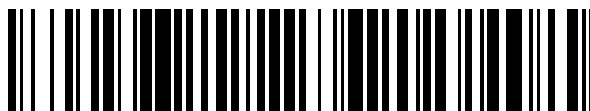


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 412**

51 Int. Cl.:

C12N 15/87 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2014** **PCT/EP2014/073159**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015** **WO15063112**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2014** **E 14790591 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019** **EP 3063280**

54 Título: **Electrotransferencia génica a las células de la piel**

30 Prioridad:

28.10.2013 EP 13190550

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2020

73 Titular/es:

INVECTYS (50.0%)
28 rue du Docteur Roux
75015 Paris, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)

72 Inventor/es:

LANGLADE DEMOYEN, PIERRE;
HUET, THIERRY;
LIARD, CHRISTELLE;
THALMENS, JESSIE;
MIR, LUIS M. y
CALVET, CHRISTOPHE

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 2 753 412 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Electrotransferencia génica a las células de la piel

La presente invención se refiere al campo de la electroporación celular para la transferencia de genes

Antecedentes de la invención

- 5 La electroporación celular, es decir, la permeabilización celular a través del suministro local de pulsos eléctricos (EP), se utiliza cada vez más para el manejo y la prevención de una amplia gama de patologías humanas y animales, incluyendo el cáncer.

La membrana celular delimita dos compartimentos, el citoplasma y el medio extracelular, que presentan diferentes concentraciones de iones, creando así una diferencia en el potencial de membrana. Cuando se aplica un campo eléctrico a las células, se produce un potencial de membrana inducido que se superpone al de reposo (Mir et al., 2005). Por encima de un umbral, se produce una permeabilización transitoria que conduce a un intercambio de moléculas entre el citoplasma y el medio externo. Este fenómeno como consecuencia de la aplicación de EP a las células y que conduce a la pérdida de la permeabilidad de la membrana se denomina electroporación. Esta técnica se ha utilizado durante tres décadas para mejorar la absorción de moléculas no permeables por las células.

Aunque el mecanismo exacto de la electroporación aún está sujeto a debate, esta técnica allanó el camino para muchas aplicaciones biomédicas, en particular para tratamientos contra el cáncer (Breton & Mir, 2011). Una de ellas, llamada electroquimioterapia antitumoral, consiste en acoplar EP directamente aplicados al sitio del tumor con la administración de bleomicina o cisplatino, que no se difunden espontáneamente (o pobremente) a través de la membrana plasmática (Mir et al., 1991; Mir, 2006). Una vez que entran en las células impermeabilizadas, estos dos fármacos generan daños en el DNA y desencadenan la muerte celular. No solo los fármacos, sino también los ácidos nucleicos, que son moléculas no permeables (Satkauskas et al., 2002; Andre & Mir, 2010), se pueden electrot transferir a las células mediante electroporación. El DNA se ha transferido con éxito a diversos tejidos de animales vivos, incluyendo piel, músculo, hígado, tumor, córnea, pulmón, riñón, cerebro, vejiga y testículos (revisado en Andre et al., 2008; Gothelf & Ghel, 2010).

Un uso prometedor del método de electrotransferencia génica se refiere al campo de la vacunación con DNA. De hecho, la vacunación con DNA ha generado una gran emoción desde principios de los 90. Wolff y sus colaboradores lograron primero transferir DNA a los músculos animales. Una vez transfectadas, las moléculas de DNA permitieron que las células objetivo produjeran la proteína codificada (Wolff et al., 1990). Tang et al., demostraron que una proteína codificada por un DNA transferido a las células de la piel mediante un método biolístico podría desencadenar una respuesta inmune (Tang et al., 1992) y Barry et al., mostraron que la vacunación génica con un plásmido que codifica una proteína patógena protegió a los animales frente a un desafío con el patógeno relevante (Barry et al., 1995). Esta tecnología se ha utilizado para una amplia gama de aplicaciones, desde herramientas de laboratorio hasta vacunas veterinarias autorizadas (Anderson et al., 1996) y está en desarrollo para el manejo de diversas patologías adquiridas, tales como el cáncer, malaria, hepatitis B y C o para la prevención de algunas infecciones virales tales como la gripe o el virus de la inmunodeficiencia humana (clinicaltrials.gov) (Bergman et al., 2003).

Finalmente, las vacunas de DNA poseen ventajas de fabricación, accesibilidad y económicas en comparación con otras tecnologías de vacunas (Liu, 2011). A pesar del hecho de que las vacunas de DNA ofrecen una estrategia precisa y flexible para administrar antígenos a las células inmunes y para montar una respuesta inmune específica, al principio hubo problemas para traducir esta técnica de roedores pequeños a animales más grandes y, en definitiva, a pacientes (Rochard et al., 2011). De hecho, se descubrió que las vacunas de DNA son débilmente inmunogénicas debido en parte a la baja absorción celular de moléculas de DNA en el sitio de vacunación. Este problema se ha superado mediante el uso de electrotransferencia génica que mejora drásticamente el rendimiento de las vacunas de DNA (Li et al., 2012; Gothelf & Gehl, 2012).

Sin embargo, para utilizar la electrotransferencia como se esperaba para las estrategias de vacunación, el procedimiento deber realizarse con un procedimiento muy específico. La electrotransferencia es un proceso de varias etapas que se basa en dos diferentes tipos de EP (Andre & Mir, 2010; Satkauskas et al., 2005; Favard et al., 2007). Primero, El DNA debe acercarse al entorno de las células objetivo mediante la inyección en el sitio esperado de vacunación (piel, músculo), después uno o varios pulsos cortos (aproximadamente cien microsegundos) e intensos (aproximadamente mil voltios por centímetro), llamados pulsos de alto voltaje (HV), permeabilizan reversiblemente la membrana celular. Un tiempo de retraso definido después, se aplican uno o varios pulsos largos (aproximadamente varios cientos de milisegundos) y menos intensos (aproximadamente cien voltios por centímetro), llamados pulsos de bajo voltaje (LV). Los pulsos de LV están destinados a conducir electroforéticamente el DNA a través de la matriz extracelular hasta el contacto con la membrana electroporación. En este punto, no existe consenso sobre como las moléculas de ADN atraviesan la membrana plasmática y llegan al núcleo para ser tomadas a cargo por la maquinaria de traducción celular (Escoffre et al., 2009).

Curiosamente, no se detectó ningún efecto secundario grave ni en animales ni en humanos después de la administración de DNA seguido de electrotransferencia (Fioretti et al., 2013). Un estudio informó que después de la administración, una vacuna de DNA se localizó principalmente alrededor del sitio de inyección, sus niveles de detección locales disminuyeron rápidamente con el tiempo, no se internalizó tejido gonadal (muy bajo riesgo de transmisión de la línea germinal) y la probabilidad de integración fue muy baja ya que no se utilizó proteína viral (Dolter et al., 2011). Además, cuando las moléculas de DNA se utilizan para fines de vacunación junto con el método de electrotransferencia génica, no hay problemas de inmunidad previos o posteriores al tratamiento contrarios a los vectores virales, tales como los vectores adenovirales, permitiendo así múltiples administraciones (DNA homólogo de refuerzo primario/DNA o DNA heterólogo de refuerzo primario/vector o DNA/proteína) (Villemejane & Mir, 2009). En consecuencia, la vacunación de DNA combinada con electrotransferencia ha ganado interés en los últimos años.

En lo que respecta a la patología del cáncer, las vacunas de DNA están destinadas a desencadenar una respuesta inmune contra antígenos específicos del tumor o asociados al tumor (Stevenson & Palucka, 2010). De hecho, las células cancerosas engañan al sistema inmune que no siempre puede iniciar de manera eficiente una respuesta inmune debido a múltiples mecanismos complejos tales como la auto-tolerancia (Bei & Scardino, 2010), diversos mecanismos de inmunosupresión que involucran células T reguladoras o células dendríticas supresoras derivadas de mieloides (moDCs) (Lindau et al., 2013), moléculas expresadas en la superficie de células inmunes tales como CTLA-4 (Kolar et al., 2009; Shevach, 2009) y la interacción PD-1/PD-1L (Keir et al., 2008).

