggcgca	gccatgacct	agtcacgtag	cgatagcgga	3720
gtgtatactg	gcttaactat	gcggcatcag	agcagattgt	actgagagtg	caccatatgc	3780
ggtgtgaaat	accgcacaga	tgcgtaagga	gaaaataacc	catcaggcgc	tcttccgctt	3840
cctcgtcac	tgactcgtg	cgctcggctg	ttcggctcgc	gcgagcggta	tcagctcact	3900
caaaggcgg	aatacggtta	tccacagaat	caggggataa	cgcaggaaag	aacatgtgag	3960
caaaaggcca	gcaaaaggcc	aggaaccgta	aaaaggccgc	gttgctggcg	ttttccata	4020
ggctccgccc	ccctgacgag	catcacaaaa	atcgacgctc	aagtcagagg	tggcgaacc	4080
cgacaggact	ataaagatac	caggcgtttc	cccctggaag	ctccctcgtg	cgctctcctg	4140
ttccgacct	gccgcttacc	ggatacctgt	ccgcctttct	cccttcggga	agcgtggcgc	4200
ttctcatag	ctcacgctgt	aggtatctca	gttcggtgta	ggtcgttcgc	tccaagctgg	4260
gctgtgtgca	cgaaccccc	gttcagcccg	accgctgcgc	cttatccggt	aactatcgtc	4320
ttgagtccaa	cccggtaaga	cacgacttat	cgccactggc	agcagccact	ggtaacagga	4380

ES 2 675 020 T3

ttagcagagc	gaggtatgta	ggcggtgcta	cagagttcct	gaagtgggtg	cctaactacg	4440
gctacactag	aaggacagta	tttggtatct	gcgctctgct	gaagccagtt	accttcggaa	4500
aaagagttgg	tagctcttga	tccggcaaac	aaaccaccgc	tggtagcggg	ggtttttttg	4560
tttgaagca	gcagattacg	cgcagaaaaa	aaggatctca	agaagatcct	ttgatc	4616

REIVINDICACIONES

1. Una cepa mutante atenuada de Salmonella que comprende al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión eucariota que codifica la proteína tumoral de Wilms (WT1).
- 5 2. La cepa mutante atenuada de Salmonella de la reivindicación 1, en donde la cepa mutante atenuada de Salmonella es de la especie Salmonella enterica, particularmente en donde la cepa mutante atenuada de Salmonella es Salmonella typhi Ty21a.
- 10 3. La cepa mutante atenuada de Salmonella de la reivindicación 1 ó 2, en donde WT1 es WT1 humana, particularmente en donde WT1 está truncada, más particularmente en donde se elimina el dominio del dedo de zinc de WT1, más particularmente en donde la WT1 truncada tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en SEQ ID NO:1.
- 15 4. La cepa mutante atenuada de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la molécula de ADN recombinante comprende el gen de resistencia al antibiótico kanamicina, el ori pMB1, y un casete de expresión eucariota que codifica WT1 humana, particularmente WT1 humana truncada, bajo el control de un promotor de CMV.
- 5 5. La cepa mutante atenuada de Salmonella de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso como un medicamento.
6. La cepa mutante atenuada de Salmonella para su uso según la reivindicación 5 como una vacuna.
7. La cepa mutante atenuada de Salmonella para su uso según la reivindicación 6 en la inmunoterapia contra el cáncer.
- 20 8. La cepa mutante atenuada de Salmonella para su uso según la reivindicación 7, en donde la inmunoterapia contra el cáncer comprende además la administración de una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella que comprenden al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión que codifica un antígeno tumoral y/o un antígeno del estroma tumoral, particularmente en donde dicha una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella es/son Salmonella typhi Ty21a que comprende un casete de expresión eucariota, más particularmente en donde dicha una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella comprende o comprenden una cepa mutante atenuada de Salmonella que codifica VEGFR-2 humana, más particularmente en donde dicha una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella comprende o comprenden la cepa mutante atenuada de Salmonella denominada VXM01.
- 25 9. La cepa mutante atenuada de Salmonella para su uso según la reivindicación 8, en donde la cepa mutante atenuada de Salmonella se co-administra con dicha una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella.
- 30 10. La cepa mutante atenuada de Salmonella para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la inmunoterapia contra el cáncer se combina con quimioterapia, radioterapia o terapia biológica contra el cáncer, particularmente en donde la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra antes o durante la quimioterapia o el ciclo de tratamiento de radioterapia o antes o durante la terapia biológica contra el cáncer, o antes y durante la quimioterapia o el ciclo de tratamiento de radioterapia o de la terapia biológica contra el cáncer.
- 35 11. La cepa mutante atenuada de Salmonella para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra por vía oral.
- 40 12. La cepa mutante atenuada de Salmonella para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde el cáncer se selecciona de leucemia, particularmente de leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia linfocítica aguda (LLA), y de tumores sólidos, particularmente de cáncer de pulmón, cáncer de mama, esófago, colon, colorrectal, gástrico, colangiocarcinoma, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, sarcoma sinovial, angiosarcoma, osteosarcoma, cáncer de tiroides, cervical, endometrial, cáncer de ovario, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de próstata.
- 45 13. La cepa mutante atenuada de Salmonella para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en donde la dosis única comprende de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{11} , particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{10} , más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^9 , más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 , lo más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC).

