



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 298 418**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02795235 .7**
86 Fecha de presentación : **19.12.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1458410**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **22.09.2004**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de una librería de ARNm de antígenos tumorales.**

30 Prioridad: **19.12.2001 DE 101 62 480**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

73 Titular/es: **Curevac GmbH**
Paul-Ehrlich-Str. 15
72076 Tübingen, DE

72 Inventor/es: **Hoerr, Ingmar;**
Von der Mülbe, Florian y
Pascolo, Steve

74 Agente: **Gil Vega, Víctor**

ES 2 298 418 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

Procedimiento para la preparación de una librería de ARNm de antígenos tumorales.

5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene como mínimo un mRNA que incluye al menos una región que codifica como mínimo un antígeno tumoral, junto con un disolvente acuoso y preferentemente una citoquina, por ejemplo GM-CSF, y a un procedimiento para preparar dicha composición farmacéutica. La composición farmacéutica según la invención es aplicable principalmente para la terapia y/o la profilaxis contra el cáncer.

10 La terapia genética y la vacunación genética son procedimientos de medicina molecular cuyo empleo en la terapia y en la prevención de enfermedades va a tener importantes consecuencias para la práctica médica. Ambos métodos se basan en la introducción de ácidos nucleicos en células o tejidos del paciente, y también en el posterior procesamiento de la información codificada por los ácidos nucleicos introducidos, es decir, la expresión de los polipéptidos deseados.

15 El modo de proceder habitual en los procedimientos de la terapia genética y de vacunación genética aplicados hasta la fecha consiste en la utilización de un ADN para infiltrar en la célula la información genética necesaria. En este contexto se han desarrollado diferentes procedimientos para la introducción de ADN en las células, por ejemplo transfección de fosfato de calcio, transfección de polipreno, transfección de protoplastos, electroporación, microinyección y lipofección, habiéndose comprobado que en especial la lipofección es un procedimiento adecuado.

20 Otro procedimiento propuesto en particular para procedimientos de vacunación genética consiste en la utilización de virus de ADN como vehículos de ADN. Estos virus tienen la ventaja de que, gracias a sus propiedades infecciosas, permiten alcanzar una tasa de transfección muy alta. Los virus utilizados se modifican genéticamente de modo que en la célula transfectada no se genera ninguna partícula infecciosa funcional. Sin embargo, a pesar de esta medida de precaución, debido a los posibles fenómenos de recombinación, no se puede descartar un cierto riesgo de propagación incontrolada de los genes virales introducidos, que tiene cierto efecto en la terapia genética.

Normalmente, el ADN introducido en la célula se integra en cierta medida en el genoma de la célula transfectada. Por una parte, este fenómeno puede tener un efecto deseable, ya que permite alcanzar un efecto duradero del ADN introducido. Por otra parte, la integración en el genoma implica un riesgo esencial de la terapia genética. Por ejemplo, se puede producir una inserción del ADN introducido en un gen intacto, lo que constituye una mutación que obstaculiza o incluso elimina por completo la función del gen endógeno. Debido a estos fenómenos de integración se puede producir la eliminación de sistemas enzimáticos de vital importancia para la célula y además existe el peligro de transformar la célula modificada dejándola en un estado degenerado cuando, mediante la integración del ADN extraño, se modifica un gen decisivo para la regulación del crecimiento celular. Por ello, cuando se utilizan virus de ADN como agentes para la terapia genética y la vacunación no se puede descartar un riesgo de desarrollo cancerígeno. En este contexto también se ha de tener en cuenta que, para lograr una expresión eficaz de los genes introducidos en la célula, los vehículos de ADN correspondientes contienen un promotor fuerte, por ejemplo el promotor CMV viral. La integración de este tipo de promotores en el genoma de la célula tratada puede producir cambios no deseados en la regulación de la expresión génica en la célula.

Otra desventaja de la utilización de ADNs como agentes de terapia genética y vacunas consiste en la inducción de anticuerpos anti-ADN patógenos en el paciente, provocando una respuesta inmune posiblemente mortal.

45 A diferencia del ADN, la utilización de ARN como agente para la terapia genética o la vacunación se ha de clasificar en una categoría esencialmente más segura. Principalmente, el ARN no conlleva el peligro de integrarse de forma estable en el genoma de la célula transfectada. Además, para lograr una transcripción eficaz no se requiere ninguna secuencia viral, tal como un promotor. Por otra parte, el ARN se descompone *in vivo* con mucha más facilidad. Probablemente a causa de la vida media relativamente corta del ARN en la circulación sanguínea, hasta ahora no se ha detectado ningún anticuerpo anti-ARN. Por ello, el ARN se puede considerar como la mejor molécula para los procedimientos terapéuticos de medicina molecular.

55 Sin embargo, antes de hacer un uso más amplio de los procedimientos médicos basados en sistemas de expresión de ARN es necesario solucionar algunos problemas fundamentales. Uno de los problemas de la utilización de ARN consiste en la transferencia eficaz, segura y específica, con respecto a la célula o el tejido, del ácido nucleico. Dado que el ARN en solución normalmente resulta ser muy inestable, hasta la fecha no se ha podido utilizar ARN como agente terapéutico o de vacuna, o sólo se ha utilizado de forma muy ineficaz con los procedimientos convencionales utilizados con el ADN.

60 La inestabilidad se debe a unas enzimas que descomponen el ARN, llamadas ARNasas (ribonucleasas). La más mínima contaminación con ribonucleasas es suficiente para descomponer por completo el ARN en solución. La descomposición natural del ARNm en el citoplasma celular necesita de una regulación muy fina. A este respecto se conocen diversos mecanismos. Por ejemplo, para un ARNm funcional la estructura terminal tiene una importancia decisiva. En el extremo 5' se encuentra la denominada "caperuza" (un nucleótido guanosina modificado) y en el extremo 3' una sucesión de hasta 200 nucleótidos adenosina (la llamada cola poli-A). Mediante estas estructuras, el ARN es reconocido como ARNm y se regula la descomposición. Además existen otros procesos que estabilizan o desestabilizan el ARN. Muchos de estos procesos todavía son desconocidos, pero frecuentemente parece ser determinante una interacción entre el ARN y las proteínas. Por ejemplo, recientemente se ha descrito un "RNAm-Surveillance-System"

(sistema de vigilancia de ARNm) (Hellerin y Parker, Annu. Rev. Genet. 1999, 33: 229 a 260), en el que, mediante determinadas interacciones *feedback*-proteína en el citosol, se reconoce ARNm incompleto o antisentido y se hace accesible para la descomposición, la mayor parte de estos procesos son llevados a cabo por exonucleasas.

5 En el estado actual de la técnica se han propuesto algunas medidas para aumentar la estabilidad del ARN y posibilitar así su utilización como agente en la terapia genética o como vacuna de ARN.

10 En el documento EP-A-108232 se dan a conocer vacunas de ARNm que codifican un único antígeno tumoral, un polipéptido de varios antígenos tumorales conocidos o una colección de ARNm, y que se obtienen mediante una librería de ADNc (no)fraccionada de tejido tumoral y por transcripción inversa en ARNm. El ARNm se puede estabilizar mediante: cap-5', cola poli-A, 5'/3' UTR de beta-globina, formación de complejo con protaminas (o con otros péptidos policatiónicos) y adición de ARNs. Además, el ARNm puede codificar una citoquina (GM-CSF) y contener un IRES. Se libera así una respuesta de CTL y humoral.

15 Las vacunas de ARNm no se integran en el genoma del paciente y, por ello, son ventajosas en comparación con las vacunas de ADN. No se requiere ningún adyuvante.

20 El documento WO 99/14346 describe otros procedimientos para la estabilización de ARNm. Principalmente se proponen modificaciones de ARNm que estabilizan las especies de ARNm frente a la descomposición por ARNasas. Estas modificaciones se refieren, por una parte, a una estabilización mediante modificaciones de secuencia, en particular reducción del contenido de C y/o U mediante eliminación o sustitución de bases. Por otra parte, se proponen modificaciones químicas, en particular la utilización de análogos de nucleótidos y también de grupos de bloqueo 5' y 3', un aumento de la longitud de la cola poli-A y también la formación de complejos de ARNm con medios estabilizadores, y combinaciones de las medidas mencionadas.

25 En las patentes US 5,580,859 y US 6,214,804 se dan a conocer, entre otras cosas, vacunas y agentes terapéuticos de ARNm en el marco de la "terapia genética transitoria" (TGT). Se describen diferentes medidas para aumentar la eficacia de traducción y la estabilidad del ARNm, que se refieren principalmente a las regiones de secuencia no traducidas.

30 Bieler y Wagner (en Schlee (eds.), Plasmids for Therapy and Vaccination, capítulo 9, páginas 147 a 168, Wiley-VCH, Weinheim, 2001) informan sobre la utilización de genes sintéticos en relación con métodos de terapia genética en los que se emplean vacunas de ADN y vectores lentivirales. Se describe la construcción de un gen *gag* sintético derivado de VIH-1, donde los codones habían sido modificados con respecto a la secuencia natural (utilización de codones alternativos, en inglés: "codon usage") de tal modo que se correspondía con la utilización de codones que se encuentran en genes de mamíferos altamente expresados. De este modo principalmente se redujo el contenido de A/T con respecto a la secuencia natural. Los autores constatan principalmente un aumento de la tasa de expresión del gen *gag* sintético en células transfectadas. Además se observó un aumento de la formación de anticuerpos contra la proteína *gag* en ratones inmunizados con el constructo de ADN sintético y también un aumento de la liberación de citoquina *in vitro* en células de bazo de ratón transfectadas. Por último, se pudo confirmar la inducción de una respuesta inmune citotóxica en ratones inmunizados con el plásmido de expresión *gag*. Los autores de este artículo atribuyen las propiedades mejoradas de su vacuna de ADN esencialmente a una modificación del transporte nucleocitoplasmático del ARNm expresado por la vacuna de ADN, provocada por la utilización de codones optimizada. En cambio, los autores consideran que la utilización de codones modificados tiene pocas repercusiones en la eficacia de la traducción.

45 Por consiguiente, la presente invención tiene por objetivo proponer un nuevo sistema para la terapia genética y la vacunación genética contra tumores que supere las desventajas relacionadas con las propiedades de los agentes terapéuticos y vacunas de ADN.

50 Este objetivo se resuelve mediante las formas de realización de la presente invención definidas en las reivindicaciones.

55 En particular se propone una composición farmacéutica que contiene como mínimo un ARNm que incluye al menos una región que codifica como mínimo un antígeno de tumoral, junto con un disolvente acuoso.

60 De acuerdo con la invención, el concepto "antígeno tumoral" significa que el antígeno correspondiente es expresado en células asociadas a un tumor. Por ello, de acuerdo con la invención, los antígenos tumorales son principalmente aquellos antígenos producidos en las propias células degeneradas. Preferentemente se trata de antígenos localizados en la superficie de las células. No obstante, también son antígenos tumorales aquellos que son expresados en células que no están degeneradas (o que originalmente no estaban degeneradas), pero que están asociadas al tumor en cuestión. A este grupo pertenecen, por ejemplo, antígenos relacionados con vasos que alimentan tumores o con su (nueva) formación, en particular los antígenos asociados con la neovascularización o la angiogénesis, o factores de crecimiento como VEGF, bFGF, etc. Estos antígenos relacionados con el tumor también incluyen antígenos de las células tisulares que rodean el tumor. En este contexto se pueden mencionar los antígenos correspondientes de células de tejido conjuntivo, por ejemplo antígenos de la matriz extracelular.

65 De acuerdo con la invención, en la composición farmacéutica se utilizan uno o más ARNm para la terapia o la inoculación, es decir, vacunación, en el tratamiento o la prevención (profilaxis) de enfermedades cancerosas. La

vacunación se basa en la introducción de un antígeno (o varios antígenos) de un tumor, en el presente caso de la información genética para el antígeno, en forma del ARNm que codifica el o los antígenos, en el organismo, en particular en la célula. El ARNm contenido en la composición farmacéutica se traduce en el antígeno (tumoral), es decir, se expresa el polipéptido o el péptido antigénico codificado por el ARNm modificado, con lo que es estimula una respuesta inmune contra este polipéptido o péptido antigénico. Por consiguiente, en el presente caso de utilización como vacuna genética para el tratamiento del cáncer, la respuesta inmune se logra mediante la introducción de la información genética de antígenos tumorales, en particular proteínas, que son expresados exclusivamente en células cancerosas, administrando una composición farmacéutica según la invención que contiene un ARNm que codifica un antígeno canceroso. De este modo, en el organismo se expresan el antígeno o los antígenos cancerosos, con lo que se provoca una respuesta inmune que es eficaz contra las células cancerosas.

En su utilización como vacuna, la composición farmacéutica según la invención entra en consideración principalmente para el tratamiento de enfermedades cancerosas (codificando el ARNm preferentemente un antígeno de superficie específico de tumor (TSSA)), por ejemplo para el tratamiento de melanomas malignos, carcinomas de colon, linfomas, sarcomas, carcinoma pulmonar de células pequeñas, blastomas, etc. Ejemplos específicos de antígenos tumorales son, entre otros, 707-AP, AFP, ART-4, BAGE, β -catenina/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/neu, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HAST-2, hTERT (o hTRT), iCE, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/Melan-A, MC1R, Miosina/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NY-ESO-1, p190 minor bcr-abl, Pml/RARa, PRAME, PSA, PSM, RAGE, RU1 o RU2, SAGE, SART-1 o SART-3, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2 y WT1.

De acuerdo con otra forma de realización preferente, el antígeno o los antígenos tumorales son un polipeptópe del antígeno o de los antígenos de un tumor. Un "polipeptópe" de un antígeno o de varios antígenos es una secuencia de aminoácidos en la que están representadas varias o muchas regiones del antígeno o de los antígenos que interactúan con el sitio de un anticuerpo al que se une el antígeno o con un receptor de células T. El polipeptópe puede estar completo y no modificado. No obstante, de acuerdo con la presente invención también puede estar modificado, sobre todo para optimizar la interacción anticuerpo/antígeno o receptor de células T/antígeno. Una modificación con respecto al polipeptópe natural puede incluir, por ejemplo, una delección, adición y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácido. En consecuencia, en el ARNm de la presente invención, que codifica el polipeptópe modificado, se eliminan, añaden o sustituyen uno o más nucleótidos con respecto al ARNm que codifica el polipeptópe natural.

Para aumentar la estabilidad del ARN(m) contenido en la composición farmacéutica según la invención, cada uno de los ARN(m) contenidos en la composición farmacéutica presenta una o más modificaciones, en particular modificaciones químicas, que contribuyen a aumentar la vida media del ARNm o de los ARNm en el organismo o mejoran la transferencia del ARNm o de los ARNm en la célula.

Por ejemplo, en las secuencias existen elementos de secuencia desestabilizadores (DSE) de ARNm eucariotas, a los que se unen proteínas señal que regulan la descomposición enzimática del ARNm *in vivo*. Por consiguiente, para una estabilización adicional del ARNm modificado contenido en la composición farmacéutica según la invención, en caso dado en la región que codifica el antígeno o los antígenos tumorales, se llevan a cabo una o más modificaciones con respecto a la región correspondiente del ARNm natural, de modo que ya no contenga ningún elemento de secuencia desestabilizador. Evidentemente, de acuerdo con la invención, también es preferible eliminar los DSE del ARNm dado el caso presentes en las regiones no traducidas (3'- y/o 5'-UTR).

Estas secuencias desestabilizadoras son, por ejemplo, secuencias ricas en AU ("AURES"), que están presentes en secciones 3'-UTR de numerosos ARNm inestables (Caput y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83: 1670 a 1674). Por ello, las moléculas de ARNm contenidas en la composición farmacéutica según la invención preferentemente están modificadas con respecto al ARNm natural de tal modo que no presentan ninguna secuencia desestabilizadora de este tipo. Esto también es aplicable a los motivos de secuencia que son reconocidos por posibles endonucleasas, por ejemplo la secuencia GAACAAG que está incluida en el segmento 3'UTR del gen que codifica el receptor de la transferrina (Binder y col., EMBO J. 1994, 13: 1969 a 1980). Preferentemente, en el ARNm modificado de la composición farmacéutica según la invención también se eliminan estos motivos de secuencia.

Los especialistas conocen diferentes procedimientos que son adecuados para la sustitución de codones en el ARNm modificado según la invención. En caso de regiones codificadoras más cortas (que codifican péptidos con efecto biológico o antigénicos), el ARNm completo se puede sintetizar químicamente, por ejemplo utilizando técnicas estándar.

Sin embargo, preferentemente se introducen sustituciones de bases utilizando una matriz de ADN para producir el ARNm modificado con ayuda de técnicas de la mutagénesis selectiva convencional (Maniatis y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edición, Cold Spring Harbor, NY, 2001).

Por consiguiente, en este procedimiento, para producir el ARNm se transcribe *in vitro* una molécula del ADN correspondiente. Esta matriz de ADN posee un promotor adecuado, por ejemplo un promotor T7 o SP6, para la transcripción *in vitro*, al que siguen la secuencia de nucleótidos deseada para el ARNm a producir y una señal de terminación para la transcripción *in vitro*. De acuerdo con la invención, la molécula de ADN que constituye la matriz del constructo de ARN a producir se prepara mediante reproducción por fermentación y aislamiento subsiguiente como parte de un plásmido replicable en bacterias. Como plásmidos adecuados para la presente invención se pueden

mencionar, por ejemplo, los plásmidos pT7TS (número de acceso al Banco de Genes U26404; Lai y col., Development 1995, 121: 2349 a 2360; véase también la Figura 8), serie pGEM[®], por ejemplo pGEM[®]-1 (número de acceso al Banco de Genes X65300; de Promega) y pSP64 (número de acceso al Banco de Genes X65327); véase también Mezei y Storts, Purification of PCR Products, en: Griffin y Griffin (eds.), PCR Technology: Current Innovation, CRC Press, Boca Raton, FL, 2001.

De este modo, utilizando oligonucleótidos de ADN sintéticos cortos que presentan transiciones de cadena simple cortas en los puntos de intersección formados, o empleando genes producidos mediante síntesis química, la secuencia de nucleótidos deseada se puede clonar en un plásmido adecuado mediante métodos de biología molecular conocidos por los especialistas (Maniatis y col., véase más arriba). Después, la molécula de ADN se recorta del plásmido, en el que puede estar presente en copia simple o múltiple, mediante digestión con endonucleasas de restricción.

El ARNm modificado contenido en la composición farmacéutica según la invención puede presentar además una estructura cap-5' (un nucleótido guanosina modificado). Como ejemplos de estructuras cap se pueden mencionar: m7G(5')ppp (5'(A,G(5')ppp(5')A y G(5')ppp(5')G).

De acuerdo con otra forma de realización preferente de la presente invención, el ARNm modificado contiene una cola poli(A⁺) de como mínimo aproximadamente 25 nucleótidos, en particular de como mínimo aproximadamente 30 nucleótidos, preferentemente de como mínimo aproximadamente 50 nucleótidos, en especial de como mínimo aproximadamente 70 nucleótidos, de forma especialmente preferente de como mínimo aproximadamente 100 nucleótidos. No obstante, la cola poli(A⁺) también puede incluir 200 o más nucleótidos.

Para una traducción eficiente del ARNm también se requiere una unión eficaz de los ribosomas al sitio de unión ribosómico (secuencia de Kozak: GCCGCCACCAUGG, el AUG constituye el codón de iniciación). A este respecto se ha comprobado que un contenido elevado de A/U alrededor de dicho sitio posibilita una unión más eficiente de los ribosomas al ARNm. También es posible insertar en el ARNm uno o más de los llamados IRES (en inglés "internal ribosomal entry side"). Un IRES puede actuar como único sitio de unión de ribosomas, pero también puede servir para la preparación de un ARNm que codifica varios péptidos o polipéptidos, que han de ser traducidos independientemente entre sí por los ribosomas (ARNm "multicistrónico" o "policistrónico"). Las secuencias IRES a utilizar según la invención son, por ejemplo, las procedentes de picornavirus (por ejemplo FMDV), pestivirus (CFFV), poliovirus (PV), virus de la encefalomiocarditis (ECMV), virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la fiebre porcina clásica (CSFV), virus de la leucemia murina (MLV), virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) o virus de la parálisis cricket (CrPV).

De acuerdo con otra realización preferente de la presente invención, el ARNm presenta, en las áreas no traducidas, en 5' y/o 3', secuencias estabilizadoras que pueden aumentar la vida media del ARNm en el citosol.

Las secuencias estabilizadoras pueden presentar una secuencia un 100% homóloga a las secuencias naturales presentes en virus, bacterias y eucariotas, pero también pueden ser de naturaleza parcial o totalmente sintética. Como ejemplos de secuencias estabilizadoras a utilizar en la presente invención se pueden mencionar las secuencias no traducidas (UTR) del gen de β -globina, por ejemplo de *Homo sapiens* o *Xenopus laevis*. Otro ejemplo de secuencia estabilizadora es la fórmula general (C/U)CCAN_xCCC(U/A)Py_xUC(C/U)CC, que está incluida en el 3'UTR del ARNm muy estable que codifica α -globina, α -(I)-colágeno, 15-lipoxigenasa o tirosina-hidroxilasa (véase Holcik y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94: 2410 a 2414). Evidentemente, estas secuencias estabilizadoras se pueden utilizar de forma individual o combinadas entre sí o con otras secuencias estabilizadoras conocidas por los especialistas.

Para una mayor estabilización del ARNm también es preferible que éste presente como mínimo un análogo de nucleótidos naturales. Esto se debe a que las enzimas que descomponen el ARN presentes en las células reconocen como sustratos preferentemente nucleótidos naturales. Por consiguiente, mediante la inserción de análogos de nucleótidos se puede dificultar la descomposición del ARN. La inserción de estos análogos, en particular en la región codificadora del ARNm, puede tener un efecto positivo o negativo en la eficiencia de la traducción.

En una enumeración en modo alguna definitiva, como ejemplos de análogos de nucleótidos a utilizar según la invención se pueden mencionar fosfoamidatos, fosfotioatos, peptidonucleótidos, metilfosfonatos, 7-deazaguanosina, 5-metilcitosina e inosina. La preparación de estos análogos es conocida por los especialistas y se da a conocer, por ejemplo, en las patentes US 4,373,071, US 4,401,796, US 4,415,732, US 4,458,066, US 4,500,707, US 4,668,777, US 4,973,679, US 5,047,524, US 5,132,418, US 5,153,319, US 5,262,530 y 5,700,642. De acuerdo con la invención, estos análogos pueden estar presentes en regiones no traducidas y traducidas del ARNm modificado.

Además, la eficacia de transferencia del ARNm, preferentemente modificado, en las células a tratar o en el organismo a tratar se puede mejorar si el ARNm está asociado o unido a un agente catiónico o policatiónico, en particular al péptido o la proteína correspondiente. Por ello, el ARNm está presente en la composición farmacéutica según la invención preferentemente complejo o condensado con un agente de este tipo. En este contexto, la utilización de protamina como proteína policatiónica de unión de ácido nucleico es especialmente eficaz. También es posible utilizar otros péptidos o proteínas catiónicas, como poli-L-lisina, poli-L-arginina o histonas. El procedimiento para estabilizar el ARNm modificado se describe en el documento EP-A-1083232, cuyo contenido publicado a este respecto está incluido en toda su extensión en la presente invención.

Además del péptido o del polipéptido antigénico o eficaz para la terapia genética, el ARNm modificado según la invención también puede contener como mínimo otra sección funcional que codifique por ejemplo una citoquina promotora de la respuesta inmune (monoquina, linfoquina, interleuquina o quimioquina, como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IFN- α , IFN- γ , GM-CFS, LT- α o factores de crecimiento, como hGH.

La composición farmacéutica según la invención puede contener además uno o más adyuvantes para aumentar la inmunogenicidad. Por “adyuvante” se ha de entender todo compuesto químico o biológico que favorezca una respuesta inmune específica. A este respecto, en función de los diferentes tipos de adyuvantes pueden entrar en consideración diferentes mecanismos. Por ejemplo, una primera clase de adyuvantes a utilizar está formada por aquellos compuestos que promueven una endocitosis del ARNm modificado contenido en la composición farmacéutica por células dendríticas (DC). Otros compuestos que permiten la maduración de las DC, por ejemplo lipopolisacáridos, TNF- α o ligando CD40, constituyen otra clase de adyuvantes adecuados. En general, como adyuvante se puede utilizar cualquier agente del tipo “señal de peligro” (LPS, GP96, oligonucleótidos con el motivo CpG) o citoquinas, en particular GM-CFS, que influya en el sistema inmunitario y que permita aumentar y/o influir selectivamente en una respuesta inmune contra un antígeno codificado por el ARNm modificado. En este contexto, son particularmente preferentes las citoquinas anteriormente mencionadas. Otros adyuvantes conocidos son: hidróxido de aluminio, el adyuvante de Freund y los péptidos o polipéptidos catiónicos estabilizadores anteriormente mencionados, como protaminas. También se pueden utilizar de forma especialmente adecuada lipopéptidos, como Pam3Cys, como adyuvantes en la composición farmacéutica de la presente invención; véase Deres y col., Nature 1989, 342: 561-564.

Además, otros adyuvantes especialmente adecuados son (otras) especies de ARN o también de ARNm que pueden añadirse a la composición farmacéutica de la presente invención para aumentar la inmunogenicidad. Este ARN adyuvante está modificado químicamente de forma ventajosa para la estabilización (“modificación cis” o “estabilización cis”), por ejemplo mediante los análogos de nucleótidos anteriormente mencionados, en particular nucleótidos modificados con fosfotioato, o también mediante las otras medidas arriba descritas para la estabilización del ARN. Otra posibilidad ventajosa de la estabilización consiste en la formación de complejos o asociación (“asociación trans” o “modificación trans” o “estabilización trans”) con los agentes catiónicos o policatiónicos anteriormente mencionados, por ejemplo con protaminas.

De acuerdo con otra forma de realización ventajosa, la estabilidad de las moléculas de ARN contenidas en la composición farmacéutica (ARNm codificador de un antígeno tumoral, y en caso dado ARN(m) adyuvante) se aumenta gracias a uno o más inhibidores de ARNasa. Los inhibidores de ARNasa preferentes son péptidos o proteínas, en particular procedentes de placenta (por ejemplo de placenta humana) o del páncreas. Estos inhibidores de ARNasa también pueden estar presentes en forma recombinante. Un ejemplo específico de un inhibidor de ARNasa es RNAsin[®], que se puede obtener en el mercado, por ejemplo de Promega. Estos inhibidores de ARNasa se pueden utilizar en general para la estabilización del ARN. Por ello, de acuerdo con la invención, también se pone a disposición general una composición farmacéutica que contiene como mínimo un ARN que codifica al menos un antígeno, en particular ARNm, y como mínimo un inhibidor de ARNasa tal como se define más arriba, dado el caso junto con un disolvente, soporte y/o vehículo farmacéuticamente compatible. A continuación se definen los antígenos correspondientes de forma general y también los disolventes, soportes o vehículos. En lo que respecta a los antígenos tumorales preferentes, véanse las explicaciones correspondientes a la composición farmacéutica preferente que contiene como mínimo un ARNm que codifica al menos un antígeno tumoral.

Además del disolvente acuoso y del ARNm, la composición farmacéutica según la invención contiene preferentemente uno o más soportes farmacéuticamente compatibles adicionales y/o uno o más vehículos farmacéuticamente compatibles adicionales. En “Remington’s Pharmaceutical Sciences” (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980), cuyo contenido completo forma parte de la exposición de la presente invención, se dan a conocer métodos para la formulación y producción adecuada de las composiciones farmacéuticas según la invención. Para la administración parenteral, como sustancias de soporte, además de agua estéril o soluciones salinas estériles, también entran en consideración como disolventes acuosos polialquilenglicoles, naftaleno hidrogenado y principalmente polímeros lactida, copolímeros lactida/glicolida o copolímeros polioxietileno/polioxipropileno. Las composiciones según la invención pueden contener sustancias de carga o sustancias como lactosa, manitol, sustancias para el enlace covalente de polímeros, por ejemplo polietilenglicol en inhibidores según la invención, para la formación de complejos con iones metálicos o para la inclusión de materiales en o sobre preparaciones de compuestos polimérico, por ejemplo polilactato, ácido poliglicólico, hidrogel, o sobre liposomas, microemulsión, micelas, vesículas unilaminares o multilaminares, fragmentos de eritrocitos o esferoplastos. Las formas de realización correspondientes de las composiciones se eligen en función del comportamiento físico, por ejemplo teniendo en cuenta la solubilidad, la estabilidad, la biodisponibilidad o la degradabilidad. La liberación controlada o constante del componente de principio activo según la invención en la composición incluye formulaciones basadas en depósitos lipófilos (por ejemplo ácidos grasos, ceras o aceites). En el marco de la presente invención también se dan a conocer revestimientos para las sustancias según la invención o para las composiciones que contienen estas sustancias, a saber: revestimientos con polímeros (por ejemplo poloxámeros o poloxaminas). Además, las sustancias o composiciones según la invención también pueden presentar revestimientos protectores, por ejemplo inhibidores de proteasa o amplificadores de permeabilidad. Materiales de soporte acuosos preferentes son, por ejemplo, agua para inyección (WFI) o agua tamponada con fosfato, citrato o acetato, etc., ajustándose el pH típicamente a un valor de 5,0 a 8,0, preferentemente de 6,0 a 7,0. Preferentemente, el disolvente acuoso o el soporte o los soportes adicionales, o el vehículo o los vehículos adicionales, contendrán adicionalmente componentes salinos, por ejemplo cloruro sódico, cloruro potásico u otros componentes, que hacen que la solución, por ejemplo, se vuelva isotónica. Además de los componentes anteriormente mencionados, el disolvente acuoso, o el soporte o los

ES 2 298 418 T3

soportes adicionales, o el vehículo o los vehículos adicionales, también pueden contener componentes adicionales, como seroalbúmina humana (HSA), polisorbato 80, azúcares o aminoácidos.

5 El modo de administración y la dosificación de la composición farmacéutica según la invención dependen de la enfermedad a tratar y del estado de avance de la misma, y también del peso corporal, la edad y el sexo del paciente.

10 Por consiguiente, la concentración de ARNm modificado en estas formulaciones puede variar dentro de amplios márgenes, desde 1 $\mu\text{g/ml}$ a 100 mg/ml. La composición farmacéutica según la invención se administra al paciente preferentemente por vía parenteral, por ejemplo intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular. También es posible administrar la composición farmacéutica por vía tópica u oral. Preferentemente, la composición farmacéutica según la invención se administra por vía intradérmica. También es posible una administración transdérmica con ayuda de corrientes eléctricas o a través de fuerzas osmóticas. Además, la composición farmacéutica de la presente invención se puede inyectar localmente en un tumor.

15 Por consiguiente, de acuerdo con la invención también se pone a disposición un procedimiento para el tratamiento de enfermedades cancerosas, por ejemplo las enfermedades anteriormente mencionadas, o un procedimiento de vacunación para la prevención de las mismas, que incluye la administración de la composición farmacéutica según la invención a un paciente, en particular a un ser humano.

20 De acuerdo con una forma de realización preferente del procedimiento de tratamiento o vacunación, o en la utilización anteriormente definida del ARNm según la invención, que codifica como mínimo un antígeno tumoral, para producir una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades cancerosas, se administran al paciente una o más citoquinas junto con la composición farmacéutica según la invención.

25 Por consiguiente, de acuerdo con la invención, en general también se pone a disposición un procedimiento de tratamiento o vacunación que incluye la administración de como mínimo un ARN, preferentemente ARNm, que codifica como mínimo un antígeno tumoral (tal como se define más arriba) y que en caso dado está estabilizado tal como se explica más arriba, y como mínimo una citoquina, por ejemplo una o más de las citoquinas arriba mencionadas, en particular GM-CSF, a un paciente, en particular a un ser humano. El procedimiento es aplicable principalmente para el
30 tratamiento y/o la prevención de las enfermedades cancerosas correspondientes (por ejemplo las enfermedades cancerosas arriba indicadas). En consecuencia, la presente invención en general también está orientada a una composición farmacéutica que incluye como mínimo un ARN, preferentemente ARNm, que codifica como mínimo un antígeno tumoral (tal como se define más arriba), y que en caso dado está estabilizado tal como se explica más arriba, y como mínimo una citoquina, por ejemplo una o más de las citoquinas arriba mencionadas, como GM-CSF, preferentemente
35 junto con un soporte y/o vehículo farmacéuticamente compatible, por ejemplo un disolvente acuoso o uno de los soportes, disolventes o vehículos anteriormente definidos. Por consiguiente, de acuerdo con la invención también se da a conocer la utilización de citoquinas, por ejemplo una o más de las citoquinas anteriormente mencionadas, en particular GM-CSF, en combinación con una o más moléculas de ARN tal como se definen más arriba, en particular ARNm, para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades cancerosas (por ejemplo las enfermedades cancerosas
40 anteriormente indicadas).

De acuerdo con otra forma de realización preferente de la presente invención, la citoquina, por ejemplo GM-CSF, se administra al mismo tiempo que la composición farmacéutica que contiene el ARNm que codifica como mínimo un antígeno tumoral, o preferentemente se administra antes o después de ésta (o se utiliza para producir el medicamento
45 correspondiente para ser administrado simultáneamente con el ARN(m) anteriormente descrito o para ser administrado antes o después de éste). De forma totalmente preferente, la administración de la citoquina, en particular GM-CSF, tiene lugar poco antes (por ejemplo aproximadamente 15 minutos antes o menos, por ejemplo aproximadamente 10 o aproximadamente 5 minutos antes), poco después (por ejemplo aproximadamente 5, 10, 15, 30, 45 ó 60 minutos después) o mucho después (por ejemplo aproximadamente 2, 6, 12, 24, ó 36 horas) de la administración de la composición farmacéutica anteriormente definida, o en general después de la administración del ARN(m) o de los ARN(m) que codifican como mínimo un antígeno tumoral.

55 La administración de la citoquina, por ejemplo GM-CFS, puede tener lugar del mismo modo que las composiciones farmacéuticas según la invención o el ARN(m) o los ARN(m) que codifican como mínimo un antígeno tumoral, o de un modo diferente. Las vías de administración adecuadas y también las posibilidades de formulación adecuadas con respecto a la o las citoquinas se pueden extraer de las anteriores explicaciones con respecto a las composiciones farmacéuticas según la invención. En caso de un paciente humano es recomendable en particular una dosis de GM-CFS de 100 microgramos/m². De forma especialmente preferente, la citoquina, por ejemplo GM-CFS, se administra mediante inyección subcutánea.

60 Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención, o los ARN que codifican un antígeno tumoral y en caso dado junto con ellos la o las citoquinas, se administran en forma de dosis periódicas. Por ejemplo, se puede administrar una dosis de la composición farmacéutica según la invención a intervalos cortos, por ejemplo a diario, cada dos días, cada tres días, etc., o preferiblemente a intervalos más largos, por ejemplo semanalmente, cada dos semanas, cada tres semanas, mensualmente, etc. Los intervalos también pueden ser variables, para lo que se
65 han de tener en cuenta principalmente los parámetros inmunológicos del paciente. Por ejemplo, la administración de una composición farmacéutica según la invención (y en caso dado junto con ella la administración de la citoquina o de las citoquinas) puede seguir un esquema de tratamiento de forma que, al principio, el intervalo es más corto, por

ejemplo cada dos semanas, y después, en función del desarrollo del tratamiento o de los parámetros inmunológicos del paciente determinados correspondientemente, el intervalo se puede prolongar por ejemplo a una vez al mes. De este modo, dependiendo del paciente, en particular de su estado y de sus parámetros inmunológicos, se puede emplear un esquema terapéutico a medida del individuo correspondiente.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento para producir la composición farmacéutica anteriormente definida, que incluye los siguientes pasos:

- (a) preparación de una librería de ADNc, o de una parte de la misma, a partir de tejido tumoral de un paciente;
- (b) preparación de una matriz para la transcripción *in vitro* de ARN a partir de la librería de ADNc o de una parte de ésta; y
- (c) transcripción *in vitro* de la matriz.

El tejido tumoral del paciente se puede obtener, por ejemplo, mediante una simple biopsia. No obstante, también se puede preparar mediante extirpación quirúrgica del tejido afectado por el tumor. Además, la preparación de la librería de ADNc, o de una parte de la misma, según el paso (a) del procedimiento de producción de la presente invención se puede llevar a cabo después de que el tejido haya sido congelado, preferentemente a temperaturas por debajo de -70°C, para guardarlo. Para preparar la librería de ADNc, o de una parte de la misma, en primer lugar se lleva a cabo un aislamiento del ARN total, por ejemplo de una biopsia de tejido tumoral. Por ejemplo, en Maniatis y col. (véase más arriba) se describen procedimientos para ello. Además en el mercado se pueden adquirir los *kits* correspondientes, por ejemplo de la firma Roche AG (por ejemplo el producto “High Pure ARN Isolation Kit”). A partir del ARN total se aísla el poli(A⁺)-ARN correspondiente de acuerdo con un procedimiento conocido por los especialistas (por ejemplo Maniatis y col., véase más arriba). En el mercado también se pueden adquirir los *kits* correspondientes para ello, por ejemplo el “High Pure ARN Tissue Kit” de la firma Roche AG. A partir del poli(A⁺)-ARN así obtenido se prepara después la librería de ADNc (a este respecto véase también por ejemplo Maniatis y col., más arriba). Los especialistas también pueden adquirir en el mercado *kits* para este paso de la preparación de la librería de ADNc, por ejemplo “SMART PCR cADN Synthesis Kit” de la firma Clontech Inc. Las subetapas independientes desde el poli(A⁺)-ARN hasta el ADNc de cadena doble están representadas esquemáticamente en la Figura 11 en relación con el ejemplo del procedimiento de acuerdo con el “SMART PCR cADN Synthesis Kit” de la firma Clontech Inc.

De acuerdo con el paso (b) del procedimiento de preparación arriba descrito, a partir de la librería de ADNc (o de una parte de ésta) se sintetiza una matriz para la transcripción *in vitro*. De acuerdo con la invención, esto se lleva a cabo en particular clonando los fragmentos de ADNc obtenidos en un vector de producción de ARN adecuado. La matriz de ADN adecuada y los plásmidos preferentes según la invención ya han sido indicados más arriba en relación con la preparación del ARNm para la composición farmacéutica según la invención.

Para la transcripción *in vitro* de la matriz producida en el paso (b) según la invención, cuando ésta se encuentra en forma de ADN(c) plásmido circular, primero se linealiza con una enzima de restricción adecuada. Preferentemente, antes de la transcripción *in vitro* propiamente dicha, el constructo así cortado se purifica de nuevo, por ejemplo con mezclas adecuadas de fenol/cloroformo o cloroformo/fenol/alcohol isoamílico. Esto sirve principalmente para asegurar que la matriz de ADN esté libre de proteínas. A continuación se lleva a cabo la síntesis enzimática del ARN a partir de la matriz purificada. Esta subetapa tiene lugar en la mezcla de reacción correspondiente, que contiene la matriz de ADN linealizada y libre de proteínas, en un tampón adecuado, al que preferentemente se añade un inhibidor de ribonucleasa, utilizando una mezcla de los trifosfatos de ribonucleótidos necesarios (rATP, rCTP, rUTP y rGTP) y una cantidad suficiente de una ARN-polimerasa, por ejemplo polimerasa T7. En este proceso, la mezcla de reacción se encuentra en agua libre de ARNasas. Preferentemente, en la propia síntesis enzimática del ARN también se añade un análogo CAP. Después de una incubación a 37°C durante el tiempo necesario, por ejemplo 2 horas, la matriz de ADN se descompone mediante la adición de ADNasa libre de ARNasa, para lo que preferentemente se vuelve a incubar a 37°C.

Preferentemente, el ARN así preparado se precipita con acetato de amonio/etanol y, en caso dado, se lava una o varias veces con etanol libre de ARNasa. Finalmente, el ARN purificado se seca y, de acuerdo con una forma de realización preferente, se recoge en agua libre de ARNasa. Además, el ARN así producido se puede someter a varias extracciones con fenol/cloroformo o cloroformo/fenol/alcohol isoamílico.

De acuerdo con otra forma de realización preferente del procedimiento de preparación anteriormente definido, sólo se produce una parte de una librería de ADNc total y se transforma en las moléculas de ARNm correspondientes. Por consiguiente, de acuerdo con la invención, también se puede utilizar una denominada “librería de sustracción” como parte de la librería de ADNc total para preparar las moléculas de ARNm según la invención. Una parte preferente de la librería de ADNc del tejido tumoral codifica los antígenos específicos del tumor. En el caso de ciertos tumores ya se conocen los antígenos correspondientes. De acuerdo con otra forma de realización preferente, en primer lugar (es decir, antes del paso (a) del procedimiento anteriormente definido) se puede determinar la parte de la librería de ADNc que codifica los antígenos específicos del tumor. Preferentemente, esto se lleva a cabo determinando las secuencias de los antígenos tumorales específicos mediante una asignación en base a una librería correspondiente de ADNc de tejido sano.

La asignación según la invención incluye principalmente una comparación del patrón de expresión del tejido sano con el del tejido tumoral en cuestión. Los patrones de expresión correspondientes se pueden determinar a nivel de ácido nucleico, por ejemplo con ayuda de experimentos de hibridación adecuados. Para ello, por ejemplo, las librerías de ARN(m) o de ADNc correspondientes de los tejidos se pueden separar en cada caso en geles de agarosa o poliacrilamida adecuados, trasladar a membranas e hibridar con las sondas de ácido nucleico adecuadas, preferentemente sondas de oligonucleótido, que representen los genes correspondientes (Northern-Blot o Southern-Blot). De este modo, una comparación de las hibridaciones correspondientes permite determinar qué genes son expresados exclusivamente por el tejido tumoral o son expresados con más intensidad dentro de éste.

De acuerdo con otra forma de realización preferente, los experimentos de hibridación mencionados se llevan a cabo con ayuda de un diagnóstico por *microarrays* (biomatrices) (uno o más *microarrays*). Un *microarray* de ADN correspondiente incluye una disposición definida, en poco espacio o en el menor espacio posible, de sondas de ácido nucleico, en particular sondas de oligonucleótido, por ejemplo representando cada sonda un gen cuya presencia o ausencia se ha de investigar en la librería de ARN(m) o de ADNc correspondiente. En una microdisposición correspondiente pueden estar representados cientos, miles, incluso decenas y centenares de miles de genes. Para analizar el patrón de expresión del tejido correspondiente, el poli(A⁺)-ARN o preferentemente el ADNc correspondiente se marca con un marcador adecuado, para lo que se utilizan en particular marcadores fluorescentes, y se pone en contacto con el *microarray*, bajo condiciones de hibridación adecuadas. Si una especie de ADNc se une a una molécula de la sonda presente en el *microarray*, en particular una molécula de la sonda de oligonucleótido, se observa una señal de fluorescencia correspondiente más o menos intensa, que puede medirse con un aparato de detección adecuado, por ejemplo un espectrómetro de fluorescencia adecuadamente diseñado. Cuanto mayor sea la representación de la especie de ADNc (o ARN) en la librería, mayor será la señal, por ejemplo la señal de fluorescencia. El experimento de hibridación con *microarrays* (o varios o muchos de ellos) se lleva(n) a cabo por separado para el tejido tumoral y para el tejido sano. La diferencia entre las señales seleccionadas de los experimentos con *microarrays* permite deducir qué genes son expresados de forma exclusiva o incrementada por el tejido tumoral. Por ejemplo en Schena (2002), *Microarray Analysis*, ISBN 0-471-41443-3, John Wiley & Sons, Inc., New York, se describen análisis con *microarrays* de ADN de este tipo, quedando incluido en la presente invención el contenido correspondiente de dicha publicación en toda su extensión.

Sin embargo, la preparación de patrones de expresión específicos de tejido tumoral no está limitada en modo alguno al análisis a nivel de ácido nucleico. Evidentemente, los especialistas también conocen procedimientos del estado actual de la técnica que sirven para el análisis de expresión a nivel de proteínas. En este contexto se han de mencionar, en particular, las técnicas de electroforesis en gel 2D y espectrometría de masas, pudiendo combinarse ventajosamente estas técnicas también con biochips de proteína (es decir, *microarrays* a nivel de proteínas, en los que por ejemplo un extracto proteínico de tejido sano o de tejido tumoral se pone en contacto con los anticuerpos y/o péptidos aplicados sobre el sustrato del *microarray*). En lo que respecta a los procedimientos de espectrometría de masas, se han de mencionar principalmente los procedimientos MALDI-TOF ("matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight"). Las técnicas mencionadas para el análisis químico proteínico para la obtención del patrón de expresión de tumores en comparación con tejido sano se describen, por ejemplo, en Rehm (2000) *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3ª edición, a cuyo contenido correspondiente se hace referencia explícita *expressis verbis* en la presente invención. Además, en cuanto a los *microarrays* de proteínas se remite de nuevo a las explicaciones al respecto dadas en Schena (2002), véase más arriba.

Las figuras muestran:

Figura 1: representación gráfica de los resultados de una vacunación tumoral de ratones (animales transgénicos con Her-2/neu de rata) que desarrollan espontáneamente cáncer de mama, con ARN. Se muestra la multiplicidad tumoral en el eje "Y" en función de la edad de los ratones, en el eje "X". Todos los ratones no tratados (n = 4) que sirvieron como control presentaban tumores a la edad de 6 meses. A tres ratones se les inyectó ADN codificador de Her-2/neu y 10 meses después un ratón estaba libre de tumores. Como control negativo adicional, 4 ratones recibieron un ARNm antisentido complementario al ARNm para Her-2/neu. Todos estos ratones también presentaban tumores 6 meses después (no mostrado). En cambio, uno de 4 ratones a los que se les había inyectado ARNm codificador de Her-2/neu (es decir, la cadena sentido), estaba libre de tumores 9 meses después.

Figura 2: representación gráfica de los resultados de experimentos para la actividad de CTL (linfocitos T citotóxicos) específicos de beta-galactosidasa (beta-Gal) mediante la inmunización con un ARNm codificador de beta-Gal bajo la influencia de GM-CSF. Unos ratones BALB/c se inmunizaron mediante inyección con 25 µg de ARNm codificador de beta-Gal en el interior del pabellón auricular. Los esplenocitos se estimularon *in vitro* con proteína beta-Gal y la actividad de CTL se determinó 6 días después de la estimulación *in vitro* utilizando un ensayo de liberación de ⁵¹Cr estándar. Las células diana eran células P815 (H₂^d) cargadas (■) o no cargadas (▲) con el péptido sintético TPHPA-RIGL, que corresponde al epítipo H₂^d de beta-Gal. En cada caso se trataron dos o tres animales por grupo. Como control negativo se utilizaron animales a los que sólo se les inyectó vía intradérmica un tampón para inyección en ambas orejas. Como control positivo ("ADN") se utilizaron animales a los que se les inyectaron por vía intradérmica en ambas orejas 10 µg de un plásmido codificador de beta-Gal en PBS. Los grupos de ensayo recibieron ARN codificador de beta-Gal, solo o en combinación con GM-CSF, que se inyectó 24 horas antes de la inyección de ARN ("GM-CSF t-1"), 2 horas antes de la inyección de ARN ("GM-CSF t0") o 24 horas después de la inyección de ARN ("GM-CSF t+1") en el mismo lugar (en los pabellones de las orejas) o en un lugar diferente (vía subcutánea en el lomo). En cada caso se ensayaron tres relaciones de células efectoras/células diana (200, 44, 10).

ES 2 298 418 T3

Figura 3: muestra otras representaciones gráficas de los resultados de ensayos estándar ELISA específicos para IFN-gamma (A) o IL-4 (B), que documentan la producción de citoquina correspondiente de esplenocitos reestimulados *in vitro* con proteína beta-Gal. Unos ratones BALB/c se inmunizaron tal como ya se ha indicado anteriormente en relación con la Figura 2. Los esplenocitos se estimularon *in vitro* con proteína beta-Gal. Después se recogieron los sobrenadantes de cultivo correspondientes y se determinó la concentración de IFN-gamma o IL-4 mediante un ensayo estándar ELISA.

Figura 4: muestra otras representaciones gráficas que demuestran la respuesta de anticuerpos de ratones inmunizados según la invención. Unos ratones BALB/c se inmunizaron tal como se indica para la Figura 2. Dos semanas después de la administración de refuerzo se extrajo sangre y se obtuvo el suero de la misma. Con ayuda de un ensayo ELISA se determinaron los anticuerpos IgG1 (A) e IgG2a (B) específicos para beta-Gal. En cada caso, en el eje "Y" se muestra la extinción (OD) a 405 nm que resulta de la reacción del sustrato ABTS en el ensayo ELISA. Las extinciones mostradas son los valores de los que se han restado los valores correspondientes a los ratones tratados con un tampón para inyección.

Figura 5: secciones microscópicas teñidas con X-Gal de orejas de ratones a los que se les había inyectado vía intradérmica en la oreja ARNm codificador de beta-galactosidasa. Doce horas después de la inyección de 25 µg de ARN en un tampón para inyección de HEPES-NaCl, se cortaron las orejas y se prepararon secciones teñidas con X-Gal. Las células azules indican una actividad de beta-galactosidasa. Como se puede observar, en las dos secciones sólo hay unas pocas células azules.

Figura 6: muestra una sección correspondiente a la Figura 5 a través de una oreja de un ratón al que se le había inyectado en la misma ARNm codificador de beta-galactosidasa estabilizado con protamina. La sección microscópica teñida con X-Gal muestra unas pocas células de color azul.

Figura 7: muestra otras dos secciones a través del pabellón auricular de ratones, habiéndose preparado dos imágenes por sección para representar un mayor fragmento. En este caso se inyectó en la oreja ARNm codificador de beta-galactosidasa en un tampón al que se le añadieron 10 U de ARNsin, un inhibidor de ARNasa enzimático de páncreas (disponible en Roche o Promega), directamente antes de la inyección. En comparación con las secciones de la Figura 5 y la Figura 6 se pueden reconocer claramente más áreas de color azul, correspondientes a células con actividad de beta-galactosidasa.

Figura 8: representación esquemática del plásmido pT7TS, que fue utilizado para la transcripción *in vitro*. En los sitios BglIII y SpeI, cuya posición relativa entre sí está indicada, se clonaron constructos según la invención. El área rellena de negro incluye la región no traducida en 5' del gen de beta-globina de *Xenopus laevis*, mientras que el área rellena de gris representa una región correspondiente no traducida en 3' del gen de beta-globina de *X. laevis*. También se indica la posición relativa del promotor T7, el sitio PstI utilizado para la secuenciación, la cola poli(A⁺) (A₃₀C₃₀) y con una flecha el sentido de transcripción.

Figura 9: ejemplo de esquema de proceso del desarrollo de una terapia de vacunación con ARN según la invención con administración de GM-CFS como apoyo. Al paciente se le administran vía intradérmica las moléculas de ARNm codificador de uno o más antígenos tumorales (MUC1, Her-2/neu, telomerasa, MAGE-1) o un ARNm codificador de un antígeno control (Influenza Matrix Protein (IMP), un antígeno viral), los días 0, 14, 28 y 42. Además, un día después de la vacunación con ARN, al paciente se le inyecta vía subcutánea GM-CFS (Leucomax[®] (100 µg/m²) de Novartis/Essex Pharma). En caso de una evolución estable o una respuesta objetiva del tumor (remisión completa (CR) o remisión parcial (PR)), los pacientes reciben la vacunación vía subcutánea una vez al mes. Después de la cuarta inyección (día 49), la respuesta del tumor se evalúa por radiología, química de laboratorio o sonografía, y también se evalúan los fenómenos inmunológicos inducidos por la terapia. A partir del día 70, la terapia de inmunización continúa a intervalos de 4 semanas. Los días 0, 14, 28, 42 y 49 se toman muestras de sangre para determinar los parámetros de laboratorio correspondientes, la fórmula leucocitaria (Diff-BB), análisis FACS y citoquinas. El reestadiaje del paciente se realiza a partir del día 49 y después en caso dado cada 4 a 8 semanas.

Figura 10: diagrama de flujo de la construcción de ARN autólogo estabilizado de acuerdo con el procedimiento de preparación de la presente invención. En primer lugar se obtiene el tejido tumoral, por ejemplo por biopsia. Después se extrae de éste el ARN total. Mediante el poli(A⁺)-ARN obtenido en la extracción de ARN se construye una biblioteca de ADNc. A partir de ésta, después de producir una matriz de ADN correspondiente, se obtiene el ARN autólogo estabilizado mediante transcripción *in vitro*.

Figura 11: esquema de reacción de los pasos para la producción de una librería de ADNc a partir de poli(A⁺)-ARN, por ejemplo para el SMART PCR cADN Synthesis Kit de la firma Clontech Inc.

Figura 12: fotografía de un gel de agarosa en la que se puede ver el fraccionamiento de tamaños típico de una librería de ADNc elaborada con tejido de placenta humana. En la pista M se muestra un marcador de longitud con fragmentos de la longitud indicada a la izquierda. La pista "DS cADN" contiene la biblioteca de ADNc. Los fragmentos que corresponden a la fracción de tamaño prevista (aproximadamente 200 pb a 4.000 pb) se utilizan para la transcripción *in vitro*.

Figura 13: ejemplo de un plan de tratamiento para la terapia tumoral según la invención, mediante inyección de una librería de ARNm tumoral, en este caso en combinación con GM-CSF, para pacientes con melanoma maligno. Para ello se utiliza ARN autólogo estabilizado, producido a partir de tejido tumoral del propio paciente. Al paciente se le administra vía intradérmica este ARN tumoral autólogo amplificado los días 0, 14, 28 y 42. Además, un día después de la inyección de ARN, al paciente se le inyecta GM-CSF (Leucomax® 100 µg/m² Novartis/Essex Pharma) vía subcutánea. Dos semanas después de la cuarta inyección (día 56), se evalúa la respuesta del tumor mediante estadiaje (entre otros procesos, sonografía, radiografía de tórax, CT, etc.) y también mediante análisis de los parámetros inmunológicos inducidos por la terapia. En caso de una evolución estable de la enfermedad o de una respuesta objetiva del tumor (CR o PR), el paciente es sometido a otra vacunación cada cuatro semanas. El día 126 y después a intervalos de 12 semanas se realizan otros análisis de reestadiaje.

Figura 14: esquema del desarrollo general de una terapia con la composición farmacéutica según la invención con ARN tumoral autólogo amplificado, es decir, el ARN contenido en la composición farmacéutica representa una librería de ADNc de tejido tumoral. En primer lugar se obtiene una muestra del tejido tumoral, por ejemplo por biopsia. A partir de este tejido se prepara ARN total y después el poli(A⁺)-ARN mediante las extracciones correspondientes. A partir del poli(A⁺)-ARN se construye una librería de ADNc, que se clona en un vector adecuado para la transcripción *in vitro* subsiguiente. Después, mediante transcripción *in vitro* se obtiene una vacuna de ARN que se le inyecta al paciente del que fue tomado el tejido tumoral para combatir el tumor.

Los siguientes ejemplos de realización describen la invención más detalladamente, pero no la limitan.

Ejemplos

Ejemplo 1

Vacunación tumoral con ARN en el modelo animal

Materiales y métodos

Se preparó un ARNm con caperuza codificador de una versión reducida de la proteína Her-2/neu de rata (“ECD-TM-neu-rata”, que contiene el dominio extracelular y la región transmembrana, pero no la región citoplasmática), utilizando la “SP6 mMessageMachine” (Ambion) con ayuda de un plásmido que correspondía esencialmente a la estructura mostrada en la Figura 8, pero que en lugar del promotor T7 contenía un promotor SP6, y en el que el constructo ECD-TM-neu-rata estaba insertado detrás del promotor SP6-ARN-polimerasa. El ARNm preparado se disolvió en tampón para inyección (NaCl 150 mM, HEPES 10 mM) a una concentración de 0,8 mg/ml y se mezcló con sulfato de protamina (Sigma) (1 mg de protamina por 1 mg de ARN). Después se inyectaron 50 µl de esta solución en los pabellones de las orejas de los ratones (en cada caso 25 µl por oreja). Se realizaron ocho inyecciones a las edades de 6, 8, 13, 15, 20, 22, 27 y 29 semanas, respectivamente. Como controles se utilizaron ratones a los que se les administraron las inyecciones correspondientes con tampón para inyección, con ADN plásmido codificador de ECD-TM-neu-rata o con un ARNm antisentido correspondiente al ARNm según la invención.

Resultados

Unos ratones BalB-neu T hembra (ratones BalB/c que expresan el oncogen Her2/neu de la rata; véase Rovero y col. (2000) J. Immunol. 165(9): 5133-5142) que desarrollan espontáneamente cáncer de mama fueron inmunizados con ARN codificador de una versión reducida de la proteína Her-2/neu (“ECD-TM-neu-rata” que contiene el dominio extracelular y la región transmembrana, pero no la región citoplasmática). Como control negativo se utilizaron cuatro ratones tratados con tampón para inyección. A otro grupo formado por tres ratones se le inyectó ADN codificador de Her-2/neu reducido. A cuatro ratones se les administró el ARNm codificador del antígeno tumoral Her-2/neu (versión reducida ECD-TM, véase más arriba) según la invención. Otro grupo control estaba formado por cuatro ratones a los que se les inyectó el ARN antisentido correspondiente. Como muestra la Figura 1, en los animales del grupo control no tratado se observó una multiplicidad tumoral con un valor medio de 10 después de 26 semanas, presentando todos los animales tumores de mama palpables a la edad de aproximadamente 20 semanas. En cambio, en el caso de la inmunización con el ARNm codificador de ECD-TM-neu-rata se observa una clara desaceleración de la formación de carcinomas, en particular hasta llegar a la edad de 30 semanas no se alcanza una multiplicidad tumoral de 10. También se reduce el tamaño de los tumores (no mostrado). Uno de los 4 ratones tratado con el ARNm según la invención seguía estando libre de tumores después de 9 meses. Todos los ratones del grupo al que se le había inyectado el ARNm antisentido presentaban tumores a la edad de 6 meses. Los ratones del grupo comparativo al que se le había inyectado ADN plásmido codificador de la versión reducida de Her-2/neu también mostraban una formación de carcinomas más lenta que la del grupo control no tratado (véase también en relación con experimentos correspondientes con inyección intramuscular de ADN plásmido: Di Carlo y col. (2001) Clin. Cancer Res. 7(3^{er} suplemento): 830s-837s), pero la formación de carcinomas hasta la semana 27 no se había desacelerado tanto como en el caso de la inmunización con ARNm codificador de la versión reducida de Her2/neu. Además, en la inmunización con ADN se han de tener en cuenta las desventajas anteriormente mencionadas, en particular el peligro de integración del ADN en el genoma, la formación de anticuerpos anti-ADN, etc.

Ejemplo 2

*Influencia de la GM-CFS en la vacunación con ARN*5 *Materiales y métodos**Ratones*

Se adquirieron ratones BALB-c AnNCrIBR (H-2^d) (hembra) de 6-10 semanas de edad de Charles River (Sulzfeld, Alemania).

Plásmidos y preparación de ARN

El marco de lectura abierta (ORF) (LacZ) codificador de beta-galactosidasa flanqueado por secuencias no traducidas en 5' y 3' del gen de beta-globina de *X. laevis* se insertó en el plásmido T7TS (P.A. Creek, Austin, TX, USA) para producir el plásmido pT7TS-kozak-5' beta gl-lacZ-3' beta gl-A30C30 (véase Hoerr y col. (2000) Eur. J. Immunol. 30: 1-7). En la Figura 8 se representa esquemáticamente la estructura general del plásmido pT7TS flanqueado por las secuencias no traducidas en 3' y 5' del gen de beta-globina de *X. laevis*.

El plásmido así producido se linealizó con Pst I y se sometió a transcripción *in vitro* utilizando el *kit* m-Messagem-MachineT7 (Ambion, Austin, TX USA). El ARN producido se purificó mediante precipitación en LiCl, extracción con fenol/cloroformo y precipitación en acetato de amonio. Finalmente, el ARN purificado se resuspendió en tampón para inyección (NaCl 150 mM, HEPES 10 mM) a una concentración de 0,5 mg/ml.

25 *Medios y cultivo celular*

Se cultivaron células P815 y P13.1 en RPMI 1640 (Bio-Whittaker, Verviers, Bélgica) complementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (FCS) (PAN systems, Alemania), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin.

Se mantuvieron cultivos de CTL en un medio RPMI 1640 complementado con un 10% FCS, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin, beta-mercaptoetanol 0,05 μ M, 50 mg/ml de gentamicina, aminoácidos no esenciales MEM (100 x) y piruvato de sodio 1 mM. Los CTL se reestimularon durante una semana con 1 mg/ml de proteína de beta-galactosidasa (Sigma, Taufkirchen, Alemania). El cuarto día se retiraron cuidadosamente con una pipeta 4 ml del sobrenadante del cultivo y se sustituyeron por un medio fresco que contenía 10 U/ml de rIL-2 (concentración final).

Inmunización

3 ratones BALB/c por grupo se anestesiaron vía intraperitoneal con 20 mg de pentobarbital/ratón. Después, en ambas orejas de los ratones se inyectaron vía intradérmica 25 mg de ARNm codificador de beta-galactosidasa (beta-Gal) en tampón de inyección (NaCl 150 mM, HEPES 10 mM). En algunos casos se inyectó adicionalmente factor de estimulación de colonia de granulocitos macrófagos (GM-CFS) 24 horas o 2 horas antes de la inyección de ARN o 24 horas después de la misma, en el mismo lugar o en un sitio de inyección diferente (en la oreja o subcutánea en el lomo). Como control positivo, a algunos animales se les inyectaron, en cada caso vía intradérmica, en las dos orejas 10 mg de un ADN plásmido codificador de beta-Gal en PBS. Como control positivo se utilizó un grupo de animales a los que sólo se les administró tampón de inyección vía intradérmica en las dos orejas. Dos semanas después de la primera inyección se administró una inyección de refuerzo en cada caso del mismo modo que la primera inyección. Dos semanas después de la inyección de refuerzo se tomaron muestras de sangre, los ratones fueron sacrificados y se les extirpó el bazo.

Ensayo de liberación de ⁵¹Cr

Los esplenocitos obtenidos del bazo se estimularon *in vitro* con proteína beta-Gal y 6 días después se determinó la actividad de CTL utilizando un ensayo estándar de ⁵¹Cr de 6 horas tal como se describe en Rammensee y col. (1989) Immunogenetics 30:296-302. En resumen, las células dianas se marcaron con ⁵¹Cr y se cargaron con el péptido TPHPARIGL durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación conjunta de células efectoras y células diana (con tres relaciones diferentes en cada caso células efectoras:células diana = 200, 44 y 10) en placas redondas de 96 pocillos durante 6 horas, se dispusieron con pipeta 50 ml de 200 ml de sobrenadante de cultivo en una placa de escintilación Luma (Packard) de 96 pocillos y, después del secado, se midió la radiactividad con un contador de escintilación (1405 Microbeta Plus). La liberación específica porcentual se determinó a partir de la cantidad de ⁵¹Cr liberado en el medio (A) menos la liberación espontánea (B) dividido por la liberación total (C) (utilizando Triton X-100) menos la liberación espontánea (B): porcentaje de lisis específica = 100 (A-B)/(C-B).

65 *ELISA de citoquina*

Cuatro días después de la reestimulación con proteína beta-Gal, el sobrenadante del cultivo de esplenocitos se retiró con pipeta y se guardó a -50°C hasta su utilización. Sobre unas placas MaxiSorb (Nalge Nunc InteARNtional, Nalge,

Dinamarca) se dispusieron con una pipeta a lo largo de la noche, a 4°C, 100 ml de anticuerpo captador antirratón-anti-IFN-gamma o -IL-4 (Becton Dickenson, Heidelberg, Alemania) a una concentración de 1 mg/ml en tampón de revestimiento (0,02% NaN₃, Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 15 mM, BH 9,6). Después de tres lavados con tampón de lavado (0,05% Tween 20 en PBS), las placas se saturaron con 200 ml de tampón de bloqueo (0,05% Tween 20, 1% BSA en PBS) durante 2 horas a 37°C. Después de tres lavados con tampón de lavado, 100 ml del sobrenadante del cultivo celular se incubaron durante 5 horas a 37°C. A continuación las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado y se añadieron con pipeta 100 ml de anticuerpo de detección antirratón-anti-IFN-gamma o -IL-4 (Becton Dickenson, Heidelberg, Alemania) por pocillo a una concentración de 0,5 mg/ml en tampón de bloqueo, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados con tampón de lavado, se añadieron a cada pocillo 100 ml de una dilución 1/1.000 de Spreptavidin-HRP (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron tres veces con el tampón de lavado y dos veces con agua bidestilada. A continuación se añadieron a cada pocillo 100 ml del sustrato de ABTS. Después de 15 - 30 minutos a temperatura ambiente se midió la extinción a 405 nm con un lector Sunrise-ELISA (Tecan, Crailsheim, Alemania).

15 *ELISA de anticuerpos*

Dos semanas después de la inyección de refuerzo se tomó sangre de los ratones a través de la vena orbital y se preparó suero sanguíneo. Sobre unas placas Maxisorb (Nalge Nunc InteARNtional, Nalge, Dinamarca) se dispusieron con pipeta, durante 2 horas a 37°C, 100 ml de proteína beta-Gal a una concentración de 100 mg/ml en un tampón de revestimiento (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5). Después, las placas se lavaron tres veces con 200 ml de tampón de lavado (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, EDTA 0,01 M, 0,1% Tween 20, 1% BSA, pH 7,4) y se saturaron con proteína con 200 ml de tampón de lavado a lo largo de la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con el tampón de lavado y se añadieron sueros sanguíneos a una dilución de 1/10, 1/30 ó 1/90 en tampón de lavado. Después de 1 hora a 37°C, las placas se lavaron tres veces con el tampón de lavado y se añadieron 100 ml de diluciones 1/1.000 de anticuerpos cabra-antirratón-IgG1 o -IgG2a (Caltag, Burlington, CA, USA). Después de 1 hora a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado y se añadieron 100 ml de sustrato de ABTS a cada pocillo. Después de 15 - 30 minutos a temperatura ambiente, se midió la extinción a 405 nm con un lector Sunrise-ELISA (Tecan, Crailsheim, Alemania).

30 *Resultados y discusión*

Se comprobó que la inyección directa de ARN codificador de beta-galactosidasa en la oreja de ratones provoca una respuesta inmune anti-beta-galactosidasa esencialmente de tipo Th2: en esplenocitos estimulados con beta-galactosidasa procedentes de ratones a los que se les había inyectado ARN codificador de beta-galactosidasa se constata una producción de inmunoglobulinas anti-beta-galactosidasa de tipo IG1 (Figura 3A) y una secreción de IL-4 (Figura 2 B). Para aumentar la eficiencia de la vacuna de ARN, se administró adicionalmente la citoquina GM-CFS. Esta citoquina aumenta la eficiencia de algunas vacunas de ADN. Además se comprobó que el momento de la inyección de GM-CFS en comparación con la inyección de ADN influye en el tipo de la respuesta inmune (Kusakabe (2000) J. Immunol. 164: 3102-3111). De acuerdo con la invención se comprobó que la GM-CFS puede reforzar la respuesta inmune provocada por una vacunación con ARN. La inyección de GM-CFS un día antes de la inyección de ARN apenas influye en la intensidad o en el tipo de la respuesta inmune. En cambio, la inyección de GM-CFS 2 horas antes de la inyección del ARN refuerza la respuesta inmune (véase en la Figura 2 la liberación de IL-4 correspondiente a los 2 ratones a los que se les había inyectado GM-CFD en el tiempo T = 0), pero no influye en la polaridad de Th2. Sin embargo, si se inyecta GM-CFS un día después de la vacuna de ARN en el mismo lugar o en un lugar diferente (no mostrado), no sólo se refuerza la respuesta inmune en conjunto (véase la respuesta de anticuerpos en la Figura 3), sino que la respuesta inmune se polariza al tipo Th1 (véase la producción de IFN-gamma por esplenocitos estimulados con proteína beta-Gal en la Figura 2A, la producción de anticuerpos IgG2a contra beta-Gal en la Figura 3B y la producción de CTL activados en la Figura 1). La inyección de GM-CFS unos minutos o unas horas después de la inyección de ARN debería tener el mismo efecto (refuerzo y polarización) en la respuesta inmune.

50 *Ejemplo 3*

Efecto del inhibidor de ARNasa en la expresión de ARNm in vivo

Un ARNm desnudo o asociado o complejado con protamina codificador de beta-galactosidasa (preparado tal como se indica en el Ejemplo 2) se inyectó en el pabellón auricular de ratones en una cantidad de 25 mg de ARN en tampón de inyección (NaCl 150 mM, HEPES 10 mM). A otros ratones se les inyectó el ARNm codificador de beta-galactosidasa junto con 10 U del inhibidor de ARNasa ARNsin (un inhibidor de ARNasa enzimático extraído de páncreas, adquirible en Roche o Promega). El inhibidor de ARNasa se mezcló directamente con la solución de ARN antes de la inyección. Doce horas después se cortaron las orejas a los ratones. Se prepararon secciones microscópicas de los pabellones auriculares, que se tiñeron con X-Gal. La inyección de ARNm desnudo o asociado con protamina conduce a una actividad detectable de beta-galactosidasa en unas pocas células de las secciones microscópicas correspondientes (células azules en las Figuras 5 y 6). Por consiguiente, algunas células han absorbido el ARN exógeno y lo han traducido a la proteína. Cuando el ARNm codificador de beta-galactosidasa estaba protegido con el inhibidor de ARNasa ARNsin se observaban muchas más células azules que en el caso del ARN desnudo o asociado con protamina (Figura 7). Dado que el ARNsin inhibe las ARNasas, la vida media de las moléculas de ARNm inyectadas se prolonga *in vivo* en los lugares en los que el entorno (tejido intersticial) está contaminado con ARNasas. Esta estabilización del ARN conduce a una mayor absorción por las células del entorno y, con ello, a un refuerzo de la expresión de la

ES 2 298 418 T3

proteína codificada por el ARN exógeno. Por consiguiente, este fenómeno también se puede utilizar para reforzar una respuesta inmune contra un antígeno codificado por el ARNm inyectado.

Ejemplo 4

5 Vacunación con ARN en caso de pacientes con enfermedades malignas

Introducción

10 Los linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocen antígenos como péptidos cortos (8-9 aminoácidos) que son expresados en la superficie celular unidos a glicoproteínas MHC de clase I (1). Estos péptidos son fragmentos de moléculas albuminoides intracelulares. Sin embargo, existen indicios de que también existen antígenos absorbidos de forma exógena por macropinocitosis o fagocitosis, que pueden conducir a la respuesta inmune dependiente de células T CD8⁺. Las proteínas se disocian en proteosomas. Los péptidos formados en este proceso son transportados desde el citosol hasta el lumen del retículo endoplasmático y se unen a moléculas MHC de clase I.

Las proteínas así procesadas son transportadas en forma de complejo de péptido/MHC-clase I a la superficie de la célula y presentadas a los CTL. Este proceso tiene lugar en cada célula, lo que permite al sistema inmunitario un control preciso de cada célula individual en cuanto a la presencia de proteínas exógenas o de proteínas modificadas o embrionales, independientemente de si proceden de gérmenes patógenos intracelulares, oncogenes o genes desregulados. De este modo, los linfocitos citotóxicos puede reconocer y lisar células infectadas o neoplásicas (2, 3).

Estos últimos años se ha logrado aislar diferentes antígenos asociados a tumores (TAA) y péptidos que son reconocidos por CTL y que, en consecuencia, conducen a la lisis de células tumorales (21-27). Estos TAA pueden estimular células T e inducir CTL específicos de antígenos cuando son expresados en forma de complejo de molécula HLA y péptido en células presentadoras de antígeno (APC).

En numerosos estudios realizados principalmente en pacientes con melanoma maligno se ha demostrado que, con el avance de la enfermedad tumoral, las células malignas pierden la expresión de TAA. Algo parecido se observa en la vacunación con antígenos tumorales individuales. En las terapias de vacunación también se puede producir una selección de células tumorales, lo que permite eludir el sistema inmunitario y una progresión de la enfermedad a pesar de la terapia. La utilización de varios antígenos tumorales diferentes, como está previsto en el plan de tratamiento según la invención del presente ejemplo, ha de evitar una selección de células tumorales y, con ello, que las células malignas eludan el sistema inmunitario por pérdida de antígenos.

Recientemente se ha desarrollado un método con el que se pueden transfectar DC con ARN de un plásmido que codifica un antígeno tumoral (Nair y col., 1998, Nair y col., 2000). La transfección de DC con ARN para CEA o telomerasa condujo a la inducción de CTL específicos de antígenos. Este procedimiento permite inducir CTL y linfocitos T coadyuvantes contra varios epítopes en diferentes moléculas HLA de un antígeno tumoral. Otra ventaja de esta estrategia consiste en el hecho de que no requiere previamente la caracterización de los antígenos tumorales o epítopes, ni la definición del haplotipo de HLA del paciente. Mediante una vacuna polivalente de este tipo se podrían reducir claramente las probabilidades de la aparición de los llamados fenómenos de “tumor escape” clonales. Además, mediante este planteamiento se podrían inducir respuestas inmunes dependientes de células T contra antígenos procesados y presentados de forma natural, eventualmente con mayor inmunodominancia. La respuesta inmune específica de tumor inducida se podría reforzar y mantener durante más tiempo mediante la participación adicional de epítopes restringidos por MHC de clase II.

Más abajo se muestra un ejemplo de un esquema de tratamiento según la invención para la vacunación tumoral de pacientes con enfermedades malignas avanzadas (carcinomas de mama, de ovario, colonrectal, de páncreas y de células renales). Un ARN preparado a partir de plásmidos codificadores de los antígenos tumorales MUC1, Her-2/neu, telomerasa y MAGE-1 y también proteína de matriz de gripe (IMP) (control positivo) se administró vía intradérmica a pacientes con las enfermedades malignas arriba mencionadas. De este modo se posibilita una inducción de CTL *in vivo* para evitar la progresión de la enfermedad o para provocar una reversión de la misma. Los antígenos tumorales mencionados son expresados en las células malignas de carcinomas de mama, de ovario, colonrectal, de páncreas y de células renales.

De acuerdo con el plan de tratamiento (véanse las siguientes explicaciones al respecto y también la Figura 9), las especies de ARN preparadas en el laboratorio, que codifican CEA, MUC1, Her-2/neu, telomerasa, Mage-1 e IMP, son administradas vía intradérmica a los pacientes, en primer lugar, 4 veces los días 0, 14, 28 y 42. Además, a los pacientes se les administra vía subcutánea GM-CSF (Leucomax[®], 100 µg/m², Novartis/Essex Pharma) en cada caso un día después de la vacunación con ARN.

El tratamiento según la invención consiste en una carga de inmunización que sólo requiere intervenciones mínimas en el paciente (inyección). La terapia es ambulatoria y es adecuada para muchos pacientes de tumores sin limitarse a determinados tipos de HLA o epítopes de células T definidos. Además, mediante esta terapia se pueden inducir coadyuvantes T CD4⁺ policlonales y también CTL CD8⁺.

ES 2 298 418 T3

Plan de tratamiento

A los pacientes se les administran los ARN codificadores de varios antígenos tumorales (MUC1, Her-2/neu, telomerasa, MAGE-1) y de un antígeno control, la proteína de matriz de gripe (IMP, antígeno viral), vía intradérmica, los días 0, 14, 28 y 42. Además, los pacientes reciben vía subcutánea GM-CSF (Leucomax[®] (100 µg/m²) Novartis/Essex Pharma) en cada caso un día después de la vacunación con ARN. En caso de una evolución estable de la enfermedad o de una respuesta objetiva del tumor (remisión completa (CR) o remisión parcial (PR)), los pacientes opcionalmente reciben la vacunación vía subcutánea una vez al mes. Después de la cuarta inyección (día 49), la respuesta del tumor se evalúa por radiología, química de laboratorio y/o sonografía, y también se evalúan los fenómenos inmunológicos inducidos por la terapia.

A partir del día 70, la terapia de inmunización continúa a intervalos de 4 semanas.

Los días 0, 14, 28, 42 y 49 se toman muestras de sangre para laboratorio, Diff-BB, análisis FACS y citoquinas (en total 50 ml). El reestadiaje del paciente se realiza a partir del día 49 y después, si es el caso, cada 4 a 8 semanas.

El plan de tratamiento está representado esquemáticamente en la Figura 9.

Laboratorio: Coagulación, electrolitos, LDH, β2-M, CK, enzimas hepáticas, bilirrubina, creatinina, ácido úrico, albúmina total, coagulación, CRP, marcadores tumorales (Ca 12-5, Ca 15-3, CEA, Ca 19-9): 15 ml sangre

Diff-BB: Fórmula leucocitaria con frotis (5 ml EDTA-sangre)

Citoquinas: 10 ml suero

FACS: 10 ml heparina-sangre

ELIspot: 20 ml heparina-sangre

Multitest: Análisis de la reacción DTH

DTH: (En inglés: “delayed type hypersensitivity”, reacción dependiente de células T retardada) Análisis de la reacción al ARN administrado vía intradérmica. En caso de reacción DTH positiva se ha de realizar adicionalmente una biopsia cutánea (para ello no se requiere anestesia local).

Preparación de ARN a partir de plásmidos

Para la producción de una vacuna basada en ARNm sólo se requieren precursores sintetizados químicamente y precursores purificados de bacterias. Preferentemente, esto se lleva a cabo en una unidad de producción de ARN con equipamiento especial. Ésta se encuentra en un espacio cerrado declarado como zona libre de ARNasa, es decir, en él no se pueden realizar trabajos con ARNasa (por ejemplo la purificación de plásmidos). Además, constantemente se comprueba la contaminación con ARNasas naturales. Este espacio está equipado con aparatos nuevos (refrigeradores a 4°C y -20°C, bloque térmico, banco estéril, centrífuga, pipetas) que nunca han sido utilizados para trabajos biológicos o clínicos. Esta unidad de producción de ARN se utiliza exclusivamente para la producción enzimática (transcripción *in vitro*) de ARNm (excluyendo los trabajos bacterianos, virales o de cultivo celular). El producto final incluye una solución de ARN estéril en tampón HEPES/NaCl. En un gel de formaldehído-agarosa se llevan a cabo análisis de calidad. Además, la concentración de ARN y la proporción de proteínas se determinan por fotometría ($OD_{320} < 0,1$; relación $OD_{260}/OD_{280} > 1,8$ con ARN puro). En el ensayo LAL se analiza la posibilidad de contaminación por LPS. Todas las muestras de ARN se someten a filtración estéril antes de ser administradas.

Constructos de plásmido

Los genes elegidos (CES, Mucin1, Her-2/neu, telomerasa, Mage-A1 y matriz de gripe) se amplifican por PCR empleando enzimas termoestables de alto rendimiento (pfu, Stratagene). Los genes proceden de ADNc tumoral (Mucin1, Her-2/neu, telomerasa) o han sido clonados en vectores bacterianos (matriz de gripe y MAGE-A1). Los fragmentos de PCR se cortan con enzimas de restricción (Mucin1: BglII-SpeI; Her-2/neu: HinDIIIblunt-SpeI; telomerasa: BglII-SpeI; MAGE-A1: BamHI-SpeI; proteína de matriz de gripe: BglII-SpeI) y el plásmido T7TS (véase la Figura 8) se clona a través de los sitios de restricción BglII y SpeI. Mediante el Endo-free Maxipreparation Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) se obtienen plásmidos de alta pureza. La secuencia del vector se controla y documenta a través de una secuenciación de cadena doble del promotor T7 hasta el sitio PstI. Para la transcripción *in vitro* se utilizan los plásmidos cuya secuencia genética insertada es correcta y no presenta mutaciones (Control sobre las secuencias publicadas: números de acceso: M11730 para Her-2/neu, NM_002456 para MUC1, NM_003219 para telomerasa TERT, V01099 para matriz de gripe y M77481 para MAGE-A1.)

ES 2 298 418 T3

Transcripción in vitro

Producción de ADN lineal libre de proteínas

5 500 μg de cada plásmido se linealizan en un volumen de 0,8 ml mediante digestión con la enzima de restricción PstI en un recipiente de reacción Eppendorf de 2 ml. Este constructo cortado se lleva a la unidad de producción de ARN. Al ADN linealizado se le añade 1 ml de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. El recipiente de reacción se somete a vórtice durante 2 minutos y se centrifuga durante 3 minutos a 15.000 rpm. Después se retira la fase acuosa y se mezcla con 0,7 ml de 2-propanol en un recipiente de reacción de 2 ml. Este recipiente se centrifuga durante 15 minutos a 15.000 rpm, el sobrenadante se desecha y se añade 1 ml de etanol al 75%. El recipiente de reacción se centrifuga durante 10 minutos a 15.000 rpm y se retira el etanol. El recipiente se centrifuga de nuevo durante 2 minutos y los restos de etanol se retiran con una jeringa de microlitro. La pella de ADN se disuelve después a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en agua libre de ARNasa.

15 *Síntesis enzimática del ARN*

En un tubo Falcon de 50 ml se prepara la siguiente mezcla de reacción: 100 μg de ADN linealizado libre de proteínas, 1 ml 5x tampón (Tris-HCl 200 mM (pH 7,9), MgCl_2 30 mM, espermidina 10 mM, NaCl 50 mM, DTT 50 mM), 200 μl de inhibidor de ribonucleasa (ARNasa) (recombinante, 5.000 U), 1 ml de rNTP-Mix (ATP, CTP, UTP, en cada caso 10 mM; GTP 2 mM), 1 ml de análogo CAP (8 mM), 150 μl polimerasa T7 (3.000 U) y 2,55 ml de agua libre de ARNasa. El volumen total es de 5 ml. La mezcla se incuba durante 2 horas a 37°C. Después se añaden 100 U de ADNasa libre de ARNasa, y la mezcla se incuba de nuevo durante 30 minutos a 37°C. La matriz de ADN se descompone enzimáticamente en este proceso.

25 *Descripción y procedencia de los componentes individuales*

Polimerasa T7: purificada a partir de una cepa de *E. coli* que contiene un plásmido con el gen para la polimerasa. Esta ARN-polimerasa utiliza como sustrato únicamente secuencias promotoras del fago T7; firma Fermentas.

30 NTP: sintetizado químicamente y purificado a través de HPLC. Pureza por encima del 96%; firma Fermentas.

Análogo CAP: sintetizado químicamente y purificado a través de HPLC. Pureza por encima del 90%; Institut für Organische Chemie de la Universidad de Tübingen.

35 Inhibidor de ARNasa: ARNsin, para inyección, producido de forma recombinante (*E. coli*); firma Promega.

ADNasa: Pulmozym® (“dornase alfa”); firma Roche.

40 *Purificación*

El ARN tratado con ADNasa se mezcla con 20 ml de una solución de 3,3 ml de NH_4OAc 5M más 16,65 ml de etanol. La mezcla se incuba durante 1 hora a -20°C y se centrifuga durante 1 hora a 4.000 rpm. Después se retira el sobrenadante y la pella se lava con 5 ml de etanol libre de ARNasa al 75%. El recipiente se centrifuga de nuevo a 4.000 rpm durante 15 minutos y se retira el sobrenadante. El recipiente se vuelve a centrifugar bajo las condiciones arriba indicadas y el etanol restante se retira con una jeringa de microlitro. A continuación se abre el recipiente de reacción y la pella se seca bajo un banco estéril en el entorno estéril.

Al ARN seco se le añade 1 ml de agua libre de ARNasa. La pella se incuba a 4°C durante como mínimo 4 horas. Dos μl de la solución acuosa se someten a un análisis cuantitativo (determinación de la absorción UV a 260 nm). A 1 ml de solución acuosa de ARN se añaden 2 ml de una solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. La mezcla se somete a vórtice durante 2 minutos y se centrifuga durante 2 minutos a 4.000 rpm. La fase acuosa se retira con una pipeta de microlitro y se traslada a otro recipiente de reacción. Después se añaden 4 ml de una solución de 0,66 ml de NH_4OAc 5M más 3,33 ml de etanol. La mezcla se incuba durante 1 hora a -20°C y se centrifuga durante 1 hora a 4.000 rpm. El sobrenadante se retira y la pella se lava con etanol libre de ARNasa al 75%. El recipiente se centrifuga de nuevo durante 15 minutos a 4.000 rpm y se retira el sobrenadante. El recipiente se vuelve a centrifugar bajo las condiciones arriba indicadas y el etanol restante se retira con una jeringa de microlitro. A continuación se abre el recipiente de reacción y la pella se seca bajo un banco estéril en el entorno estéril.

El ARN se disuelve en agua libre de ARNasa y se ajusta a una concentración de 10 mg/ml. La solución se incuba durante 12 horas a 4°C. Mediante adición de tampón de inyección (NaCl 150 mM, HEPES 10 mM) se llega a una concentración final de 2 mg/ml. Preferentemente, el producto final se somete a filtración estéril bajo condiciones GMP antes de su uso.

65 *Administración del ARN*

Cada paciente recibe en dos lugares diferentes una inyección intradérmica (i.d.) de 150 μl de la solución de inyección, que contiene en cada caso 100 μg de ARNm codificador de antígeno (CEA, Her-2/neu, MAGE-A1, Mucin 1, telomerasa, proteína de matriz de gripe).

ES 2 298 418 T3

Después de la inmunización primaria se lleva a cabo una inmunización de refuerzo cada 14 días, para repetir después las vacunaciones a intervalos de un mes. En cada caso, un día después de la inyección de ARN se administra adicionalmente a los pacientes GM-CSF (Leucomax[®], Sandoz/Essex Pharma) vía subcutánea (s.c.).

5 Si se produce una respuesta clínica o una estabilización de la enfermedad, esta terapia se continúa a intervalos de un mes.

Otros análisis inmunológicos in vitro (opcional)

10 Análisis por citometría de flujo de PMBC para cuantificar precursores de CTL;

ensayo de liberación de ⁵¹Cr;

nivel de receptores solubles y citoquina en el suero;

15

reacción DTH (reacción cutánea al ARN inyectado vía intradérmica, “delayed type hypersensitivity”, reacción dependiente de células T); y

muestras de biopsia cutánea del sitio de inyección para análisis histológico de infiltración de células T (patología).

20

Parámetros para la evaluación de la eficacia

Para poder responder a la cuestión de la eficacia de esta terapia inmunológica se recurre a la inducción de células T específicas de tumor y a una remisión mensurable del tumor. Como parámetros se utilizan reacciones de células T medidas *in vitro* e *in vivo* y también las variaciones de tamaño de manifestaciones tumorales registrables en dos dimensiones o parámetros de desarrollo de química de laboratorio.

25

La remisión objetiva se define como la mejor respuesta en forma de remisión completa o parcial, correspondientemente a los criterios indicados más abajo. La tasa de remisión se calcula a partir de la relación entre la cantidad de pacientes con remisión objetiva y la cantidad total de pacientes evaluados.

30

Como respuesta inmunológica a la terapia se evalúa un cambio en el estado inmunitario, determinado por tipificación inmunitaria de células mononucleares periféricas, un aumento de la frecuencia de precursores de CTL específicos de antígeno en sangre periférica y la inducción de una actividad continua de células T específicas de tumor. Para ello se establecen cultivos de inducción *in vitro* para activar CTLs específicos tumorales.

35

Criterios de remisión (según UICC)

Remisión completa (CR): Reversión completa de todas las manifestaciones tumorales mensurables, documentada mediante 2 análisis de control separados por un intervalo de tiempo de como mínimo 4 semanas.

40

Remisión parcial (PR): Disminución de la magnitud de la suma de las medidas de superficie (producto de dos diámetros de tumores o medida lineal de lesiones mensurables de modo unidimensional de todos los diagnósticos tumorales en un 50% durante como mínimo 4 semanas). Sin aparición de nuevas manifestaciones tumorales ni progresión de diagnósticos tumorales.

45

“No Change” (NC)
(sin cambios):

50

Reducción de todas las manifestaciones tumorales mensurables en menos de un 50% o aumento de un diagnóstico tumoral.

Progresión (PD):

55

Aumento de la magnitud de los parámetros tumorales como mínimo en un foco o aparición de una nueva manifestación tumoral.

Referencias

1. **Rammensee HG, Falk K, Rotzschke O:** Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 11: 213, 1993.

60

2. **Bevan M.J:** Antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes *in vivo*. *J Exp Med* 182: 639, 1995.

3. **Rock K.L:** A new foreign policy: MHC class I molecules police the outside world. *Immunol Today* 17: 131, 1996.

65

4. **Steinman, A.M:** The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol* 9: 271, 1991.

5. **Steinman RM, Witmer-Pack M, Inaba K:** Dendritic cells: antigen presentation, accessory function and clinical relevance. *Adv Exp Med Biol* 329: 1, 1993.
6. **Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM:** Dendritic cells pulsed with protein antigens *in vitro* can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells *in situ*. *J Exp Med* 172: 631, 1990.
7. **Austyn JM:** New insight into the mobilisation and phagocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 183: 1287, 1996.
8. **Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livingstone AM, Fathman CG, Steinman RM:** Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. *J Exp Med* 169: 1169, 1989.
9. **Nair S, Zhou F, Reddy R, Huang L, Rouse BT:** Soluble proteins delivered to dendritic cells via pH-sensitive liposomes induce primary cytotoxic T lymphocyte responses *in vitro*. *J Exp Med* 175: 609, 1992.
10. **Cohen PJ, Cohen PA, Rosenberg SA, Katz SI, Mule JJ:** Murine epidermal Langerhans cells and splenic dendritic cells present tumor-associated antigens to primed T cells. *Eur J Immunol* 24: 315, 1994.
11. **Porgador A, Gilboa E:** Bone-marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 182: 255, 1995.
12. **Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, M.T. Lotze MT, and L.D. Falo LD:** Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific, CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med* 183: 283, 1996.
13. **Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, Lotze MT, Storkus WJ:** Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, ant T helper cell 1-associated cytokines. *J Exp Med* 183: 87, 1996.
14. **Porgador A, Snyder D, Gilboa E:** Induction of antitumor immunity using bone marrow-generated dendritic cells. *J Immunol* 156: 2918, 1996.
15. **Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, Colombo MP:** Murine dendritic cells loaded *in vitro* with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen *in vivo*. *J Exp Med* 183: 317, 1996.
16. **Brossart P, Goldrath AW, Butz EA, Martin S, Bevan MJ:** Adenovirus mediated delivery of antigenic epitopes into DC by a means of CTL induction. *J Immunol* 158: 3270, 1997.
17. **Fisch P, Köhler G, Garbe A, Herbst B, Wilder D, Kohler H, Schaefer HE, Mertelsmann R, Brugger W, Kanz L:** Generation of antigen-presenting cells for soluble protein antigens *ex vivo* from peripheral blood CD34 + hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Eur J Immunol* 26: 595, 1996.
18. **Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A:** Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the Major Histocompatibility Complex class II compartment: Down regulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182: 389, 1995.
19. **Bernhard H, Disis ML, Heimfeld S, Hand S, Gralow JR, Cheever MA:** Generation of immunostimulatory dendritic cells from human CD34 + hematopoietic progenitor cells of the bone marrow and peripheral blood. *Cancer Res* 55: 1099, 1995.
20. **Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engelman EG, Levy R:** Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2: 52, 1996.
21. **Robbins PF, Kawakami Y:** Humoral tumor antigens recognized by T cells. *Curr Opin Immunol* 8: 628, 1996.
22. **Linehan DC, Goedegebuure PS, Peoples GE, Rogers SO, Eberlein TJ:** Tumor-specific and HLA-A2 restricted cytotoxicity by tumor-associated lymphocytes in human metastatic breast cancer. *J Immunol* 155: 4486, 1995.
23. **Peoples GE, Goedegebuure PS, Smith R, Linehan DC, Yoshino I, Eberlein TJ:** Breast and ovarian cancer specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER-2/neu derived peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 432, 1995.
24. **Fisk B, Blevins TL, Wharton JT, Ioannides CG:** Identification of an immunodominant peptide of HER-A/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J Exp Med* 181: 2109, 1995.
25. **Brossart P, Stuhler G, Flad T, Stevanovic S, Rammensee H-G, Kanz L and Brugger W.** HER-2/neu derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by *in vitro* induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res*. 58: 732-736, 1998.

ES 2 298 418 T3

26. **Apostolopoulos, V. and McKenzie, I.F.C.**, Cellular mucins: targets for immunotherapy. *Crit. Rev. Immunol.* 14: 293-302, 1995.

27. **Brossart P, Heinrich KS, Stevanovic S, Stuhler G, Behnke L, Reichardt VL, Muhm A, Rammensee H-G, Kanz L, Brugger W.** Identification of HLA-A2 restricted T cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable cancer vaccines. *Blood* 93: 4309-4317, 1999.

28. **Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W.** Induction of CTL responses *in vivo* after vaccinations with peptide pulsed dendritic cells. *Blood* 96:3102-8, 2000.

29. **Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zöller G, Zobywalski A, Brossart P, Trefzer U, Ulrich S, Müller CA, Becker V, Gross AJ, Hemmerlein B, Kanz L, Müller GA, Ringert RH.** Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nature Med* 3: 332-336, 2000 (IF 25,58).

30. **Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D** (1998) Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 4:328.

31. **Schuler-Thurner B, Dieckmann D, Keikavoussi P, Bender A, Maczek C, Jonuleit H, Roder C, Haendle I, Leisgang W, Dunbar R, Cerundolo V, von Den DP, Knop J, Brocker EB, Enk A, Kampgen E, Schuler G** (2000) Mage-3 and influenza-matrix peptide-specific cytotoxic T cells are inducible in terminal stage HLA-A2.1 + melanoma patients by mature monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 165:3492.

32. **Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von Den DP, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G** (1999) Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J. Exp. Med.* 190: 1669.

Ejemplo 5

Vacunación con ARN tumoral autólogo amplificado en caso de pacientes con melanoma maligno

Introducción

La incidencia del melanoma maligno ha aumentado mucho en todo el mundo en los últimos años. Si en el momento del establecimiento del diagnóstico la enfermedad por melanoma ya está en estadio de metástasis, actualmente no existe ninguna terapia que influya positivamente con seguridad suficiente en la evolución posterior de la enfermedad.

Las terapias de vacunación realizadas hasta la fecha utilizando células dendríticas requieren mucho trabajo de laboratorio, elevados costes y mucho tiempo debido a la complejidad de cultivo de las células (condiciones GMP). Además, hasta ahora los estudios se han concentrado predominantemente en antígenos asociados a tumores (TAA) conocidos, por ejemplo Melan-A o tirosinasa.

Una serie de fenómenos inmunológicos diferentes, entre otros la aparición de regresiones tumorales espontáneas o la involución espontánea de metástasis, han hecho del melanoma el candidato prioritario para la prueba de análisis inmunoterapéuticos (Parkinson y col., 1992). Además de los ensayos de estimulación no específica del sistema inmune mediante interleuquina-2, extractos de muérdago, BCG e interferones, que hasta la fecha no han conducido a ningún progreso decisivo en la terapia de enfermedades tumorales avanzadas, estos últimos años se ha seguido principalmente la estrategia de la inducción de diferentes linfocitos T citotóxicos (CTL) altamente específicos. Estos CTLs son capaces de reconocer y matar células de melanoma autólogas (Boon y col., 1994; Houghton, 1994). El resultado de la investigación de este proceso indica que los CTLs reconocen péptidos definidos junto con moléculas MHG de clase I. La presentación de péptidos por células presentadoras de antígeno (APC) es la vía fisiológica para la generación de respuestas inmunes específicas por linfocitos (Rammensee, 1993). Las células dendríticas han resultado ser potentes células presentadoras de antígeno que conducen a una inducción de la respuesta inmune por dos vías: la primera consiste en la presentación directa de péptidos frente a linfocitos T CD8⁺ y la activación de los mismos (Schuler & Steinmann, 1985; Inaba y col., 1987; Romani y col., 1989), la segunda consiste en la generación de una respuesta inmune protectora mediada por linfocitos coadyuvantes CD4⁺, que supone una presentación de péptidos a través de moléculas MHG de clase II (Grabbe y col., 1991, 1992, 1995).

De este modo, mediante el análisis de péptidos se han podido identificar diferentes antígenos asociados a tumores (TAA) que son específicos para el melanoma y que, después de la presentación junto con la molécula MHC y reconocimiento por los CTLs, conducen a la citólisis de las células tumorales (Schadendorf y col., 1997, páginas 21-27).

En el marco de un estudio piloto con pacientes de melanoma se ha ensayado la utilización de células dendríticas autólogas en cuanto a su potencial para inducir linfocitos T citotóxicos de forma eficaz, rápida y segura. En este estudio, 16 pacientes de melanoma en estadio IV que ya habían sido tratados previamente con quimioterapia fueron vacunados con células dendríticas cargadas con péptidos. La tasa de respuesta fue de más del 30% (5/16 pacientes)

(Nestle y col., 1998). En otro estudio independiente se pudo demostrar una tasa de respuesta aun mayor, superior al 50% (6/11 pacientes), después de la inmunización de pacientes de melanoma, que ya habían sido tratados previamente con quimioterapia, con células dendríticas cargadas con MAGE-3A1 (Thurner y col., 1999). Además, en 8/11 pacientes se observó una expansión significativa de células T CD8⁺ específicas de MAGE-A3. En algunos casos, después de la
 5 vacunación con DC se produjo una regresión de las metástasis. Ésta fue acompañada de una infiltración de células T CD8⁺. Esto demostró que las células T inducidas eran activas *in vivo*. Una desventaja de esta estrategia consiste en los elevados costes y esfuerzos de técnica de laboratorio que exige (en particular condiciones GMP). Para la generación de las DC, que requiere mucho tiempo, se necesitan grandes cantidades de sangre del paciente. En la preparación de los péptidos sólo se puede recurrir a antígenos asociados a tumores conocidos y, además, dependiendo del haplotipo
 10 de HLA se requieren diferentes péptidos.

Un perfeccionamiento de esta propuesta consiste en la vacunación con DC transfectadas con ARN (Nair y col., 1998, Nair y col., 2000). Desde entonces, numerosos estudios prueban que DCs de ratón y humano previamente transfectadas con ARNm pueden provocar una respuesta eficaz de CTL *in vitro* e *in vivo* y pueden conducir a una clara
 15 reducción de las metástasis (Boczkowski y col., 1996, 2000; Ashley y col., 1997; Nair y col., 1998, 2000; Heiser y col., 2001; Mitchell y Nair, 2000; Koido y col., 2000; Schmitt y col., 2001). Una gran ventaja de la utilización de ARN frente a los péptidos consiste en que a partir de un ARNm codificador de un TAA se pueden procesar y presentar los péptidos más diversos. Mediante una vacuna polivalente de este tipo se pueden reducir notablemente las probabilidades de aparición de los llamados fenómenos de “tumor escape” clonales. Además, mediante este planteamiento se pueden
 20 inducir respuestas inmunes dependientes de células T contra antígenos procesados y presentados de forma natural con una inmunodominancia potencialmente mayor. La respuesta inmune específica tumoral inducida se puede reforzar y mantener durante más tiempo mediante la participación adicional de epítopes restringidos por MHC de clase II. Sin embargo, este procedimiento también se puede realizar únicamente con un gran gasto de laboratorio (condiciones GMP) debido a la necesidad de cultivar las DC autólogas.

En la presente estrategia según la invención, la vacunación se lleva a cabo con el perfil de expresión de ARN presente en el tumor autólogo del paciente. De este modo se tiene en cuenta el perfil tumoral específico del paciente y la vacuna también incluye TAA desconocidos. Ya no es necesario el costoso cultivo de las DC, ya que en la vacunación se utiliza ARN (y no DC transfectadas).
 25

Por consiguiente, la invención pone a disposición una terapia de vacunación que utiliza ARN tumoral autólogo amplificado para pacientes con melanoma maligno con metástasis, en particular de estadio III/IV.
 30

Mediante la vacunación se inducen *in vivo* células T citotóxicas específicas tumorales, para lograr así un efecto clínico-terapéutico (respuesta tumoral). Se trata de una estrategia de inmunización que sólo requiere intervenciones mínimas en el paciente (inyección). La terapia puede ser ambulatoria y es adecuada para muchos pacientes de tumores sin limitarse a determinados tipos de HLA o epítopes de células T definidos. Además, mediante esta terapia se pueden inducir coadyuvantes T CD4⁺ y también CTL CD8⁺. Desde el punto de vista de la estrategia también es decisiva la inclusión en el protocolo de vacunación de TAA desconocidos hasta la fecha y la utilización exclusiva de material autólogo resulta especialmente ventajosa.
 35
 40

Plan de tratamiento

A los pacientes se les administran vía intradérmica los ARN tumorales autólogos amplificados los días 0, 14, 28 y
 45 42. Además, los pacientes reciben vía subcutánea GM-CSF (Leucomax[®] 100 µg/m², Novartis/Essex) en cada caso un día después de la vacunación con ARN. Cada paciente recibe en dos lugares diferentes una inyección intradérmica de 150 µl de la solución de inyección, que contiene en cada caso 100 µg de ARN tumoral autólogo.

Dos semanas después de la cuarta inyección (día 56) se evalúa en caso dado la respuesta del tumor mediante un análisis de estadiaje (entre otros procesos, sonografía, radiografía de tórax, CT, etc.; véanse más abajo las explicaciones al respecto) y también mediante el análisis de los parámetros inmunológicos inducidos por la terapia.
 50

En caso de una evolución estable de la enfermedad o de una respuesta objetiva del tumor (CR o PR), los pacientes son sometidos a la vacunación cada 4 semanas. Se puede prever la realización de otros análisis de reestadiaje por ejemplo el día 126 y después a intervalos de 12 semanas.
 55

El plan de tratamiento está representado esquemáticamente en la Figura 13.

Preparación de ARN tumoral autólogo

El objetivo consiste en la preparación de poli(A⁺)-ARN autólogo. Para ello se aísla poli(A⁺)-ARN de tejido tumoral del paciente. Este ARN aislado es muy inestable en sí y su cantidad es limitada. Por ello, la información genética se transcribe en una librería de ADNc, considerablemente más estable, y de este modo se conserva. A partir de la librería de ADNc propia del paciente se puede preparar ARN autólogo estabilizado para todo el período de tratamiento. El
 60
 65 procedimiento de la invención está representado esquemáticamente en la Figura 10.

ES 2 298 418 T3

Aislamiento de ARN

Para aislar ARN total de una biopsia de tejido tumoral se emplea un procedimiento de la firma Roche AG. En este procedimiento se utiliza el kit High Pure ARN Isolation (número de pedido 1828665) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El poli(A⁺)-ARN se aísla del ARN total a través de otro procedimiento de Roche AG con el kit High Pure ARN Tissue (número de pedido 2033674).

Preparación de una librería de ADNc

La librería de ADNc se construye con el kit “SMART PCR cADN Synthesis” (firma Clontech Inc., USA; número de pedido PT3041-1) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El poli(A⁺)-ARN de cadena simple se somete a transcripción inversa a través de un cebador especial. A través de un saliente poli-C en el extremo 3' del nuevo ADN sintetizado se puede hibridar otro cebador, mediante el cual se puede amplificar el constructo por PCR. Los fragmentos de ADNc de cadena doble ya están listos para la clonación en un vector de producción de ARN adecuado (por ejemplo pT7TS; véase la Figura 8).

El procedimiento para preparar la librería de ADNc a partir del poli(A⁺)-ARN con ayuda del *kit* arriba indicado está representado esquemáticamente en la Figura 11.

Constructo plásmido

Los fragmentos de ADNc PCR se cortan con las enzimas de restricción NotI y SpeI y se clonan en los sitios de restricción correspondientes del vector pT7TS análogamente al procedimiento indicado en el Ejemplo 4. Mediante el kit Endo-free Maxipreparation (Quiagen, Hilden, Alemania) se obtienen plásmidos de alta pureza. Para la transcripción *in vitro* se utilizan los plásmidos cuya secuencia genética clonada corresponde al fraccionamiento de tamaños previsto (200 pb - 4.000 pb) de la librería de ADNc. La Figura 12 muestra un ejemplo de separación de una librería de ADNc representativa en un gel de agarosa.

Transcripción in vitro y administración del ARN

La transcripción *in vitro* y la administración del ARN tienen lugar tal como se describe en el anterior Ejemplo 4.

Análisis durante el tratamiento

Antes de cada vacunación (el día de la vacunación):

examen físico (incluyendo RR, fiebre);

toma de muestras de sangre para valores rutinarios de laboratorio

1. hemograma, fórmula leucocitaria: 3 ml;

2. electrolitos, LDH, CK, enzimas hepáticas, bilirrubina, creatinina, ácido úrico, albúmina total, CRP: 5 ml;

3. sedimentación sanguínea: 2 ml; y

en caso de vacunaciones repetidas, adicionalmente: inspección de los sitios de inyección.

El día 1 después de cada vacunación:

examen físico (incluyendo RR, fiebre); e

inspección de los sitios de inyección.

En los análisis de estadiaje los días 56 y 126 tras la primera vacunación y después cada 12 semanas, adicionalmente:

toma de muestras sangre rutinaria ampliada:

1. marcadores tumorales S100 (7 ml);

2. valores de coagulación (3 ml);

toma de muestras de sangre control inmunológico (30 ml);

estado general (ECOG-Score);

procedimientos con imágenes (radiografía de tórax, sonografía, escintigrafía ósea, CT abdomen, pelvis, tórax, cráneo); y

ECG.

Otros análisis inmunológicos *in vitro*

En caso dado se mide la frecuencia relativa de células precursoras de CTL específicas de antígeno en sangre periférica del paciente en el curso de la terapia de vacunación.

En este contexto, por una parte, mediante análisis FACS (tinción de tetrámeros) se cuantifican células precursoras de CTL que están dirigidas contra antígenos expresados en especial medida por células melanómicas (tirosinasa, MAGE-3, Melan-A, GP100). Por otra parte se realizan análisis ELISpot diseñados de tal modo que se registran adicionalmente células precursoras de CTL que están dirigidas contra antígenos desconocidos hasta la fecha. Para ello, unas células dendríticas autólogas cultivadas a partir de la sangre periférica del paciente se incuban con el mismo ARN con el que se ha realizado la vacunación. Éstas sirven como células estimuladoras en el análisis ELISpot. Por consiguiente, la medición abarca todo el espectro de vacunación. Para estos análisis se pueden prever tomas de muestras de sangre para el control inmunológico en el marco de los análisis de estadiaje y adicionalmente en los días 0, 14, 28 y 42 de un total de 30 ml (20 ml ELISpot, 10 ml análisis FACS), y también una toma única de 100 ml el día 70 para el cultivo de las DC.

Además se pueden tomar muestras de biopsia cutánea del sitio de inyección para el análisis histológico en relación con una infiltración de células T.

Parámetros para la evaluación de la eficacia

La eficacia de la terapia según la invención se mide mediante los parámetros anteriormente indicados en el Ejemplo 4.

Referencias

Anichini, A, Mortarini, R., Maccalli, C., Squarcina, P., Fleishhauer, K., Mascheroni, L., Parmiani, G. (1996). Cytotoxic T cells directed to tumor antigens not expressed on normal melanocytes dominate HLA-A2.1-restricted immune repertoire to melanoma. *J. Immunol.* 156, 208-217.

Ashley, DM., Faiola, B., Nair, S., Hale, LP., Bigner, DD, Gilboa, E. (1997). Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor ARN induce anti-tumor immunity against central nervous system tumors. *J. Exp. Med.* 186, 1177-1182.

Boczkowski, D., Nair, SK., Synder, D., Gilboa, E. (1996). Dendritic cells pulsed with ARN are potent antigen-presenting cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Exp. Med.* 184, 465-472.

Boczkowski, D., Nair, SK., Nam, J., Lysterly, K., Gilboa, E. (2000). Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger ARN amplified from tumor cells. *Cancer Res.* 60, 1028-1034.

Boon, T., Coulie, P., Marchand, M., Weynants, P. Wölfel, T., Brichard, V. (1994). Genes coding for tumor rejection antigens: perspectives for specific immunotherapy. In *Important Advances in Oncology 1994*. DeVita, VT, Hellman, S., Rosenberg, SA, ed. (Philadelphia: Lippincott Co), pp. 53-69.

Garbe, C, Orfanos, CE (1989): Epidemiologie des malignen Melanoms in der Bundesrepublik Deutschland im internationalen Vergleich. *Onkologie* 12, 253-262.

Grabbe, S., Bruvers, S., Gallo, R.L., Knisely, T.L., Nazareno, R., and Granstein, R.D. (1991). Tumor antigen presentation by murine epidermal cells. *J Immunol.* 146, 3656-3661.

Grabbe, S., Bruvers, S., Lindgren, A.M., Hosoi, J., Tan, K.C., and Granstein, R.D. (1992). Tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells in the mouse: modulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, tumor necrosis factor alpha, and ultraviolet radiation. *J Leukoc. Biol.* 52, 209-217.

Grabbe, S., Beissert, S., Schwarz, T., and Granstein, R.D. (1995). Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy? *Immunol. Today* 16, 117-121.

Grünebach, F, Müller, MR, Nencioni, A, Brugger, W, and Brossart, P (2002). Transfection of dendritic cells with ARN induces cytotoxic T lymphocytes against breast and renal cell carcinomas and reveals the immunodominance of presented T cell epitopes. submitted.

Heiser, A., Maurice, MA, Yancey, DR., Coleman, DM., Dahm, P., Vieweg, J. (2001). Human dendritic cells transfected with renal tumor ARN stimulate polyclonal T cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors. *Cancer Res.* 61, 3388-3393.

5 **Heiser, A., Maurice, MA, Yancey, DR., Wu, NZ., Dahm, P., Pruitt, SK., Boczkowski, D., Nair, SK., Ballo, MS., Gilboa, E., Vieweg, J. (2001).** Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor ARN. *J. Immunol.* 166, 2953-2960.

Hoerr, I, Obst, R, Rammensee, HG, Jung, G (2000). *In vivo* application of ARN leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur J Immunol.* 30, 1-7.

Houghton, AN (1994). Cancer antigens: immune recognition of self and altered self. *J. Exp. Med* 180, 1-4.

15 **Inaba, K, Young, JW and Steinman, RM (1987).** Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 166, 182-194.

Koido, S., Kashiwaba, M., Chen, D., Gendler, S., Kufe, D., Gong, J. (2000). Induction of antitumor immunity by vaccination of dendritic cells transfected with MUC1 ARN. *J. Immunol.* 165, 5713-5719.

20 **Mitchell, DA., Nair, SK. (2000).** ARN-transfected dendritic cells in cancer immunotherapy. *J. Clin. Invest.* 106, 1065-1069.

Nair, S., Boczkowski, S., Synder, D., Gilboa, E. (1998). Antigen presenting cells pulsed with unfractionated tumor-derived peptides are potent tumor vaccines. *Eur. J. Immunol.* 27, 589-597.

25 **Nair, S., Heiser, A., Boczkowski, D., Majumdar, A., Naoe, M., Lebkowski, JS., Vieweg, J., Gilboa, E. (2000).** Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against un related tumors using telomerase reverse transcriptase ARN transfected dendritic cells. *Nat. Med.* 6, 1011-1017.

30 **Nestle, F.O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., and Schadendorf, D. (1998).** Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med* 4, 328-332.

Parkinson, DR, Houghton, AN, Hersey, P, Borden, EC (1992). Biologic therapy for melanoma. *I Cutaneous melanoma.* Balch, CM, Houghton, AN, Milton GW, Soober, AJ, Soong, SJ, ed. (Lippincott Co), pp. 522-541.

35 **Rammensee, H.G., Falk, K., and Rotzschke, O. (1993).** Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 213-244.

Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livingstone AM, Fathman CG, Steinman RM: Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. *J Exp Med* 169:1169, 1989.

Schadendorf, D., Grabbe, S, Nestle, FO (1997). Vaccination with Dendritic Cells - A specific Immunomodulatory Approach. *In Strategies for Immunointervention in Dermatology.* Burg, G, Dummer, RG, ed. (Heidelberg, New York: Springer-Verlag).

45 **Schmitt, WE., Stassar, MJG., Schmitt, W., Littlee, M., Cochlovius, B. (2001).** *In vitro* induction of a bladder cancer-specific T-cell response by mARN-transfected dendritic cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127, 203-206.

50 **Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K (1997):** Kompendium Internistische Onkologie, 2. Aufl., Springer-Verlag Berlin, Teil 2, 1415.

Schuler G and Steinmann RM (1985). Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells *in vitro.* *J. Exp. Med.* 161, 526-546.

55 **Thurner, B., Haendle, I., Roder, C. et al. (1999).** Vaccination with Mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induce regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J. Exp. Med.* 190, 1669-1678.

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una composición farmacéutica que incluye los siguientes pasos:

- 5 (a) preparación de una parte de una librería de ADNc a partir de tejido tumoral de un paciente, parte que representa una librería de sustracción de la librería de ADNc total y codifica antígenos específicos tumorales, y antes del paso (a) se determinan las secuencias de los antígenos específicos tumorales, y la determinación de las secuencias de los antígenos específicos tumorales incluye una alineación con una librería de ADNc de tejido sano,
- 10 (b) preparación de una matriz para la transcripción *in vitro* de ARN a partir de la parte de la librería de ADNc; y
- 15 (c) transcripción *in vitro* de la matriz.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque para la composición farmacéutica se transcribe o transcriben el o los antígenos tumorales del grupo consistente en 707-AP, AFP, ART-4, BAGE, β -catenin/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/neu, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HAST-2, hTERT (o hTRT), iCE, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/Melan-A, MC1R, Myosin/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NY-ESO-1, p190 minor bcr-abl, Pml/RAR α , PRAME, PSA, PSM, RAGE, RU1 o RU2, SAGE, SART-1 o SART-3, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2 y WT1.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque en la composición farmacéutica se preparan moléculas de ARNm con una estructura cap-5' y/o una cola poli(A⁺) de como mínimo 25 nucleótidos y/o con como mínimo un IRES y/o con como mínimo una secuencia estabilizadora en 5' y/o con como mínimo una secuencia estabilizadora en 3'.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores 1 a 3, **caracterizado** porque a la composición farmacéutica se añaden uno o más adyuvantes.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque a la composición farmacéutica se le añade un adyuvante seleccionado de entre el grupo consistente en lipopolisacárido, TNF- α , ligando CD40, GP96, oligonucleótidos con el motivo CpG, hidróxido de aluminio, adyuvante de Freund, lipopéptidos y citoquinas.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque a la composición farmacéutica se le añade la citoquina GM-CSF.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores 1 a 6, **caracterizado** porque en la composición farmacéutica las moléculas de ARN, se complejan o condensan con como mínimo un agente catiónico o policatiónico.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque el agente catiónico o policatiónico se selecciona de entre el grupo consistente en protamina, poli-L-lisina, poli-L-arginina e histonas.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores 1 a 8, **caracterizado** porque a la composición farmacéutica se le añade además como mínimo un inhibidor de ARNasa.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque el inhibidor de ARNasa es ARNsin.

11. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores 1 a 10, **caracterizado** porque se añade como mínimo otro soporte farmacéuticamente aceptable y/o como mínimo otro vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque la alineación incluye una comparación de los patrones de expresión de tejido sano y de tejido tumoral.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, **caracterizado** porque la determinación de las secuencias de los antígenos específicos tumorales incluye un diagnóstico mediante un *microarray* (micromatriz).

14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 12 ó 13, **caracterizado** porque los patrones de expresión se comparan a nivel de ácido nucleico.

15. Procedimiento según la reivindicación 12, **caracterizado** porque los patrones de expresión se determinan mediante análisis de expresión a nivel de proteínas.

Fig. 1

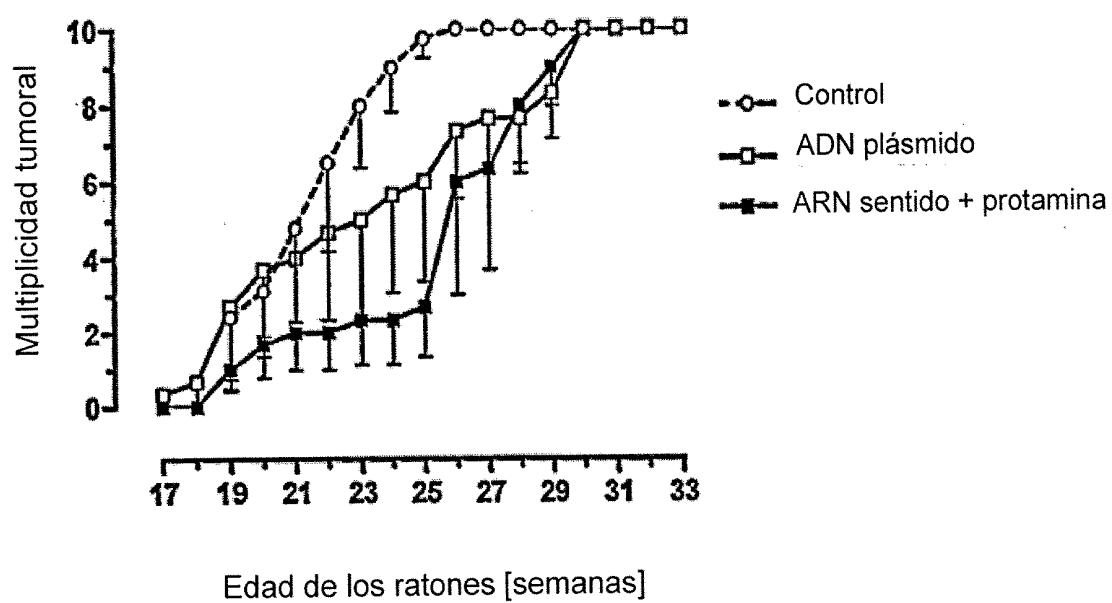


Fig. 2

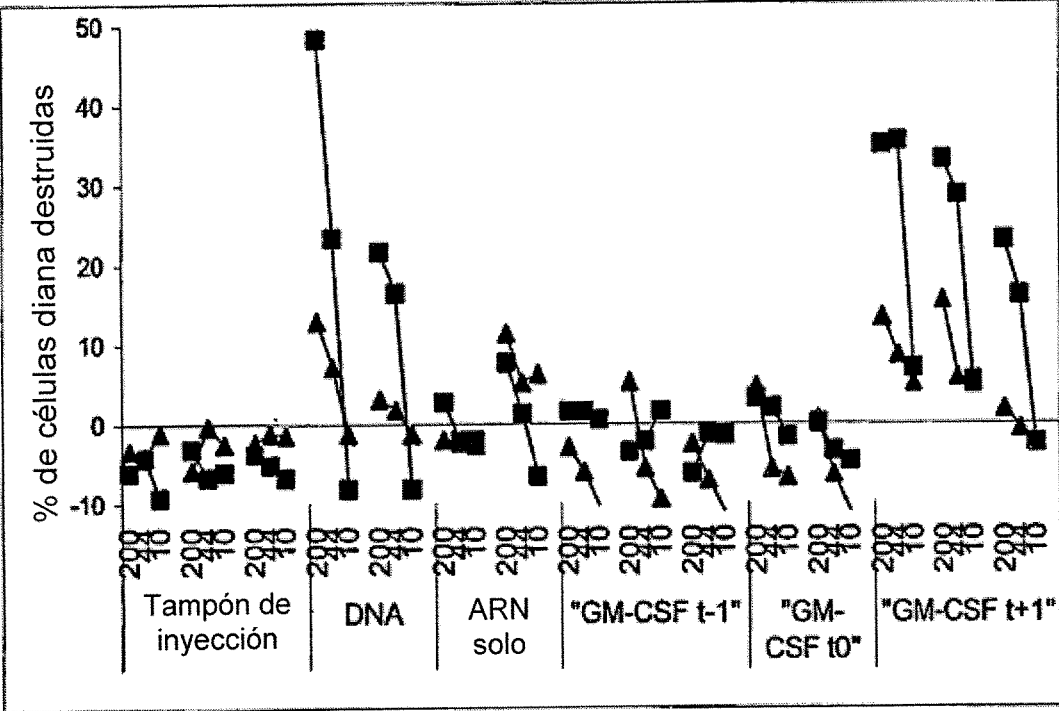
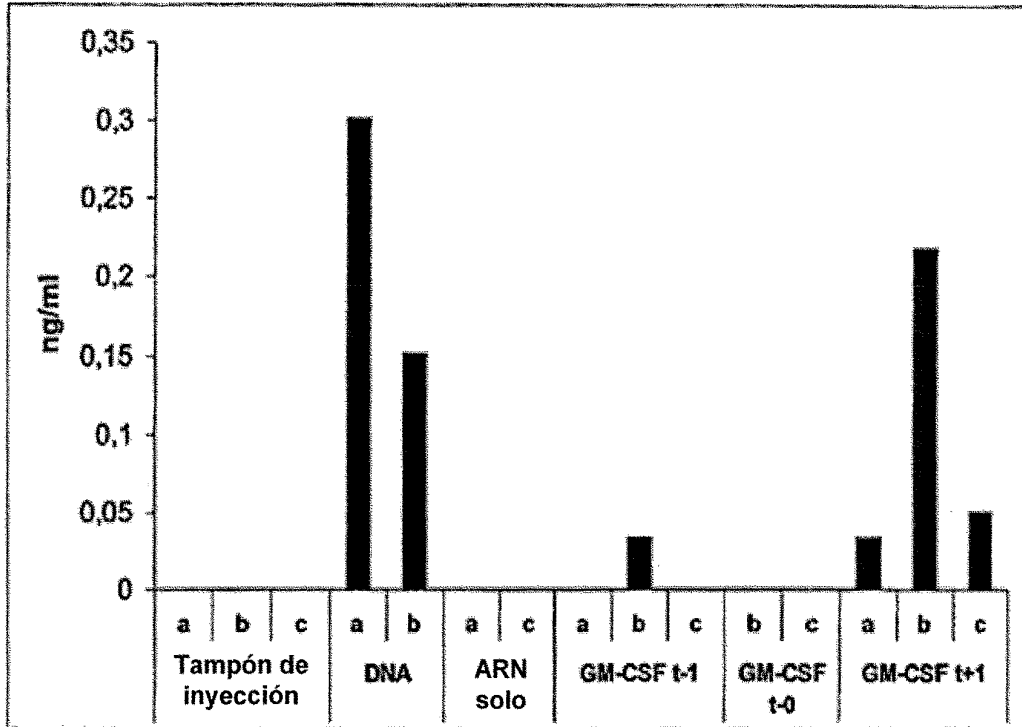


Fig. 3

A



B

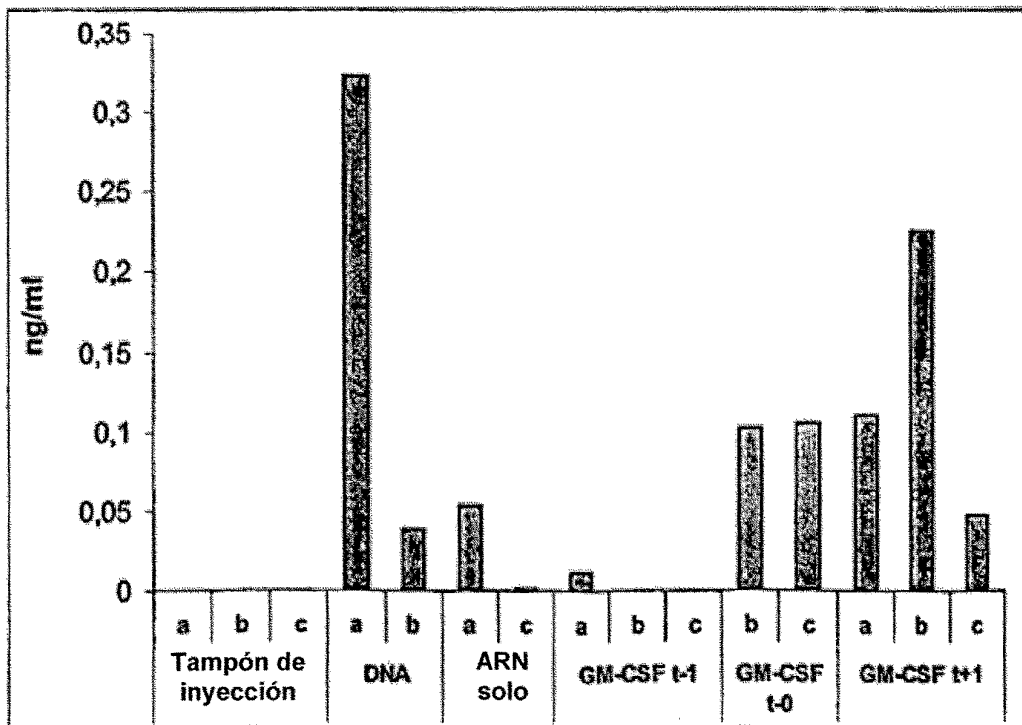
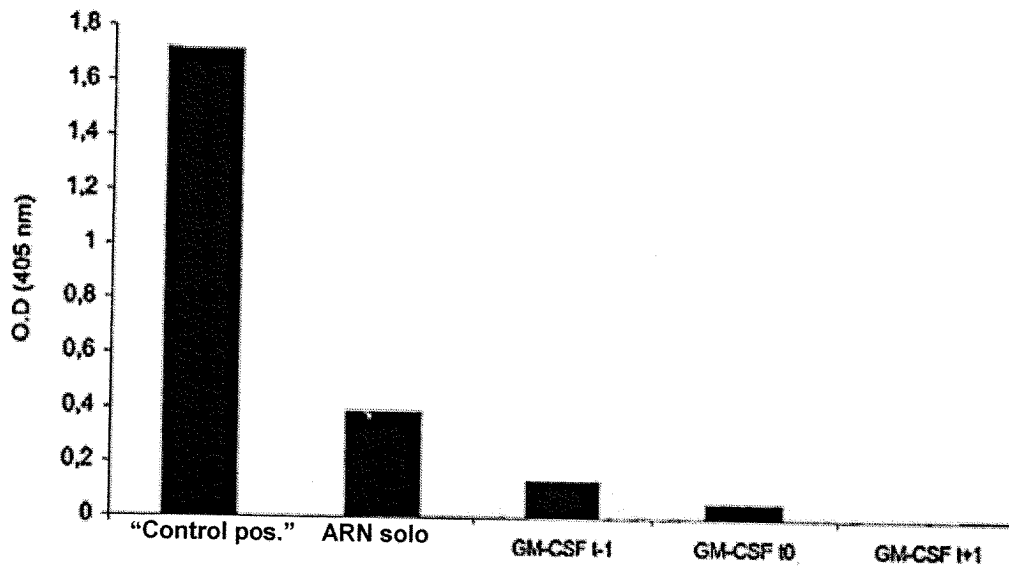


Fig. 4

A



B

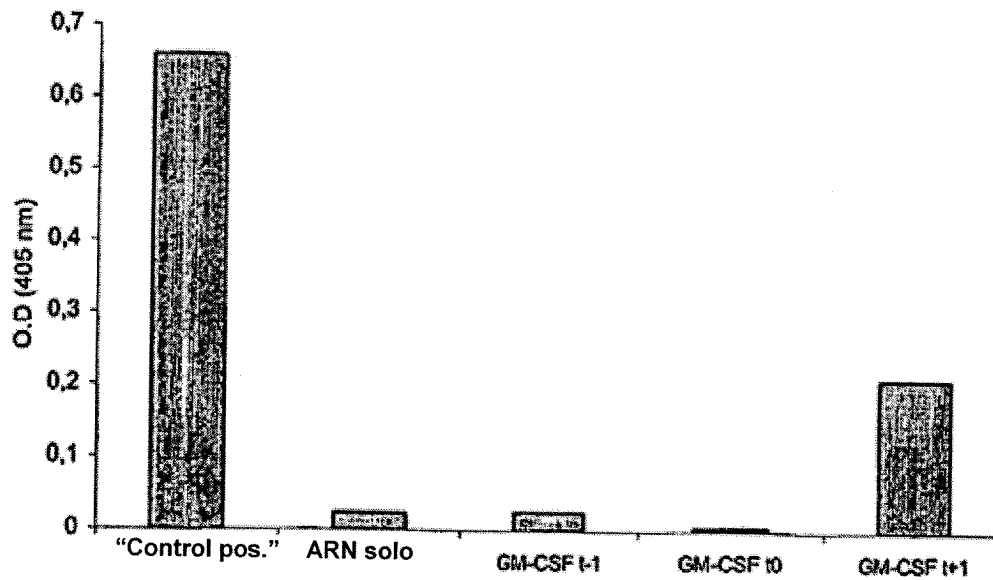
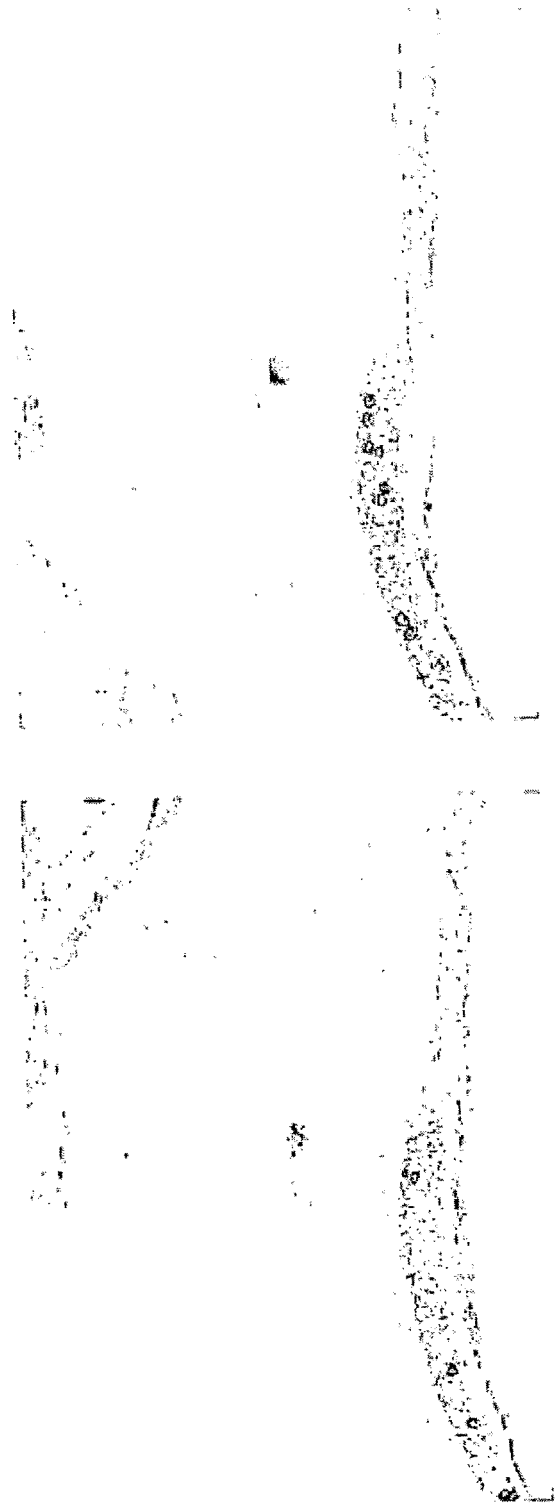


Fig. 5



Sección 2

Sección 1

Fig. 6

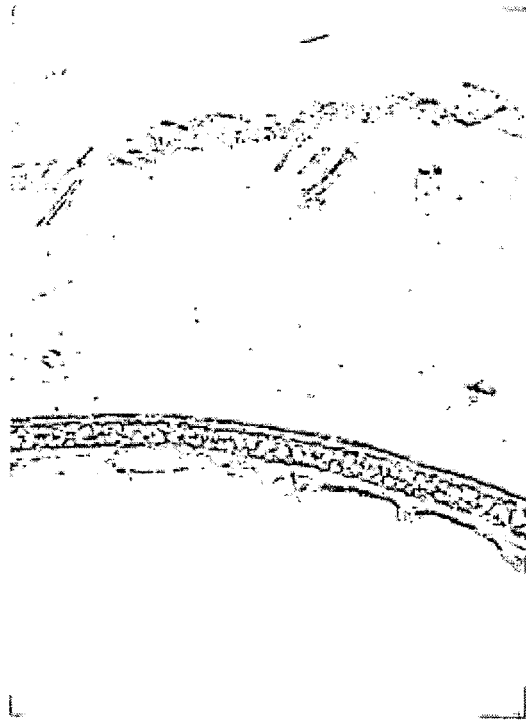


Fig. 7

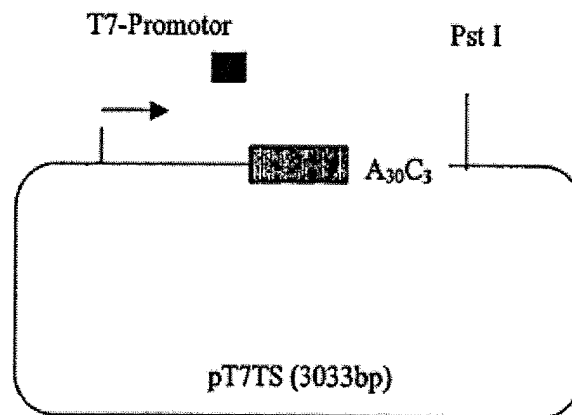
Sección 1



Sección 2



Fig. 8



Región no traducida en 5' de β -globina de Xenopus:

GCTTGTTCTTTTGCAGAAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGC

Región no traducida en 3' de β -globina de Xenopus:

**GACTGACTAGGATCTGGTTACCACTAAACCAGCCTCAAGAACACCCGA
ATGGAGTCTCTAAGCTACATAATACCAACTTACACTTACAAAATGTTG
TCCCCAAAATGTAGCCATTCTGCTCCTAATAAAAAGAAAGTT
TCTTCACATTCTA**

Fig. 9

GM-CSF		X	X	X	X	
Vacunación ARN		X	X	X	X	
Tag	-7 ↑	0	14	28	42	↑ 70
	Estadiaje					Reestadiaje
	Laboratorio					Laboratorio
	Citoquinas					Citoquinas
	FACS					FACS
	Prueba de secreción de IFN- γ					Secreción de IFN- γ
						DTH (biopsia cutánea)

Fig. 10

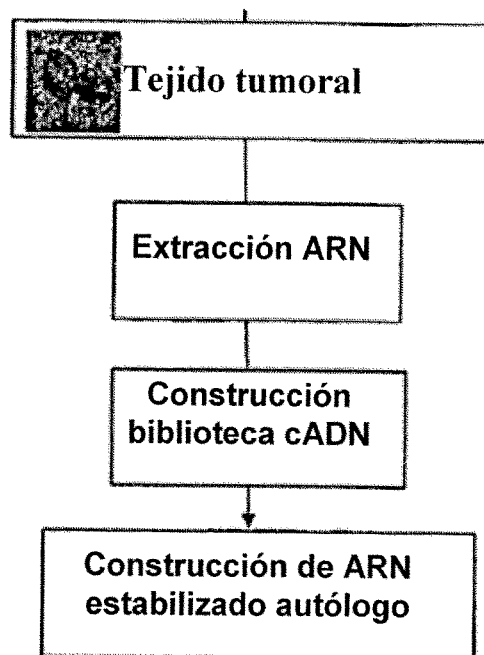


Fig. 11

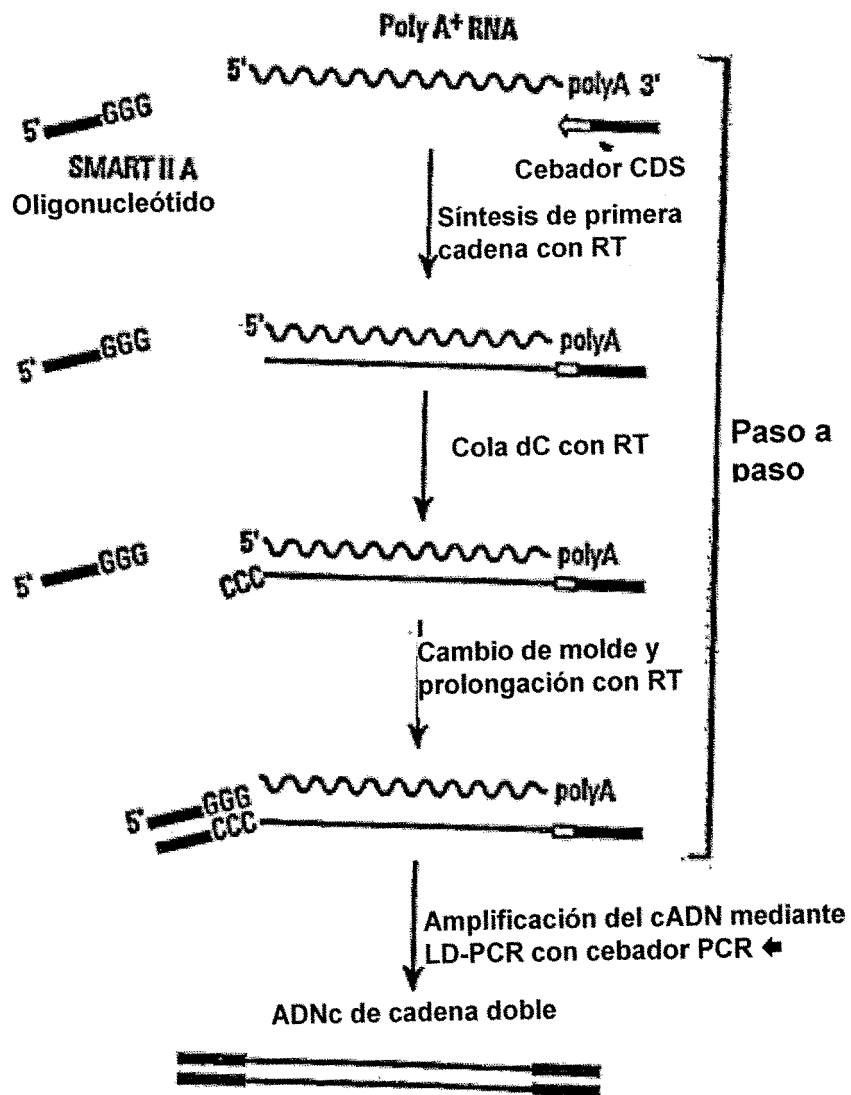


Fig. 12

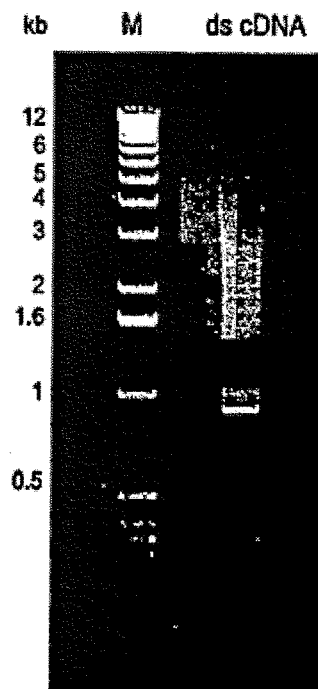


Fig. 13

-Día	-7	0	14	28	42	56	70	98	126	154	182	210
Semana	-1	0	2	4	6	8	10	14	18	22	26	30
Vacunación		1	2	3	4	6	6	6	7	8	9	10
GM-CSF sc		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Toma de sangre	60	40	40	40	40	150	10	10	50	10	10	50
Estadaje		X				X			X			X

Fig. 14