El objetivo final de una vacuna eficaz de DNA administrada mediante la tecnología de electrotransferencia debe ser generar el tipo correcto de respuestas inmunes frente al antígeno codificado por el plásmido de interés. Aunque bien descrito para la ruta de administración intramuscular (solicitud de Patente WO 2007/026236) (Mir et al., 2005; Andre & Mir, 2010), se conoce muy poco acerca de los parámetros de electrotransferencia en la piel, con fines de vacunación. La respuesta inmune debe ser lo suficientemente intensa y duradera como para generar efectos terapéuticos positivos en pacientes con una patología específica. Es de destacar que la intensidad de la respuesta inmune depende, al menos parcialmente, del nivel de expresión del antígeno (Lee et al., 1997; Kirman & Seder, 2003), que está estrechamente relacionado con la eficacia de la transferencia génica. En cuanto a la eficiencia de la electrotransferencia génica en la piel, depende de varios parámetros, incluyendo la intensidad de EP y el tipo de electrodos utilizados para administrarlos (Gothelf & Gehl, 2010). Pavsely & Preat (Journal of Controlled Release 106 (2005) pp 407-415) describen que una combinación de un pulso corto de alto voltaje (HV; 700 a 1000 V/cm para una duración de 100 μ s) para permeabilizar las células de la piel seguido por un pulso largo de bajo voltaje (LV; 140 a 200 V/cm para una duración de 400 ms) para transferir DNA mediante electroforesis es un protocolo de electroporación eficiente para mejorar la expresión de DNA de las proteínas informadoras GFP o luciferasa en la piel. También se describió que la piel era un tejido objetivo muy atractivo para la vacunación de DNA.

Breve descripción de la invención

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto. Las realizaciones y/o ejemplos de la siguiente descripción que no están cubiertos por las reivindicaciones adjuntas no se consideran parte de la presente invención.

Los inventores han encontrado que la eficiencia de la electrotransferencia en la piel podría mejorarse utilizando una combinación específica de pulsos de alto voltaje y bajo voltaje.

La presente invención se refiere a métodos para transferir un ácido nucleico *in vivo* a células de la piel en donde el ácido nucleico se inyecta mediante inyección intradérmica (ID) y se transfiere eléctricamente a las células de la piel con un pulso único de alto voltaje, seguido de un pulso único de bajo voltaje.

La invención se refiere a un ácido nucleico que codifica un antígeno tumoral, para su uso en la vacunación antitumoral en un sujeto mediante el montaje de una respuesta inmune celular, en el que el ácido nucleico codifica una proteína de la Transcriptasa Inversa de la Telomerasa (TERT) y se debe administrar mediante inyección intradérmica, y permeabilización eléctrica de células de la piel con:

- un pulso único de intensidad de campo de alto voltaje de 1250 a 1400 V/cm y duración de 10 μ s a 1000 μ s;
- seguido, preferiblemente después de un tiempo de retraso definido, por un pulso único de intensidad de campo de bajo voltaje de entre 100 a 200 V/cm y de duración de entre 300 y 800 ms.

La invención es útil en el campo de la vacunación. De hecho, los tejidos de la piel permiten i) una combinación perfecta entre el sitio de vacunación y la ubicación de las células presentadoras del antígeno (APCs), e ii) una reducción de las dosis antigénicas.

La invención se utiliza en el campo de la vacunación antitumoral. El ácido nucleico codifica un antígeno tumoral eficaz para reducir, prevenir o suprimir un tumor.

Leyendas de las Figuras

La Figura 1 es una representación esquemática del vector de DNA del plásmido INVAC-1. Bases 1-3478: vector NTC8685-eRNA41H-HindIII-XbaI (NTC); Bases 3479-3484: sitio de clonación HindIII (NTC/Invectys); Bases 3485-6967: transgen de la Ubi-Telomerasa (Invectys); Bases 6968-6973: sitio de clonación XbaI (Invectys/NTC); Bases 6974-7120: vector NTC8685-eRNA41H-HindIII-XbaI (NTC).

Las Figuras 2A y 2B son gráficos que muestran que la electrotransferencia es ventajosa para la transferencia génica y la inmunización. (A) Representación de las intensidades de bioluminiscencia en ratones C57BL/6J después de la inyección de pCMV-luc seguida o no de EP, n = 5 ratones para la inyección ID de pCMV-luc sola, n = 10 (de 5 ratones, 2 tratamientos por ratón) para inyección ID de pCMV-luc + EP. (B) Frecuencia de células T CD8 de INF γ + específicas de hTERT detectadas en ratones C57BL/6J vacunados con INVAC-1 seguido o no por EP, n = 6-8 ratones. Las barras representan los valores medios. * = p < 0,05, ** = p < 0,01, ensayo de Mann-Whitney-Wilcoxon.

Las Figuras 3A y 3B son gráficos que muestran la elección de los mejores electrodos. (A) Representación de las intensidades de bioluminiscencia en ratones C57BL/6J después de la electrotransferencia de pCMV-luc utilizando los tres tipos de electrodos, n = 14 ratones para la inyección ID de pCMV-luc sola, n = 8-10 (de 4 a 5 ratones, 2 tratamientos por ratón) para la inyección ID de pCMV-luc + EP. (B) Frecuencia de células T INF γ + CD8 específicas de hTERT detectadas en ratones HLA-B7 vacunados con INVAC-1 utilizando los tres tipos de electrodos, n = 3 ratones para el control de la inmunización con PBS y n = 4-9 ratones para la inmunización mediada por INVAC-1. Las barras representan los valores medios. * = p < 0,05, ** = p < 0,001, ensayo de Kruskal-Wallis con el ensayo de comparación múltiple de Dunn.

La Figura 4 es un conjunto de fotografías que muestran la localización de la expresión del gen de la luciferasa en ratones C57BL/6J después de la inyección ID y la electrotransferencia de pCMV-luc utilizando electrodos de placa.

La Figura 5 es un gráfico que muestra la determinación de la intensidad de pulso de HV óptima en ratones C57BL/6J para la electrotransferencia de pCMV-luc inyectada por vía intradérmica utilizando electrodos de placa, n = 24 ratones para inyección ID de pCMV-luc sola, n = 8 (de 4 ratones, 2 tratamientos por ratón) para inyección ID de pCMV-luc + EP. Las barras representan los valores medios. * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, ensayo de Kruskal-Wallis con el ensayo de comparación múltiple de Dunn.

Las Figuras 6A y 6B son gráficos que muestran la elección de la mejor combinación de pulsos HV-LV en ratones C57BL/6J. (A) Bioluminiscencia obtenida después de la inyección ID de pCMV-luc en varias combinaciones de pulsos de HV-LV, n = 30 ratones para la inyección ID de pCMV-luc sola y n = 6 (de 3 ratones, 2 tratamientos por ratón) para la inyección ID de pCMV-luc + EP. (B) Frecuencia de células T CD8 INF γ + específicas de hTERT detectadas en ratones C57BL/6J vacunados con INVAC-1 según varias combinaciones de pulsos de HV-LV, n = 8 ratones para el control de la inmunización con PBS y n = 5 ratones para la inmunización mediada por INVAC-1. Las barras representan los valores medios. * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, ensayo de Kruskal-Wallis con el ensayo de comparación múltiple de Dunn.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término HV significa alto voltaje, y el término LV significa bajo voltaje.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “piel” denota la piel de un animal, por ejemplo, un humano o un mamífero no humano, tal como un roedor (por ejemplo, un ratón, un conejo o una rata), un perro, un gato o un primate, un caballo, una cabra, un cerdo, una oveja, una vaca, etc. En una realización preferida, el ácido nucleico se transfiere a las células de la dermis. Las células de la piel, a las que se transfiere el ácido nucleico según la invención, son preferiblemente células dendríticas, pero también pueden incluir queratinocitos, melanocitos, fibroblastos o células mieloides o linfoides. El término “ácido nucleico” significa cualquier ácido nucleico de interés, en particular cualquier ácido nucleico capaz de expresar una proteína de interés. El ácido nucleico puede ser DNA o RNA monocatenario o bicatenario (por ejemplo, antisentido o iRNA). Preferiblemente es DNA, preferiblemente DNA bicatenario. En una realización preferida, el ácido nucleico es un vector de expresión del DNA del tipo bien conocido en la técnica. En general, un vector de expresión contiene un promotor operativamente unido a una secuencia de DNA que codifica la proteína de interés.

El término “TERT” se refiere a la “Transcriptasa Inversa de la Telomerasa”, que es la principal determinante de la actividad de la telomerasa, incluyendo la telomerasa de tipo nativo, o variantes de la misma.

El término “inmunogénico” significa que la composición o el constructo al que se refiere es capaz de inducir una respuesta inmune tras la administración. La “respuesta inmune” en un sujeto se refiere al desarrollo de una respuesta inmune innata y adaptativa, que incluye una respuesta inmune humoral, una respuesta inmune celular, o ambas, a un antígeno. Una “respuesta inmune humoral” se refiere a una que está mediada por anticuerpos. Una “respuesta inmune celular” está mediada por linfocitos T. Incluye la producción de citocinas, quimiocinas, y

moléculas similares producidas por células T activadas, glóbulos blancos o ambas. Las respuestas inmunes se pueden determinar mediante inmunoensayos estándar y ensayos de neutralización para la detección de la respuesta inmune humoral, que son conocidas en la técnica. En el contexto de la vacunación contra el cáncer, la respuesta inmune abarca preferiblemente la estimulación o la proliferación de células T CD8 citotóxicas y/o células T CD4 y puede determinarse utilizando inmunoensayos tales como el ensayo ELISpot, el ensayo de citotoxicidad *in vivo* o el ensayo de unión a la secreción de citosinas.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “tratamiento” o “terapia” o “inmunoterapia” se refiere a cualquiera de alivio, mejora y/o eliminación, reducción y/o estabilización (por ejemplo, no progresar a etapas más avanzadas) de un síntoma, así como retraso en la progresión de la enfermedad, o de un síntoma de la misma. Cuando la enfermedad es cáncer, el término incluye, así, el logro de una respuesta inmune antitumoral eficiente observada en pacientes con cáncer.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “prevención” o “prevenir” se refiere al alivio, mejora y/o eliminación, reducción y/o estabilización (por ejemplo, no progresar a etapas más avanzadas) de un pródromo, es decir, cualquier alteración o síntoma temprano (o conjunto de síntomas) que pueden indicar el inicio de una enfermedad antes de que aparezcan síntomas específicos.

El “paciente” o “sujeto” es típicamente un sujeto mamífero, tal como se indicó anteriormente, preferiblemente un sujeto humano, de cualquier edad, sexo o gravedad de la afección.

Parámetros de la electrotransferencia

El ácido nucleico está destinado preferiblemente a ponerse en contacto con las células de la piel antes de aplicar el pulso LV único, y aún más preferiblemente, antes de la aplicación del pulso HV único. El tiempo entre la inyección del ácido nucleico y los pulsos eléctricos, especialmente entre la inyección y el pulso HV único, no es crítico. Típicamente, la composición farmacéutica se ha puesto en contacto con las células de la piel desde unos pocos segundos a 10 minutos, por ejemplo, desde 30 segundos a 5 minutos. Un intervalo de 5 a 10 minutos antes del pulso HV también es aceptable. El ácido nucleico o la composición farmacéutica que contiene el ácido nucleico se pone en contacto con las células de la piel (es decir, las células de la dermis) mediante inyección intradérmica.

Según la invención, el pulso único de alto voltaje tiene preferiblemente una intensidad de campo de entre 1250 y 1400 V/cm.

El pulso único de alto voltaje puede tener una duración de entre 50 y 150 μ s, preferiblemente de 100 μ s.

Según la invención, el pulso único de bajo voltaje tiene preferiblemente una intensidad de campo de entre 100 y 200 V/cm, preferiblemente de 180 V/cm.

El pulso único de bajo voltaje puede tener preferiblemente una duración de entre 350 y 600 ms, más preferiblemente 400 ms.

En una realización preferida, el pulso único de alto voltaje tiene preferiblemente una intensidad de campo de entre 1250 y 1400 V/cm y una duración de entre 50 y 150 μ s, preferiblemente 100 μ s, y el pulso único de bajo voltaje tiene una intensidad de campo de entre 100 y 200 V/cm, preferiblemente de 180 V/cm, y una duración de entre 350 y 600 ms, más preferiblemente 400 ms.

En una realización particular, cuando el sujeto es un sujeto humano, el pulso único de alto voltaje puede tener una intensidad de campo de 1250 V/cm, y preferiblemente una duración de 100 μ s, y el pulso único de bajo voltaje puede tener una intensidad de campo de 180 V/cm, y preferiblemente una duración de 400 ms.

El pulso LV puede ser de la misma polaridad o de una polaridad opuesta que el pulso HV.

Preferiblemente, el pulso LV único es un pulso cuadrado. También puede ser trapezoidal o discontinuo.

El pulso HV único puede ser ventajosamente un pulso cuadrado.

Los pulsos HV y LV se pueden separar por un retraso y este retraso puede estar ventajosamente entre 300 y 3000 ms, preferiblemente entre 500 y 1200 ms, típicamente de 1000 ms.

Además, se describe en la presente memoria el método de electroporación en sí mismo, que comprende colocar electrodos cerca de las células de la dermis que contienen el ácido nucleico intersticialmente, después permeabilizar eléctricamente las células de la dermis de la siguiente manera:

- primero con un pulso único de intensidad de campo de alto voltaje de entre 1250 y 1400 V/cm y de duración de 10 μ s a 1000 μ s.

- segundo, preferiblemente después de un tiempo de retraso definido, con un pulso único de intensidad de campo de bajo voltaje de entre 100 y 200 V/cm y de duración de entre 300 y 800 ms.

El ácido nucleico se transfiere a las células de la dermis como resultado de estos pulsos eléctricos.

Se puede utilizar un generador de voltaje programable.

- 5 Los electrodos que se utilizarán pueden ser electrodos de aguja invasivos (tal como N-30-4B, IGEA), que generalmente pueden consistir en dos filas de cuatro agujas largas, separadas por 4 mm, o electrodos invasivos de dedos (tal como F-05-OR, IGEA) que normalmente pueden consistir en dos filas de tres agujas cortas, separadas por 4 mm, pero son preferiblemente electrodos de placa no invasivos (como P30-8B, IGEA).

Los electrodos deben colocarse en las proximidades del sitio de inyección de manera que el campo eléctrico entre los electrodos pase a través del sitio o región de inyección en el que el líquido inyectado se ha difundido tras la inyección. Se puede utilizar ventajosamente un gel conductor, como lo conoce la persona experta.

- 10 En un aspecto particular, los electrodos pueden ser transportados por un dispositivo que realiza tanto la inyección como la estimulación eléctrica.

Constructos genéticos, composiciones inmunogénicas

- 15 Preferiblemente, el ácido nucleico es un constructo genético que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína de interés, que es TERT, y secuencias reguladoras (tales como un promotor (es), potenciador (es), terminador (es) adecuados, etc.) que permiten la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) del producto proteico en la célula huésped u organismo huésped.

- 20 Los constructos genéticos utilizados en la invención pueden estar típicamente en una forma adecuada para la transformación de la célula huésped u organismo huésped previsto, en una forma adecuada para la integración en el DNA genómico de la célula huésped prevista o en una forma adecuada para la replicación independiente, mantenimiento y/o herencia en la célula u organismo previsto. Por ejemplo, los constructos genéticos utilizados en la invención pueden estar en forma de un vector, tal como por ejemplo un plásmido, cósmido, YAC, un vector viral o transposón. En particular, el vector puede ser un vector de expresión, es decir, un vector que puede proporcionar la transcripción de RNAs y/o la expresión de proteínas *in vivo*, especialmente en células de la dermis.

- 25 En un aspecto preferido pero no limitante, un constructo genético de la descripción comprende i) al menos un ácido nucleico que codifica la proteína de interés; operativamente unido a ii) uno o más elementos reguladores, tal como un promotor y opcionalmente un terminador adecuado; y opcionalmente también iii) uno o más elementos adicionales de los constructos genéticos tales como secuencias 3'- o 5'-UTR, secuencias líderes, marcadores de selección, marcadores de expresión/genes informadores, y/o elementos que pueden facilitar o aumentar (la eficacia de) la transformación o integración.

- 30 Se apreciará que el uso según la invención abarca el caso en el que se utilizan dos o más ácidos nucleicos capaces de expresar *in vivo* diferentes moléculas activas para preparar la composición farmacéutica. Los ácidos nucleicos se eligen para ser complementarios y/o actuar de forma sinérgica en el tratamiento de una afección. En ese caso, las secuencias de nucleótidos que codifican las diferentes moléculas pueden estar bajo el control del mismo promotor o diferentes promotores. Se pueden preparar composiciones que comprenden dicho (s) ácido (s) nucleico (s) o vector
35 (es). Las composiciones son inmunogénicas. Pueden comprender un vehículo o excipientes que son adecuados para la administración en humanos o mamíferos (es decir, no tóxicos). Dichos excipientes incluyen diluyentes líquidos, semisólidos o sólidos que sirven como vehículos farmacéuticos, agentes isotónicos, estabilizantes o cualquier adyuvante.

Vacunación

- 40 El ácido nucleico es útil en vacunación, a través de la expresión de una proteína de interés. En una realización preferida, la proteína de interés tiene una acción inmunoestimulante, más preferiblemente un efecto vacunal. Ventajosamente, se obtiene una respuesta inmune humoral.

- 45 En un aspecto preferido, el ácido nucleico comprende secuencias de ácidos nucleicos capaces de expresarse *in vivo* en las células de la piel transfectadas una o más moléculas terapéuticamente activas, preferiblemente una proteína o proteínas de interés.