Figura 1:

10 20 30 40 50 60
 MGSDVRLNA LLPAVPSLGG GGGCALPVSG AAQWAPVLD APPGASAYGS LGGPAPPPAP
 70 80 90 100 110 120
 PPPPPPPHS FIKQEPSWGG AEPHEEQCLS AFTVHFSGQF TG TAGACRYG PFGPPPPSQA
 130 140 150 160 170 180
 SSGQARMFPN APYLPSCLES QPAIRNQGYS TVTFDGTPSY GH TPSHAAQ FPNHSFKHED
 190 200 210 220 230 240
 PMGQQGSLGE QQYSVPPPVY GCHTPTDCT GSQALLRTP YSSDNLYQMT SQLECM TWNQ
 250 260 270 280 290 300
 MNLGATLKG V AAGSSSSVKW TEGQSNHSTG YESDNHTTPI LCGAQYRIHT HGVFRGIQDV
 310 320 330 340 350 360
 RRVPGVAPTL VRSASETSEK RPFMCAYPGC NKRYFKLSHL QMHSRKHTGE KPYQCDFKDC
 370
 ERRFSRSDQL K

Figura 2:

TGGGCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTGACTCTTCGCGATGTACGGGCC
 AGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGG
 GGTCAATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAA
 TGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACG
 TATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACT
 ATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC
 GCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTAC
 ATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTAT
 TACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGAC
 TCACGGGGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCA
 CCAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAA
 ATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAA
 CTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGA
 GACCCAAGCTGGCTAGCATGGACTTCTCTTGCTGCAGGACCCGGCTTCCACGTG
 TGTCGCGGAGCCGGCGTCTCAGCACACGCTCCGCTCCGGGCTGGGTGCCTACAG
 CAGCCAGAGCAGCAGGGAGTCCGGGACCCGGGCGGCATCTGGGCCAAGTTAGGC
 GCCGCCGAGGCCAGCGCTGAACGTCTCAGGGCCGGAGGAGCCGCGGGGCGTCC
 GGGTCTGAGCCGACAAATGGGCTCCGACGTGCGGGACCTGAACGCGCTGCTG
 CCCGCCGTCCTTCCCTGGGTGGCGGCGGGCGGCTGTGCCCTGCCTGTGAGCGGCG
 CGGCGCAGTGGGCGCCGGTGTGACTTTGCGCCCCCGGGCGCTTCGGCTTACGG
 GTCGTTGGGCGGCCCGCGCCGCCACCGGCTCCGCCGCCACCCCGCCGCCGCCGCG
 CCTACTCCTTCATCAAACAGGAGCCGAGCTGGGGCGGCGCGGAGCCGCACGAG
 GAGCAGTGCCTGAGCGCCTTCACTGTCCACTTTTCCGGCCAGTTCACTGGCACAG
 CCGGAGCCTGTGCTACGGGCCCTTCGGTCTCTCCGCCAGCCAGGCGTCATC
 CGGCCAGGCCAGGATGTTTCCTAACGCGCCCTACCTGCCAGCTGCCTGGAGAGC
 CAGCCCGCTATTCGCAATCAGGGTTACAGCACGGTACCTTCGACGGGACGCCCA
 GCTACGGTACACGCCCTCGCACCATGCGGCGCAGTTCCCAACCACTCATTCAA
 GCATGAGGATCCCATGGGCCAGCAGGGCTCGCTGGGTGAGCAGCAGTACTCGGT
 GCCGCCCCCGGTCTATGGGTGCCACACCCCCACCGACAGCTGCACCGGCAGCCAG
 GCTTTGCTGCTGAGGACGCCCTACAGCAGTGACAATTTATACCAAATGACATCCC
 AGCTTGAATGCATGACCTGGAATCAGATGAACTTAGGAGCCACCTTAAAGGGAG
 TTGCTGCTGGGAGCTCCAGCTCAGTGAATGGACAGAAGGGCAGAGCAACCACA
 GCACAGGGTACGAGAGCGATAACCACACAACGCCCATCCTCTGCGGAGCCCAAT
 ACAGAATACACACGCACGGTGTCTTCAGAGGCATTCAGTGACTCGAGTCTAGAGG
 GCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTG
 TTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTC
 CTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTAT
 TCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATA
 GCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTACTGGGCGGTTTTATGG
 ACAGCAAGCGAACCAGGAAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAG
 CCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTCTCGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGG
 GATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAG
 ATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGA
 CTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCG
 CAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAAC
 TGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGC
 AGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAA

GTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCA
 TCATGGCTGATGCAATGCGGGCGGTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATT
 CGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGG
 TCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGA
 ACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACC
 CATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGAT
 TCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGC
 TACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCCTCGTG
 CTTTACGGTATCGCCGCTCCCATTCCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGA
 CGAGTTCTTCTGAATTATTAACGCTTACAATTTCTGATGCGGTATTTTCTCCTTAC
 GCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGC
 GCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATG
 AGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATAGCACGTGCTAAAACCTTCATTTT
 AATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCC
 TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCATCAGTGACCAAACAGG
 AAAAAACCGCCCTTAACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCT
 GGAGAACTCAACGAGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCT
 TCACGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGAC
 GGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACACAGCTTGTCTGTAAG
 CGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGT
 GTCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTT
 AACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAA
 ATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTTCCGCTTCT
 CGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCA
 CTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAA
 CATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCT
 GCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCA
 AGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCT
 GGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTC
 CGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATC
 TCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGT
 TCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTA
 AGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCG
 AGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACA
 CTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAA
 AAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTT
 TTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTT
 TGATC

Figura 3:

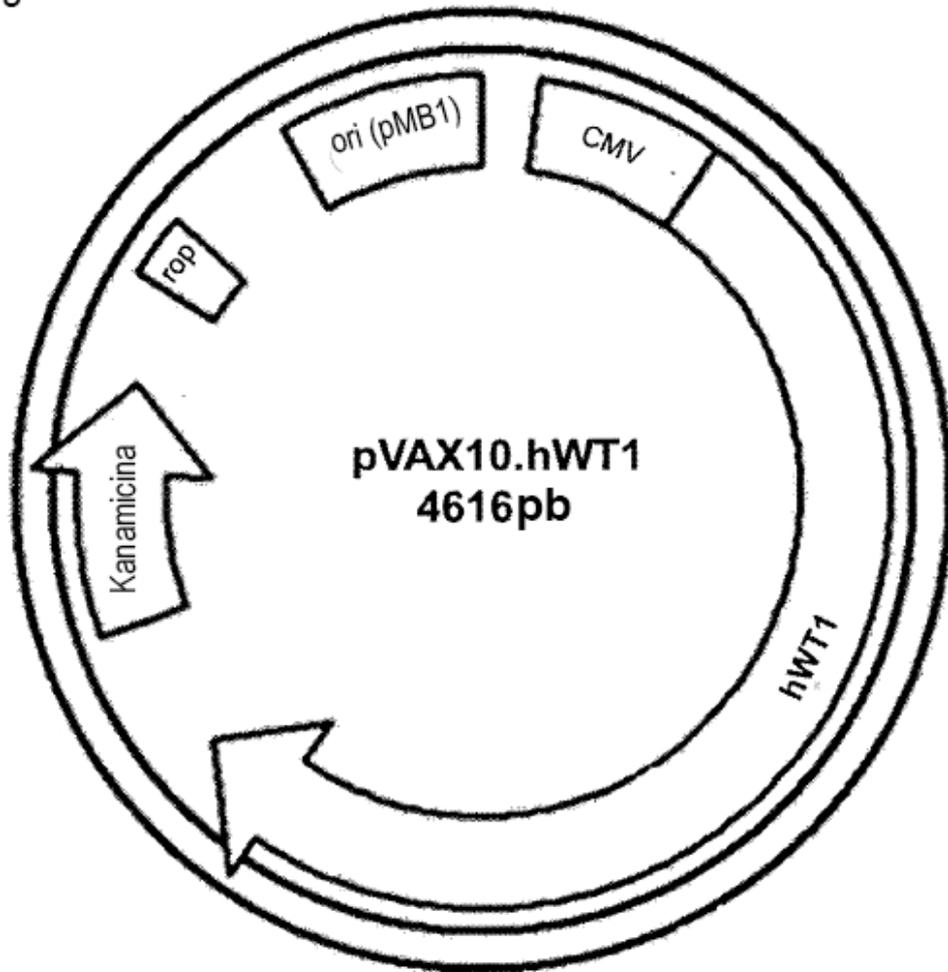


Figura 4:

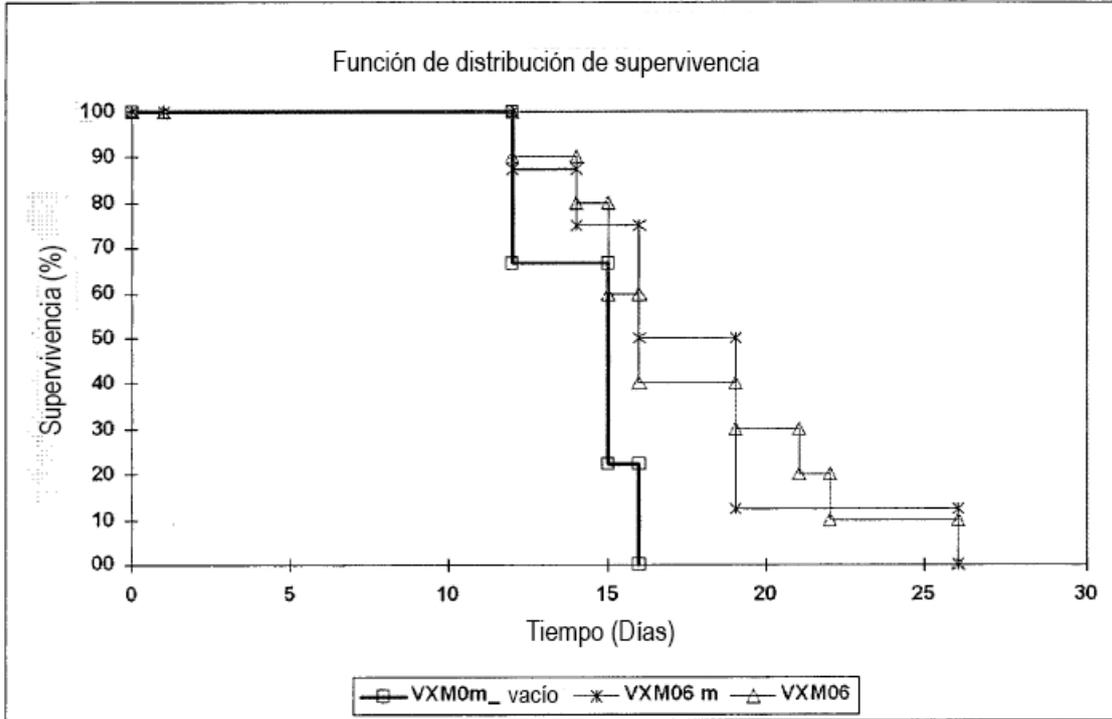


Figura 5:

