

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 938 900**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2018** **PCT/US2018/065522**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2019** **WO19118763**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2018** **E 18888094 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2022** **EP 3737397**

54 Título: **Vacunas contra el cáncer dirigidas al PRAME y usos de las mismas**

30 Prioridad:

13.12.2017 US 201762598290 P

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

17.04.2023

73 Titular/es:

**INOVIO PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
660 W. Germantown Pike, Suite 110
Plymouth Meeting, PA 19462, US**

72 Inventor/es:

**YAN, JIAN;
SLAGER, ANNA;
GARMAN, BRADLEY y
COOCH, NEIL**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 938 900 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas contra el cáncer dirigidas al PRAME y usos de las mismas

Campo técnico

La presente invención se refiere a antígenos expresados preferentemente en melanomas (PRAME) y moléculas de ácido nucleico que los codifican. La presente invención también se refiere a vacunas que incluyen dichos inmunógenos PRAME y/o moléculas de ácido nucleico. La presente invención se refiere además a las vacunas para su uso en la inducción de respuestas inmunes y la prevención y/o el tratamiento de individuos que tienen células cancerosas y tumores que expresan PRAME.

Antecedentes

El cáncer se encuentra entre las principales causas de muerte en todo el mundo y, en Estados Unidos, es la segunda causa de muerte más común, lo que representa casi una de cada cuatro muertes. El mercado de las vacunas contra el cáncer está creciendo rápidamente. Las vacunas tumorales eficaces pueden ser útiles para prevenir el crecimiento del tumor y/o pueden ser útiles como alternativa más eficaz y menos tóxica a los tratamientos estándar para pacientes con cánceres avanzados. Un antígeno asociado al cáncer y, por lo tanto, una diana para las vacunas antitumorales es el PRAME.

PRAME, identificado originalmente como un gen que codifica un péptido antigénico restringido a HLA-A24 en el melanoma humano, desencadena respuestas inmunitarias autólogas mediadas por células T citotóxicas. El gen humano PRAME, localizado en el cromosoma 22 (HSA22), codifica una proteína con siete motivos ricos en leucina (LXXLL) a través de la cual PRAME interfiere con la vía del receptor del ácido retinoico (RAR), y conduce a la inhibición de la diferenciación, detención del crecimiento y apoptosis inducidas por el RAR (Epping, M. T. *et al.* El antígeno tumoral humano PRAME es un represor dominante de la señalización del receptor del ácido retinoico. *Cell* 122, 835-847, doi:10.1016/j.cell.2005.07.003 (2005)). De este modo, PRAME funciona como un represor transcripcional de las vías de señalización, y la sobreexpresión de PRAME da lugar a la tumorigénesis.

Debido a que su expresión es baja o ausente en casi todos los tejidos adultos normales excepto en los testículos, PRAME se considera un antígeno testicular cancerígeno (CTA). Además del melanoma, PRAME se sobreexpresa en otras neoplasias malignas humanas, tales como la leucemia aguda y crónica, el mieloma múltiple, el meduloblastoma, los sarcomas, el cáncer de cabeza y cuello, el cáncer de mama, el cáncer de pulmón no microcítico, el cáncer renal y el cáncer de ovario. En un estudio sobre carcinoma ovárico, se identificó la expresión de PRAME en el 100% de las muestras quirúrgicas (n=27) (Brenne, K., Nymoen, D. A., Reich, R. & Davidson, B. PRAME (antígeno de melanoma expresado preferentemente) es un nuevo marcador para diferenciar el carcinoma seroso del mesotelioma maligno. *American journal of clinical pathology* 137, 240-247, doi: 10.1309/AJCPGA95KVSAUDMF (2012)).

La prevención, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer pueden adoptar muchas formas diferentes. La prevención puede incluir la detección de factores predisponentes (p. ej., variantes genéticas específicas), la modificación del comportamiento (p. ej., tabaquismo, dieta y cantidad de actividad física) y la vacunación contra virus (p. ej., virus del papiloma humano virus de la hepatitis B). El tratamiento puede incluir quimioterapia, radioterapia y extirpación quirúrgica del tumor o tejido canceroso. A pesar de la disponibilidad de numerosos procedimientos de prevención y tratamiento, dichos procedimientos suelen tener un éxito limitado a la hora de prevenir y/o tratar eficazmente el cáncer.

Las vacunas para el tratamiento y la prevención del cáncer son de interés. Sin embargo, las vacunas existentes dirigidas a antígenos de células tumorales están limitadas por la escasa expresión del antígeno *in vivo*. En consecuencia, continúa la existencia de una necesidad en la técnica de vacunas seguras y eficaces y procedimientos de su uso para prevenir y/o tratar el cáncer y reducir la mortalidad en individuos que padecen cáncer.

Sumario de la invención

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. La presente divulgación está dirigida a moléculas de ácido nucleico que comprenden SEC ID NO: 1 o las moléculas de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos establecida en SEC ID NO: En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEC ID NO: 1. En otras realizaciones, las moléculas de ácido nucleico comprenden la secuencia de ácido nucleico establecida en los nucleótidos 55 a 1584 de SEC ID NO: 1. En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos establecida en SEC ID NO: 2. En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos tal como se establece en los residuos de aminoácidos 19 a 526 de SEC ID NO: 2. En otras realizaciones, un vector comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1.

En otras realizaciones, las moléculas de ácido nucleico codifican un antígeno PRAME. En algunas realizaciones, el

antígeno PRAME codificado comprende la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos de aminoácidos 19 a 526 de SEC ID NO: 2. En algunas realizaciones, el antígeno PRAME codificado comprende la SEC ID NO: 2.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria se pueden incorporar a un vector, tal como un plásmido o un vector viral. En algunas realizaciones, el vector comprende la secuencia de ácido nucleico establecida en SEC ID NO: 1. En ciertas realizaciones, el vector comprende la secuencia de ácido nucleico establecida en los nucleótidos 55 a 1584 de SEC ID NO: 1. En otras realizaciones, el vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos establecida en SEC ID NO: 2. En otras realizaciones, el vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos tal como se establece en los residuos de aminoácidos 19 a 526 de SEC ID NO: 2. En ciertas realizaciones, un vector comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria están operablemente unidos a un elemento regulador. En algunas realizaciones, el elemento regulador es un promotor y/o una señal de poliadenilación. En otras realizaciones, el promotor es un promotor inmediato temprano de citomegalovirus humano (promotor hCMV). En otras realizaciones, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (bGH poli A).

En la presente memoria se proporciona además una proteína antigénica PRAME que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos de aminoácidos 19 a 526 de SEC ID NO: 2. En algunas realizaciones, el antígeno PRAME comprende la SEC ID NO: 2.

Vacunas que comprenden un antígeno PRAME, en las que el antígeno comprende la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos de aminoácidos 19 a 526 de SEC ID NO: 2 también se proporcionan. En algunas realizaciones, el antígeno PRAME comprende la SEC ID NO: 2. En algunas realizaciones, el antígeno PRAME está codificado por los nucleótidos 55 a 1584 de la SEC ID NO: 1. En algunas realizaciones, el antígeno PRAME está codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende la SEC ID NO: 1.

También se proporcionan vacunas que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno PRAME divulgado. En algunas realizaciones, el antígeno PRAME codificado comprende la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos de aminoácidos 19 a 526 de SEC ID NO: 2. En algunas realizaciones, el antígeno PRAME codificado comprende la SEC ID NO: 2. En algunas realizaciones, el antígeno PRAME está codificado por los nucleótidos 55 a 1584 de la SEC ID NO: 1. En algunas realizaciones, el antígeno PRAME está codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende la SEC ID NO: 1. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se incorpora a un vector, que incluye pero no se limita a un plásmido o vector viral.

La vacuna divulgada puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, las vacunas pueden comprender además un adyuvante. En ciertas realizaciones, el adyuvante es IL-12, IL-15, IL-28, o RANTES. Las referencias a procedimientos de tratamiento en los párrafos subsiguientes de esta descripción se deben interpretar como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y vacunas de la presente invención para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano (o animal) por medio de terapia.

En la presente memoria se proporcionan además procedimientos para tratar a un individuo que tiene una célula caracterizada por una expresión aberrante de PRAME que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la vacuna. En algunas realizaciones, la administración incluye una etapa de electroporación. En otras realizaciones, la administración tiene lugar en uno o más puntos del individuo.

También se describen en la presente memoria procedimientos para tratar el cáncer en un individuo, el procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna al individuo. También se proporcionan procedimientos para vacunar a un individuo contra células caracterizadas por una expresión aberrante de PRAME que comprenden la administración de una vacuna en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria. La vacuna administrada en los procedimientos enseñados en esta divulgación comprende un ácido nucleico como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la administración incluye una etapa de electroporación. En otras realizaciones, la administración tiene lugar en uno o más puntos del individuo.

En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria son para uso como medicamento. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria se utilizan como medicamentos para el tratamiento del cáncer. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria se utilizan en la preparación de un medicamento. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria se utilizan en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1A y FIG. 1B son una representación esquemática de PRAME. La FIG. 1A proporciona una representación gráfica de la localización de los números de residuos de aminoácidos de los siete recuadros putativos de receptores nucleares (NR) (motivos LXXLL) en la proteína PRAME. La FIG. 1B proporciona los

datos de la secuencia de aminoácidos, incluidos los residuos de aminoácidos adyacentes, para cada caja NR.

La FIG. 2 proporciona una alineación de secuencias de un PRAME consenso sintético modificado con secuencias PRAME humanas.

La FIG. 3 representa de forma general la reacción de clonación que da lugar a pGX1421.

La FIG. 4 ilustra la confirmación por medio del análisis Western blot de la expresión del antígeno PRAME en líneas celulares transfectadas con el consenso sintético PRAME.

La FIG. 5 muestra los resultados de un inmunoensayo que compara la expresión del consenso sintético PRAME con un control (pVAX).

La FIG. 6 representa los calendarios de inmunización y sangrado para un estudio de inmunogenicidad llevado a cabo en ratones C57Bl/6.

La FIG. 7 representa la respuesta a la dosis de pGX1411 en ratones.

La FIG. 8A ilustra la confirmación de que pGX1411 es inmunogénico en ratones. **La FIG. 8B** representa gráficamente la respuesta inmunitaria en ratones tras la administración de pGX1411 o ratones no tratados.

Las FIGs. 9A - 9F representan gráficamente los resultados del análisis de citometría de flujo para determinar las respuestas de células T CD4+ y CD8+ en ratones. Específicamente, **las FIGs. 9A y 9B** muestran la respuesta CD4+ y CD8+ para producir IFN γ en ratones que recibieron pGX1411 en comparación con los controles no tratados, respectivamente. **Las FIGs. 9C y 9D** muestran la respuesta CD4+ y CD8+ para producir CD107a+ en ratones que recibieron pGX1411 en comparación con los controles no tratados, respectivamente. **Las FIGs. 9E y 9F** muestran la respuesta CD4+ y CD8+ para producir TNF α en ratones que recibieron pGX1411 en comparación con los controles no tratados, respectivamente.

La FIG. 10 representa gráficamente los títulos finales tras el tratamiento con 5, 25 y 50 μ g de pGX1411 en comparación con los controles no tratados.

La FIG. 11 presenta la tinción inmunohistoquímica de tejido canceroso.

La FIG. 12 ilustra gráficamente la comparación de la respuesta inmunitaria en ratones a los que se administró PRAME de consenso sintético y PRAME de consenso sintético modificado.

La FIG. 13 ilustra el programa de inmunización y sangrado para estudios con primates no humanos (NHP).

Las FIGs. 14A-14C representan la inmunogenicidad celular determinada por IFN γ ELISpot. **La FIG. 14A** ilustra la respuesta media de IFN γ con el grupo inmunizado a lo largo del tiempo. **La FIG. 14B** ilustra las respuestas de IFN γ para NHP individuales. **La FIG. 14C** ilustra las respuestas de IFN γ en los grupos junto con la variación dentro del grupo. El momento de la administración de pGX1421 y pGX6006 se indica con las flechas 1-4.

Las FIGs. 15A-15D ilustran las respuestas de las células T CD4+ y CD8+ en NHPs a los que se administró pGX1421 y pGX6006. **La FIG. 15A** muestra gráficamente la respuesta de las células T CD4+. **La FIG. 15B** representa gráficamente la respuesta CD8+. **La FIG. 15C** representa gráficamente la respuesta de las células T CD8+GrB+. **La FIG. 15D** ilustra el cambio en el fenotipo de las células T CD8+ tras la inmunización.

Las FIGs. 16A-16C ilustran las respuestas inmunitarias celulares inducidas por pGX1421 y pGX1421 en combinación con pGX6006 (IL-12). **La FIG. 16A** muestra la respuesta a IFN γ en NHP individuales a los que se administró pGX1421. **La FIG. 16B** ilustra la respuesta de IFN γ en NHPs individuales a los que se administró tanto pGX1421 como pGX6006. **La FIG. 16C** proporciona una comparación de las respuestas representadas en las FIGs. 16A y 16B. El momento de la administración de pGX1421 y pGX1421 en combinación con pGX6006 se indica con las flechas 1-4.

Las FIGs. 17A-17F ilustran las respuestas inmunes celulares inducidas por pGX1421 y pGX1421 en combinación con pGX6006 según se caracterizan por citometría de flujo. **La FIG. 17A** representa la respuesta CD4+ mínima en cualquier receptor individual, y **la FIG. 17B** ilustra la diferencia en INF γ y TNF α entre los grupos. **La FIG. 17C** muestra una mayor respuesta de células T CD8+ para la administración de pGX1421/pGX6006 que para la administración de pGX1421 sola, y **la FIG. 17D** ilustra la diferencia en INF γ y TNF α entre los grupos. **La FIG. 17E** representa la respuesta de células T CD8+GrB+ en NHPs a los que se administró pGX1421 solo o en combinación con pGX6006, y **la FIG. 17F** ilustra la diferencia en INF γ y TNF α entre los grupos.

Las FIGs. 18A-18C comparan las respuestas de IFN γ inducidas por la administración de pGX1421 en combinación con pGX6006 (**FIG. 18A**) a aquellas respuestas inducidas por la administración de pGX1411 en combinación con pGX6006 (**FIG. 18B**). **La FIG. 18C** combina los datos de las FIGs. 18A y 18B para facilitar la comparación. El momento de la administración de pGX1421 en combinación con pGX6006 y de pGX1411 en combinación con pGX6006 se indica con las flechas 1-4.

Las FIGs. 19A-19F ilustran las respuestas inmunes celulares inducidas por la administración de pGX1421 en combinación con pGX6006 y esas mismas respuestas inducidas por la administración de pGX1411 en combinación con pGX6006. Específicamente, **la FIG. 19A** ilustra las respuestas de células T CD4+ inducidas por la administración de pGX1421 en combinación con pGX6006 y las respuestas de células T CD4+ inducidas por la administración de pGX1411 en combinación con pGX6006, y **la FIG. 19D** ilustra en INF γ y TNF α entre estos dos grupos. **La FIG. 19B** ilustra las respuestas de células T CD8+ inducidas por la administración de pGX1421 en combinación con pGX6006 y las respuestas de células T CD8+ inducidas por la administración de pGX1411 en combinación con pGX6006, y **la FIG. 19E** ilustra en INF γ y TNF α entre estos dos grupos. **La FIG. 19C** ilustra las respuestas de células T CD8+GrB+ inducidas por la administración de pGX1421 en combinación con pGX6006 y las respuestas de células T CD8+GrB+ inducidas por la administración de pGX1411 en combinación con pGX6006, y **la FIG. 19F** ilustra en INF γ y TNF α entre los grupos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a vacunas que comprenden un antígeno PRAME. Las vacunas proporcionan tratamiento y/o prevención para un cáncer que expresa PRAME. La vacuna de la invención puede proporcionar cualquier combinación de antígenos cancerígenos particulares para la prevención o el tratamiento particular del cáncer de un individuo que necesita tratamiento.

5 Una manera de diseñar el ácido nucleico y su secuencia de aminoácidos codificada del antígeno canceroso recombinante es por medio de la introducción de mutaciones que cambian aminoácidos particulares en la secuencia general de aminoácidos del antígeno canceroso nativo. La introducción de mutaciones no altera tanto el antígeno cancerígeno que no se pueda aplicar universalmente en un individuo mamífero, y preferentemente un individuo humano o canino, sino que lo cambia lo suficiente como para que la secuencia de aminoácidos resultante rompa la tolerancia o se considere un antígeno extraño a fin de generar una respuesta inmunitaria. Otra manera puede ser crear un antígeno canceroso recombinante de consenso que tenga al menos un 85% y hasta un 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con su correspondiente antígeno canceroso nativo; preferentemente al menos un 90% y hasta un 98% de identidad de secuencia; más preferentemente al menos un 93% y hasta un 98% de identidad de secuencia; o aún más preferentemente al menos un 95% y hasta un 98% de identidad de secuencia. En algunos casos, el antígeno canceroso recombinante tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con su correspondiente antígeno canceroso nativo. El antígeno cancerígeno nativo es el antígeno normalmente asociado al cáncer o tumor canceroso concreto. Dependiendo del antígeno del cáncer, la secuencia consenso del antígeno del cáncer puede ser a través de especies de mamíferos o dentro de subtipos de una especie o a través de cepas virales o serotipos. Algunos antígenos cancerígenos no varían mucho de la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje del antígeno cancerígeno. Algunos antígenos del cáncer tienen secuencias de ácidos nucleicos/aminoácidos tan divergentes entre especies que no se puede generar una secuencia de consenso. En estos casos, se genera un antígeno canceroso recombinante que rompa la tolerancia y genere una respuesta inmunitaria que tenga al menos un 85% y hasta un 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con su correspondiente antígeno canceroso nativo; preferentemente al menos un 90% y hasta un 98% de identidad de secuencia; más preferentemente al menos un 93% y hasta un 98% de identidad de secuencia; o incluso más preferentemente al menos un 95% y hasta un 98% de identidad de secuencia. En algunos casos, el antígeno canceroso recombinante tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con su correspondiente antígeno canceroso nativo. Los enfoques antes mencionados se pueden combinar para que el antígeno recombinante final tenga un porcentaje de similitud con la secuencia de aminoácidos del antígeno nativo del cáncer, tal como se ha comentado anteriormente.

El antígeno PRAME de la presente divulgación puede ser un antígeno PRAME consenso sintético derivado de las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos de PRAME de diferentes especies o de diferentes isoformas dentro de una especie, y de este modo, el antígeno PRAME consenso sintético no es nativo. El antígeno consenso sintético PRAME también comprende sustituciones de aminoácidos en el dominio proteico que interactúa o media la interacción con el receptor de ácido retinoico (RAR). Específicamente, los residuos de aminoácidos de leucina en los residuos de aminoácidos 487 y 488 se pueden sustituir por residuos de valina. Además, el antígeno PRAME puede comprender una secuencia reguladora Kozak y/o una secuencia líder IgE para mejorar la expresión y la inmunogenicidad, respectivamente.

El recombinante PRAME puede inducir respuestas de células T específicas de antígeno y/o de anticuerpos de alto título, para de este modo inducir o provocar una respuesta inmunitaria dirigida o reactiva contra el cáncer o el tumor que expresa el antígeno. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria inducida o provocada puede ser una respuesta inmunitaria celular, humoral o tanto celular como humoral. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria celular inducida o provocada puede incluir la inducción o secreción de interferón-gamma (IFN- γ) y/o factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). En otras realizaciones, la respuesta inmunitaria inducida o provocada puede reducir o inhibir uno o más factores de supresión inmunitaria que promueven el crecimiento del tumor o del cáncer que expresa el antígeno, por ejemplo, pero sin limitarse a, factores que subregulan la presentación del CMH, factores que sobrerregulan las células T reguladoras específicas del antígeno (Tregs), PD-L1, FasL, citoquinas tales como IL-10 y TGF- β , macrófagos asociados al tumor, fibroblastos asociados al tumor, factores solubles producidos por medio de células inmunosupresoras, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1, y una molécula de punto de control inmunitario.

La vacuna se puede combinar además con anticuerpos contra inhibidores de puntos de control tales como PD-1 y PDL-1 para aumentar la estimulación de las respuestas inmunitarias celular y humoral. El uso de anticuerpos anti-PD-1 o anti-PDL-1 impide que PD-1 o PDL-1 supriman las respuestas de células T y/o células B. En general, al diseñar los antígenos del cáncer para que sean reconocidos por el sistema inmunitario se ayuda a superar otras formas de supresión inmunitaria por parte de las células tumorales, y estas vacunas se pueden utilizar en combinación con terapias de supresión o inhibición (tales como las terapias con anticuerpos anti-PD-1 y anti-PDL-1) para aumentar aún más las respuestas de las células T y/o B.

Definiciones

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica. En caso de conflicto, prevalecerá el presente documento, incluidas las definiciones. A continuación se describen los procedimientos y

materiales preferentes, aunque en la práctica o en los ensayos de la presente invención se pueden utilizar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en la presente memoria se incorporan por referencia en su totalidad. Los materiales, procedimientos y ejemplos divulgados en la presente memoria son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Se debe entender que la terminología empleada en la presente memoria tiene por objeto describir realizaciones particulares únicamente, y no pretende ser limitativa.

Los términos "comprende(s)", "incluye(n)", "tiene(n)", "puede(n)", "contiene(n)" y sus variantes, como se utilizan en la presente memoria, pretenden ser expresiones, términos o palabras transitorias abiertas que no excluyen la posibilidad de actos o estructuras adicionales. Las formas singulares "un", "y" y "el, la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. La presente divulgación también contempla otras realizaciones "que comprenden", "que consisten en" y "que consisten esencialmente en" las realizaciones o los elementos presentados en la presente memoria, tanto si se exponen explícitamente como si no.

Para la recitación de intervalos numéricos en la presente memoria, se contempla explícitamente cada valor intermedio que tenga el mismo grado de precisión que el mínimo y el máximo del intervalo recitado. Por ejemplo, para el intervalo de 6 a 9, se contemplan los números 7 y 8 además de 6 y 9, y para el intervalo 6,0 a 7,0, se contemplan explícitamente los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0.

"Adyuvante", como se utiliza en la presente memoria, significa cualquier molécula añadida a las vacunas descritas en la presente memoria para mejorar la inmunogenicidad de los antígenos PRAME antígenos y/o las moléculas de ácido nucleico que codifican los antígenos descritos en la presente memoria.

"Anticuerpo" como se usa en la presente memoria significa un anticuerpo de las clases IgG, IgM, IgA, IgD, o IgE, o fragmentos, o derivados de los mismos, que incluyen Fab, F(ab')₂, Fd, y anticuerpos de cadena simple, diabodies, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos bifuncionales, y derivados de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo aislado de la muestra de suero de un mamífero, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo purificado por afinidad, o cualquier mezcla de los mismos que presente suficiente especificidad de unión a un epítipo deseado o a una secuencia derivada del mismo.

"Antígeno PRAME" se refiere a: proteínas que tienen secuencias de aminoácidos PRAME mutadas que incluyen los residuos de aminoácidos 19 a 526 de SEC ID NO:2. Los antígenos PRAME pueden incluir opcionalmente péptidos señal como los de otras proteínas. Por ejemplo, un antígeno PRAME que comprende un péptido señal puede incluir la secuencia de aminoácidos establecida en SEC ID NO: 2.

"Secuencia codificante" o "ácido nucleico codificante", como se utiliza en la presente memoria, significa los ácidos nucleicos (molécula de ARN o ADN) que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína. La secuencia codificadora puede incluir además señales de iniciación y terminación vinculadas de forma operativa a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación capaces de dirigir la expresión en las células de un individuo o mamífero al que se le administre el ácido nucleico.

"Complemento" o "complementario", tal como se utiliza en la presente memoria, puede significar un ácido nucleico de Watson-Crick (por ejemplo, A-T/U y C-G) o el emparejamiento de bases de Hoogsteen entre nucleótidos o análogos de nucleótidos de moléculas de ácido nucleico.

Como se utiliza en la presente memoria, "consenso" o "secuencia de consenso" significa una secuencia polipeptídica en base al análisis de una alineación de múltiples secuencias para el mismo gen de diferentes organismos. Se pueden preparar secuencias de ácido nucleico que codifican una secuencia polipeptídica consenso. Las vacunas que comprenden proteínas que comprenden secuencias de consenso y/o moléculas de ácido nucleico que codifican dichas proteínas se pueden utilizar para inducir una amplia inmunidad contra múltiples subtipos o serotipos de un antígeno particular.

"Corriente constante", tal como se utiliza en la presente memoria, describe una corriente que recibe o experimenta un tejido, o las células que definen dicho tejido, durante la duración de un impulso eléctrico administrado al mismo tejido. El impulso eléctrico se administra desde los dispositivos de electroporación descritos en la presente memoria. Esta corriente permanece a un amperaje constante en dicho tejido durante la vida de un pulso eléctrico porque el dispositivo de electroporación proporcionado en la presente memoria tiene un elemento de retroalimentación, preferentemente con retroalimentación instantánea. El elemento de retroalimentación puede medir la resistencia del tejido (o células) a lo largo de la duración del pulso y hacer que el dispositivo de electroporación altere su salida de energía eléctrica (por ejemplo, aumentar el voltaje) para que la corriente en el mismo tejido permanezca constante a lo largo del pulso eléctrico (del orden de microsegundos), y de pulso a pulso. En algunas realizaciones, el elemento de retroalimentación comprende un controlador.

"Retroalimentación de corriente" o "retroalimentación", como se utilizan en la presente memoria, se pueden usar indistintamente y pueden significar la respuesta activa de los dispositivos de electroporación proporcionados, que comprende la medición de la corriente en el tejido entre los electrodos y la alteración de la salida de energía suministrada por el dispositivo EP en consecuencia con el fin de mantener la corriente a un nivel constante. El usuario preajusta este nivel constante antes de iniciar una secuencia de impulsos o un tratamiento eléctrico. La

retroalimentación puede ser llevada a cabo por el componente de electroporación, por ejemplo, el controlador, del dispositivo de electroporación, dado que el circuito eléctrico es capaz de monitorizar continuamente la corriente en el tejido entre los electrodos y comparar esa corriente monitorizada (o corriente dentro del tejido) con una corriente preestablecida y llevar a cabo continuamente ajustes de salida de energía para mantener la corriente monitorizada en los niveles preestablecidos. El bucle de realimentación puede ser instantáneo, dado que se trata de una realimentación analógica en bucle cerrado.

"Corriente descentralizada", como se utiliza en la presente memoria, puede significar el patrón de corrientes eléctricas suministradas desde las diversas matrices de electrodos de aguja de los dispositivos de electroporación descritos en la presente memoria, en los que los patrones minimizan, o preferentemente eliminan, la aparición de estrés térmico relacionado con la electroporación en cualquier área del tejido que se electropora.

"Electroporación", "electropermeabilización" o "mejora electrocinética" ("EP"), como se utilizan indistintamente en la presente memoria, significa el uso de un pulso de campo eléctrico transmembrana para inducir vías microscópicas (poros) en una biomembrana; su presencia permite que biomoléculas tales como plásmidos, oligonucleótidos, ARNip, fármacos, iones y agua pasen de un lado a otro de la membrana celular.

Como se utiliza en la presente memoria, "fragmento" con respecto a las secuencias de ácido nucleico, significa una secuencia de ácido nucleico o una porción de la misma, que codifica un polipéptido capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero que reacciona de forma cruzada con un antígeno divulgado en la presente memoria. Los fragmentos pueden ser fragmentos de ADN seleccionados entre al menos una de las diversas secuencias de nucleótidos que codifican fragmentos de proteínas que se exponen a continuación. Los fragmentos pueden comprender al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% o al menos un 95% de una o más de las secuencias de ácido nucleico que se exponen a continuación, que excluyen un péptido señal heterólogo añadido. El fragmento puede comprender al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% de una o más de las secuencias de ácido nucleico que se exponen a continuación y, además, comprender opcionalmente la secuencia que codifica un péptido señal heterólogo que no se incluye al calcular el porcentaje de identidad. Los fragmentos pueden comprender además secuencias codificantes para un péptido señal, como un péptido señal de inmunoglobulina, por ejemplo un péptido señal de IgE o IgG. La secuencia codificante que codifica una metionina terminal N y/o un péptido señal puede estar unida a un fragmento de secuencia codificante.

En algunas realizaciones, los fragmentos pueden comprender al menos 20 nucleótidos o más, al menos 30 nucleótidos o más, al menos 40 nucleótidos o más, al menos 50 nucleótidos o más, al menos 60 nucleótidos o más, al menos 70 nucleótidos o más, al menos 80 nucleótidos o más, al menos 90 nucleótidos o más, al menos 100 nucleótidos o más, al menos 150 nucleótidos o más, al menos 200 nucleótidos o más, al menos 250 nucleótidos o más, al menos 300 nucleótidos o más, al menos 350 nucleótidos o más, al menos 400 nucleótidos o más, al menos 450 nucleótidos o más, al menos 500 nucleótidos o más, al menos 550 nucleótidos o más, al menos 600 nucleótidos o más, al menos 650 nucleótidos o más, al menos 700 nucleótidos o más, al menos 750 nucleótidos o más, al menos 800 nucleótidos o más, al menos 850 nucleótidos o más, al menos 900 nucleótidos o más, al menos 950 nucleótidos o más, o al menos 1000 nucleótidos o más de al menos una de las secuencias de ácido nucleico establecidas a continuación.

Como se utiliza en la presente memoria, "fragmento" o "fragmento inmunogénico" con respecto a las secuencias polipeptídicas, significa una polipéptido capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero que reacciona de forma cruzada con un antígeno divulgado en la presente memoria. Los fragmentos pueden ser fragmentos polipeptídicos seleccionados entre al menos una de las diversas secuencias de aminoácidos que se exponen a continuación. Los fragmentos de proteínas de consenso pueden comprender al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% o al menos un 95% de una proteína de consenso, que excluyen cualquier péptido señal heterólogo añadido. El fragmento puede comprender al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, o al menos el 99% de una o más de las secuencias amino establecidas a continuación y, opcionalmente, comprender un péptido señal heterólogo que no se incluye al calcular el porcentaje de identidad. Los fragmentos pueden comprender además un péptido señal, tal como un péptido señal de inmunoglobulina, por ejemplo un péptido señal de IgE o IgG.

Como se describe en la presente memoria, los fragmentos de proteínas de consenso pueden comprender al menos 20 aminoácidos o más, al menos 30 aminoácidos o más, al menos 40 aminoácidos o más, al menos 50 aminoácidos o más, al menos 60 aminoácidos o más, al menos 70 aminoácidos o más, al menos 80 aminoácidos o más, al menos 90 aminoácidos o más, al menos 100 aminoácidos o más, al menos 110 aminoácidos o más, al menos 120 aminoácidos o más, al menos 130 aminoácidos o más, al menos 140 aminoácidos o más, al menos 150 aminoácidos o más, al menos 160 aminoácidos o más, al menos 170 aminoácidos o más, al menos 180 aminoácidos o más de una proteína consenso divulgada en la presente memoria.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "construcción genética" se refiere a las moléculas de ADN o ARN que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifican una proteína. La secuencia codificadora incluye señales de iniciación y terminación unidas de forma operativa a elementos reguladores que incluyen un promotor y

una señal de poliadenilación capaces de dirigir la expresión en las células del individuo al que se le administra la molécula de ácido nucleico. Como se utiliza en la presente memoria, el término "forma expresable" se refiere a los constructos genéticos que contienen los elementos reguladores necesarios enlazados a una secuencia codificadora que codifica una proteína de forma que, cuando está presente en la célula del individuo, la secuencia codificadora se expresará.

El término "homología", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un grado de complementariedad. Puede haber homología parcial o completa (es decir, identidad). Una secuencia parcialmente complementaria que inhibe, al menos parcialmente, la hibridación de una secuencia completamente complementaria con un ácido nucleico diana se denomina con el término funcional "sustancialmente homólogo". Cuando se utiliza en referencia a una secuencia de ácido nucleico de doble cadena, tal como un ADNc o un clon genómico, el término "sustancialmente homólogo" como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una sonda que se puede hibridar con una cadena de la secuencia de ácido nucleico de doble cadena en condiciones de baja rigurosidad. Cuando se utiliza en referencia a una secuencia de ácido nucleico monocatenario, el término "sustancialmente homólogo" como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una sonda que puede hibridar con (es decir, es el complemento de) la secuencia plantilla de ácido nucleico monocatenario en condiciones de baja rigurosidad.

"Idéntico" o "identidad", como se utiliza en la presente memoria en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, significa que las secuencias tienen un porcentaje específico de residuos que son iguales en una región específica. El porcentaje se puede calcular al alinear óptimamente las dos secuencias, comparar las dos secuencias en la región especificada, determinar el número de posiciones en las que el residuo idéntico aparece en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividir el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la región especificada y multiplicar el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de la secuencia. En los casos en los que las dos secuencias tienen longitudes diferentes o el alineamiento produce uno o más extremos escalonados y la región de comparación especificada incluye una sola secuencia, los residuos de la secuencia única se incluyen en el denominador pero no en el numerador del cálculo. Al comparar el ADN y el ARN, la timina (T) y el uracilo (U) pueden considerarse equivalentes. La identificación puede realizarse manualmente o mediante un algoritmo informático de secuencias como BLAST o BLAST 2.0.

La "impedancia", como se utiliza en este documento, se puede utilizar cuando se habla del mecanismo de retroalimentación y se puede convertir en un valor de corriente de acuerdo con la ley de Ohm, para de este modo permitir comparaciones con la corriente preestablecida.

Por "respuesta inmunitaria", como se utiliza en la presente memoria, se entiende la activación del sistema inmunitario de un huésped, por ejemplo, el de un mamífero, en respuesta a la introducción de un antígeno. La respuesta inmunitaria puede ser en forma de respuesta celular o humoral, o ambas.

"Ácido nucleico" u "oligonucleótido" o "polinucleótido", tal como se utiliza aquí, significa al menos dos nucleótidos unidos covalentemente. La representación de una sola cadena también define la secuencia de la cadena complementaria. Así, un ácido nucleico también abarca la cadena complementaria de una cadena simple representada. Muchas variantes de un ácido nucleico pueden utilizarse para el mismo fin que un ácido nucleico determinado. Por lo tanto, un ácido nucleico también abarca los ácidos nucleicos sustancialmente idénticos y sus complementos. Una sola cadena proporciona una sonda que puede hibridarse con una secuencia objetivo en condiciones de hibridación estrictas. Así, un ácido nucleico también abarca una sonda que se hibrida en condiciones de hibridación estrictas.

Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, o pueden contener porciones de secuencia tanto bicatenario como monocatenario. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN, o un híbrido, donde el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribó y ribo-nucleótidos, y combinaciones de bases que incluyen uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina hipoxantina, isocitosina e isoguanina. Los ácidos nucleicos pueden obtenerse por procedimientos de síntesis química o por procedimientos recombinantes.

"Unido operativamente", como se utiliza en la presente memoria, significa que la expresión de un gen está bajo el control de un promotor con el que está conectado espacialmente. Un promotor puede situarse a 5' (corriente arriba) o a 3' (corriente abajo) de un gen bajo su control. La distancia entre el promotor y un gen puede ser aproximadamente la misma que la distancia entre ese promotor y el gen que controla en el gen del que deriva el promotor. Como se sabe en la técnica, la variación de esta distancia se puede acomodar sin pérdida de la función del promotor.

Un "péptido", "proteína" o "polipéptido", como se utiliza en la presente memoria, puede significar una secuencia enlazada de aminoácidos y puede ser natural, sintético o una modificación o combinación de natural y sintético.

Por "promotor", como se utiliza en la presente memoria, se entiende una molécula sintética o de origen natural que es capaz de conferir, activar o potenciar la expresión de un ácido nucleico en una célula. Un promotor puede comprender una o más secuencias reguladoras transcripcionales específicas para mejorar aún más la expresión y/o alterar la expresión espacial y/o temporal del ácido nucleico en una célula. Un promotor también puede incluir

elementos distales potenciadores o represores, que pueden estar situados a varios miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor puede provenir de fuentes tales como virus, bacterias, hongos, plantas, insectos y animales. Un promotor puede regular la expresión de un componente génico de forma constitutiva o diferencial con respecto a la célula, el tejido u órgano en el que se produce la expresión o, con respecto a la etapa de desarrollo en la que se produce la expresión, o en respuesta a estímulos externos tales como tensiones fisiológicas, patógenos, iones metálicos o agentes inductores. Ejemplos representativos de promotores incluyen el promotor del bacteriófago T7, el promotor del bacteriófago T3, el promotor SP6, el operador-promotor lac, el promotor tac, el promotor tardío del SV40, el promotor temprano del SV40, el promotor RSV-LTR, el promotor IE del CMV, el promotor temprano del SV40 o el promotor tardío del SV40 y el promotor IE del CMV.

Los términos "péptido señal" y "secuencia líder" se utilizan indistintamente en la presente memoria y se refieren a una secuencia de aminoácidos que puede unirse en el extremo amino de una proteína citada en la presente memoria. Los péptidos señalizadores/secuencias líderes suelen dirigir la localización de una proteína. Los péptidos señalizadores/secuencias líderes utilizados en el presente documento facilitan preferentemente la secreción de la proteína desde la célula en la que se produce. Los péptidos señalizadores/secuencias líderes suelen escindirse del resto de la proteína, a menudo denominada proteína madura, al ser secretada por la célula. Los péptidos señalizadores/secuencias líderes se unen al extremo amino (es decir, extremo N) de la proteína.

Como se utiliza en la presente memoria, "condiciones de hibridación estrictas" significa condiciones en las que una primera secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, la sonda) se hibridará con una segunda secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, el objetivo), tal como en una mezcla compleja de ácidos nucleicos. Las condiciones estrictas dependen de la secuencia y serán diferentes en distintas circunstancias. Las condiciones estrictas se pueden seleccionar para que sean entre 5 y 10 °C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica en un pH de fuerza iónica definido. La T_m puede ser la temperatura (bajo una fuerza iónica, un pH y una concentración nucleica definidos) a la que el 50% de las sondas complementarias a la diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio (como las secuencias diana están presentes en exceso, a la T_m, el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones estrictas pueden ser aquellas en las que la concentración de sal es inferior a aproximadamente 1,0 M de iones de sodio, tales como por ejemplo entre 0,01 y 1,0 M de concentración de iones de sodio (u otras sales) a un pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos unos 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, de unos 10 a 50 nucleótidos) y de al menos unos 60 °C para sondas largas (por ejemplo, mayores de unos 50 nucleótidos). También se pueden conseguir condiciones más estrictas con la adición de agentes desestabilizadores tales como la formamida. A fin de la hibridación selectiva o específica, una señal positiva puede ser al menos de 2 a 10 veces la hibridación de fondo. Algunos ejemplos de condiciones de hibridación estrictas son los siguientes: 50% de formamida, 5x SSC, y 1% de SDS, incubando a 42 °C, o, 5x SSC, 1% de SDS, incubando a 65 °C, con lavado en 0,2x SSC, y 0,1% de SDS a 65 °C.

"Individuo", como se utiliza en la presente memoria, puede significar un mamífero que quiere o necesita ser inmunizado con la vacuna descrita en la presente memoria. El mamífero puede ser un humano, un chimpancé, un perro, un gato, un caballo, una vaca, un cerdo, un pollo, un ratón o una rata.

Como se utiliza en la presente memoria, "sustancialmente complementaria" significa que una primera secuencia es al menos un 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica al complemento de una segunda secuencia en una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 180, 270, 360, 450, 540, o más nucleótidos o aminoácidos, o que las dos secuencias hibridan en condiciones de hibridación estrictas.

Como se utiliza en la presente memoria, "sustancialmente idéntica" significa que una primera y segunda secuencia son al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idénticas en una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 180, 270, 360, 450, 540 o más nucleótidos o aminoácidos, o con respecto a los ácidos nucleicos, si la primera secuencia es sustancialmente complementaria al complemento de la segunda secuencia.

"Tratamiento" o "tratar", como se utiliza en la presente memoria, puede significar la protección de un animal de una enfermedad a través de medios de prevención, supresión, represión o eliminación completa de la enfermedad. La prevención de la enfermedad implica la administración de una vacuna de la presente invención a un animal antes de la aparición de la enfermedad. La supresión de la enfermedad implica la administración de una vacuna de la presente invención a un animal después de la inducción de la enfermedad pero antes de su aparición clínica. Reprimir la enfermedad implica administrar una vacuna de la presente invención a un animal después de la aparición clínica de la enfermedad.

"Variante" utilizado en la presente memoria con respecto a un ácido nucleico significa (i) una porción o fragmento de una secuencia de nucleótidos de referencia; (ii) el complemento de una secuencia de nucleótidos de referencia o una porción de la misma; (iii) un ácido nucleico que es sustancialmente idéntico a un ácido nucleico de referencia o al complemento del mismo; o (iv) un ácido nucleico que hibrida en condiciones estrictas con el ácido nucleico de referencia, el complemento del mismo, o una secuencia sustancialmente idéntica.

Como se utiliza en la presente memoria, "variante" con respecto a un péptido o polipéptido significa que difiere en la

secuencia de aminoácidos por la inserción, supresión o sustitución conservadora de aminoácidos, pero conserva al menos una actividad biológica. Variante también puede significar una proteína con una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una proteína de referencia con una secuencia de aminoácidos que conserva al menos una actividad biológica. Una sustitución conservadora de un aminoácido, es decir, la sustitución de un aminoácido por otro de propiedades similares (por ejemplo, hidrofiliidad, grado y distribución de las regiones cargadas) se reconoce en la técnica como algo que típicamente implica un cambio menor. Estos cambios menores pueden identificarse, en parte, considerando el índice hidropático de los aminoácidos, tal como se entiende en la técnica. Kyte et al., J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982). El índice hidropático de un aminoácido se basa en la consideración de su hidrofobicidad y su carga. Se sabe en la técnica que los aminoácidos de índices hidropáticos similares pueden ser sustituidos y seguir conservando la función proteica. En un aspecto, se sustituyen aminoácidos que tienen índices hidropáticos de ± 2 . La hidrofiliidad de los aminoácidos también puede utilizarse para revelar las sustituciones que harían que las proteínas conservaran su función biológica. La consideración de la hidrofiliidad de los aminoácidos en el contexto de un péptido permite calcular la mayor hidrofiliidad media local de ese péptido, una medida útil que, según se ha informado, se correlaciona bien con la antigenicidad y la inmunogenicidad. La sustitución de aminoácidos con valores de hidrofiliidad similares puede dar lugar a que los péptidos conserven la actividad biológica, por ejemplo la inmunogenicidad, como se entiende en la técnica. Las sustituciones pueden realizarse con aminoácidos que tengan valores de hidrofiliidad dentro de un margen de ± 2 . Tanto el índice de hidrofobicidad como el valor de hidrofiliidad de los aminoácidos están influidos por la cadena lateral concreta de ese aminoácido. En consonancia con esa observación, se entiende que las sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la función biológica dependen de la similitud relativa de los aminoácidos y, en particular, de las cadenas laterales de esos aminoácidos, tal y como revelan la hidrofobicidad, la hidrofiliidad, la carga, el tamaño y otras propiedades.

Una variante puede ser una secuencia de ácido nucleico que es sustancialmente idéntica en toda la longitud de la secuencia genética completa o en un fragmento de la misma. La secuencia de ácido nucleico puede ser 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica en toda la longitud de la secuencia genética o de un fragmento de la misma. Una variante puede ser una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica en toda la longitud de la secuencia de aminoácidos o en un fragmento de la misma. La secuencia de aminoácidos puede ser 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica en toda la longitud de la secuencia de aminoácidos o en un fragmento de la misma

"Vector", tal como se utiliza aquí, significa una secuencia de ácido nucleico que contiene un origen de replicación. Un vector puede ser un vector viral, un bacteriófago, un cromosoma artificial bacteriano o un cromosoma artificial de levadura. Un vector puede ser de ADN o de ARN. Un vector puede ser un vector extracromosómico autorreplicante y, preferentemente, es un plásmido de ADN. El vector puede contener o incluir una o más secuencias de ácido nucleico heterólogas.

Vacuna

Se proporcionan vacunas que comprenden un antígeno PRAME descrito en la presente memoria o una molécula de ácido nucleico que codifica dicho antígeno. En algunas realizaciones, el antígeno PRAME comprende la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos de aminoácidos 19 a 526 de SEC ID NO: 2. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica un antígeno PRAME que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos de aminoácidos 19 a 526 SEC ID NO:2. Un dominio humano de unión a la antimesotelina, que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEC ID NO: 2. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica un antígeno PRAME que tiene la secuencia de aminoácidos establecida SEC ID NO:2. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno PRAME comprende la secuencia de ácido nucleico establecida en los nucleótidos 55 a 1584 de SEC ID NO: 1.. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica el anígeno PRAME comprende la secuencia de ácido nucleico establecida en SEC ID NO: 1. Las vacunas pueden ser capaces de generar en un individuo una respuesta inmunitaria contra el antígeno. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria terapéutica o profiláctica. Las vacunas pueden comprender un vector o una pluralidad de vectores, como se describe con más detalle a continuación.

Las vacunas se pueden utilizar para proteger contra el cáncer, por ejemplo, un cáncer o tumor que exprese PRAME. Las vacunas se pueden utilizar para prevenir y/o tratar un cáncer de ovario que exprese PRAME en un individuo que lo necesite. Las vacunas pueden inducir respuestas celulares y/o de anticuerpos contra PRAME y contra cánceres que expresen PRAME en un individuo que las necesite. En algunas realizaciones de la presente divulgación, la vacuna se puede utilizar para proteger contra, prevenir, tratar y/o inducir respuestas celulares y/o de anticuerpos contra células caracterizadas por la expresión aberrante de PRAME. En algunas realizaciones de la presente divulgación, la vacuna se puede usar para proteger contra, prevenir, tratar, y/o inducir respuestas celulares y/o de anticuerpos contra células de cáncer de ovario caracterizadas por expresión aberrante de PRAME, específicamente células de cáncer de ovario epitelial, y más específicamente, células de cáncer de ovario seroso.

El desarrollo de una vacuna contra el cáncer como se describe en la presente memoria comprende la identificación de un antígeno del cáncer, por ejemplo, PRAME, que no es reconocido por el sistema inmunitario y es un autoantígeno. El antígeno cancerígeno identificado pasa de ser un antígeno propio a un antígeno extraño para ser

reconocido por el sistema inmunitario. El rediseño de la secuencia de ácidos nucleicos y aminoácidos del antígeno canceroso recombinante de un antígeno propio a un antígeno extraño rompe la tolerancia del sistema inmunitario al antígeno. A fin de romper la tolerancia, se pueden emplear varias medidas de rediseño para producir el antígeno del cáncer, como se describe a continuación.

- 5 El rompimiento de tolerancia puede inducir respuestas de células T específicas de antígeno y/o de anticuerpos de alto título, para de este modo inducir o provocar una respuesta inmunitaria dirigida o reactiva contra el cáncer o el tumor que expresa el antígeno. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria inducida o provocada puede ser una respuesta inmunitaria celular, humoral o tanto celular como humoral. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria celular inducida o provocada puede incluir la inducción o secreción de interferón-gamma (IFN- γ) y/o
- 10 factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). En otras realizaciones, la respuesta inmunitaria inducida o provocada puede reducir o inhibir uno o más factores de supresión inmunitaria que promueven el crecimiento del tumor o del cáncer que expresa el antígeno, por ejemplo, pero sin limitarse a, factores que subregulan la presentación del CMH, factores que sobrerregulan las células T reguladoras específicas del antígeno (Tregs), PD-L1, FasL, citoquinas tales como IL-10 y TFG- β , macrófagos asociados al tumor, fibroblastos asociados al tumor, factores solubles producidos por células inmunosupresoras, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1, y una molécula de punto de control inmunitario.
- 15

En una realización particular, la vacuna puede mediar la eliminación o prevenir el crecimiento de células tumorales por medio (1) del aumento de linfocitos T citotóxicos tales como CD8+ (CTL) para atacar y eliminar células tumorales; (2) del aumento de respuestas de células T auxiliares; y/o (3) del aumento de respuestas inflamatorias a través de IFN- γ y TFN- α , o preferentemente todo lo anterior. La vacuna puede aumentar la supervivencia libre de tumor en un 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44% y 45%. La vacuna puede reducir la masa tumoral en un 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% y 60% tras la inmunización. La vacuna puede prevenir y bloquear el aumento de la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), una citocina segregada por las células supresoras mieloides derivadas. La vacuna puede aumentar la supervivencia del tumor en un 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% y 60%.

20

25

La vacuna puede aumentar una respuesta inmunitaria celular en un individuo al que se le administra la vacuna de aproximadamente 50 veces a aproximadamente 6000 veces, de aproximadamente 50 veces a aproximadamente 5500 veces, de aproximadamente 50 veces a aproximadamente 5000 veces, de aproximadamente 50 veces a aproximadamente 4500 veces, entre 100 y 6000 veces, entre 150 y 6000 veces, entre 200 y 6000 veces, entre 250 y 6000 veces, o entre 300 y 6000 veces en comparación con la respuesta inmunitaria celular de un individuo al que no se le administró la vacuna. En algunas realizaciones, la vacuna puede aumentar la respuesta inmunitaria celular en el individuo al que se administra la vacuna en aproximadamente 50 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces, 250 veces, 300 veces, 350 veces, 400 veces, 450 veces, 500 veces, 550 veces, 600 veces, 650 veces, 700 veces, 750 veces, 800 veces, 850 veces, 900 veces, 950 veces, 1000 veces, 1100 veces, 1200 veces, 1300 veces, 1400 veces, 1500 veces, 1600 veces, 1700 veces, 1800 veces, 1900 veces, 2000 veces, 2100 veces, 2200 veces, 2300 veces, 2400 veces, 2500 veces, 2600 veces, 2700 veces, 2800 veces, 2900 veces, 3000 veces, 3100 veces, 3200 veces, 3300 veces, 3400 veces, 3500 veces, 3600 veces, 3700 veces, 3800 veces, 3900 veces, 4000 veces, 4100 veces, 4200 veces, 4300 veces, 4400 veces, 4500 veces, 4600 veces, 4700 veces, 4800 veces, 4900 veces, 5000 veces, 5100 veces, 5200 veces, 5300 veces, 5400 veces, 5500 veces, 5600 veces, 5700 veces, 5800 veces, 5900 veces o 6000 veces en comparación con la respuesta inmunitaria celular en el individuo al que no se administró la vacuna.

30

35

40

La vacuna puede aumentar los niveles de interferón gamma (IFN- γ) en un individuo al que se le administra la vacuna entre 50 y 6000 veces, entre 50 y 5500 veces, entre 50 y 5000 veces, entre 50 y 4500 veces, entre 100 y 6000 veces, entre 150 y 6000 veces, entre 200 y 6000 veces, entre 250 y 6000 veces, o entre 300 y 6000 veces en comparación con los niveles de IFN- γ en un individuo al que no se le administró la vacuna. En algunas realizaciones, la vacuna puede aumentar los niveles de IFN- γ en el individuo al que se administra la vacuna en aproximadamente 50 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces, 250 veces, 300 veces, 350 veces, 400 veces, 450 veces, 500 veces, 550 veces, 600 veces, 650 veces, 700 veces, 750 veces, 800 veces, 850 veces, 900 veces, 950 veces, 1000 veces, 1100 veces, 1200 veces, 1300 veces, 1400 veces, 1500 veces, 1600 veces, 1700 veces, 1800 veces, 1900 veces, 2000 veces, 2100 veces, 2200 veces, 2300 veces, 2400 veces, 2500 veces, 2600 veces, 2700 veces, 2800 veces, 2900 veces, 3000 veces, 3100 veces, 3200 veces, 3300 veces, 3400 veces, 3500 veces, 3600 veces, 3700 veces, 3800 veces, 3900 veces, 4000 veces, 4100 veces, 4200 veces, 4300 veces, 4400 veces, 4500 veces, 4600 veces, 4700 veces, 4800 veces, 4900 veces, 5000 veces, 5100 veces, 5200 veces, 5300 veces, 5400 veces, 5500 veces, 5600 veces, 5700 veces, 5800 veces, 5900 veces o 6000 veces en comparación con los niveles de IFN- γ en el individuo al que no se administró la vacuna.

45

50

55

La vacuna puede ser una vacuna de ADN. Las vacunas de ADN se desvelan en los documentos Patentes estadounidenses n° 5.593.972; 5.739.118; 5.817.637; 5.830.876; 5.962.428; 5.981.505; 5.580.859; 5.703.055 y 5.676.594. La vacuna de ADN puede comprender además elementos o reactivos que inhiban su integración en el cromosoma.

- 60 La vacuna puede incluir un ARN que codifica el antígeno del cáncer. La vacuna de ARN se puede introducir en la célula.

La vacuna puede ser una vacuna viva atenuada, una vacuna que utilice vectores recombinantes para administrar antígeno, vacunas de subunidades y vacunas de glicoproteínas, por ejemplo, pero sin limitarse a ellas, las vacunas descritas en los documentos Patentes de EE.UU. Nos: 4.510.245, 4.797.368, 4.722.848, 4.790.987, 4.920.209, 5.077.044, 5.110.587, 5.112.749, 5.387.744, 5.389.368., 5.424.065, 5.451.499, 5.453, 64, 5.462.734, 5.470.734, 5.474.935, 5.482.713, 5.591.439, 5.643.579, 5.650.309, 5.698.202, 5.955.088, 6.034.298, 6.042.836 y 6.589.529.

En algunas realizaciones, la vacuna de ácido nucleico puede comprender además secuencia codificante para un adyuvante molecular, en algunos casos el adyuvante molecular puede ser IL-12, IL-15, IL-28, IL-31, IL-33, y/o RANTES, y en algunos casos el adyuvante molecular es un inhibidor de punto de control, que incluye antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), receptor-1 de muerte antiprogramada (PD-1) y gen de activación antilinfocitaria (LAG-3). La secuencia codificante para IL-12, IL-15, IL-28, IL-31, IL-33 y/o RANTES se puede incluir en una o más moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencia codificante para uno o más antígenos. La secuencia codificante para IL-12, IL-15, IL-28, IL-31, IL-33 y/o RANTES se puede incluir en moléculas de ácido nucleico separadas, tales como un plásmido separado.

La vacuna de la presente invención puede tener las características requeridas de las vacunas efectivas, tales como ser segura para que la vacuna en sí misma no cause enfermedad o muerte; ser protectora contra la enfermedad resultante de la exposición a patógenos vivos tales como virus o bacterias; inducir anticuerpos neutralizantes para prevenir la infección de las células; inducir células T protectoras contra patógenos intracelulares; y proporcionar facilidad de administración, pocos efectos secundarios, estabilidad biológica y bajo coste por dosis. La vacuna puede lograr algunas o todas estas características al contener el antígeno del cáncer como se discute a continuación.

La vacuna puede comprender además uno o más inhibidores de una o más moléculas de punto de control inmunitario (es decir, un inhibidor de punto de control inmunitario). A continuación se describen con más detalle las moléculas de punto de control inmunitario. El inhibidor del punto de control inmunitario es cualquier ácido nucleico o proteína que impida la supresión de cualquier componente del sistema inmunitario, tal como la presentación de clase MHC, la presentación y/o diferenciación de células T, la presentación y/o diferenciación de células B, cualquier citocina, quimiocina o señalización para la proliferación y/o diferenciación de células inmunitarias. Como también se describe a continuación con más detalle, la vacuna se puede combinarse además con anticuerpos contra inhibidores de puntos de control tales como PD-1 y PDL-1 para aumentar la estimulación de las respuestas inmunitarias tanto celular como humoral. El uso de anticuerpos anti-PD-1 o anti-PDL-1 impide que PD-1 o PDL-1 supriman las respuestas de células T y/o células B.

Antígeno

Como se ha descrito anteriormente, la vacuna puede comprender un antígeno o una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno. El antígeno puede ser PRAME, un fragmento del mismo, una variante del mismo o una combinación del mismo. PRAME se expresa en los testículos, pero no suele hacerlo, o lo hace en cantidades relativamente pequeñas, en los tejidos normales no cancerosos. La proteína PRAME es un represor del receptor del ácido retinoico y, sin estar ligada a la teoría, se cree que esta represión confiere una ventaja de crecimiento a las células cancerosas al reprimir la detención de la proliferación celular y la apoptosis inducida por el ácido retinoico. Por ejemplo, el PRAME se ha asociado a varias formas de cáncer y es un antígeno cancerígeno conocido. La expresión de PRAME aumenta en el cáncer de endometrio, testículo, melanoma y ovario.

En consecuencia, la vacuna se puede utilizar para tratar a los individuos que padecen el cáncer que expresa PRAME. La vacuna también se puede utilizar para tratar a individuos con cánceres o tumores que expresan PRAME para prevenir el desarrollo de dichos tumores en los individuos. El antígeno PRAME de la presente divulgación puede diferir del antígeno PRAME nativo, "normal", y por lo tanto, proporcionar terapia o profilaxis contra un tumor que exprese el antígeno PRAME. En consecuencia, en la presente memoria se proporcionan secuencias de antígeno PRAME que difieren del gen PRAME nativo (es decir, genes o secuencias PRAME variantes). Algunos aspectos de la presente invención proporcionan vacunas que comprenden una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico establecida en SEC ID NO: 1, y algunos aspectos proporcionan una vacuna que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos establecida en SEC ID NO: 2.

Se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden las secuencias heterólogas descritas anteriormente. Se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que consisten en las secuencias heterólogas descritas anteriormente. Las moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden las secuencias heterólogas descritas anteriormente se pueden incorporar a vectores tales como plásmidos, vectores virales y otras formas de moléculas de ácido nucleico como se describe a continuación. De este modo, en algunas realizaciones de la presente divulgación, la molécula de ácido nucleico se incorpora a un plásmido. En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico se incorpora a un vector. Algunos aspectos de la presente divulgación proporcionan composiciones que comprenden el ácido nucleico que tiene la secuencia de ácido nucleótido SEC ID NO: 1 y que tiene una secuencia de nucleótido que codifica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2.

Se proporcionan moléculas de ácido nucleico con secuencias que codifican antígenos PRAME. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se incorpora a un vector, incluyendo pero sin limitarse a un plásmido o

un vector viral. Las secuencias codificantes que codifican los antígenos PRAME tienen las secuencias descritas anteriormente.

Se proporcionan moléculas proteicas que comprenden las secuencias de aminoácidos heterólogas descritas anteriormente. Se proporcionan moléculas proteicas compuestas por las secuencias de aminoácidos heterólogas descritas anteriormente. Se proporcionan proteínas y polipéptidos con las secuencias descritas anteriormente. Las proteínas y polipéptidos de la presente divulgación se pueden denominar antígenos PRAME e inmunógenos PRAME. Los antígenos PRAME son capaces de provocar una respuesta inmunitaria contra los cánceres y/o tumores que expresan un antígeno PRAME.

En un aspecto, se desea que el antígeno consenso proporcione una transcripción y traducción mejoradas, incluyendo tener uno o más de los siguientes: secuencia líder de bajo contenido de GC para aumentar la transcripción; estabilidad del ARNm y optimización de codones; y, en la medida de lo posible, eliminación de motivos de secuencia de acción cis (es decir, cajas TATA internas).

En algunos aspectos, se desea generar un antígeno de consenso que genere una amplia respuesta inmunitaria a través de múltiples cepas, teniendo el antígeno de consenso una o más de las siguientes características: incorporar todas las secuencias de longitud completa disponibles; secuencias generadas por ordenador que utilicen el aminoácido más comúnmente presente en cada posición; y aumentar la reactividad cruzada entre cepas.

El antígeno PRAME puede ser una secuencia de antígeno (o inmunógeno) consenso derivada de dos o más especies. El antígeno PRAME puede comprender secuencias de consenso y/o modificación para mejorar la expresión. La modificación puede incluir la optimización de codones, la optimización del ARN, la adición de una secuencia Kozak (por ejemplo, GCC ACC) para aumentar la iniciación de la traducción y/o la adición de una secuencia líder de inmunoglobulina para aumentar la inmunogenicidad del antígeno PRAME. El antígeno PRAME puede comprender un péptido señal tal como un péptido señal de inmunoglobulina, por ejemplo, pero no limitado a, un péptido señal de inmunoglobulina E (IgE) o inmunoglobulina G (IgG). En algunas realizaciones, el antígeno consenso PRAME puede comprender una etiqueta de hemaglutinina (HA). Los antígenos consenso PRAME se pueden diseñar para provocar respuestas inmunitarias celulares más fuertes y amplias que los correspondientes antígenos PRAME optimizados por codones.

El antígeno consenso PRAME puede comprender una o más variantes en uno o más dominios funcionales de la proteína, para de este modo provocar respuestas inmunitarias celulares y/o humorales más fuertes y más amplias que un antígeno PRAME correspondiente optimizado por codón. La una o más mutaciones pueden ser una sustitución de uno o más de los aminoácidos en un dominio de la proteína PRAME que media la interacción con RAR.

Vacuna en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario

La vacuna puede comprender además uno o más inhibidores de una o más moléculas de punto de control inmunitario (es decir, un inhibidor de punto de control inmunitario). A continuación se describen con más detalle las moléculas del punto de control inmunitario. El inhibidor del punto de control inmunitario es cualquier ácido nucleico o proteína que impida la supresión de cualquier componente del sistema inmunitario, tal como la presentación de clase MHC, la presentación y/o diferenciación de células T, la presentación y/o diferenciación de células B, cualquier citocina, quimiocina o señalización para la proliferación y/o diferenciación de células inmunitarias.

Dicho inhibidor puede ser una secuencia de ácido nucleico, una secuencia de aminoácido, una molécula pequeña o una combinación de las mismas. La secuencia de ácido nucleico puede ser ADN, ARN, ADNc, una variante del mismo, un fragmento del mismo o una combinación de los mismos. El ácido nucleico también puede incluir secuencias adicionales que codifican secuencias enlazadoras o de etiqueta que se unen al inhibidor de punto de control inmunitario por medio de un enlace peptídico. La molécula pequeña puede ser un compuesto orgánico o inorgánico de bajo peso molecular, por ejemplo, inferior a 800 Daltons, que puede servir como sustrato enzimático, ligando (o análogo del mismo) unido a una proteína o ácido nucleico, o regulador de un proceso biológico. La secuencia de aminoácidos puede ser una proteína, un péptido, una variante del mismo, un fragmento del mismo o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario puede ser una o más secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo, una variante del mismo, un fragmento del mismo o una combinación de los mismos. En otras realizaciones, el inhibidor del punto de control inmunitario puede ser un anticuerpo, una variante del mismo, un fragmento del mismo o una combinación de los mismos.

1. Molécula de punto de control inmunitario

La molécula del punto de control inmunitario puede ser una secuencia de ácido nucleico, una secuencia de aminoácidos, una molécula pequeña o una combinación de las mismas. La secuencia de ácido nucleico puede ser ADN, ARN, ADNc, una variante del mismo, un fragmento del mismo o una combinación de los mismos. El ácido nucleico también puede incluir secuencias adicionales que codifican secuencias enlazadoras o de etiqueta que se unen al inhibidor de punto de control inmunitario por medio de un enlace peptídico. La molécula pequeña puede ser

un compuesto orgánico o inorgánico de bajo peso molecular, por ejemplo, inferior a 800 Daltons, que puede servir como sustrato enzimático, ligando (o análogo del mismo) unido a una proteína o ácido nucleico, o regulador de un proceso biológico. La secuencia de aminoácidos puede ser una proteína, un péptido, una variante del mismo, un fragmento del mismo o una combinación de los mismos.

5 a. PD-1 y PD-L1

La molécula de punto de control inmunitario puede ser la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), el ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1), un fragmento del mismo, una variante del mismo o una combinación de los mismos. PD-1 es una proteína de la superficie celular codificada por el gen *PDCD1*. PD-1 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y se expresa en células T y pro-B, por lo que contribuye al destino y/o diferenciación de estas células. En particular, PD-1 es una proteína de membrana de tipo 1 de la familia CD28/CTLA-4 de reguladores de células T y regula negativamente las señales del receptor de células T (TCR), para de este modo regular negativamente las respuestas inmunitarias. PD-1 puede regular negativamente las respuestas de las células T CD8+ y, por tanto, inhibir la citotoxicidad mediada por CD8 y potenciar el crecimiento tumoral.

PD-1 tiene dos ligandos, PD-L1 y PD-L2, que son miembros de la familia B7. PD-L1 se regula al alza en macrófagos y células dendríticas (DC) en respuesta al tratamiento con LPS y GM-CSF, y en células T y B tras la señalización de los receptores de células TCR y B. PD-L1 se expresa en muchas líneas celulares tumorales, incluidos mielomas, mastocitomas y melanomas.

2. Anticuerpo contra molécula de punto de control inmunitario

Como se ha descrito anteriormente, el inhibidor del punto de control inmunitario puede ser un anticuerpo. El anticuerpo se puede unir o reaccionar con un antígeno (es decir, la molécula de punto de control inmunitario descrita anteriormente). En consecuencia, el anticuerpo se puede considerar un anticuerpo de molécula de punto de control antiinmunitario o un anticuerpo de molécula de punto de control inmunitario. El anticuerpo puede estar codificado por una secuencia de ácido nucleico contenida en

El anticuerpo puede incluir un polipéptido de cadena pesada y un polipéptido de cadena ligera. El polipéptido de cadena pesada puede incluir una región de cadena pesada variable (VH) y/o al menos una región de cadena pesada constante (CH). La al menos una región de cadena pesada constante puede incluir una región de cadena pesada constante 1 (CH1), una región de cadena pesada constante 2 (CH2), y una región de cadena pesada constante 3 (CH3), y/o una región bisagra.

En algunas realizaciones, el polipéptido de cadena pesada puede incluir una región VH y una región CH1. En otras realizaciones, el polipéptido de cadena pesada puede incluir una región VH, una región CH1, una región bisagra, una región CH2 y una región CH3.

El polipéptido de cadena pesada puede incluir un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad ("CDR"). El conjunto CDR puede contener tres regiones hipervariables de la región VH. Partiendo del N-terminal del polipéptido de la cadena pesada, estas CDR se denominan "CDR1", "CDR2" y "CDR3", respectivamente. Las CDR1, CDR2 y CDR3 del polipéptido de la cadena pesada pueden contribuir a la unión o al reconocimiento del antígeno.

El polipéptido de cadena ligera puede incluir una región de cadena ligera variable (VL) y/o una región de cadena ligera constante (CL). El polipéptido de cadena ligera puede incluir un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad ("CDR"). El conjunto CDR puede contener tres regiones hipervariables de la región VL. Partiendo del N-terminal del polipéptido de la cadena ligera, estas CDR se denominan "CDR1", "CDR2" y "CDR3", respectivamente. Las CDR1, CDR2 y CDR3 del polipéptido de la cadena ligera pueden contribuir a la unión o al reconocimiento del antígeno.

El anticuerpo puede comprender un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad ("CDR") de la cadena pesada y de la cadena ligera, respectivamente interpuestas entre un conjunto de marco ("FR") de la cadena pesada y de la cadena ligera que proporcionan soporte a las CDR y definen la relación espacial de las CDR entre sí. El conjunto de CDR puede contener tres regiones hipervariables de una región V de la cadena pesada o ligera. Partiendo del extremo N de una cadena pesada o ligera, estas regiones se denominan "CDR1", "CDR2" y "CDR3", respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por lo tanto, puede incluir seis CDRs, comprendiendo el conjunto de CDRs de cada una de las regiones V de la cadena pesada y ligera.

El anticuerpo puede ser una inmunoglobulina (Ig). Las Ig pueden ser, por ejemplo, IgA, IgM, IgD, IgE e IgG. La inmunoglobulina puede incluir el polipéptido de cadena pesada y el polipéptido de cadena ligera. El polipéptido de cadena pesada de la inmunoglobulina puede incluir una región VH, una región CH1, una región bisagra, una región CH2 y una región CH3. El polipéptido de cadena ligera de la inmunoglobulina puede incluir una región VL y una región CL.

Además, la enzima proteolítica papaína escinde preferentemente las moléculas de IgG para producir varios fragmentos, dos de los cuales (los fragmentos F(ab)) comprenden cada uno un heterodímero covalente que incluye un sitio de unión al antígeno intacto. La enzima pepsina es capaz de escindir las moléculas de IgG para proporcionar

varios fragmentos, incluido el fragmento $F(ab')_2$, que comprende los dos sitios de unión al antígeno. En consecuencia, el anticuerpo puede ser el Fab o el $F(ab')_2$. El Fab puede incluir el polipéptido de cadena pesada y el polipéptido de cadena ligera. El polipéptido de cadena pesada del Fab puede incluir la región VH y la región CH1. La cadena ligera del Fab puede incluir la región VL y la región CL.

- 5 El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena única, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo totalmente humano. El anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo de una especie no humana que se une al antígeno deseado con una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana.

10 **a. Anticuerpo PD-1**

El anticuerpo de molécula de punto de control antiinmunitario puede ser un anticuerpo anti-PD-1 (también denominado en la presente memoria "anticuerpo PD-1"), una variante del mismo, un fragmento del mismo o una combinación de los mismos. El anticuerpo PD-1 puede ser Nivolumab. El anticuerpo anti-PD-1 puede inhibir la actividad PD-1, para de este modo inducir, provocar o aumentar una respuesta inmunitaria contra un tumor o cáncer y disminuir el crecimiento tumoral.

15 **b. Anticuerpo PD-L1**

El anticuerpo de molécula de punto de control antiinmunitario puede ser un anticuerpo anti-PD-L1 (también denominado en la presente memoria "anticuerpo PD-L1"), una variante del mismo, un fragmento del mismo o una combinación de los mismos. El anticuerpo anti-PD-L1 puede inhibir la actividad de PD-L1, para de este modo inducir, provocar o aumentar una respuesta inmunitaria contra un tumor o cáncer y disminuir el crecimiento tumoral.

Vector

La vacuna puede comprender uno o más vectores que incluyen un ácido nucleico heterólogo que codifica el antígeno PRAME. El uno o más vectores pueden ser capaces de expresar el antígeno en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en el mamífero. El vector puede comprender ácido nucleico heterólogo que codifica el antígeno. El vector puede tener una secuencia de ácido nucleico que contenga un origen de replicación. El vector puede ser un plásmido, un bacteriófago, un cromosoma artificial bacteriano o un cromosoma artificial de levadura. El vector puede ser un vector extracromosómico de autorreplicación o un vector que se integra en el genoma del huésped.

El uno o más vectores pueden ser un constructo de expresión, que generalmente es un plásmido que se utiliza para introducir un gen específico en una célula diana. Una vez que el vector de expresión está dentro de la célula, la proteína codificada por el gen es producida por los complejos ribosomales de la maquinaria celular de transcripción y traducción. El plásmido suele estar diseñado para contener secuencias reguladoras que actúan como regiones potenciadoras y promotoras y que conducen a la transcripción eficiente del gen transportado en el vector de expresión. Los vectores de la presente invención expresan grandes cantidades de ARN mensajero estable y, por tanto, proteínas.

Los vectores pueden tener señales de expresión como un promotor fuerte, un codón de terminación fuerte, el ajuste de la distancia entre el promotor y el gen clonado, y la inserción de una secuencia de terminación de la transcripción y una PTIS (secuencia de iniciación de la traducción portátil).

El vector puede ser un plásmido circular o un ácido nucleico lineal. El plásmido circular y el ácido nucleico lineal son capaces de dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos particular en una célula sujeta apropiada. El vector puede tener un promotor unido de forma operable a la secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno, que puede estar unido de forma operable a señales de terminación. El vector también puede contener las secuencias necesarias para la correcta traducción de la secuencia de nucleótidos. El vector puede incluir secuencias necesarias para la clonación de fragmentos deseados o para mejorar la eficacia de dicha clonación, incluyendo, entre otros, el antígeno PRAME u otras secuencias codificantes, secuencias reguladoras y secuencias codificantes de marcadores de selección y/o cribado. El vector que comprende la secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérico, lo que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. La expresión de la secuencia de nucleótidos en el casete de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible, que inicia la transcripción sólo cuando la célula huésped está expuesta a algún estímulo externo particular. En el caso de un organismo multicelular, el promotor también puede ser específico de un tejido u órgano concreto o de una fase de desarrollo.

El vector puede ser un plásmido. El vector puede ser útil para transfectar células con ácido nucleico que codifica un antígeno de PRAME, que la célula huésped transformada se cultiva y mantiene en condiciones en las que tiene lugar la expresión del antígeno.

El plásmido puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más de los antígenos PRAME divulgados en la presente memoria, incluidas secuencias codificantes que codifican antígenos consenso sintéticos

capaces de provocar una respuesta inmunitaria contra un antígeno, fragmentos de dichas proteínas, variantes de dichas proteínas, fragmentos de variantes o proteínas de fusión que se componen de combinaciones de proteínas consenso y/o fragmentos de proteínas consenso y/o variantes de proteínas consenso y/o fragmentos de variantes de proteínas consenso.

- 5 Un solo plásmido puede contener secuencia codificante para un solo antígeno, secuencia codificante para dos antígenos, secuencia codificante para tres antígenos o secuencia codificante para cuatro antígenos.

En algunas realizaciones, un plásmido puede comprender además secuencia codificante que codifica CCR20 solo o como parte de uno de estos plásmidos. Del mismo modo, los plásmidos pueden comprender además secuencias codificantes para IL-12, IL-15, y/o IL-28.

- 10 El plásmido puede comprender además un codón de iniciación, que puede estar aguas arriba de la secuencia codificante, y un codón de parada, que puede estar aguas abajo de la secuencia codificante. El codón de iniciación y terminación están en el marco de la secuencia de codificación del antígeno.

- 15 El vector también puede comprender un promotor que está operablemente unido a la secuencia codificadora del antígeno. El promotor operativamente unido a la secuencia codificadora puede ser un promotor del virus simio 40 (SV40), un promotor del virus del tumor mamario del ratón (MMTV), un promotor del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como el promotor de la repetición terminal larga (LTR) del virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV), un promotor del virus Moloney, un promotor del virus de la leucosis aviar (ALV), un promotor del citomegalovirus (CMV) como el promotor temprano inmediato del CMV, un promotor del virus de Epstein Barr (EBV) o un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), o similares. El promotor también puede ser un promotor de un gen humano tal como actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana o metalotioneína humana.
- 20 El promotor también puede ser un promotor específico del tejido, tal como un promotor específico del músculo o de la piel, natural o sintético. Ejemplos de tales promotores se describen en el documento Publicación estadounidense nº 2004/0175727 cuyo contenido se incorpora en la presente memoria en su totalidad.

- 25 El plásmido también puede comprender una señal de poliadenilación, que puede estar corriente abajo de la secuencia codificadora. La señal de poliadenilación puede ser una señal de poliadenilación de SV40, una señal de poliadenilación de LTR, una señal de poliadenilación de CMV, una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (bGH), una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento humana (hGH) o una señal de poliadenilación de la β -globina humana. La señal de poliadenilación del SV40 puede ser una señal de poliadenilación de un vector pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA).

- 30 El plásmido también puede comprender un potenciador corriente arriba de la secuencia codificante. El potenciador puede ser actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana o un potenciador viral tal como uno de CMV, FMDV, RSV o EBV. Los potenciadores de función polinucleotídicos se describen en los documentos Patentes de EE.UU. Nos. 5.593.972; 5,962,428y WO94/016737 cuyo contenido se incorpora íntegramente por referencia.

- 35 El plásmido también puede comprender un origen de replicación de mamífero a fin de mantener el plásmido extracromosómico y producir múltiples copias del plásmido en una célula. El plásmido puede ser pVAX1, pCEP4 o pREP4 (Invitrogen, San Diego, CA). El plásmido puede comprender el origen de replicación del virus de Epstein Barr y la región de codificación del antígeno nuclear EBNA-1, que puede producir una replicación episomal de alta copia sin integración. El esqueleto del plásmido puede ser pAV0242. El plásmido puede ser un plásmido de adenovirus tipo 5 (Ad5) de replicación defectuosa.
- 40

El plásmido también puede comprender una secuencia reguladora, que puede ser muy adecuada para la expresión del gen en una célula en la que se administra el plásmido. La secuencia codificadora puede comprender un codón, que puede permitir una transcripción más eficiente de la secuencia codificadora en la célula huésped.

- 45 La secuencia codificante también puede comprender una secuencia líder de inmunoglobulina (Ig). La secuencia líder puede estar a 5' de la secuencia codificante. Los antígenos consenso codificados por esta secuencia pueden comprender un líder Ig N-terminal seguido de una proteína antígeno consenso. La Ig líder N-terminal puede ser IgE o IgG.

- 50 El plásmido puede ser pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.), que se puede utilizar para la producción de proteínas en *Escherichia coli* (*E. coli*). El plásmido también puede ser pYES2 (Invitrogen, San Diego, California), que se puede utilizar para la producción de proteínas en cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El plásmido también puede ser del sistema completo de expresión de baculovirus MAXBAC™ (Invitrogen, San Diego, California), que se puede utilizar para la producción de proteínas en células de insectos. El plásmido también puede ser pcDNA1 o pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, California), que se puede utilizar para la producción de proteínas en células de mamíferos tales como las células de ovario de hámster chino (CHO).

- 55 El vector puede ser un plásmido circular, que puede transformar una célula diana por integración en el genoma celular o existir de forma extracromosómica (por ejemplo, plásmido de replicación autónoma con un origen de replicación).

El vector puede ser pVAX, pcDNA3.0, o provax, o cualquier otro vector de expresión capaz de expresar el ADN que codifica el antígeno, o el adyuvante y que permite a una célula traducir la secuencia a un antígeno que es reconocido por el sistema inmunitario.

También se proporciona en la presente memoria una vacuna de ácido nucleico lineal, o casete de expresión lineal ("LEC"), que es capaz de ser administrada eficientemente a un individuo por medio de electroporación y que expresa uno o más antígenos deseados. El LEC puede ser cualquier ADN lineal desprovisto de cualquier columna vertebral de fosfato. El ADN puede codificar uno o más antígenos. El LEC puede contener un promotor, un intrón, un codón de parada y/o una señal de poliadenilación. La expresión del antígeno o del adyuvante puede ser controlada por el promotor. El LEC no puede contener ningún gen de resistencia a los antibióticos y/o una columna vertebral de fosfato. El LEC no puede contener otras secuencias de ácido nucleico que no estén relacionadas con la expresión del gen del antígeno deseado.

El LEC puede derivarse de cualquier plásmido capaz de ser linealizado. El plásmido puede ser capaz de expresar el antígeno. El plásmido puede ser pNP (Puerto Rico/34) o pM2 (Nueva Caledonia/99). El plásmido puede ser WLV009, pVAX, pcDNA3.0, o provax, o cualquier otro vector de expresión capaz de expresar ADN que codifique el antígeno y que permita a una célula traducir la secuencia a un antígeno que sea reconocido por el sistema inmunitario.

El LEC puede ser pcrM2. El LEC puede ser pcrNP. pcrNP y pcrMR pueden derivarse de pNP (Puerto Rico/34) y pM2 (Nueva Caledonia/99), respectivamente.

El vector puede tener un promotor. Un promotor puede ser cualquier promotor que sea capaz de impulsar la expresión del gen y regular la expresión del ácido nucleico aislado. Dicho promotor es un elemento de secuencia de acción cis necesario para la transcripción a través de una ARN polimerasa dependiente del ADN, que transcribe la secuencia del antígeno descrita en la presente memoria.

La selección del promotor utilizado para dirigir la expresión de un ácido nucleico heterólogo depende de la aplicación concreta. El promotor puede situarse aproximadamente a la misma distancia del inicio de la transcripción en el vector que del sitio de inicio de la transcripción en su entorno natural. Sin embargo, la variación de esta distancia puede acomodarse sin pérdida de la función del promotor.

El promotor puede estar unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno y a las señales necesarias para la poliadenilación eficiente del transcrito, los sitios de unión al ribosoma y la terminación de la traducción.

El promotor puede ser un promotor del CMV, un promotor temprano del SV40, un promotor tardío del SV40, un promotor de la metalotioneína, un promotor del virus del tumor mamario murino, un promotor del virus del sarcoma de Rous, un promotor de la polihedrina u otro promotor que haya demostrado ser eficaz para la expresión en células eucariotas.

El vector puede incluir un potenciador y un intrón con sitios donantes y aceptores de empalme funcionales. El vector puede contener una región de terminación de la transcripción a continuación del gen estructural para permitir una terminación eficiente. La región de terminación puede obtenerse del mismo gen que la secuencia promotora o puede obtenerse de genes diferentes.

Procedimientos de preparación del vector

Se proporcionan en la presente memoria procedimientos para preparar el vector que comprende las moléculas de ácido nucleico que codifican un antígeno PRAME discutido en la presente memoria. El vector, tras la etapa final de subclonación en el plásmido de expresión de mamífero, se puede utilizar para inocular un cultivo celular en un tanque de fermentación a gran escala, mediante el uso de procedimientos conocidos en la técnica.

El vector para su uso con los dispositivos EP, que se describen a continuación con más detalle, se puede formular o fabricar mediante el uso de una combinación de dispositivos y técnicas conocidos, pero preferentemente se fabrican mediante el uso de una técnica de fabricación de plásmidos optimizada que se describe en una solicitud copendiente de licencia Solicitud de EE.UU. nº 12/126.611, presentada el 23 de mayo de 2008. En algunos ejemplos, las moléculas de ácido nucleico codificantes del antígeno PRAME utilizadas en estos estudios se pueden formular a concentraciones superiores o iguales a 10 mg/mL. Las técnicas de fabricación también incluyen o incorporan diversos dispositivos y protocolos que son comúnmente conocidos por los expertos en la técnica, además de los descritos en la solicitud de patente de los EE.UU. nº 60/939792 Solicitud de EE.UU. nº 60/939.792 incluidos los descritos en una patente bajo licencia, Patente estadounidense 7.238.522, expedida el 3 de julio de 2007.

Excipientes y otros componentes de la vacuna

La vacuna puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser moléculas funcionales tales como vehículos, portadores o diluyentes. El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un agente facilitador de la transfección, que puede incluir agentes activos

de superficie, como complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), adyuvante incompleto de Freund's, análogo del LPS, incluido el lípido monofosforilo A, péptidos de muramilo, análogos de quinona, vesículas como el escualeno y el escualeno, ácido hialurónico, lípidos, liposomas, iones de calcio, proteínas virales, polianiones, policationes o nanopartículas, u otros agentes facilitadores de la transfección conocidos.

5 El agente facilitador de la transfección es un polianión, un polication, incluyendo el poli-L-glutamato (LGS), o un lípido. El agente facilitador de la transfección es poli-L-glutamato, y el poli-L-glutamato puede estar presente en la vacuna a una concentración inferior a 6 mg/ml. El agente facilitador de la transfección también puede incluir agentes activos de superficie como complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), adyuvante incompleto de Freund's, análogo de LPS que incluye el lípido monofosforilo A, péptidos de muramilo, análogos de quinona y vesículas como el escualeno y el ácido hialurónico también pueden utilizarse administrados junto con el constructo genético. Las vacunas con plásmidos de ADN también pueden incluir un agente facilitador de la transfección, como lípidos, liposomas, incluyendo liposomas de lecitina u otros liposomas conocidos en la técnica, como una mezcla de ADN-liposoma (véase, por ejemplo WO9324640), iones de calcio, proteínas virales, polianiones, policationes o nanopartículas, u otros agentes facilitadores de la transfección conocidos. El agente facilitador de la transfección es un polianión, un polication, incluido el poli-L-glutamato (LGS), o un lípido. La concentración del agente de transfección en la vacuna es inferior a 4 mg/ml, inferior a 2 mg/ml, inferior a 1 mg/ml, inferior a 0,750 mg/ml, inferior a 0,500 mg/ml, inferior a 0,250 mg/ml, inferior a 0,100 mg/ml, inferior a 0,050 mg/ml o inferior a 0,010 mg/ml.

El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser uno o más adyuvantes. El adyuvante adicional puede ser otros genes que se expresan en un plásmido alternativo o se administran como proteínas en combinación con el plásmido anterior en la vacuna. El uno o más adyuvantes se puede seleccionar del grupo que consiste en: CCL20, α -interferón (IFN- α), β -interferón (IFN- β), γ -interferón, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), quimioquina cutánea atrayente de células T (CTACK), quimioquina epitelial expresada en el timo (TECK), quimioquina epitelial asociada a la mucosa (MEC), MHC, CD80, CD86, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-28, IL-33, MCP-1, MIP-1a, MIP-1 β , IL-8, L-selectina, P-selectina, E-selectina, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento de fibroblastos, IL-7, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento endotelial vascular, Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DRS, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspase ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, NIK inactivo, SAP K, SAP-I, JNK, genes de respuesta al interferón, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Ox40, Ox40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAPI, TAP2, IL-15 que tiene la secuencia señal o la secuencia codificante que codifica la secuencia señal suprimida y opcionalmente incluye un péptido señal diferente tal como el de IgE o la secuencia codificante que codifica un péptido señal diferente como el de IgE, y fragmentos funcionales de los mismos, o una combinación de los mismos. El adyuvante puede ser IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, o una combinación de ellos.

En algunas realizaciones el adyuvante puede ser una o más proteínas y/o moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: CCL-20, IL-12, IL-15, IL-28, IL-33, CTACK, TECK, MEC o RANTES. En la solicitud PCT No. PCT/US1997/019502 y en la correspondiente Solicitud estadounidense n.º 08/956.865y en la solicitud PCT No. PCT/US2012/069017, presentada el 11 de diciembre de 2012y las correspondientes Solicitud estadounidense n.º 14/365.086, presentada el 12 de junio de 2014presentada el 12 de diciembre de 2011, y 15/055.002, presentada el 26 de febrero de 2016. Ejemplos de construcciones y secuencias de IL-15 se desvelan en Solicitud PCT n.º PCT/US04/18962 y en la correspondiente Solicitud estadounidense n.º 10/560.650y en la Solicitud PCT n.º PCT/US07/00886 y la correspondiente Solicitud estadounidense n.º 12/160.766y en la Solicitud PCT n.º PCT/US10/048827. En la solicitud PCT n.º PCT/US09/039648 y en la correspondiente Solicitud estadounidense n.º 12/936.192. En la solicitud PCT No. PCT/US1999/004332 y en la correspondiente Solicitud estadounidense n.º 09/622.452. Otros ejemplos de construcciones y secuencias RANTES se divulgan en la solicitud PCT No. PCT/US11/024098. En la solicitud PCT No. PCT/US1999/004332 y en la correspondiente Solicitud estadounidense n.º 09/622.452. Otros ejemplos de construcciones y secuencias RANTES se divulgan en la solicitud PCT No. PCT/US11/024098. Ejemplos de construcciones y secuencias de quimiocinas CTACK, TECK y MEC se desvelan en la solicitud PCT No. PCT/US2005/042231 y en la correspondiente Solicitud estadounidense n.º 11/719.646. Ejemplos de OX40 y otros inmunomoduladores se desvelan en Solicitud de EE.UU. n.º 10/560.653. Ejemplos de DR5 y otros inmunomoduladores se desvelan en Solicitud estadounidense n.º 09/622.452.

Otros genes que pueden ser adyuvantes útiles incluyen los que codifican MCP-1, MIP-1a, MIP-1 β , IL-8, RANTES, L-selectina, P-selectina, E-selectina, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento de fibroblastos, IL-7, IL-22, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento endotelial vascular, Fas, receptor del TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspasa ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, Inactive NIK, SAP K, SAP-1, JNK, genes de respuesta al interferón, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Ox40, Ox40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A,

NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 y sus fragmentos funcionales.

La vacuna puede comprender además un agente facilitador de vacunas genéticas como se describe en el documento U.S. Serie No. 021,579 presentado el 1 de abril de 1994.

La vacuna puede comprender el antígeno y los plásmidos en cantidades de aproximadamente 1 nanogramo a 100 miligramos; de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 10 miligramos; o preferiblemente de aproximadamente 0,1 microgramo a aproximadamente 10 miligramos; o más preferiblemente de aproximadamente 1 miligramo a aproximadamente 2 miligramos. En algunas realizaciones preferentes, la vacuna de acuerdo con la presente invención comprende entre aproximadamente 5 nanogramos y 1000 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones preferentes, la vacuna de acuerdo con la presente invención puede contener entre aproximadamente 10 nanogramos y 800 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones preferentes, la vacuna de acuerdo con la presente invención puede contener entre aproximadamente 0,1 y 500 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones preferentes, la vacuna de acuerdo con la presente invención puede contener entre aproximadamente 1 y 350 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones preferidas, la vacuna puede contener de 25 a 250 microgramos aproximadamente, de 100 a 200 microgramos aproximadamente, de 1 nanogramo a 100 miligramos aproximadamente, de 1 microgramo a 10 miligramos aproximadamente, de 0,1 microgramo a 10 miligramos; de 1 miligramo a 2 miligramos, de 5 nanogramos a 1000 microgramos, de 10 nanogramos a 800 microgramos, de 0,1 a 500 microgramos, de 1 a 350 microgramos, de 25 a 250 microgramos, de 100 a 200 microgramos del antígeno o plásmido correspondiente.

La vacuna puede formularse según el modo de administración que se vaya a utilizar. Una composición farmacéutica vacunal inyectable puede ser estéril, libre de pirógenos y de partículas. Se puede utilizar una formulación o solución isotónica. Los aditivos para la isotonicidad pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. La vacuna puede comprender un agente vasoconstrictor. Las soluciones isotónicas pueden incluir solución salina tamponada con fosfato. La vacuna puede comprender además estabilizadores que incluyen gelatina y albúmina. Los estabilizadores pueden permitir que la formulación sea estable a temperatura ambiente o de la habitación durante largos periodos de tiempo, incluyendo LGS o polianiones o polianiones.

Composiciones farmacéuticas de la vacuna

La vacuna puede estar en forma de una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede comprender la vacuna. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender de aproximadamente 5 nanogramos (ng) a aproximadamente 10 miligramos (mg) de la molécula de ácido nucleico de la vacuna. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden de aproximadamente 25 ng a aproximadamente 5 mg de la molécula de ácido nucleico de la vacuna. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre 50 ng y 1 mg de la molécula de ácido nucleico de la vacuna. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 0,1 y 500 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 1 y 350 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 5 y 250 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 10 y 200 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 15 y 150 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 20 y 100 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 25 y 75 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 30 y 50 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 35 y 40 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 100 y 200 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden entre aproximadamente 10 nanogramos y 100 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden entre aproximadamente 20 nanogramos y 80 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden entre aproximadamente 25 nanogramos y 60 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden entre aproximadamente 30 ng a aproximadamente 50 microgramos de la molécula de ácido nucleico de la vacuna. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden entre aproximadamente 35 ng a aproximadamente 45 microgramos de la molécula de ácido nucleico de la vacuna. En algunas realizaciones preferentes, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 0,1 y 500 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones preferentes, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 1 y 350 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones preferentes, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 25 y 250 microgramos de molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones preferentes, las composiciones farmacéuticas contienen entre aproximadamente 100 y 200 microgramos de molécula de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 ng de la molécula de ácido nucleico

de la vacuna. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender al menos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995 o 1000 microgramos de ADN de la vacuna. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender al menos 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 mg o más de la molécula de ácido nucleico de la vacuna.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender hasta e incluyendo 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 ng de la molécula de ácido nucleico de la vacuna. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender hasta 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995 o 1000 microgramos de la molécula de ácido nucleico de la vacuna. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender hasta e incluyendo 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 mg de la molécula de ácido nucleico de la vacuna.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además otros agentes por propósitos de formulación de acuerdo con el modo de administración que se vaya a utilizar. En los casos en que las composiciones farmacéuticas son composiciones farmacéuticas inyectables, son estériles, libres de pirógenos y de partículas. Utilizar una formulación isotónica es preferente. Generalmente, los aditivos para la isotonicidad pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En algunos casos, son preferentes las soluciones isotónicas, tales como la solución salina tamponada con fosfato. Los estabilizadores incluyen la gelatina y la albúmina. En algunas realizaciones, se añade un agente vasoconstrictor a la formulación.

La vacuna puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser moléculas funcionales tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes. El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un agente facilitador de la transfección.

En algunas realizaciones, el agente facilitador de la transfección es un polianión, un polication, incluyendo el poli-L-glutamato (LGS), o un lípido. En una realización, el agente facilitador de la transfección es poli-L-glutamato, y más preferentemente, el poli-L-glutamato está presente en la vacuna a una concentración inferior a 6 mg/ml. El agente facilitador de la transfección también puede incluir agentes activos de superficie tales como complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), adyuvante incompleto de Freund, análogo de LPS que incluye el lípido monofosforil A, péptidos de muramilo, análogos de quinona y vesículas tales como el escualeno y el escualano, y el ácido hialurónico también se puede utilizar administrado junto con la construcción genética. En algunas realizaciones, el agente facilitador de la transfección puede comprender lípidos, liposomas, incluyendo liposomas de lecitina u otros liposomas conocidos en la técnica, como una mezcla de ADN-liposoma (véase, por ejemplo WO9324640), iones de calcio, proteínas virales, polianiones, policationes o nanopartículas, u otros agentes facilitadores de la transfección conocidos. La concentración del agente de transfección en la vacuna es inferior a 4 mg/ml, inferior a 2 mg/ml, inferior a 1 mg/ml, inferior a 0,750 mg/ml, inferior a 0,500 mg/ml, inferior a 0,250 mg/ml, inferior a 0,100 mg/ml, inferior a 0,050 mg/ml o inferior a 0,010 mg/ml.

Procedimiento de vacunación

En la presente memoria se proporcionan procedimientos para tratar y/o prevenir el cáncer que expresa PRAME mediante el uso de las formulaciones farmacéuticas descritas anteriormente. También se describen en la presente memoria procedimientos de uso de las formulaciones farmacéuticas descritas anteriormente en el tratamiento y/o prevención del cáncer que expresa PRAME en un individuo. También se describen procedimientos para vacunar a un individuo. También se describen en la presente memoria procedimientos de administración de las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente memoria a un individuo que las necesite. Los procedimientos descritos en la presente memoria denominados colectivamente procedimientos de tratamiento con las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden comprender la administración de una o más vacunas como las descritas en la presente memoria a un individuo que las necesite para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica y/o profiláctica. La vacuna se puede administrar a un individuo para modular la actividad del sistema inmunitario del individuo y potenciar la respuesta inmunitaria. La administración de la vacuna puede consistir en la transfección de los antígenos del cáncer descritos en la presente memoria como una molécula de ácido nucleico que se expresa en la célula transfectada y se dirige a la superficie de la célula, tras lo cual el sistema inmunitario reconoce el antígeno e

induce una respuesta celular, humoral o celular y humoral. La administración de la vacuna se puede utilizar para inducir o provocar una respuesta inmunitaria en individuos contra uno o más de los antígenos cancerígenos descritos en la presente memoria por medio de la administración al individuo de la vacuna descrita en la presente memoria.

- 5 La vacuna se puede administrar a un individuo para modular la actividad del sistema inmunitario del individuo, para de este modo potenciar la respuesta inmunitaria. En una realización, el individuo es un humano. Tras la administración de la vacuna al mamífero, y por lo tanto la introducción del vector en las células del mamífero, las células transfectadas expresarán y secretarán uno o más de los antígenos del cáncer como se describe en la presente memoria. Estas proteínas secretadas, o antígenos sintéticos, serán reconocidas como extrañas por el sistema inmunitario, que montará una respuesta inmunitaria que puede incluir: anticuerpos fabricados contra uno o más antígenos cancerígenos, y respuesta de células T específicamente contra uno o más antígenos cancerígenos. En algunos ejemplos, un mamífero vacunado con las vacunas descritas en la presente memoria tendrá un sistema inmunitario preparado y, cuando se enfrente a uno o más antígenos cancerígenos descritos en la presente memoria, el sistema inmunitario preparado permitirá la eliminación rápida de los antígenos cancerígenos posteriores descritos en la presente memoria, ya sea a través de la respuesta inmunitaria humoral, celular o tanto celular como humoral.

Los procedimientos de administración de la molécula de ácido nucleico de una vacuna se describen en Patentes de EE.UU. Nos. 4.945.050 y 5,036,006.

- 20 La vacuna se puede administrar a un mamífero para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero. El mamífero puede ser humano, primate no humano, vaca, cerdo, oveja, cabra, antílope, bisonte, búfalo de agua, bóvidos, ciervos, erizos, elefantes, llama, alpaca, ratones, ratas, y preferentemente humano, vaca o cerdo. La vacuna también se puede administrar a un individuo no mamífero, por ejemplo, un pollo, para provocar una respuesta inmunitaria.

- 25 La dosis de la vacuna puede estar entre 1 microgramo y 10 mg de componente activo/kg de peso corporal/tiempo, y puede ser de 20 microgramos a 10 mg de componente/kg de peso corporal/tiempo. La vacuna puede administrarse cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 días. El número de dosis de la vacuna para un tratamiento eficaz puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más dosis.

Procedimientos para generar una respuesta inmunitaria con la vacuna

- 30 La vacuna se puede utilizar para generar una respuesta inmunitaria en un individuo mamífero o no mamífero, incluida una respuesta inmunitaria terapéutica o profiláctica. La respuesta inmunitaria puede generar anticuerpos y/o células T asesinas dirigidas a uno o más antígenos cancerígenos, tal como se describe en la presente memoria. Dichos anticuerpos y células T se pueden aislar.

- 35 Algunas realizaciones proporcionan procedimientos para generar respuestas inmunitarias contra uno o más de los antígenos cancerígenos aquí divulgados, que comprenden la administración de la vacuna a un individuo. Algunas realizaciones proporcionan procedimientos para vacunar profilácticamente a un individuo contra un cáncer o tumor que expresa uno o más de los antígenos del cáncer descritos anteriormente, que comprenden la administración de la vacuna. Algunas realizaciones proporcionan procedimientos de vacunación terapéutica de un individuo que ha padecido el cáncer o tumor que expresa uno o más de los antígenos del cáncer, cuyas realizaciones comprenden la administración de la vacuna. El diagnóstico del cáncer o del tumor que expresa uno o más antígenos cancerígenos, tal como se describe en la presente memoria, se puede llevar a cabo de forma rutinaria antes de la administración de la vacuna.

Procedimientos de tratamiento del cáncer con la vacuna

- 45 La vacuna se puede usar para generar o provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero o individuo que la necesite que sea reactiva o dirigida a un cáncer que exprese PRAME mediado por VPH, tal como el cáncer de ovario, y específicamente, el cáncer de ovario epitelial. La respuesta inmunitaria provocada puede prevenir el cáncer o el crecimiento tumoral. La respuesta inmunitaria provocada puede prevenir y/o reducir la metástasis de las células cancerosas o tumorales. En consecuencia, la vacuna se puede utilizar en un procedimiento que trata y/o previene el cáncer o los tumores en el mamífero o individuo al que se administra la vacuna.

- 50 En algunas realizaciones, la vacuna administrada puede mediar la eliminación o prevenir el crecimiento de células tumorales por medio de la inducción de (1) la inmunidad humoral a través de las respuestas de las células B para generar anticuerpos que bloquean la producción de la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), retrasando así las células supresoras derivadas de los mieloides (MDSC) y suprimiendo el crecimiento del tumor; (2) aumentar los linfocitos T citotóxicos, como los CD8⁺ (CTL), para que ataquen y eliminen las células tumorales; (3) aumentar las respuestas de los linfocitos T auxiliares; (4) y aumentar las respuestas inflamatorias a través de IFN- γ y TFN- α o, preferentemente, todo lo anterior.

- 55 En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria puede generar una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) específica de antígeno que no cause daño o inflamación de diversos tejidos o sistemas (por ejemplo, cerebro o sistema neurológico, etc.) en el individuo al que se administra la vacuna.

- En algunas realizaciones, la vacuna administrada puede aumentar la supervivencia libre de tumor, reducir la masa tumoral o una combinación de ambas en el individuo. La vacuna administrada puede aumentar la supervivencia libre de tumor en un 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% y 60% en el individuo. La vacuna administrada puede reducir la masa tumoral en un 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, y 70% en el individuo después de la inmunización. La vacuna administrada puede prevenir y bloquear la inhibición del receptor de ácido retinoico mediada por PRAME.
- En algunas realizaciones, la vacuna se puede administrar a la periferia (como se describe con más detalle a continuación) para establecer una respuesta inmunitaria específica de antígeno dirigida a las células o tejidos cancerosos o tumorales para aclarar o eliminar el cáncer o tumor que expresa uno o más antígenos cancerosos sin dañar o causar enfermedad o muerte en el individuo al que se administra la vacuna.
- La vacuna administrada puede aumentar una respuesta inmunitaria celular en el individuo en aproximadamente 50 veces a aproximadamente 6000 veces, aproximadamente 50 veces a aproximadamente 5500 veces, aproximadamente 50 veces a aproximadamente 5000 veces, aproximadamente 50 veces a aproximadamente 4500 veces, aproximadamente 100 veces a aproximadamente 6000 veces, aproximadamente 150 veces a aproximadamente 6000 veces, aproximadamente 200 veces a aproximadamente 6000 veces, aproximadamente 250 veces a aproximadamente 6000 veces, o aproximadamente 300 veces a aproximadamente 6000 veces. En algunas realizaciones, la vacuna administrada puede aumentar la respuesta inmunitaria celular en el individuo en aproximadamente 50 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces, 250 veces, 300 veces, 350 veces, 400 veces, 450 veces, 500 veces, 550 veces, 600 veces, 650 veces, 700 veces, 750 veces, 800 veces, 850 veces, 900 veces, 950 veces, 1000 veces, 1100 veces, 1200 veces, 1300 veces, 1400 veces, 1500 veces, 1600 veces, 1700 veces, 1800 veces, 1900 veces, 2000 veces, 2100 veces, 2200 veces, 2300 veces, 2400 veces, 2500 veces, 2600 veces, 2700 veces, 2800 veces, 2900 veces, 3000 veces, 3100 veces, 3200 veces, 3300 veces, 3400 veces, 3500 veces, 3600 veces, 3700 veces, 3800 veces, 3900 veces, 4000 veces, 4100 veces, 4200 veces, 4300 veces, 4400 veces, 4500 veces, 4600 veces, 4700 veces, 4800 veces, 4900 veces, 5000 veces, 5100 veces, 5200 veces, 5300 veces, 5400 veces, 5500 veces, 5600 veces, 5700 veces, 5800 veces, 5900 veces o 6000 veces.
- La vacuna administrada puede aumentar los niveles de interferón gamma (IFN- γ) en el individuo entre 50 y 6000 veces, entre 50 y 5500 veces, entre 50 y 5000 veces, entre 50 y 4500 veces, entre 100 y 6000 veces, entre 150 y 6000 veces, entre 200 y 6000 veces, entre 250 y 6000 veces o entre 300 y 6000 veces. En algunas realizaciones, la vacuna administrada puede aumentar los niveles de IFN- γ en el individuo en aproximadamente 50 veces, 100 veces, 150 veces, 200 veces, 250 veces, 300 veces, 350 veces, 400 veces, 450 veces, 500 veces, 550 veces, 600 veces, 650 veces, 700 veces, 750 veces, 800 veces, 850 veces, 900 veces, 950 veces, 1000 veces, 1100 veces, 1200 veces, 1300 veces, 1400 veces, 1500 veces, 1600 veces, 1700 veces, 1800 veces, 1900 veces, 2000 veces, 2100 veces, 2200 veces, 2300 veces, 2400 veces, 2500 veces, 2600 veces, 2700 veces, 2800 veces, 2900 veces, 3000 veces, 3100 veces, 3200 veces, 3300 veces, 3400 veces, 3500 veces, 3600 veces, 3700 veces, 3800 veces, 3900 veces, 4000 veces, 4100 veces, 4200 veces, 4300 veces, 4400 veces, 4500 veces, 4600 veces, 4700 veces, 4800 veces, 4900 veces, 5000 veces, 5100 veces, 5200 veces, 5300 veces, 5400 veces, 5500 veces, 5600 veces, 5700 veces, 5800 veces, 5900 veces o 6000 veces.
- La dosis de la vacuna puede estar entre 1 microgramo y 10 mg de componente activo/kg de peso corporal/tiempo, y puede ser de 20 microgramos a 10 mg de componente/kg de peso corporal/tiempo. La vacuna puede administrarse cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 días. El número de dosis de la vacuna para un tratamiento eficaz puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más dosis.
- Vías de administración**
- La vacuna o composición farmacéutica se puede administrar por diferentes vías, que incluyen oral, parenteral, sublingual, transdérmica, rectal, transmucosa, tópica, vía inhalatoria, vía bucal, intrapleural, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intranasal intratecal y/o intraarticular, o combinaciones de las mismas. Para uso veterinario, la composición se puede administrar como una formulación adecuadamente aceptable de acuerdo con la práctica veterinaria normal. El veterinario puede determinar fácilmente el régimen de dosificación y la vía de administración más adecuados para un animal concreto. La composición también se puede administrar por medio de jeringuillas tradicionales, dispositivos de inyección sin aguja, "pistolas de bombardeo de microproyectos" u otros procedimientos físicos tales como la electroporación ("EP"), el "procedimiento hidrodinámico" o los ultrasonidos.
- El vector de la vacuna se puede administrar al mamífero por medio de varias tecnologías bien conocidas, tales como la inyección de ADN (también denominada vacunación con ADN) con y sin electroporación in vivo, la transfección mediada por liposomas, la transfección facilitada por nanopartículas y el uso de vectores recombinantes tales como el adenovirus recombinante, el virus asociado al adenovirus recombinante y la vaccinia recombinante. El uno o más antígenos cancerígenos de la vacuna se pueden administrar por medio de una inyección de ADN junto con electroporación in vivo.

Electroporación

La vacuna o composición farmacéutica se puede administrar por electroporación. La administración de la vacuna por medio de electroporación se puede llevar a cabo mediante el uso de dispositivos de electroporación que se pueden configurar para administrar a un tejido deseado de un mamífero un pulso de energía eficaz para provocar la formación de poros reversibles en las membranas celulares, y preferentemente el pulso de energía es una corriente constante similar a una corriente preestablecida introducida por un usuario. El dispositivo de electroporación puede comprender un componente de electroporación y un conjunto de electrodos o un conjunto de mango. El componente de electroporación puede incluir e incorporar uno o más de los diversos elementos de los dispositivos de electroporación, que incluyen: controlador, generador de forma de onda de corriente, probador de impedancia, registrador de forma de onda, elemento de entrada, elemento de informe de estado, puerto de comunicación, componente de memoria, fuente de alimentación e interruptor de alimentación. La electroporación se puede llevar a cabo mediante el uso de un dispositivo de electroporación *in vivo*, por ejemplo el sistema CELLECTRA® EP (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA) o el electroporador Elgen (Inovio Pharmaceuticals, Inc.) para facilitar la transfección de las células por el plásmido.

Ejemplos de dispositivos de electroporación y procedimientos de electroporación que pueden facilitar la administración de las vacunas de ADN de la presente invención incluyen aquellos descritos en los documentos Patente de EE.UU. 7.245.963; Publicación de EE.UU. n° 2005/0052630 cuyo contenido se incorpora por referencia en su totalidad. Otros dispositivos de electroporación y procedimientos de electroporación que se pueden utilizar para facilitar la administración de las vacunas de ADN incluyen los proporcionados en la solicitud de patente co-pendiente y co-titularidad Solicitud de Patente de EE.UU. N° 11/874,072, presentada el 17 de octubre de 2007, Las Solicitudes de Patente de EE.UU. n° 60/852.149, presentada el 17 de octubre de 2006 y 60/978,982, presentada el 10 de octubre de 2007 todas las cuales se incorporan por la presente en su totalidad.

La patente estadounidense 7.245.963 describe sistemas de electrodos modulares y su uso para facilitar la introducción de una biomolécula en células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. El sistema modular de electrodos puede comprender una pluralidad de electrodos de aguja; una aguja hipodérmica; un conector eléctrico que proporciona un enlace conductor desde un controlador de impulsos de corriente constante programable a la pluralidad de electrodos de aguja; y una fuente de energía. Un operador puede agarrar la pluralidad de electrodos de aguja que están montados en una estructura de soporte e insertarlos firmemente en el tejido seleccionado en un cuerpo o planta. Las biomoléculas se introducen a través de la aguja hipodérmica en el tejido seleccionado. El controlador de impulsos de corriente constante programable se activa y se aplica un impulso eléctrico de corriente constante a la pluralidad de electrodos de aguja. El impulso eléctrico de corriente constante aplicado facilita la introducción de la macromolécula en la célula entre la pluralidad de electrodos. Todo el contenido del documento Patente estadounidense 7.245.963.

La publicación estadounidense n° 2005/0052630 describe un dispositivo de electroporación que se puede utilizar para facilitar eficazmente la introducción de una biomolécula en células de un tejido seleccionado de un cuerpo o planta. El dispositivo de electroporación comprende un dispositivo electrocinético ("dispositivo EKD") cuyo funcionamiento se especifica por medio de un software o firmware. El dispositivo EKD produce una serie de patrones programables de impulsos de corriente constante entre los electrodos de una matriz basados en el control y la introducción de los parámetros de los impulsos por parte del usuario, y permite el almacenamiento y la adquisición de datos de forma de onda de corriente. El dispositivo de electroporación también comprende un disco de electrodos reemplazable que tiene una matriz de electrodos de aguja, un canal de inyección central para una aguja de inyección y un disco guía extraíble.

Las matrices de electrodos y los procedimientos descritos en la Patente de EE.UU. 7.245.963 y Publicación de EE.UU. n° 2005/0052630 se pueden adaptar para la penetración profunda no sólo en tejidos como el músculo, sino también en otros tejidos u órganos. Debido a la configuración de la guía de electrodos, la aguja de inyección también se inserta completamente en el órgano diana, y la inyección se administra perpendicularmente al tema diana, en la zona predelineada por los electrodos. Los electrodos descritos en Patente de EE.UU. 7.245.963 y Publicación estadounidense n° 2005/005263 son preferentemente de 20 mm de longitud y calibre 21.

Adicionalmente, contemplados en algunas realizaciones que incorporan dispositivos de electroporación y usos de los mismos, existen dispositivos de electroporación que son los descritos en las siguientes patentes: Patente de EE.UU. 5.273.525, expedida el 28 de diciembre de 1993; Patente estadounidense 6.110.161, expedida el 29 de agosto de 2000; 6.261.281, concedida el 17 de julio de 2001; 6.958.060, concedida el 25 de octubre de 2005 y Patente estadounidense 6.939.862, expedida el 6 de septiembre de 2005. Además, las patentes que cubren la técnica prevista en Patente estadounidense 6.697.669, expedida el 24 de febrero de 2004 que se refiere a la administración de ADN por medio de una variedad de dispositivos, y la La patente estadounidense 7.328.064, expedida el 5 de febrero de 2008 que se refiere a procedimientos de inyección de ADN.

Procedimientos de preparación de la vacuna

En la presente memoria se proporcionan procedimientos para preparar los vectores incluidos en las vacunas aquí discutidas. Los vectores, tras la etapa final de subclonación, se pueden utilizar para inocular un cultivo celular en un

tanque de fermentación a gran escala, mediante el uso de procedimientos conocidos en la técnica.

Los plásmidos de ADN para su uso con los dispositivos EP de la presente invención se pueden formular o fabricar mediante el uso de una combinación de dispositivos y técnicas conocidos, pero preferentemente se fabrican mediante el uso de una técnica de fabricación de plásmidos optimizada que se describe en una Publicación estadounidense nº 2009/0004716, presentada el 23 de mayo de 2007. En algunos ejemplos, los plásmidos de ADN utilizados en estos estudios se pueden formular a concentraciones superiores o iguales a 10 mg/mL. Las técnicas de fabricación también incluyen o incorporan diversos dispositivos y protocolos que son comúnmente conocidos por los expertos en la técnica, además de los descritos en la solicitud de patente de los EE.UU. nº 60/939792 Solicitud de EE.UU. nº 60/939.792 incluidos los descritos en una patente estadounidense 7.238.522, expedida el 3 de julio de 2007.

La presente invención tiene múltiples aspectos, ilustrados por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

La invención se ilustra aún más por medio de los ejemplos siguientes. Se debe entender que estos Ejemplos, aunque indican realizaciones preferentes de la invención, se dan únicamente a título ilustrativo.

Ejemplo 1

Consenso sintético PRAME

A fin de generar un consenso PRAME humano, se recogieron 10 secuencias PRAME de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Los números de acceso GenBank de las secuencias PRAME seleccionadas son:

NP_006106.1, AFX65483.1, XP_001090516.1, AFI35054.1, AFJ71405.1, XP_003805956.1, XP_525643.2, BAK62424.1, XP_003919211.1 y XP_003919212.1.

Se generó una secuencia consenso utilizando el paquete de software DNASTAR® Lasergene (versión 13.0.0.357). Las secuencias mencionadas se importaron a MegAlign y se alinearon por medio del programa de alineación múltiple de secuencias ClustalW. La secuencia PRAME resultante comparte una homología del 95,1% - 95,5% con las secuencias PRAME humanas nativas.

Una vez obtenida la secuencia de ADN consenso sintética PRAME, para tener un mayor nivel de expresión se añadió una secuencia Kozak corriente arriba y un líder IgE al N-terminal. Además, el uso de codones de este gen se adaptó al sesgo de codones de los genes del Homo sapiens. Además, se llevó a cabo una optimización del ARN: se evitaron las regiones con un contenido muy alto (>80%) o muy bajo (<30%) de GC y los motivos de secuencia cis-actores, como las cajas TATA internas, los chi-sites y los sitios de entrada ribosómica. A fin de eliminar la función potencial de una molécula expresada de PRAME en la represión de la señalización por ácido retinoico, se introdujeron dos mutaciones puntuales (L487V y L488V) en la caja LRELL del receptor nuclear de PRAME, dando lugar a un consenso sintético modificado de PRAME. Esta secuencia sintética consenso modificada de la proteína PRAME comparte una identidad del 94,7% - 95,1% con las proteínas PRAME nativas humanas. Las características del consenso sintético PRAME figuran en la Tabla 1.

Tabla 1: Características del consenso sintético PRAME

Características	Consenso sintético modificado PRAME
Identidad con el PRAME humano nativo	94,7% - 95,1%
Identidad con el rhesus nativo PRAME	98,6%
Identidad con el PRAME nativo de ratón	35,2%
Número de mutaciones de aminoácidos (frente al humano nativo)	25-27
Número de mutaciones insertadas (no derivadas del consenso)	2
Peso molecular	528 aa (58 kDa)
Longitud de la secuencia codificante (pb)	1584

Refiriéndose a las FIG. 2, una alineación de secuencias del consenso PRAME modificado con cinco secuencias

PRAME humanas ilustra las diferencias de aminoácidos entre las secuencias. Las sustituciones de leucina por valina en los residuos de aminoácidos 487 y 488 del consenso sintético modificado PRAME se encuentran entre las diferencias de aminoácidos destacadas. Los porcentajes de identidad entre las secuencias alineadas se presentan en la Tabla 2.

5 **Tabla 2: Porcentaje de identidad del PRAME de consenso modificado con el PRAME humano**

	1	2	3	4	5	
1-		95,1	94,7	94,9	94,9	PRAMEmut-GenScript.pro
2	5,1		99,6	99,8	99,8	huPRAME(AAH3973 1 .pro)
3	5,5	0,4		99,8	99,8	huPRAME(AFX65483).pro
4	5,3	0,2	0,2		100	huPRAME(NP_006106).pro
5	5,3	0,2	0,2	0,0		huPRAME(78395).pro

Las comparaciones de PRAME consenso sintético no modificado y PRAME consenso modificado se proporcionan en la Tabla 3.

Tabla 3: Comparación del consenso PRAME modificado y no modificado

	Secuencia humana	Secuencia de ratones	Secuencia del macaco
Consenso PRAME	95,1% a 95,5%	39,8% a 42,6%	98,6% a 98,8%
Consenso modificado PRAME	94,7% a 95,1%	39,8% a 42,1%	98,4% a 98,6%

10 Con referencia a las **FIG. 3**, el consenso sintético PRAME sintetizado se digirió con *BamHly XhoI*, y se clonó en el vector de expresión pGX0001 de Inovio con el casete de expresión colocado bajo el control transcripcional del promotor inmediato temprano del citomegalovirus. El plásmido resultante se designó pGX1421 y se llevó a cabo una secuenciación de longitud completa para confirmar la secuencia.

15 pGX1421 es un plásmido de ADN que codifica la proteína consenso sintética PRAME. La producción de ARNm relacionado está dirigida por un promotor CMV humano (promotor hCMV) y terminada por la señal de poliadenilación del extremo 3' de la hormona de crecimiento bovina (bGH poly A). El backbone pGX0001 (un vector de expresión pVAX1 modificado, el pVAX1 original se obtuvo de ThermoFisher, St. Louis, MO) incluye el gen de resistencia a la kanamicina (KanR) y el origen de replicación del plásmido (pUC ori) con fines de producción. Estos elementos no son funcionales en las células eucariotas.

20 Las modificaciones se introdujeron en pVAX1 para crear pGX0001 y se identifican en base a la secuencia reportada de pVAX1 disponible en ThermoFisher Scientific. Estas modificaciones se enumeran a continuación y no se detectó ningún problema en relación con la amplificación del plásmido y la transcripción y traducción del antígeno.

C>G 241 en el promotor del CMV

C>T 1158 backbone, corriente abajo de la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (bGH poly A)

25 A> - 2092 backbone, aguas abajo del gen de resistencia a la Kanamicina

C>T 2493 en el origen de replicación pUC (pUC ori)

G>C 2969 en el extremo de pUC Ori aguas arriba del sitio RNaseH

Los pares de bases 2, 3 y 4 se cambian de ACT a CTG en el backbone, aguas arriba del promotor CMV.

Ejemplo 2

30 Expresión PRAME

Se examinó la expresión de PRAME en líneas celulares transfectadas con un plásmido que codifica el consenso sintético PRAME (pGX1411) o un control para determinar si se expresaba el antígeno sintético. El análisis por Western blot de las líneas celulares mediante el uso de un anticuerpo anti-PRAME disponible comercialmente y un anticuerpo de control β -Actina muestra que sólo aquellas células transfectadas con pGX1411 exhibieron expresión de la proteína PRAME que migró al peso molecular correcto (FIG. 4). Un ensayo de inmunofluorescencia indirecta comparó la expresión del gen PRAME con la expresión de pVAX en células de rabdomiosarcoma y células Hek293. Refiriéndose a la FIG. 5, el consenso sintético PRAME se expresó en ambas líneas celulares, mientras que el

control negativo pVAX no.

Ejemplo 3

Inmunogenicidad en ratones

Se llevaron a cabo estudios de inmunogenicidad en ratones C57Bl/6 de acuerdo con el esquema de inmunización y sangrado representado en la FIG. 6. Brevemente, se administraron dosis de 5, 10, 15, 25 y 50 µg de pGX1411 por inmunización a ratones en los puntos temporales Semana 0 (inmunización inicial), Semana 2, Semana 4 y ELISpot. Los ratones fueron sangrados en los puntos temporales Semana 0 (medición basal) y Semana 5. Inicialmente se llevó a cabo un estudio dosis-respuesta para determinar la dosis más eficaz y, en referencia a la FIG. 7, todas las dosis investigadas dieron lugar a una respuesta superior a la ingenua. Se observó un ligero aumento de la respuesta con el incremento de la dosis hasta 15 µg de ADN pGX1411. A dosis superiores de 25 y 50 µg de ADN pGX1411, la respuesta se estabilizó.

El consenso sintético PRAME fue altamente inmunogénico (FIG. 8A) en ratones y se identificaron epítomos inmunodominantes mediante mapeo de epítomos (FIG. 8B y Tabla 4). En resumen, se produjeron péptidos que abarcaban todo el consenso PRAME, cada uno de los cuales contenía 15 residuos de aminoácidos que se solapaban en 8 aminoácidos. Estos péptidos se agruparon en 3 pools de péptidos (Tabla 4). Se estimularon esplenocitos de ratones inmunizados con pGX1411 y no inmunizados con los 3 grupos de péptidos en ensayos ELISpot de IFN γ de ratón. Los resultados se muestran en la FIG. 8A. Los epítomos inmunodominantes se identificaron mediante el uso de un enfoque de mapeo de matriz peptídica (FIG. 8B). Epítomos inmunodominantes se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Epítomos inmunodominantes identificados en ratones inmunizados con pGX1411

Número de grupo	Nº de péptidos que contienen epítomos	Secuencia de los péptidos que contienen epítomos
Grupo 1 aa 1 - 197	22 Péptidos	RVHSERRRLRGSIQS - RLRGSIQSRYISMSV - SRYISMSVWTSPPRL - VWTSPRRLVELAGQS - LVELAGQSLLKDEAL - SLLKDEALAIAALEL - LLPRELFPPLFMAAF - PPLFMAAFDGRHSQT - FDGRHSQTLKAMVQA - TLKAMVQAWPFTCLP - AWPFTCLPLGVLMKG - PLGVLMKGQQLHLET -
Grupo 2 aa 190-372	10 Péptidos	GQQLHLETFAVLDG - TFKAVLDGLDVLLAQ - GLDVLLAQEVRPRRW - QEVRPRRWKLEVLDL - WKLEVLDLRKNHQD - LRKNHQDFWTVWSG - DFWTVWSGNRASLYS - GNRASLYSFPEPEAA - SFPEPEAAQPMRKKR - AQPMRKKRKVDGLST - RKVDGLSTAEQPFT TPIEVLVDLSLKEGA - DLSLKEGACDELFY - ACDELFYLMKVKR - YLMKVKRQKNVHL - RQKNVHLCKKLLKI - LCKKLLKIFAMPMQD - IFAMPMQDIKMILKM - DIKMILKMVQLDSIE - EDLEVTCTWKLPTLA - TWKLPTLAKFSPYLG - ASATLQDLDFDECGI - LDFDECGIMDDQLLV - IMDDQLLVLLPSLSH - VLLPSLSHCSQLTTL - HCSQLTTLSCGNPI - LSCGNPISISVLQN - NLLHHLIGLSNLTHV - GLSNLTHVLYPVPLE - ESYEDVHGTLLHGL - GTLLHGLRLAYLHARL - LAYLHARLRELLCEL - RELLELGRPSMVW - LGRPSMVWLSANPCP - PHCGDRFTFYDPEPIL - FYDPEPILCPCFMPN

Grupo 3 aa 15 Péptidos
365 - 526

ASATLQDLDFDECGI - LDFDECGIMDDQLLV -
IMDDQLLVLLPSLSH - VLLPSLSHCSQLTTL -
HCSQLTTL SFCGNPI - LSFCGNPISISVLQN -
NLLHHLIGLSNLTHV - GLSNLTHVLYPVPLE -
ESYEDVHGTLHLGRL - GTLHLGRLAYLHARL -
LAYLHARLRELLCEL - LRELLCELGRPSMVW
LGRPSMVWLSANPCP - PHCGDRTFYDPEPIL -
FYDPEPILPCFMPN

(Publicado anteriormente HLA-A* péptidos PRAME restringidos a 02: ALYVDSLFFL, VLDGLDVLL, SLYSFPEA, SLLQHILGL y NLTHVLYPV (Quintarelli et al. 2011)).

Las respuestas de células T CD4+ y CD8+ específicas de antígeno inducidas por pGX1411 se evaluaron por medio de tinción de citoquinas intracelulares de esplenocitos estimulados con péptido de ratones ingenuos y tratados con pGX1411. Las células CD4+ de los ratones tratados con pGX1411 mostraron un aumento pequeño aunque significativo de IFN- γ tras el tratamiento con pGX1411 (FIG. 9A), mientras que las células CD8+ dieron lugar a un aumento significativo casi 10 veces mayor (FIG. 9B). En el caso del TNF- α y las células CD107a+, el aumento de células CD8+ fue significativamente mayor con el tratamiento con pGX1411 (FIGs. 9D y 9F), mientras que para las células CD4+ no hubo diferencias entre el tratamiento naive y el pGX1411 (FIGs. 9C y 9E). En general, el consenso sintético PRAME induce tanto a las células T CD4+ como a las CD8+, siendo las CD8+ las que muestran una mayor respuesta de citoquinas.

Los títulos de punto final se determinaron de manera dosis-respuesta para pGX1411, a saber, 5, 25 y 50 μ g, como se muestra en la FIG. 10. Cada dosis examinada aumentó el título final en comparación con la dosis naive, aunque el aumento de la dosis no incrementó significativamente la respuesta del título final. A fin de determinar si los anticuerpos inducidos por pGX1411 podían reconocer el PRAME nativo expresado en cánceres humanos, se investigó la reactividad de pGX1411 en el cáncer por medio de inmunohistoquímica, como se muestra en la FIG. 11.

Se tiñeron secciones de tejido de biopsias de cáncer humano con sueros de ratones ingenuos o tratados con pGX1411. Tras el tratamiento con anticuerpos secundarios biotinilados, las secciones de tejido se tiñeron con diaminobencidina con peróxido de hidrógeno y se contratiñeron con hematoxilina. La tinción de tejidos con un anticuerpo PRAME comercial se utilizó como comparador. Se detectó tinción positiva en la muestra de tejido de cáncer de melanoma con los sueros de ratones vacunados con pGX1411 y el anticuerpo comercial PRAME, pero no con los sueros de ratones ingenuos. Por lo tanto, la vacunación con pGX1411 tiene la capacidad de inducir anticuerpos específicos de PRAME.

El PRAME consenso sintético modificado codificado por pGX1421 induce una respuesta inmune similar a la generada por el PRAME consenso sintético no modificado codificado por pGX1411. Refiriéndose a la FIG. 12, esta respuesta inmunitaria provocada por pGX1421 es comparable a la provocada por pGX1411 cuando se investigó por medio de ELISpot en ratones. Tanto pGX1411 como pGX1421, a una dosis de 5 μ g, dieron lugar a aproximadamente 900 SFU/10⁶ células mononucleares de sangre periférica (PBMC), en comparación con los niveles de referencia de los naive (0 SFU/10⁶ PBMC).

Ejemplo 4

Inmunogenicidad en primates no humanos (NHP)

Los estudios de inmunogenicidad se llevaron a cabo en primates no humanos (NHPs) de acuerdo con el esquema de inmunización y sangrado representado en la FIG. 13. se administró pGX1421 por vía intramuscular (IM) con el 5P CELLECTRA® en extremidades contralaterales alternadas con IL-12 rhesus optimizada (pGX6006) en la semana 0, 4, 8 y 12 con sangrías cada 2 semanas tras la inmunización. Con referencia a las FIGs. 14A a 14C, la inmunogenicidad celular se evaluó por medio de IFN γ ELISpot, ICS, y las respuestas IFN γ medidas revelaron un aumento general con cuatro inmunizaciones con pGX1421 y pGX6006. Tras la tercera inmunización, el IFN γ aumentó hasta aproximadamente 600 SFU/10⁶ PBMC en comparación con los niveles basales. La cuarta inmunización aumentó ligeramente la respuesta en comparación con la tercera inmunización con aproximadamente 700 SFU/10⁶ PBMC (FIG. 14 A). Las respuestas individuales se muestran en las FIGs. 14B y 14C, con dos de cada seis NHP con una respuesta superior a la media tras la tercera inmunización. Esto aumentó a tres de las seis NHP con una respuesta superior a la media tras la cuarta inmunización. En general, seis de cada seis NHP respondieron según lo determinado por IFN γ ELISpot dos semanas después de la tercera inmunización (semana 10) en comparación con la semana 0.

Con referencia a las FIGs. 15A-15D, pGX1421 y pGX6006 inducen respuestas mínimas de células T CD4+ en comparación con las respuestas de células T CD8+. No se observaron respuestas de células T CD4+ en ninguna NHP, pero se detectaron respuestas robustas de células T CD8+ por medio de ICS en las NHPs con la mayor respuesta IFN γ ELISpot dos semanas después de la cuarta inmunización, en las NHP 5840 y 5967 (FIG. 15C).

Ejemplo 5**Caracterización del efecto adyuvante de pGX6006 sobre la inmunogenicidad inducida por PRAME**

Quince NHPs fueron divididos en tres grupos como se muestra en la Tabla 5 para determinar el efecto adyuvante de pGX6006. El programa de inmunización y sangrado fue el mismo para los tres grupos y se representa en la FIG. 13.

Tabla 5. Grupos de estudio

Grupo	N	Construtto antígeno	Construtto adyuvante
1	5	pGX1421 (2,0 mg)	N/A
2	5	pGX1421 (2,0 mg)	pGX6006 (0,20 mg)
3	5	pGX1411 (2,0 mg)	pGX6006 (0,20 mg)

- 5 Con referencia a las FIGS. 16A-16C, IL-12 aumentó significativamente IFN γ respuestas a PRAME codificado por pGX1421 dos semanas PD3 (Semana 10) y PD4 (Semana 14). Tras la tercera inmunización, la SFU media de IFN γ inducida por pGX1421 solo (108 ± 124) fue significativamente inferior a la respuesta media inducida por pGX1421 y pGX6006 juntos (609 ± 597 , $p < 0,08$). Las respuestas de IFN γ aumentaron en el Grupo 2 tras la cuarta inmunización (1636 ± 999 SFU, $p < 0,08$, FIG. 16C).
- 10 Las respuestas inmunitarias celulares inducidas por pGX1421 y pGX1421 en combinación con pGX6006 se caracterizaron además por citometría de flujo dos semanas PD4 (Semana 14, FIGs. 17A-17C). Se detectaron respuestas mínimas en el compartimento de células T CD4 $^{+}$ en ambos grupos, como se muestra en la FIG. 17A. Se detectaron respuestas mínimas en el compartimento de células T CD8 $^{+}$ cuando se administró pGX1421 sin pGX6006 (FIG. 17B). La mayoría de la población de células T CD8 $^{+}$ específicas de PRAME detectada en el grupo de
- 15 pGX1421 en combinación con pGX6006 dos semanas PD4 produjo tanto IFN γ como TNF α . El resto de la población fue predominantemente positiva sólo para la producción de IFN γ . La mayoría de las células T CD8 $^{+}$ antígeno-específicas inducidas por pGX1421 en combinación con pGX6006 fueron positivas tanto para CD107a como para Granzima B, indicando el potencial de función CTL y efectora (FIG. 17C).
- 20 Las respuestas inmunitarias celulares inducidas por pGX1411 en combinación con pGX6006 y pGX1421 en combinación con pGX6006 se compararon por medio de IFN γ ELISpot (FIGs. 18A-18C) y por citometría de flujo dos semanas PD4 (Semana 14, FIG. 19A-19F). Las respuestas de IFN γ específicas de PRAME dos semanas PD3 (666 ± 597 SFU) y PD4 (1931 ± 2795 SFU) inducidas por pGX1411 en combinación con pGX6006 fueron comparables a las de pGX1421 en combinación con pGX6006 (PD3: 609 ± 597 ; PD4: 1636 ± 999 SFU). No hubo diferencias significativas entre las respuestas IFN γ ELISpot inducidas por pGX1411 en combinación con pGX6006 y pGX1421
- 25 en combinación con pGX6006 en ningún momento del estudio (FIG. 18C). La caracterización adicional por medio de citometría de flujo mostró una tendencia hacia respuestas de células T CD4 $^{+}$ más robustas con pGX1411 en combinación con pGX6006 en comparación con pGX1421 en combinación con pGX6006 dos semanas PD4 (FIG. 19 A). El fenotipo y la magnitud de las respuestas en el compartimento de células T CD8 $^{+}$ fueron comparables para pGX1411 en combinación con pGX6006 y pGX1421 en combinación con pGX6006 (FIGs. 19B y 19C).
- 30 En resumen, las respuestas inmunes celulares dirigidas a PRAME fueron comparables para pGX1411 en combinación con pGX6006 y pGX1421 en combinación con pGX6006. La inclusión de IL-12 codificada por pGX6006 aumentó significativamente las respuestas inmunitarias celulares inducidas por pGX1421.

La secuencia nucleotídica de las (SEC ID NO: 1) y los aminoácidos de la SEC ID NO: 2) para el consenso sintético Prame se presentan en la Tabla 6 y la Tabla 7, respectivamente.

35 **Tabla 6:** Consenso sintético PRAME Secuencia codificadora de ADN pGX1421

SEQ ID NO.	SECUENCIA
1	atggactgga catggattct gttcctggc gctgctgcta cacgggtgca ttcagagaga cgaagactgc ggggctcaat tcagagtagg tacatcagta tgcagctcg gacccacca cggagactgg tggactggc cgggcagagc ctgctgaagg atgaggccct ggctatlgcc gctctggaac tgcctcccc agagctgttc cctcccctgt tcatggcagc cttcgacgga cggcacagcc agactctgaa ggctatggc caggcatggc cccttaccgt cctgcctctg ggcgtgctga tgaaggggca gcagctgcat ctggagactt tcaaagcagt

	gctggatggc ctggacgtgc tgcggccca ggaagtggc ctaggcgct ggaagctgga ggctctggat ctgcgcaaaa acagccacca ggactttgg accgtgtgtt ccgggaatcg ggccagctcg tactcatcc cagaaccga ggctgcacag ccaatgcgga agaaaagaaa ggaggalga ctgtccaccg aagctgagca gccctttaca ccaatgaag tgcgtgtcga tctgtccctg aaagaaggcg catgcgacga gctgttctct tatctgatgg agaaggtaaa aagacagaag aacgtgtgtc acctgtgtgt taagaaactg aaaatcttg ctatgccat gcaggacatc aagatgattc tgaatgtgt ccagctggat tccattgaag acctggaggt cactgtacc tggaagctgc caacactggc caaatctct cclacctgg gacagatgat caatctgca cggctgtgtc tgtctacat ccatgtagc tctctatta gtctgagaa ggaggaagag tacattgcac agttacttc tcagtctgt agctgtcagt gctgcaggc cctgtatgt galagcctgt tcttctgag aggcaggctg gaccagctgc tgcgacagt catgaacccc ctggaacac tgagtgtgac taattgtaga ctgtcagagg gcgatgtgat gcattgtgag cagtcacctc acgtgagcca gctgtccgtc ctgtctctga gtggcgtgat gctgacagac gtgagccctg aaccactgca ggccctgtg gagcgagcat ctgccactct gcaggacctg gattttgacg agtgtggat catggacgat cagctgtgtg tgcgtgtcc ttcactgagc cactgtccc agctgaccac actgtcttc tgtgggaacc caatccat tctgtgtg cagaatctg tgcaccatct gattggactg agcaacctga cccatgtgt gtacccctgc cctctgaaa gctatgagga tctgcagga acactgcac tggcgagct ggctatctg cagctgtcc tgcgagaag gggtgtcgag ctgggcagac cctcaatgt gtggctgagc gccaatccat gtcccatgt cggcgaccgg acattctac accccgaacc tattctgtgc cctgtctca tgcctaactg ataa
--	--

Tabla 7: Secuencia Sintética Consensuada de la Proteína PRAME pGX1421

SEQ ID NO.	SECUENCIA
2	MDWTWILFLVAAATRVHSERRRLRGSIQSRYISMSVWTSPRRLVELAGQSLLK DEALAIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPFTCLPLGVLMK GQQLHLETFKAVLDGLDVLLAQEVPRRWKLEVLDLRKNSHQDFWTVWSGN RASLYSFPEPEAAQPMRKKRKVDGLSTEAEPFTPIEVLVDLSLKEGACDELFS YLMEKVKRQKNVLHLCKKLIKIFAMPMDIKMILKMOVQLDSIEDLEVCTWK LPTLAKFSPYLGQMINLRLLLSHIHASSISPEKEEEYIAQFTSQFLSLQCLQAL YVDSLFFLRGRLDQLLRHVMNPLETSLVTNCRLESGDVMHLSQSPNVSQLSVL SLSGVMLTDVSPEPLQALLERASATLQDLDFDECGIMDDQLLVLLPSLSHCSQL TTLSFCGNPISIVLQNLHLHLGLSNLTHVLYPVPLESYEDVHGTLHLGRLAYL HARLREVVCCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPN

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico establecida en SEC ID NO: 1 o la secuencia de ácido nucleico establecida en los nucleótidos 55 a 1584 de la SEC ID NO: 1.
- 5 2. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos establecida en SEC ID NO: 2, o una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos de aminoácidos 19 a 526 de SEC ID NO: 2.
3. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2, opcionalmente en el que el vector es un plásmido o un vector viral.
- 10 4. Una composición que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 2 o el vector de la reivindicación 3.
5. Una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEC ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos de aminoácidos 19 a 526 de la SEC ID NO: 2.
6. Una vacuna que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2, o el vector de la reivindicación 3.
- 15 7. Una vacuna que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno, en el que el antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos establecida en los residuos de aminoácidos 19 a 526 de la SEC ID NO: 2.
8. La vacuna de la reivindicación 6 o 7, en la que la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico establecida en SEC ID NO: 1, o la secuencia establecida en los nucleótidos 55 a 1584 de SEC ID NO: 1.
- 20 9. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable o un adyuvante, opcionalmente en el que el adyuvante es IL-12, IL-15, IL-28 o RANTES.
10. Una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2 o el vector de la reivindicación 3 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene un cáncer que expresa preferentemente antígeno en melanoma (PRAME), dicho procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica al individuo.
- 25 11. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 10 en la que el cáncer es cáncer de ovario, preferentemente en la que el cáncer es cáncer de ovario epitelial o cáncer de ovario seroso.
12. Una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2 o el vector de la reivindicación 3 para su uso en un procedimiento de vacunación de un individuo contra el antígeno expresado preferentemente en melanoma (PRAME) o para su uso en un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria en un individuo contra PRAME, dicho procedimiento comprende administrar una cantidad de la composición farmacéutica eficaz para provocar una respuesta inmunitaria.
- 30 13. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 12, en la que la respuesta inmunitaria provocada es una respuesta celular, una respuesta inmunitaria humoral, o ambas, una respuesta inmunitaria celular y una respuesta inmunitaria humoral, preferentemente en la que la respuesta inmunitaria celular comprende la inducción o secreción de interferón-gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), o ambos.
- 35 14. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 12 o 13, en la que la respuesta inmunitaria provocada comprende la inhibición de uno o más factores de supresión inmunitaria que promueven el crecimiento de una célula, tumor o cáncer que expresa un antígeno PRAME.
- 40 15. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en la que la administración comprende electroporación o en la que la vacuna se administra en uno o más sitios del individuo.

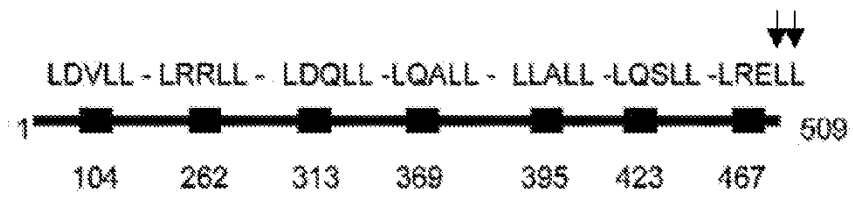


FIG. 1A

	L	XX	LL	
VLDG	L	DV	LL	AQEV
QMIN	L	RR	LL	LSHI
LRGR	L	DQ	LL	RHVM
SPEP	L	QA	LL	ERAS
TDDQ	L	LA	LL	PSLS
SISA	L	QS	LL	QHLL
LHAR	L	RE	LL	CELG

FIG. 1B

PRAMEma-Gensim:160	ERRRLPQSI	QSRVI	SMSVW	SPRRL	VEL	AGVSL	L	IDEAL	AI	AALELL	PREL	FPFL	FMAAF	DGRHSQTL	KAMV	QAWPTCL	PL	GVLMK	QOQ	HL	ETEKAV	110					
PRAMEma-AAH9731:160	ERRRLPQSI	QSRVI	SMSVW	SPRRL	VEL	AGVSL	L	IDEAL	AI	AALELL	PREL	FPFL	FMAAF	DGRHSQTL	KAMV	QAWPTCL	PL	GVLMK	QOQ	HL	ETEKAV	100					
PRAMEma-AF065463:160	ERRRLPQSI	QSRVI	SMSVW	SPRRL	VEL	AGVSL	L	IDEAL	AI	AALELL	PREL	FPFL	FMAAF	DGRHSQTL	KAMV	QAWPTCL	PL	GVLMK	QOQ	HL	ETEKAV	100					
PRAMEma-NP0361176:160	ERRRLPQSI	QSRVI	SMSVW	SPRRL	VEL	AGVSL	L	IDEAL	AI	AALELL	PREL	FPFL	FMAAF	DGRHSQTL	KAMV	QAWPTCL	PL	GVLMK	QOQ	HL	ETEKAV	100					
PRAMEma-P78395:160	ERRRLPQSI	QSRVI	SMSVW	SPRRL	VEL	AGVSL	L	IDEAL	AI	AALELL	PREL	FPFL	FMAAF	DGRHSQTL	KAMV	QAWPTCL	PL	GVLMK	QOQ	HL	ETEKAV	100					
PRAMEma-Gensim:160	LDL	DVLL	AGEV	PRPRVW	EV	LD	LRKNSH	QDFWT	VW	SGNR	ASLY	YS	FE	PE	EA	QAPM	KRK	V	QDGL	ST	EA	QDFF	217				
PRAMEma-AAH9731:160	LDL	DVLL	AGEV	PRPRVW	EV	LD	LRKNSH	QDFWT	VW	SGNR	ASLY	YS	FE	PE	EA	QAPM	KRK	V	QDGL	ST	EA	QDFF	200				
PRAMEma-AF065463:160	LDL	DVLL	AGEV	PRPRVW	EV	LD	LRKNSH	QDFWT	VW	SGNR	ASLY	YS	FE	PE	EA	QAPM	KRK	V	QDGL	ST	EA	QDFF	200				
PRAMEma-NP0361176:160	LDL	DVLL	AGEV	PRPRVW	EV	LD	LRKNSH	QDFWT	VW	SGNR	ASLY	YS	FE	PE	EA	QAPM	KRK	V	QDGL	ST	EA	QDFF	200				
PRAMEma-P78395:160	LDL	DVLL	AGEV	PRPRVW	EV	LD	LRKNSH	QDFWT	VW	SGNR	ASLY	YS	FE	PE	EA	QAPM	KRK	V	QDGL	ST	EA	QDFF	200				
PRAMEma-Gensim:160	RKNV	HL	CO	KKL	KI	FANP	MODI	KM	L	KMVOL	DSI	ED	LV	ET	CT	WAL	PT	LAK	FS	VL	QOM	NL	RL	LSH	317		
PRAMEma-AAH9731:160	RKNV	HL	CO	KKL	KI	FANP	MODI	KM	L	KMVOL	DSI	ED	LV	ET	CT	WAL	PT	LAK	FS	VL	QOM	NL	RL	LSH	300		
PRAMEma-AF065463:160	RKNV	HL	CO	KKL	KI	FANP	MODI	KM	L	KMVOL	DSI	ED	LV	ET	CT	WAL	PT	LAK	FS	VL	QOM	NL	RL	LSH	300		
PRAMEma-NP0361176:160	RKNV	HL	CO	KKL	KI	FANP	MODI	KM	L	KMVOL	DSI	ED	LV	ET	CT	WAL	PT	LAK	FS	VL	QOM	NL	RL	LSH	300		
PRAMEma-P78395:160	RKNV	HL	CO	KKL	KI	FANP	MODI	KM	L	KMVOL	DSI	ED	LV	ET	CT	WAL	PT	LAK	FS	VL	QOM	NL	RL	LSH	300		
PRAMEma-Gensim:160	LYDS	FL	FL	RGR	DQ	L	RHV	N	MPLET	S	T	N	CR	L	SG	DV	M	H	L	SQ	P	V	S	L	SGV	417	
PRAMEma-AAH9731:160	LYDS	FL	FL	RGR	DQ	L	RHV	N	MPLET	S	T	N	CR	L	SG	DV	M	H	L	SQ	P	V	S	L	SGV	400	
PRAMEma-AF065463:160	LYDS	FL	FL	RGR	DQ	L	RHV	N	MPLET	S	T	N	CR	L	SG	DV	M	H	L	SQ	P	V	S	L	SGV	400	
PRAMEma-NP0361176:160	LYDS	FL	FL	RGR	DQ	L	RHV	N	MPLET	S	T	N	CR	L	SG	DV	M	H	L	SQ	P	V	S	L	SGV	400	
PRAMEma-P78395:160	LYDS	FL	FL	RGR	DQ	L	RHV	N	MPLET	S	T	N	CR	L	SG	DV	M	H	L	SQ	P	V	S	L	SGV	400	
PRAMEma-Gensim:160	SL	SH	CS	S	Q	L	T	L	S	F	Q	N	P	I	S	I	S	V	L	Q	M	L	H	R	L	I	517
PRAMEma-AAH9731:160	SL	SH	CS	S	Q	L	T	L	S	F	Q	N	P	I	S	I	S	V	L	Q	M	L	H	R	L	I	500
PRAMEma-AF065463:160	SL	SH	CS	S	Q	L	T	L	S	F	Q	N	P	I	S	I	S	V									

FIG. 2

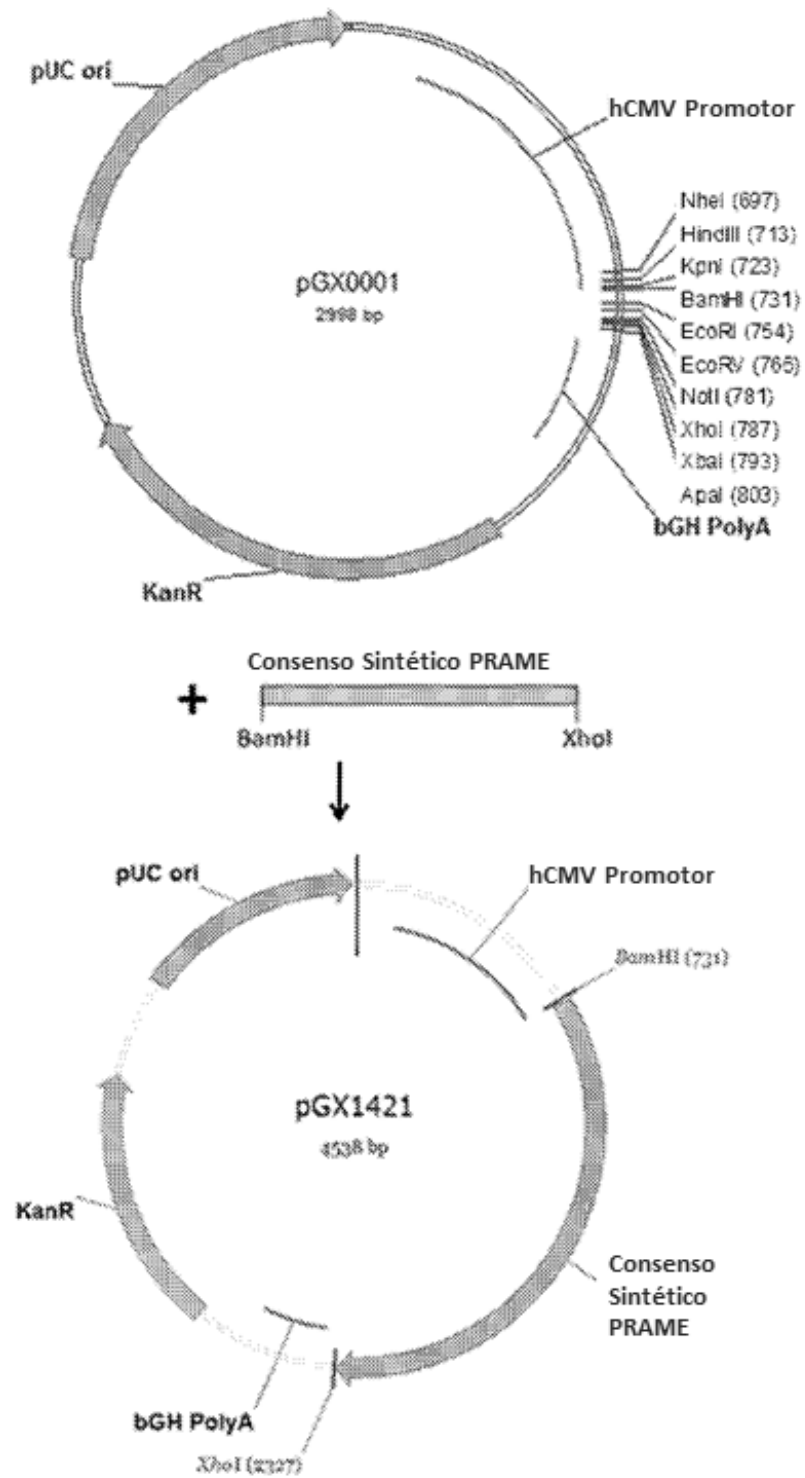


FIG. 3

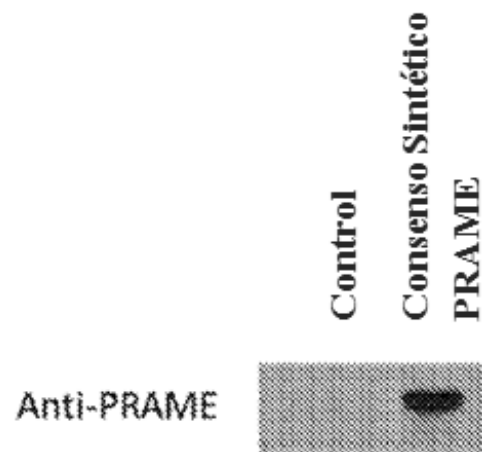


FIG. 4

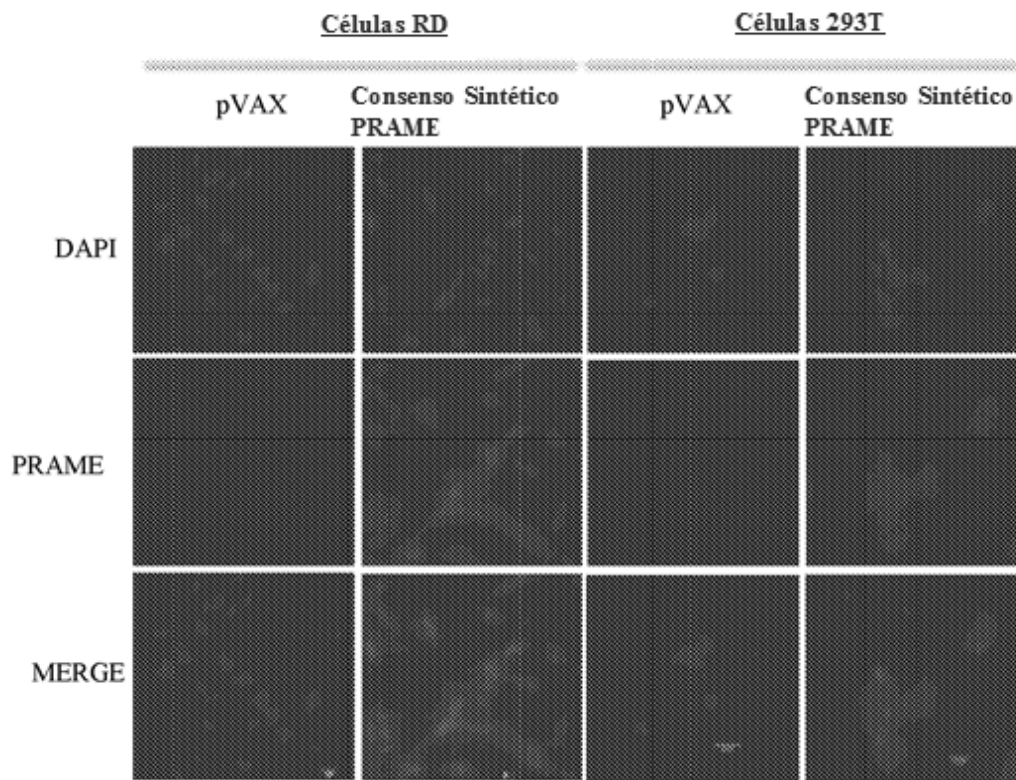


FIG. 5

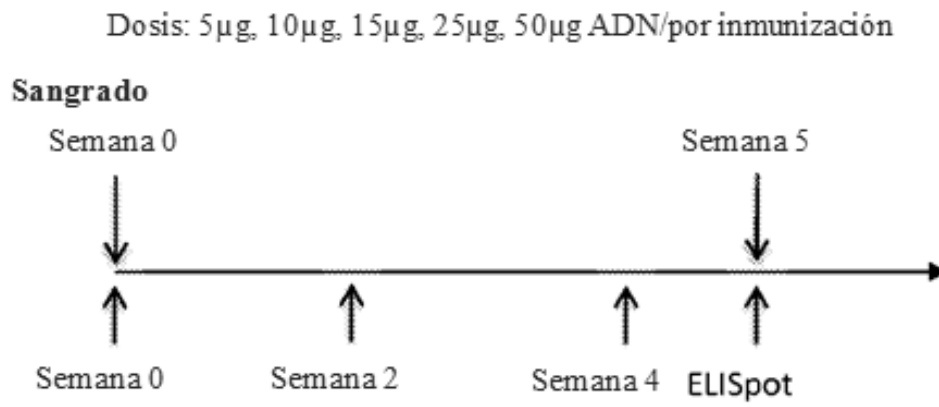


FIG. 6

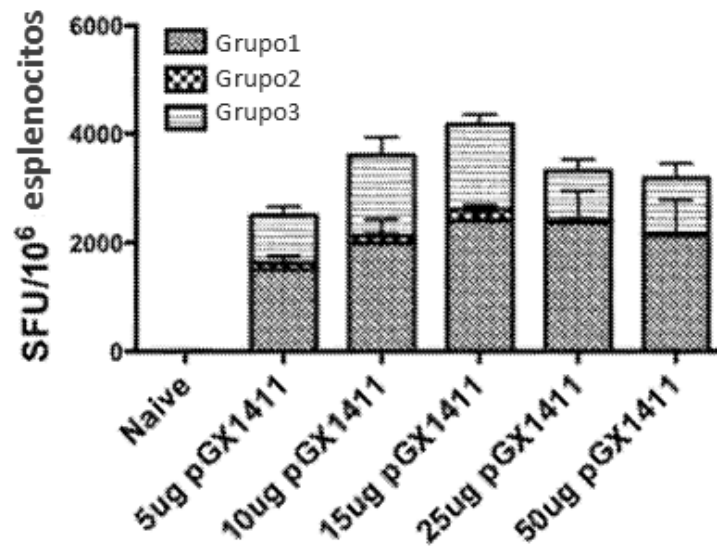


FIG. 7

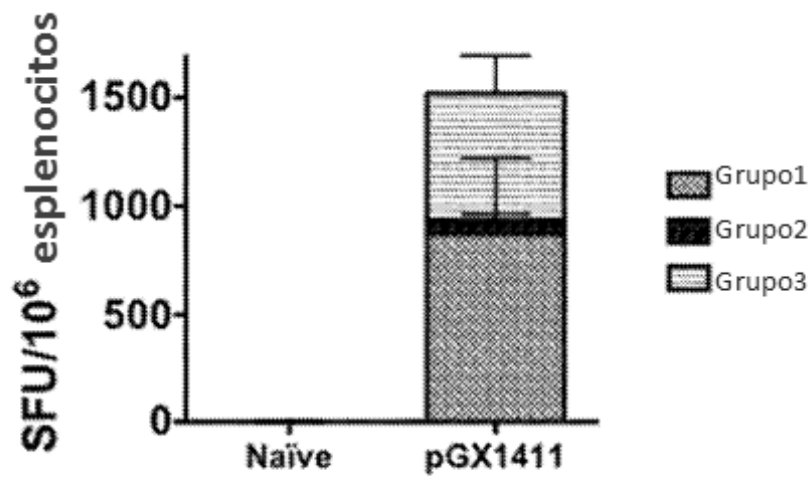


FIG. 8A

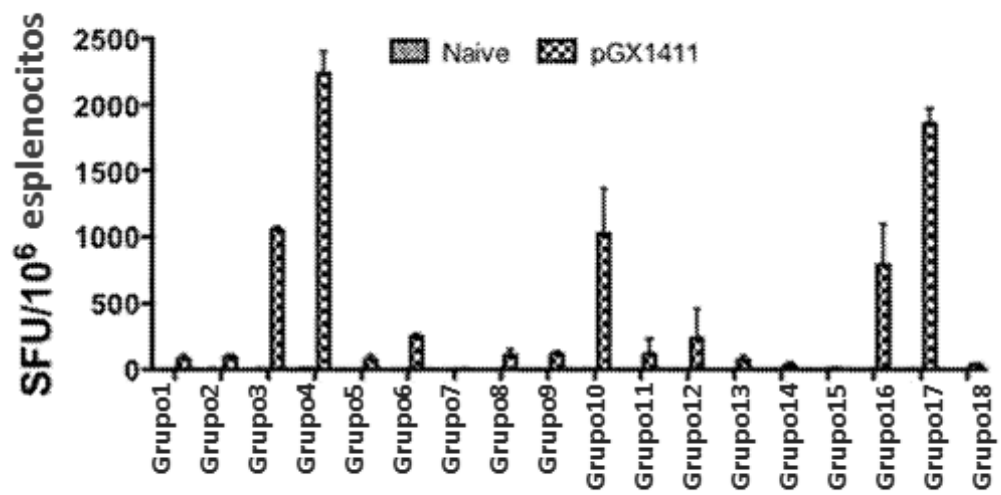


FIG. 8B

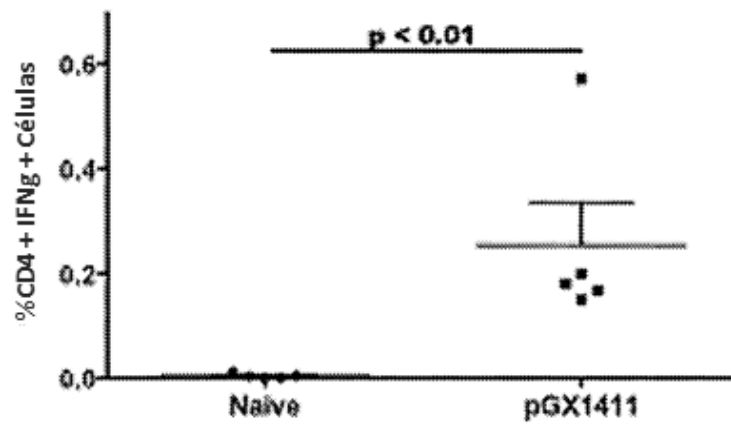


FIG. 9A

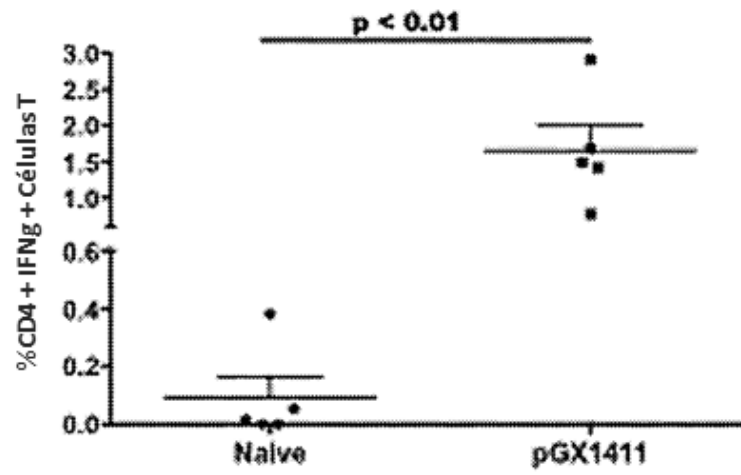


FIG. 9B

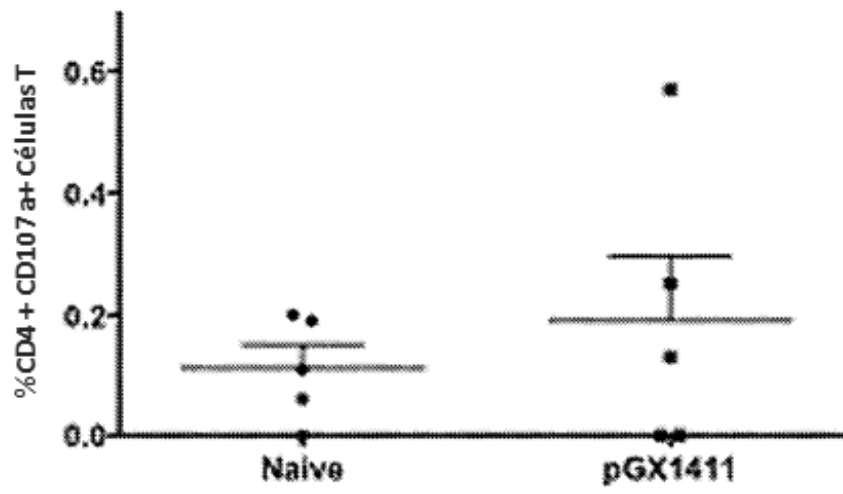


FIG. 9C

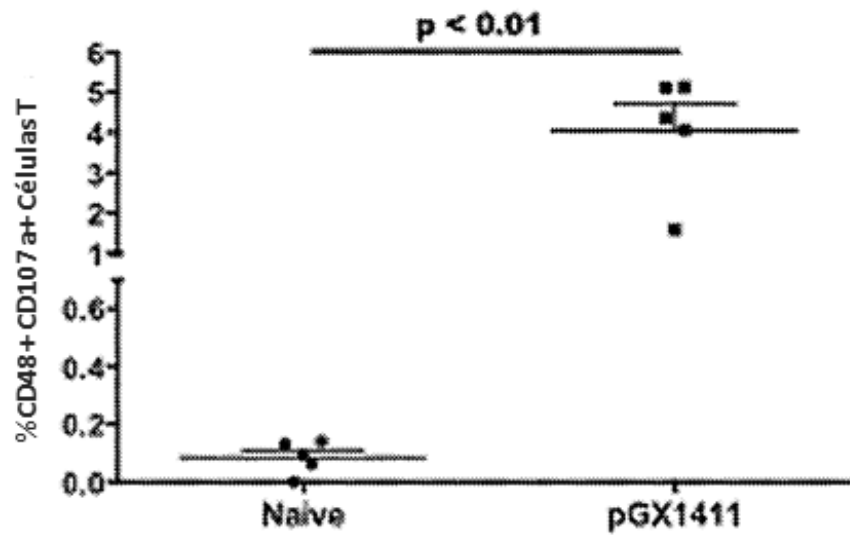


FIG. 9D

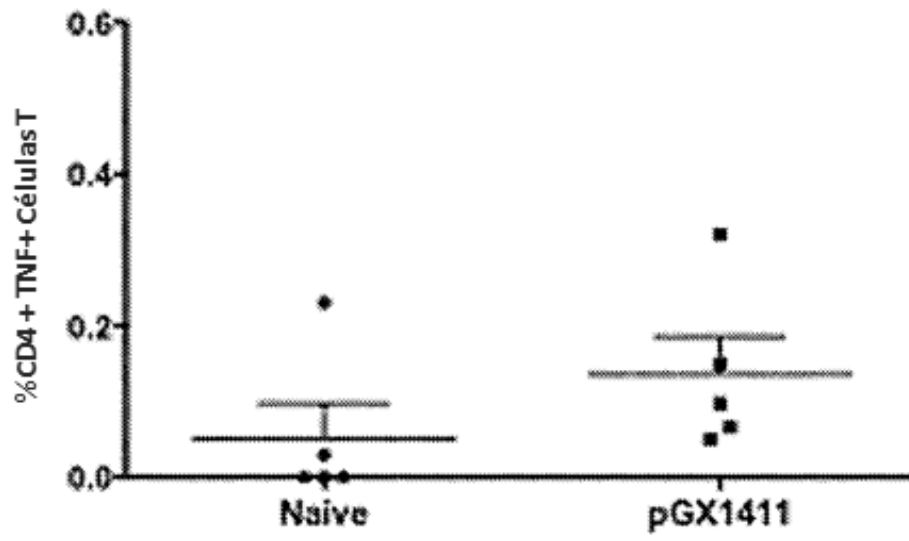


FIG. 9E

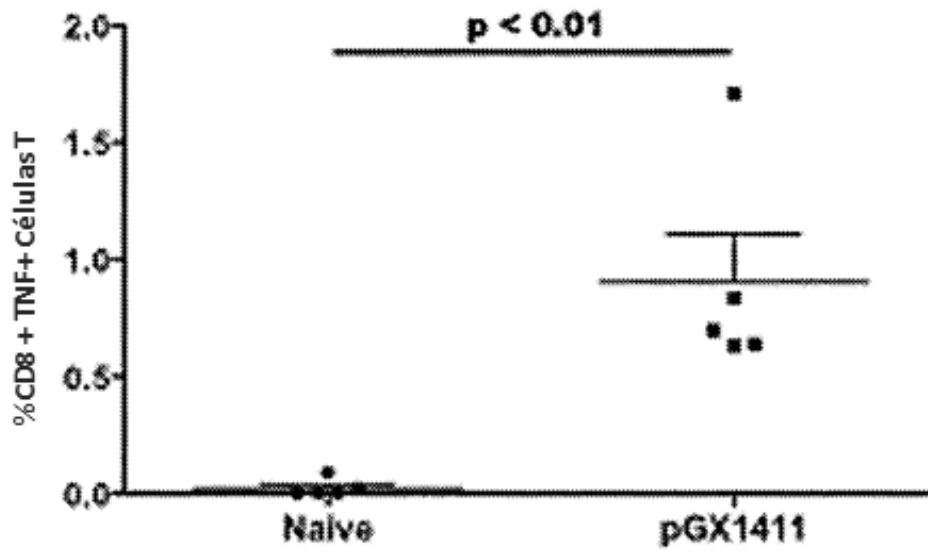


FIG. 9F

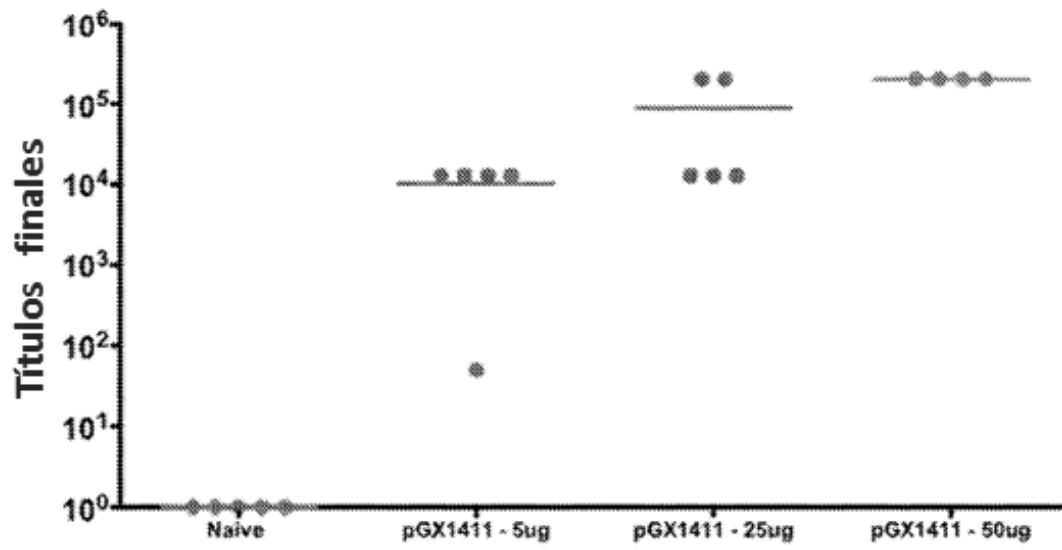


FIG. 10

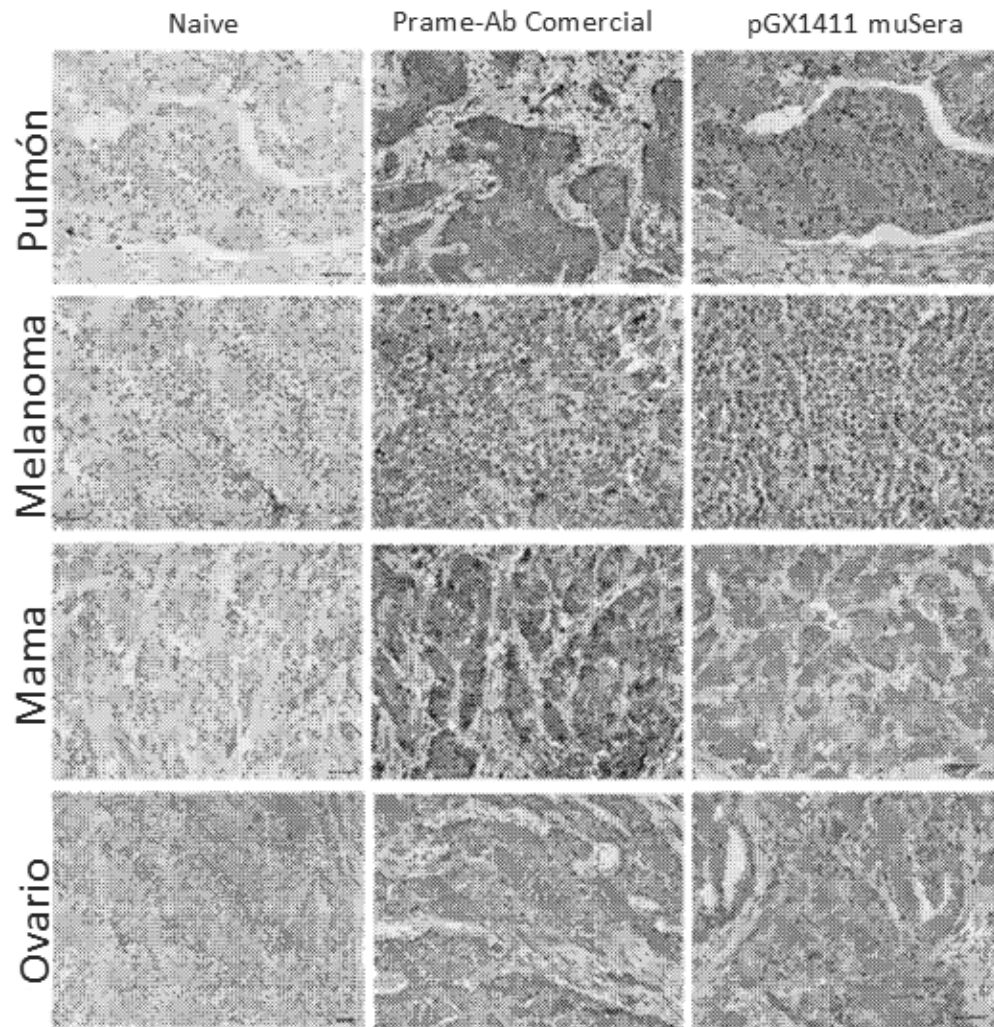


FIG. 11

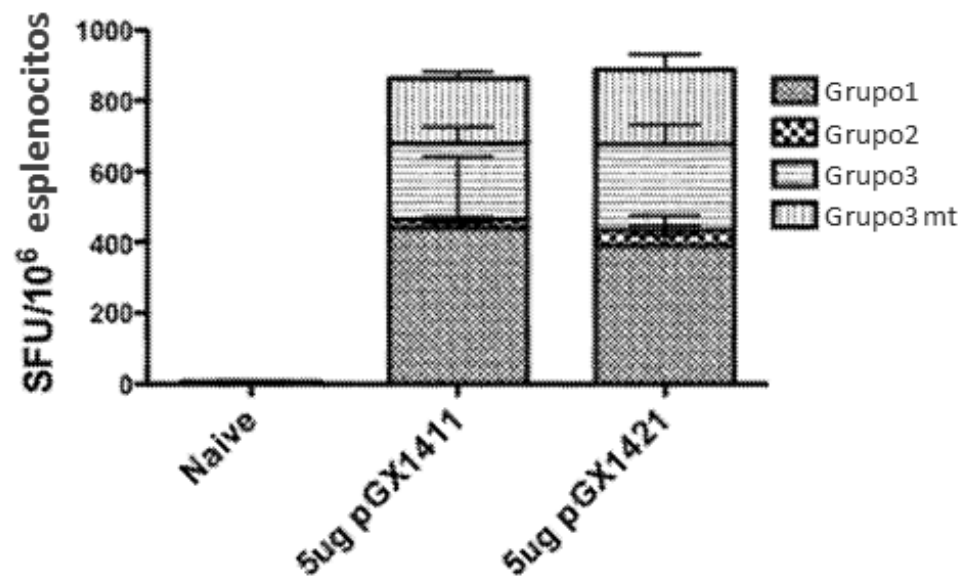


FIG. 12

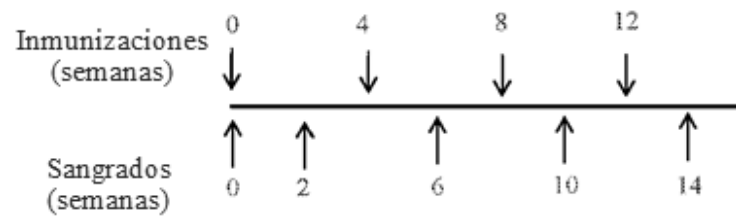


FIG. 13

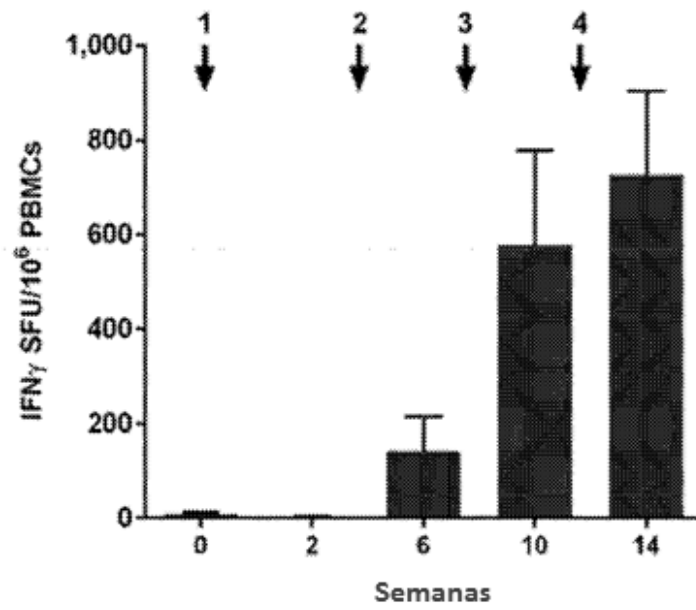


FIG. 14A

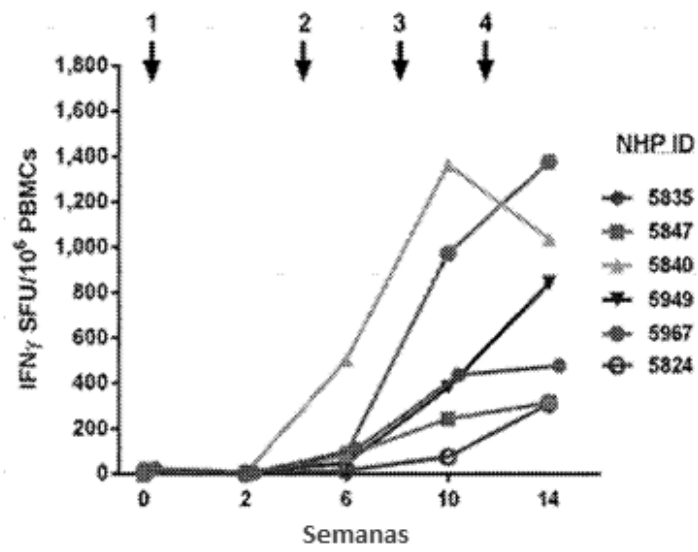


FIG. 14B

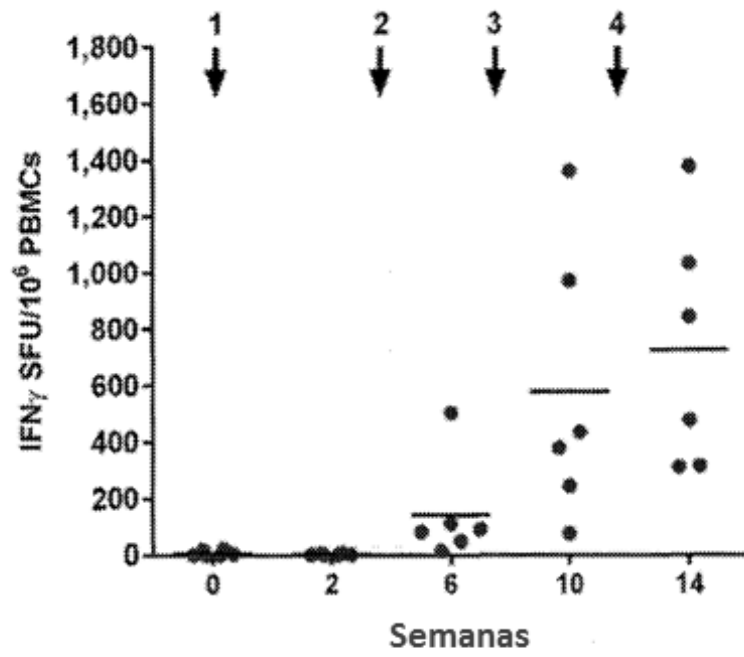


FIG. 14C

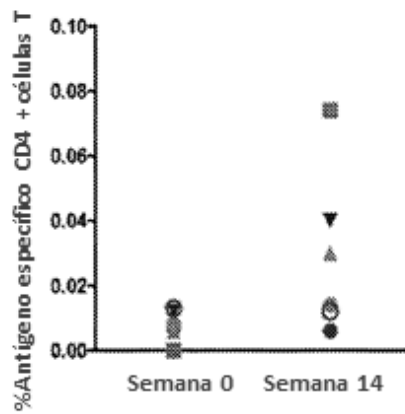


FIG. 15A

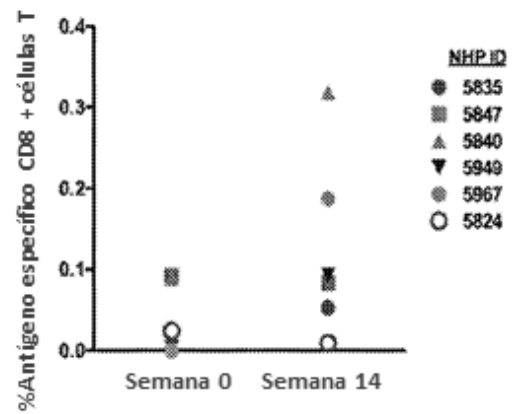


FIG. 15B

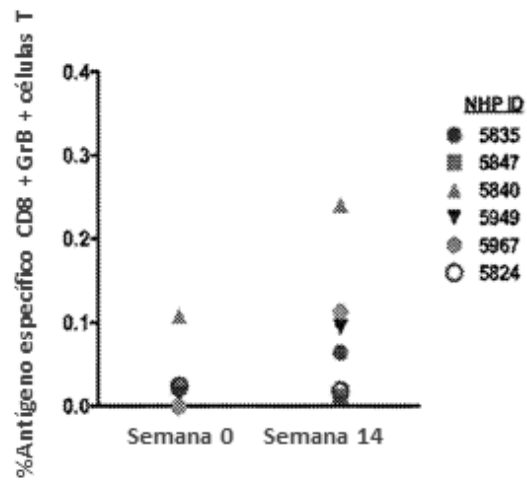


FIG. 15C

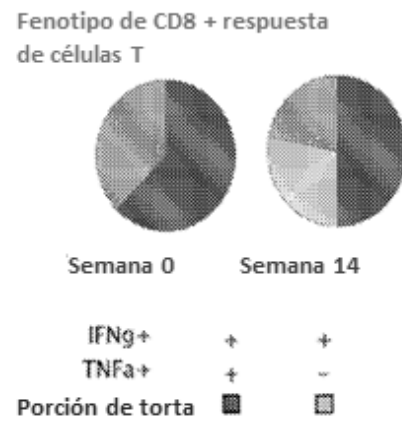


FIG. 15D

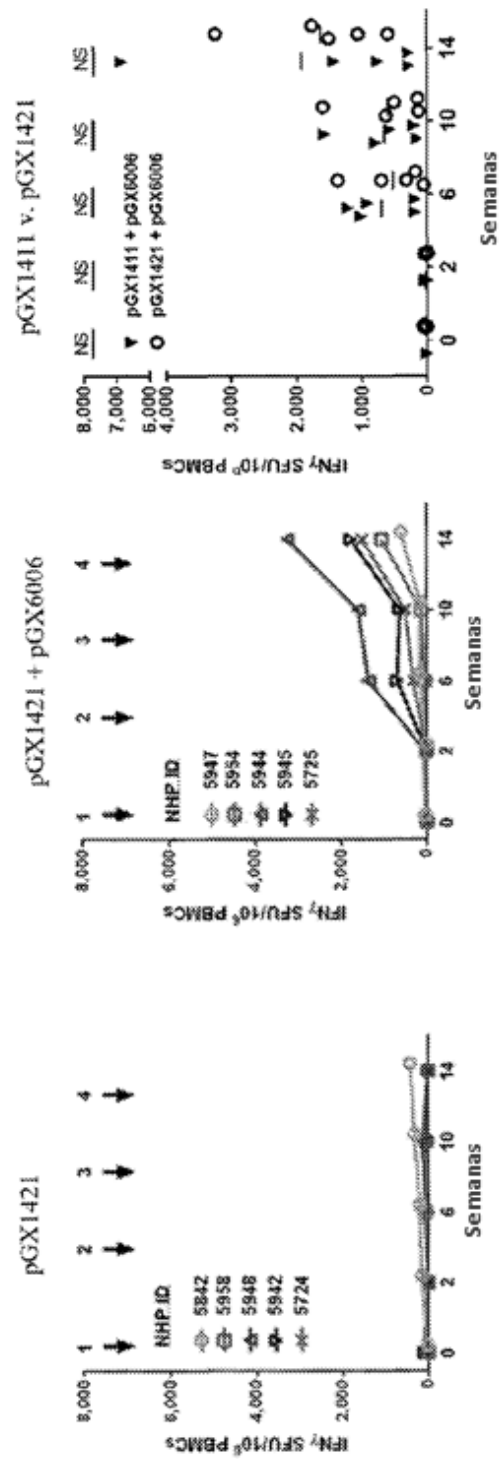


FIG. 16A

FIG. 16B

FIG. 16C

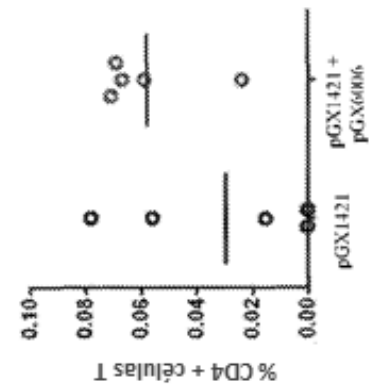


FIG. 17A

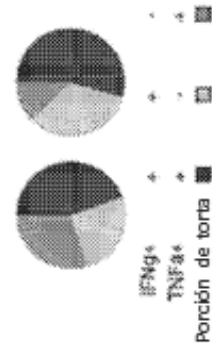


FIG. 17D

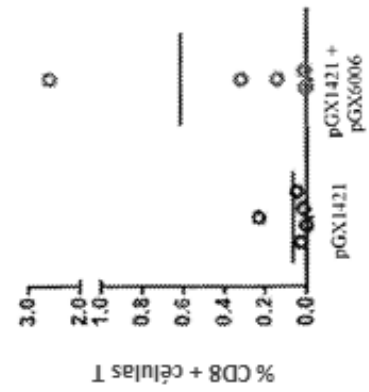


FIG. 17B

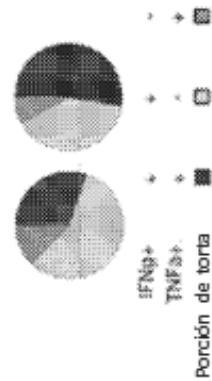


FIG. 17E

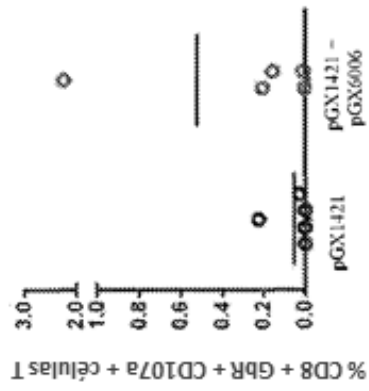


FIG. 17C

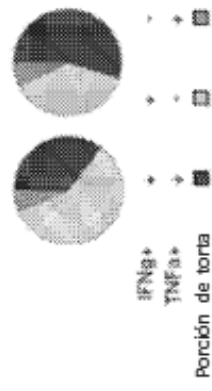


FIG. 17F

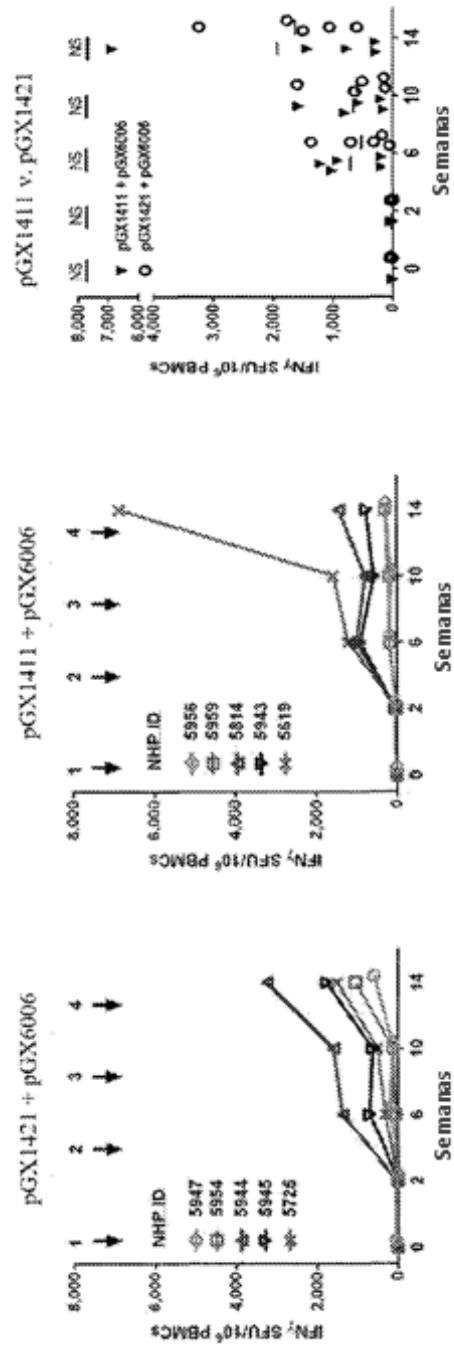


FIG. 18C

FIG. 18B

FIG. 18A

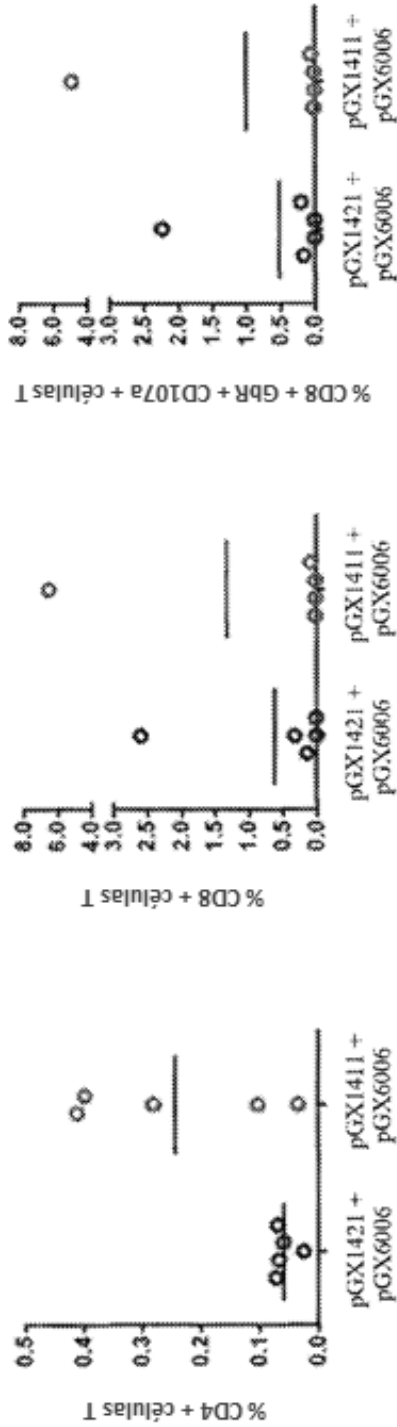


FIG. 19A

FIG. 19B

FIG. 19C

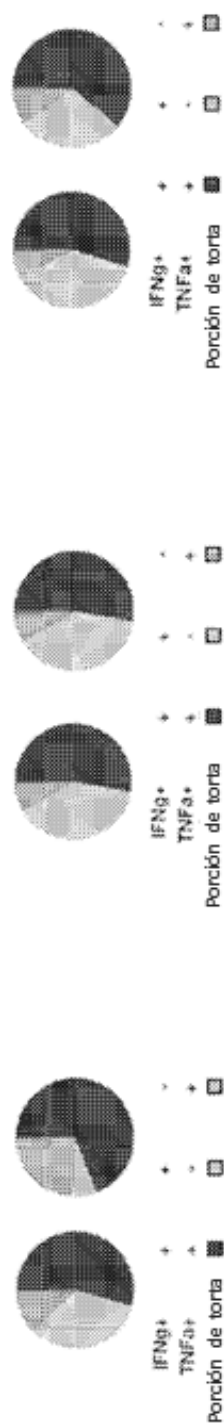


FIG. 19D

FIG. 19E

FIG. 19F