Esta molécula activa o proteína de interés puede actuar en la piel por sí misma y/o fuera de la piel en otra ubicación dentro del cuerpo, por ejemplo, en un tumor ubicado en cualquier parte del cuerpo si la molécula expresada está activa como una vacuna antitumoral, o una infección localizada en cualquier parte del cuerpo si la molécula expresada está activa como una vacuna antiinfecciosa.

- 50 Según la infección, la molécula terapéutica de interés es una proteína TERT, útil como una vacuna antitumoral. En un aspecto interesante, como una molécula terapéuticamente activa, el ácido nucleico codifica uno o varios inmunógenos (o péptidos, polipéptidos o proteínas inmunogénicas, incluyendo glicoproteínas) que son capaces de inducir una respuesta inmune en el huésped. En un aspecto, la respuesta inmune es una respuesta inmune

protectora para el huésped. En este aspecto, la descripción se refiere a la producción de una composición inmunogénica o un profiláctico o una vacuna terapéutica, que está dirigida contra el cáncer.

5 En otro aspecto, la respuesta inmune conduce a la producción de anticuerpos, especialmente anticuerpos policlonales, y estos anticuerpos están destinados a recuperarse del suero producido y utilizarse de una manera habitual.

En otro aspecto más, el ácido nucleico codifica un péptido o proteína antigénica que, tras la administración al sujeto, por ejemplo, un ratón, desencadena la producción de anticuerpos específicos.

Tratamiento de tumores

10 En un aspecto particular, se describe un método para prevenir o tratar un tumor o una proliferación de células no deseadas (por ejemplo, una displasia) en un paciente, cuyo método comprende administrar una cantidad efectiva de ácido nucleico o una composición inmunogénica en un paciente que esté en necesidad de ella, utilizando el método de electroporación descrito en la presente memoria. Dicho ácido nucleico o composición inmunogénica se administra en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune en el paciente.

15 El tumor puede ser cualquier proliferación indeseada de células, en particular un tumor benigno o un tumor maligno, especialmente un cáncer.

El cáncer puede estar en cualquier etapa de desarrollo, incluyendo la etapa metastásica.

20 De este modo, el ácido nucleico expresa preferiblemente una o varias moléculas activas seleccionadas de modo que la composición farmacéutica sea eficiente en la reducción, supresión o regresión de angiogénesis tumoral, o reduzca o suprima el crecimiento tumoral, o inhiba la metástasis. Según la invención, se puede utilizar un ácido nucleico que codifica un antígeno tumoral que es el TERT.

En una realización particular, el tumor es un cáncer sólido, un sarcoma o un carcinoma. En particular el tumor se puede seleccionar del grupo que consiste en melanoma, tumor cerebral tal como glioblastoma, neuroblastoma y astrocitoma y carcinomas de vejiga, mama, cuello uterino, colon, pulmón, especialmente cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), páncreas, próstata, cáncer de cabeza y cuello, o cáncer de estómago.

25 En otra realización, el tumor puede ser un tumor líquido, por ejemplo, un tumor hematopoyético, linfoma o leucemia, tales como una leucemia linfocítica, leucemia mieloide, linfoma incluyendo la enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, mieloma maligno.

30 Si bien se entenderá que la cantidad de material necesaria dependerá de la inmunogenicidad de cada constructo individual y no se puede predecir *a priori*, el proceso de determinar la dosis apropiada para cualquier constructo dado es sencillo. Específicamente, se administra una serie de dosis de tamaño creciente, comenzando en aproximadamente 5 a 30 µg, o preferiblemente 20-25 µg, hasta aproximadamente 500-1000 µg por ejemplo, a las especies correspondientes y se observa la respuesta inmune resultante, por ejemplo, detectando la respuesta inmune celular mediante un ensayo ELISpot de IFNγ (como se describe en la sección experimental), detectando respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) utilizando un ensayo de lisis *in vivo*, un ensayo de liberación de cromo o
35 detectando una respuesta TH (célula T auxiliar) utilizando un ensayo de liberación de citocinas.

40 En una realización preferida, el régimen de vacunación comprende de una a tres inyecciones, preferiblemente repetidas tres o cuatro semanas después. En una realización particular, el programa de vacunación puede estar compuesto por una o dos inyecciones seguidas tres o cuatro semanas después por al menos un ciclo de tres a cinco inyecciones. En otra realización, una dosis de cebador consiste en una a tres inyecciones, seguidas de al menos una dosis de refuerzo cada año, o cada dos o años, por ejemplo. Estos son solo ejemplos, y cualquier otro régimen de vacunación está incluido en la presente memoria.

La presente invención se describe con más detalle con la presentación de los siguientes experimentos no limitantes.

Ejemplos: procedimiento de electrotransferencia génica para vacunación antitumoral

45 En el presente estudio, se ha optimizado un procedimiento de electrotransferencia génica en la dermis con fines de vacunación contra el antígeno tumoral de la telomerasa. En una primera evaluación, el gen indicador de luciferasa se utilizó para evaluar la eficiencia de la electrotransferencia génica en la dermis como una función de los parámetros utilizados. En una segunda vez, estos parámetros se ensayaron para su eficacia para inmunizar ratones contra epítomos de telomerasa. Se utilizaron diferentes tipos de electrodos, no invasivos o invasivos, así como un rango de diversos campos eléctricos aplicados.

50 Se evaluaron dos lecturas importantes, que primero fueron la intensidad de la expresión de luciferasa en el sitio de la electrotransferencia y, en segundo lugar, la intensidad de las células T CD8 positivas para interferón γ (IFNγ) específicas de la vacuna, que es el tipo de respuesta inmune esperada para las vacunas anticancerígenas (Vesely

et al., 2011). Se investigaron tres factores principales de electrotransferencia: los tipos de electrodos y el impacto de los pulsos HV y LV.

Materiales y métodos

Ratones

- 5 Los ratones HLA-B7 son ratones transgénicos que expresan la molécula HLA-B*0702 de clase I. Son eliminados para las moléculas de ratón de clase I H2D^b y H2K^b. Fueron descritos previamente por Rohrlisch et al., 2003, y se obtuvieron de la cría interna de The Pasteur Institute. Se compraron ratones hembra C57BL/6J (6-8 semanas de edad) en los laboratorios Janvier (Saint-Berthevin, France) o Harlan (Gannat, France).
- 10 Los animales fueron alojados en instalaciones específicas para animales libres de patógenos del Pasteur Institute o Gustave Roussy Institute. Todos los experimentos con animales se realizaron en estricto cumplimiento de las directrices éticas emitidas por el Comité Europeo (Directiva 2010/63/EU) y los animales se manejaron en estricta conformidad con las buenas prácticas de animales.

Plásmidos

- 15 pCMV-luc (PF461, Plasmid Factory, Bielefeld, Germany) es un DNA plasmídico bicatenario de 6233 pares de bases que codifica el gen informador de luciferasa colocado bajo el control del promotor del citomegalovirus (pCMV).
- 20 INVAC-1 es un DNA plasmídico bicatenario de 7120 pares de bases que codifica una secuencia modificada de la proteína telomerasa fusionada con la secuencia de la proteína ubiquitina. La proteína telomerasa codificada es enzimáticamente inactiva, pero aún puede inducir respuestas inmunitarias contra los epítomos de la telomerasa *in vivo*. El inserto de ubiquitina-telomerasa se clona en el vector de expresión NTC8685-ERNA41H-HindIII-XbaI diseñado por Nature Technology Corporation (Lincoln, Nebraska.). La presencia de la ubiquitina aumenta el direccionamiento de la proteína de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) al proteasoma y aumenta la vía de presentación MHC de clase I de los péptidos derivados de TERT (Rodriguez et al., 1997; Wang et al., 2012). La secuencia de DNA que codifica la proteína TERT se eliminó de 47 aminoácidos en la región N-terminal, que incluye la señal de localización nucleolar. Además, se eliminaron 3 aminoácidos dentro del sitio catalítico de TERT (VDD)
- 25 para abolir la actividad enzimática de la proteína. El plásmido INVAC-1 se almacenó a -20°C, en solución salina tamponada con fosfato (PBS), a una concentración de 2 mg/mL antes del uso. La Figura 1 representa el mapa del plásmido INVAC-1.

Generador de EP y electrodos

- 30 La electrotransferencia génica se realizó utilizando el Cliniporator® (IGEA, Carpi, Italia) que suministra pulsos HV y pulsos LV. Los voltajes se establecieron según la distancia entre las dos filas de los electrodos. Se utilizaron diferentes tipos de electrodos: (1) electrodos de aguja invasivos (N-30-4B, IGEA) que consisten en 2 filas de 4 agujas largas, separadas por 4 mm, (2) electrodos de dedo invasivos (F-05-OR, IGEA) que consisten en 2 filas de 3 agujas cortas, separadas por 4 mm, (3) electrodos de placa no invasivos (P30-8B, IGEA) que consisten en 2 placas metálicas, de 1 mm de espesor y separadas 5 mm.

35 Electrotransferencia génica *in vivo*

- Los ratones se anestesiaron antes de las inyecciones intradérmicas (ID), ya sea con anestesia con gas de mezcla de isoflurano/oxígeno al 2% (Abbot, Suresnes, France) o con una solución de mezcla (vía intraperitoneal) de xilacina al 2% (Rompun, Bayer Santé, Loos, France) y 8% de ketamina (Imalgen 1000, Merial, Lyon, France) en PBS según el peso individual del animal. La inyección ID se realizó en la parte inferior del costado (inyecciones bilaterales) con agujas específicas de insulina 29 G después del afeitado. Cada animal, ya sea de la cepa de ratón HLA-B7 o C57BL/6J, recibió una dosis única de DNA, correspondiente a 100 µg de plásmido INVAC-1 (50 µg en 25 µL de PBS por costado) o 10 µg de plásmido pCMV-luc (5 µg en 25 µL de PBS por costado).

- 40 Inmediatamente después de la inyección ID, se llevó a cabo la electrotransferencia génica utilizando un pulso HV (100 µs de duración) seguido 1000 ms después por un pulso LV (400 ms de duración). Los electrodos se colocaron de tal manera que rodearan la ampolla formada por la inyección del plásmido. Ambos electrodos de dedo o aguja se presionaron durante aproximadamente 5 mm en la piel. Se utilizó gel conductor (Labo FH, gel de contact bleu, NM Médical, France) para los electrodos de placa con el fin de mejorar el contacto entre las placas metálicas y la piel.

Imágenes de bioluminiscencia *in vivo* y localización por electrotransferencia

- 50 Dos días después de la electrotransferencia de pCMV-luc, se inyectó intraperitonealmente a ratones C57BL/6J con 0,15 mg de luciferina de escarabajo (Promega, Lyon, France) por gramo de masa corporal. Veinte minutos después de la inyección, los animales se anestesiaron utilizando una mezcla de gas de anestesia de isoflurano/oxígeno al 2% y se detectó la reacción bioquímica luminiscente impulsada por la luciferasa utilizando el sistema de imagen *in vivo* Imaging System IVIS 50 (Xenogen, Waltham, EE.UU.). Para validar la electrotransferencia génica en la piel, se sacrificaron 3 ratones por dislocación cervical 20 minutos después de la inyección de luciferina y se retiró el área de

la piel electroporabilizada de los animales. Las intensidades de bioluminiscencia se evaluaron en el colgajo de piel y en los músculos subyacentes.

Preparación de esplenocitos

- 5 Catorce días después de la inyección ID de INVAC-1 y electrotransferencia, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se recuperaron los bazo. En condiciones estériles, cada bazo se presionó a través de una malla de nylon de 70 µm (filtro celular, BD Falcon Franklin Lakes, EE. UU.) y se lavó con medio de cultivo RPMI completo (medio Roswell Park Memorial Institute suplementado con suero de ternera fetal inactivado por calor al 10% (FCS), 1% de piruvato de sodio, 1% de penicilina-estreptomina y 0,1% de β-mercaptoetanol). Todos los componentes fueron adquiridos de Life Technologies SAS (Saint-Aubin, France). Los esplenocitos se purificaron en un gradiente de Ficoll (medio de separación de linfocitos, Eurobio, Courtaboeuf, France), se lavaron y se contaron utilizando el contador Cellometer® Auto T4 Plus (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) y se ajustaron a 2 millones de células/mL en RPMI completo antes de utilizarse en el ensayo ELISpot de IFNγ.

Péptidos restringidos HLA-B7 y H2

- 15 Los péptidos TERT humanos (hTERT) restringidos a la molécula HLA-B*0702 de clase I se han descrito previamente (Adotevi et al., 2006; Cortez-Gonzalez et al., 2006). Se predijeron otros péptidos mediante la predicción de epítomos *in-silico* para unir los ratones MHC de clase I, H2K^b, H2D^b utilizando cuatro algoritmos disponibles online: Syfpeithi (<http://www.syfpeithi.de/>), Bimas (<http://www.bimas.cit.nih.gov/>), NetMHCpan y SMM (<http://tools.immuneepitope.org/main/>). Todos los péptidos sintéticos se compraron liofilizados (>90% de pureza) de Proimmune (Oxford, UK). Los péptidos liofilizados se disolvieron en agua estéril a 2 mg/mL y se almacenaron en alícuotas de 35 µL a -20°C antes de su uso. Los detalles de las secuencias de péptidos según la restricción de B7 o H2 se muestran a continuación:

péptidos hTERT restringidos en H2:

- H2D^b: RPIVNMDYV (p660)
- H2K^b: HAQCPYGVV (p429)

25 péptidos hTERT restringidos en HLA-B7:

- HLA-B7: RPSLTGARRL (p351)
- HLA-B7: RPAAEATSL (p277)
- HLA-B7: LPSDFKTIL (p1123)

Ensayo ELISpot de IFNγ

- 30 Brevemente, las microplacas de fluoruro de polivinilidina (conjunto de ELISpot de IFNγ, 10 x 96 ensayos, Diaclone, Eurobio) se recubrieron durante la noche con anticuerpo de captura (IFNγ anti-ratón) y se bloquearon con leche de PBS al 2% estéril durante 2 horas. Las placas de ELISpot se lavaron y las suspensiones de esplenocitos se colocaron en placas por triplicado a 2 x 10⁵ células/pocillo. Las células fueron estimuladas después con 5 µg/ml de péptidos relevantes H2 o B7 o con 10 µg/ml de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA)-ionomicina o se realizó un simulacro de estimulación con medio de cultivo sin suero. Las placas se incubaron a 37°C, 5% de CO₂. Después de 35 19 horas, se revelaron manchas con un anticuerpo de detección de IFNγ conjugado con biotina seguido de estreptavidina-fosfatasa alcalina y una solución de sustrato de la sal de p-toluidina 5-bromo-4-cloro-3'-indolifosfato/cloruro de nitrógeno tetrazolio azul (BCIP/NBT). Los puntos se contaron utilizando el contador y el software Immunospot ELISpot (Cellular Technology Limited, Bonn, Germany).

40 Análisis estadístico y manejo de datos

El software Prism-5 se utilizó para el manejo de datos, análisis y representaciones gráficas. Para los análisis estadísticos de los ensayos de bioluminiscencia y ELISpot, se utilizó un ensayo de Mann-Whitney-Wilcoxon o un ensayo de Kruskal-Wallis con el ensayo de comparación múltiple de Dunn, dependiendo del experimento. La significancia se estableció en el valor p < 0,05.

45 Resultados

La electrotransferencia logra una expresión transgénica in vivo óptima y la inducción de células T CD8 específicas de antígeno

- 50 Los plásmidos pCMV-luc o INVAC-1 se inyectaron por vía intradérmica en los costados de ratones C57BL/6J afeitados, seguidos o no por la aplicación de EP (1 pulso de HV a 1000 V/cm durante 100 µs seguido 1000 ms después por 1 pulso LV a 140 V/cm durante 400 ms). No se observaron eritemas después del afeitado, ni durante ni

después del procedimiento de electrotransferencia. Se midieron dos parámetros después de la electrotransferencia génica: la expresión de luciferasa después de la electrotransferencia ID con pCMV-luc y la frecuencia de las células T CD8 específicas de hTERT secretoras de IFN γ después de la electrotransferencia ID de INVAC-1. Tanto la expresión de luciferasa (Figura 2A) como la frecuencia de las células T CD8 específicas de hTERT secretoras de IFN γ (Figura 2B) aumentaron significativamente cuando se aplicó EP directamente después de la inyección de DNA ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente) en comparación con animales que recibieron la inyección de DNA solo sin electrotransferencia. Por lo tanto, la electrotransferencia induce niveles significativos de respuestas de células T CD8 específicas de hTERT después de la vacunación ID con INVAC-1 y niveles significativos de la expresión de luciferasa después de la inyección ID de pCMV-luc.

- 10 Elección de los mejores electrodos para la transferencia génica óptima y generación de respuestas inmunes celulares intensas

Se pueden utilizar diferentes tipos de electrodos para la electrotransferencia *in vivo* en la piel (Gothelf & Gehl, 2010). Por lo tanto, se probaron tres electrodos diferentes (electrodos de placa, electrodos de dedo y electrodos de aguja, como se describió en la sección Materiales y Métodos) para determinar cuál era el más adecuado para la transferencia eficiente de genes y la generación de respuestas inmunes celulares específicas intensas en ratones. Los resultados mostraron que los tres tipos de electrodos mejoraron significativamente la electrotransferencia del plásmido pCMV-luc en ratones C57BL/6J en comparación con los animales que recibieron el plásmido sin EP (Figura 3A). Sin embargo, hubo una mejor homogeneidad en la respuesta para el grupo de ratones electrotransferidos con electrodos de placa ($p < 0,001$). En menor medida, los animales electrotransferidos con electrodos de aguja también presentaron niveles significativos de expresión de luciferasa ($p < 0,05$).

Resultados similares se obtuvieron de los estudios de inmunogenicidad en ratones HLA-B7. Cuando los ratones se vacunaron por vía intradérmica con INVAC-1 seguido de electrotransferencia cutánea, se detectó la frecuencia media más alta de células T CD8 específicas de IFN γ cuando se utilizaron electrodos de placa y esta diferencia fue estadísticamente significativa en comparación con el grupo de control de PBS ($p < 0,05$) (Figura 3B).

- 25 En resumen, los electrodos de placa mostraron tanto la mejor capacidad para electrotransferir pCMV-luc como para generar niveles significativos de células T CD8 específicas de hTERT.

Localización de luciferasa después de ID seguido de electrotransferencia génica

Se sabe que la electrotransferencia génica es muy eficiente en los músculos (Andre et al., 2008). Con el fin de asegurarse de que el gen de la luciferasa solo se electrotransferiera en la piel después de una inyección ID de pCMV-luc, se abrió una piel con colgajo en el costado de los ratones C57BL/6J en el sitio del tratamiento y la bioluminiscencia para el colgajo de piel y para los músculos subyacentes se midió cuatro días después de la electrotransferencia génica. Se utilizaron electrodos de placa para este estudio de electrotransferencia génica. Los inventores confirmaron que la expresión transgénica se produjo solo en la piel y que no se detectó ninguna expresión en los músculos subyacentes (Figura 4).

- 35 Elección del pulso HV

La primera optimización de los parámetros eléctricos consistió en determinar la amplitud más eficaz el pulso de HV (100 μ s de duración) entre las siguientes amplitudes de campo: 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600 V/cm. La intensidad del pulso de LV (400 ms de duración) se mantuvo constante a 140 V/cm y el desfase entre los pulsos de HV y LV se estableció a 1000 ms. Esta evaluación se realizó utilizando el gen indicador de luciferasa y ratones C57BL/6J.

Los ratones C57BL/6J electrotransferidos a 1200 V/cm, 1400 V/cm y 1600 V/cm presentaron la mejora más significativa de la expresión de luciferasa en comparación con los ratones de control ($p < 0,001$) (Figura 5). En particular, la bioluminiscencia media más alta se obtuvo en el grupo tratado a 1400 V/cm y también hubo una mejor homogeneidad en los resultados para este grupo en comparación con otros grupos. Sin embargo, no hubo diferencia estadística entre las respuestas obtenidas de estos tres grupos, es decir, 1200, 1400 y 1600 V/cm.

Elección de la mejor combinación de pulsos HV-LV

La influencia de las combinaciones HV-LV se evaluó tanto en la electrotransferencia de pCMV-luc como en las respuestas inmunes celulares específicas inducidas por INVAC-1 después de la inyección ID en la piel de ratones C57BL/6J. Con respecto al pulso de alto voltaje, se eligieron 1000 V/cm o 1400 V/cm para combinarse con varios pulsos de bajo voltaje. Inmediatamente después de la inyección ID de pCMV-luc o INVAC-1, se aplicó un pulso de HV (duración de 100 μ s) a 1000 V/cm o 1400 V/cm seguido de un pulso de LV (duración de 400 ms) a 60 V/cm, 100 V/cm, 140 V/cm, 180 V/cm o 220 V/cm. Las diez combinaciones de pulsos HV-LV se denominaron "P1" a "P10" (Tabla 1).

(V/cm)	LV = 60	LV = 100	LV = 140	LV = 180	LV = 220
HV = 1000	P1	P2	P3	P4	P5
HV = 1400	P6	P7	P8	P9	P10

Tabla 1: Combinaciones de los pulsos de HV-LV evaluados en ensayos de bioluminiscencia y en ELISpot.

Debido a limitaciones técnicas, el Cliniporator® no pudo suministrar constantemente 220 V/cm durante 400 ms. Por lo tanto, los resultados obtenidos cuando se utilizaron las condiciones P5 y P10 no generaron datos confiables y se excluyeron para el análisis de datos. Las 3 combinaciones de pulsos de HV-LV que generaron las intensidades de bioluminiscencia media más altas fueron P4, P8 y P9 (Figura 6A). Todas estas 3 combinaciones mostraron diferencias estadísticas muy altas en comparación con la inyección de pCMV-luc sola sin EP ($p < 0,001$). En particular, P9 mostró la mejor intensidad de bioluminiscencia media, el valor más alto para la intensidad de bioluminiscencia mínima y la dispersión de punto más baja.

Las combinaciones de pulsos de HV-LV P4, P8 y P9 se analizaron después para la vacunación ID con INVAC-1. Las intensidades de las respuestas de células T CD8 específicas de hTERT de estos grupos se compararon con la combinación P3 que se publicó previamente para la electrotransferencia de DNA en el tejido subcutáneo (Andre et al., 2008). Al analizar los datos del ensayo de inmunogenicidad, las combinaciones P8 y P9 parecían ser las mejores, permitiendo la generación de frecuencias significativas de células T CD8 específicas de IFN γ en comparación con los ratones control ($p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente) (Figura 6B). Aunque la diferencia entre los grupos P8 y P9 no fue estadísticamente significativa, P9 mostró una frecuencia media más alta que las células T CD8 específicas de hTERT.

Dados los análisis de datos de bioluminiscencia e inmunogenicidad, la mejor combinación de pulsos de HV-LV parecía ser P9, es decir, un pulso de HV (100 μ s de duración) a 1400 V/cm seguido de un pulso de LV (400 ms de duración) a 180 V/cm.

Conclusión

En este estudio, se optimizó el procedimiento tanto para la electrotransferencia *in vivo* del gen de la luciferasa en la dermis como la vacunación ID basada en la telomerasa. Los electrodos de placa no invasivos que administran un pulso de alto voltaje de 100 μ s seguido de un pulso de bajo voltaje de 400 ms mostraron tanto el nivel más alto de expresión de luciferasa como el mayor número de células T CD8 específicas de telomerasa. Los resultados generados con esta vacuna de DNA de telomerasa pueden establecer un procedimiento de vacunación de DNA global utilizando la tecnología de electrotransferencia independientemente del antígeno, en caso de que sea un antígeno tumoral o un antígeno viral o bacteriano.

Referencias

- Adotevi O, Mollier K, Neuveut C, Cardinaud S, Boulanger E, et al. (2006) Immunogenic HLA-B*0702-restricted epitopes derived from human telomerase reverse transcriptase that elicit antitumor cytotoxic T-cell responses. *Clin Cancer Res* 12: 3158-3167.
- Anderson ED, Mourich DV, Fahrenkrug SC, LaPatra S, Shepherd J, et al. (1996) Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol Mar Biol Biotechnol* 5: 114-122.
- Andre FM, Gehl J, Sersa G, Preat V, Hojman P, et al. (2008) Efficiency of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor, and skin. *Hum Gene Ther* 19: 1261-1271.
- Andre FM, Mir LM (2010) Nucleic Acids Electrotransfer In Vivo: Mechanisms and Practical Aspects. *Current Gene Therapy* 10: 267-280.
- Barry MA, Lai WC, Johnston SA (1995) Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature* 377: 632-635.
- Bei R, Scardino A (2010) TAA polyepitope DNA-based vaccines: a potential tool for cancer therapy. *J Biomed Biotechnol* 2010: 102758.
- Bergman PJ, McKnight J, Novosad A, Charney S, Farrelly J, et al. (2003) Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial. *Clin Cancer Res* 9: 1284-1290.
- Breton M, Mir LM (2011) Microsecond and nanosecond electric pulses in cancer treatments. *Bioelectromagnetics*.
- Cortez-Gonzalez X, Sidney J, Adotevi O, Sette A, Millard F, et al. (2006) Immunogenic HLA-B7-restricted peptides of hTERT. *Int Immunol* 18: 1707-1718.
- Dolter KE, Evans CF, Ellefsen B, Song J, Boente-Carrera M, et al. (2011) Immunogenicity, safety, biodistribution and persistence of ADVAX, a prophylactic DNA vaccine for HIV-1, delivered by in vivo electroporation. *Vaccine* 29: 795-803.
- Escoffre JM, Portet T, Wasungu L, Teissie J, Dean D, et al. (2009) What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. *Mol Biotechnol* 41: 286-295.
- Favard C, Dean DS, Rols MP (2007) Electrotransfer as a non viral method of gene delivery. *Current Gene Therapy* 7: 67-77.
- Fioretti D, Iurescia S, Fazio VM, Rinaldi M (2013) In vivo DNA electrotransfer for immunotherapy of cancer and neurodegenerative diseases. *Curr Drug Metab* 14: 279-290.
- Gothelf A, Gehl J (2010) Gene electrotransfer to skin; review of existing literature and clinical perspectives. *Curr Gene Ther* 10: 287-299.

Gothelf A, Gehl J (2012) What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 8: 1694-1702.

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26: 677-704.

Kirman JR, Seder RA (2003) DNA vaccination: the answer to stable, protective T-cell memory? *Curr Opin Immunol* 15: 471-476.

Kolar P, Knicke K, Hegel JKE, Quandt D, Burmester GR, et al. (2009) CTLA-4 (CD152) Controls Homeostasis and Suppressive Capacity of Regulatory T Cells in Mice. *Arthritis and Rheumatism* 60: 123-132.

Lee AH, Suh YS, Sung JH, Yang SH, Sung YC (1997) Comparison of various expression plasmids for the induction of immune response by DNA immunization. *Mol Cells* 7: 495-501.

Li L, Saade F, Petrovsky N (2012) The future of human DNA vaccines. *J Biotechnol* 162: 171-182.

Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ (2013) The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology* 138: 105-115.

Liu MA (2011) DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev* 239: 62-84.

Mir LM, Belehradek M, Domenge C, Orlowski S, Poddevin B, et al. (1991) [Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial]. *C R Acad Sci III* 313: 613-618.

Mir LM, Moller PH, Andre F, Gehl J (2005) Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues. *Adv Genet* 54: 83-114.

Mir LM (2006) Bases and rationale of the electrochemotherapy. *Ejc Supplements* 4: 38-44.

Rochard A, Scherman D, Bigey P (2011) Genetic immunization with plasmid DNA mediated by electrotransfer. *Hum Gene Ther* 22: 789-798.

Rodriguez F, Zhang J, Whitton JL (1997) DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *J Virol* 71: 8497-8503.

Rohrlich PS, Cardinaud S, Firat H, Lamari M, Briand P, et al. (2003) HLA-B*0702 transgenic, H-2KbDb double-knockout mice: phenotypical and functional characterization in response to influenza virus. *Int Immunol* 15: 765-772.

Satkauskas S, Bureau MF, Puc M, Mahfoudi A, Scherman D, et al. (2002) Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: Respective contributions of cell electropermeabilization and DNA electrophoresis. *Molecular Therapy* 5: 133-140.

Satkauskas S, Andre F, Bureau MF, Scherman D, Miklavcic D, et al. (2005) Electrophoretic component of electric pulses determines the efficacy of In Vivo DNA electrotransfer. *Human Gene Therapy* 16: 1194-1201.

- Shevach EM (2009) Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30: 636-645.
- Stevenson FK, Palucka K (2010) Understanding and activating immunity against human cancer. *Curr Opin Immunol* 22: 212-214.
- Tang DC, DeVit M, Johnston SA (1992) Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 152-154.
- Villemejeane J, Mir LM (2009) Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications. *British Journal of Pharmacology* 157: 207-219.
- Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ (2011) Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 29: 235-271.
- Wang Q, Lei C, Wan H, Liu Q (2012) Improved cellular immune response elicited by a ubiquitin-fused DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis*. *DNA Cell Biol* 31: 489-495.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, et al. (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465-1468.

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que codifica un antígeno tumoral, para su uso en la vacunación antitumoral en un sujeto mediante el montaje de una respuesta inmune celular, en donde el ácido nucleico codifica una proteína de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) y se administra mediante inyección intradérmica y permeabilización eléctrica de las células de la piel con:
 - 5 - un único pulso de intensidad de campo de alto voltaje de entre 1250 y 1400 V/cm y de duración de 10 µs a 1000 µs;
 - seguido, preferiblemente después de un tiempo de retraso definido, por un único pulso de intensidad de campo de bajo voltaje de entre 100 y 200 V/cm y de duración de entre 300 y 800 ms.
- 10 2. El ácido nucleico para su uso según la reivindicación 1, en donde el único pulso de bajo voltaje tiene una intensidad de campo de 180 V/cm.
3. El ácido nucleico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el único pulso de alto voltaje tiene una intensidad de campo de 1250 V/cm.
- 15 4. El ácido nucleico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el único pulso de bajo voltaje tiene una duración de entre 350 y 600 ms, preferiblemente 400 ms.
5. El ácido nucleico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el único pulso de alto voltaje tiene una duración de entre 50 y 150 µs, preferiblemente de 100 µs.
6. El ácido nucleico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde los electrodos utilizados son electrodos de placa no invasivos.
- 20 7. El ácido nucleico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el pulso de alto voltaje y el pulso de bajo voltaje están separados por un tiempo de retraso.
8. El ácido nucleico para su uso según la reivindicación 7, en donde el retraso es de entre 300 ms y 3000 ms, preferiblemente entre 500 ms y 1200 ms, más preferiblemente de 1000 ms.
- 25 9. El ácido nucleico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la respuesta celular es una respuesta de células T CD8.

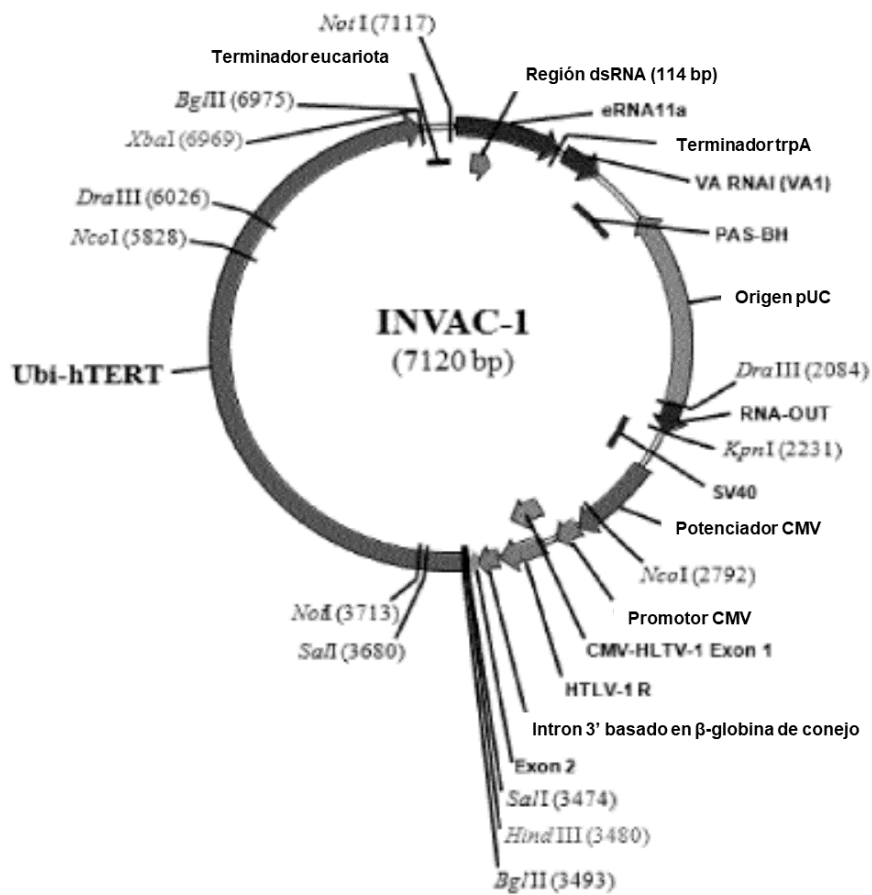


Figura 1

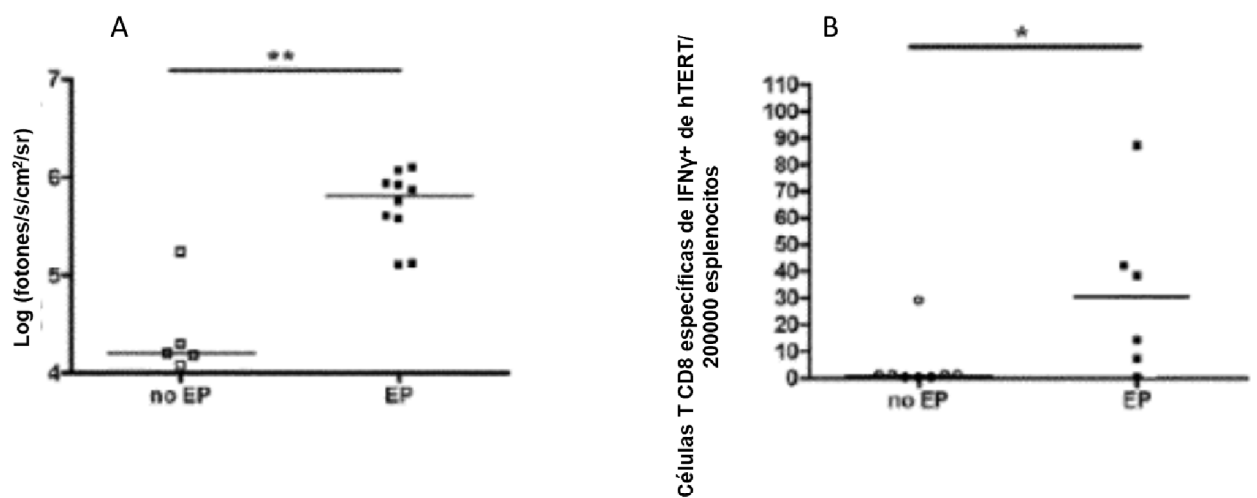


Figura 2

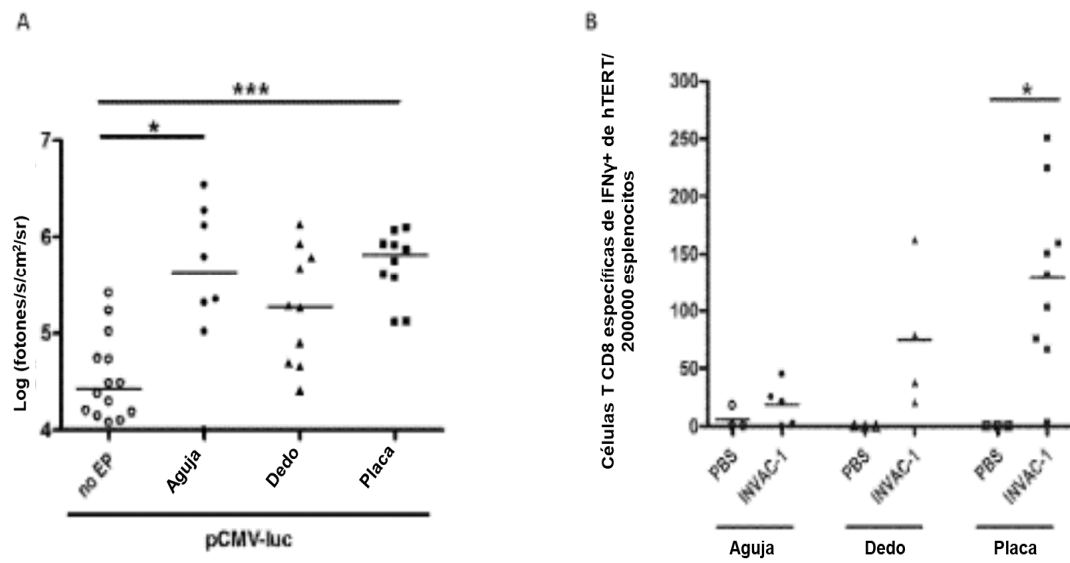


Figura 3

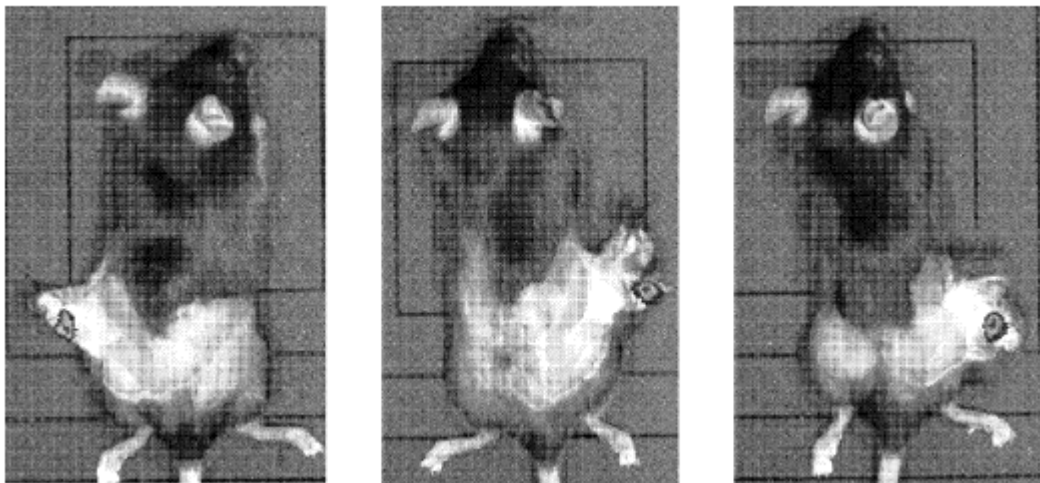


Figura 4

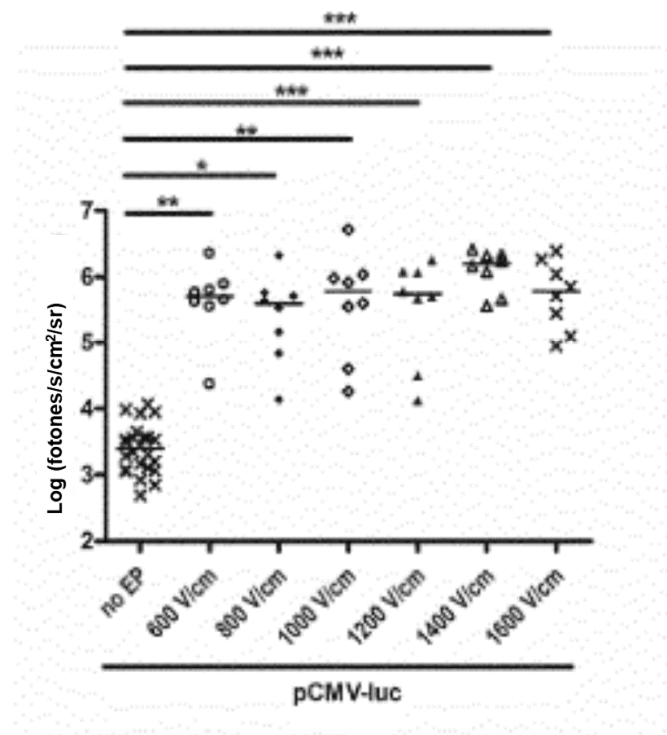


Figura 5

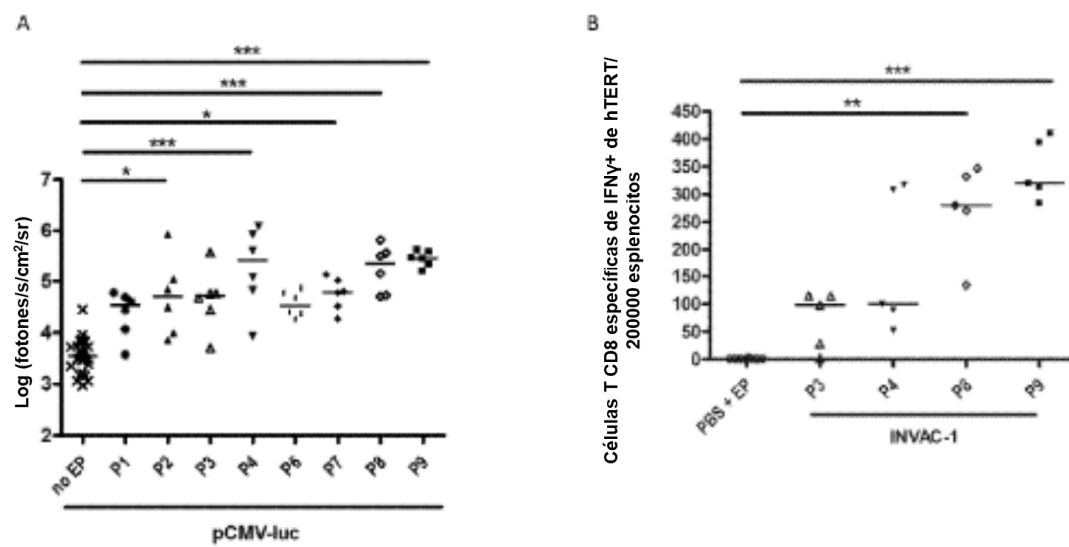


Figura 6