

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 146**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2010 E 10719285 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2419728**

54 Título: **Biomarcador para el control de pacientes**

30 Prioridad:

**17.04.2009 EP 09305328**

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

**28.02.2014**

73 Titular/es:

**TRANSGENE SA (100.0%)  
Boulevard Gonthier d' Andernach Parc  
d' Innovation, CS80166  
67405 Illkirch Graffenstaden Cedex, FR**

72 Inventor/es:

**ACRES, BRUCE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 445 146 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

Biomarcador para el control de pacientes

5 La presente invención se refiere al campo de la inmunoterapia y se refiere a procedimientos para determinar la eficacia de ciertos tratamientos de inmunoterapia. Los procedimientos de la invención incluyen la medición de un biomarcador especial en un cierto momento después del inicio del tratamiento de inmunoterapia, para evaluar el resultado clínico de dicho tratamiento. La invención tiene, por lo tanto, aplicaciones en el campo de la medicina.

10 Las técnicas de vacunación tradicionales que comportan la introducción de un antígeno en un sistema animal (por ejemplo, péptidos, proteínas) que puede inducir una respuesta inmune, y proteger, por lo tanto, dicho animal contra infecciones, por ejemplo, se han dado a conocer desde hace muchos años. Estas técnicas han incluido además el desarrollo de vacunas vivas y vacunas inactivadas. Las vacunas vivas son de manera típica, versiones atenuadas no patógenas de un agente infeccioso que son capaces de iniciar una respuesta inmune dirigida contra una versión patógena del agente infeccioso.

15 En estos últimos años se han producido avances en el desarrollo de vacunas recombinantes, especialmente vacunas recombinantes vivas, en las que antígenos externos de interés se codifican y expresan a partir de un vector. Entre ellas, los vectores basados en virus recombinantes han mostrado grandes posibilidades y desempeñan un importante papel en el desarrollo de nuevas vacunas. Se han investigado muchos virus en cuanto a su capacidad de expresar proteínas a partir de patógenos externos o tejidos tumorales, y en inducir respuestas inmunológicas específicas contra estos antígenos in vivo. De manera general, estas vacunas basadas en genes pueden estimular potentes respuestas humorales y celulares inmunes y los vectores víricos pueden ser una estrategia efectiva tanto para facilitar genes que codifican antígenos como para facilitar e incrementar la presentación del antígeno. Para su  
20 utilización como portador de vacuna, el vector vírico ideal debe ser seguro y debe posibilitar una presentación eficiente de los antígenos requeridos específicos del patógeno al sistema inmune. Además, el sistema vector debe cumplir criterios que posibilitan su producción en gran escala. Se han presentado varios vectores de vacunas hasta el momento, algunos de los cuales tienen relativas ventajas y límites dependientes de la aplicación propuesta (se puede encontrar un resumen de vacunas víricas recombinantes, por ejemplo, en el trabajo de Harrop y Carroll, 2006, Front Biosci., 11, 804-817; Yokoyama y otros, 1997, J Vet Med Sci., 59, 311-322). La utilización de dichas vacunas recombinantes es designada habitualmente inmunoterapia dirigida o inmunoterapia específica de antígeno e inmunoterapia activa.

25 Como resultado de la observación a principios de los años 1990 de que vectores de ADN de plásmidos podían transfectar directamente células de animales in vivo, se han realizado esfuerzos de investigación significativos para desarrollar técnicas de inmunoterapia basadas en la utilización de plásmidos de ADN para inducir respuesta inmune por introducción directa en animales de ADN que codifica para antígenos. Estas técnicas a las que se hace ampliamente referencia como vacuna de ADN o inmunoterapia de ADN, se han utilizado en la actualidad para producir respuestas inmunes protectoras en un gran número de modelos de enfermedad. Se puede encontrar un  
30 resumen de vacunas de ADN en la obra Reyes-Sandoval y Ertl, 2001 (Current Molecular Medicine, 1, 217-243).

Un problema general en el sector de la inmunoterapia ha sido, no obstante, la identificación de un medio para inducir una respuesta inmune suficientemente fuerte en individuos tratados para protección contra infecciones y enfermedades.

35 Por lo tanto, se han producido, por ejemplo, en estos últimos años, esfuerzos importantes para descubrir nuevos compuestos medicamentosos que actúan estimulando ciertos aspectos clave del sistema inmune, que servirán para incrementar la respuesta inmune inducida por las inmunoterapias. La mayor parte de estos compuestos, a los que se designa como modificadores (IRM) o coadyuvantes de la respuesta inmune, parecen actuar a través de mecanismos básicos del sistema inmune a través de receptores de tipo peaje ("Toll-like") (TLR) para inducir la biosíntesis de importantes citoquinas (por ejemplo, interferones, interleuquinas, factor de necrosis tumoral, etc., ver por ejemplo, Schiller y otros, 2006, Exp Dermatol., 15, 331-341). Estos compuestos se ha demostrado que estimulan una liberación rápida de ciertas células dendríticas, citoquinas derivadas de monocitos/macrófagos, y son también capaces de estimular células B para segregar anticuerpos, que juegan un papel importante en las actividades  
40 antivírica y antitumoral de los compuestos IRM.

De manera alternativa, se han propuesto estrategias de inmunoterapia, basándose la mayor parte de ellas en un régimen de vacunación ("prime-boost"). De acuerdo con estos protocolos de inmunoterapia "prime-boost", el sistema inmune es inducido en primer lugar para administración al paciente de un compuesto iniciador o cebador, y a continuación es amplificado por la administración de una segunda composición amplificadora (ver, por ejemplo, los documentos EP1411974 o US20030191076).

Además, se ha demostrado en el contexto de los cuidados de la salud, que un tratamiento puede ser efectivo solamente en un grupo específico de pacientes. Por lo tanto, es deseable facilitar a los médicos herramientas y procedimientos que posibiliten a los mismos adecuar terapias óptimas personalizadas para los pacientes, es decir, prescribir la terapia apropiada al paciente en el momento apropiado para proporcionar una tasa de éxito del  
45

tratamiento más elevada, controlar la respuesta al tratamiento, incrementar la eficacia del medicamento y la seguridad del mismo, eliminar el tratamiento innecesario de pacientes para los que la terapia no es apropiada, ahorrarle al paciente toxicidades innecesarias y efectos secundarios, reducir el coste a los pacientes y aseguradoras de medicación inefectiva, innecesaria o peligrosa y mejorar la calidad de vida del paciente, transformando eventualmente el cáncer en una enfermedad controlada con análisis de seguimiento según necesidades.

Teniendo en cuenta estos aspectos, la literatura especializada propone diferentes herramientas y procedimientos, tales como, por ejemplo:

- Farmacogenética, que consiste en el estudio de la respuesta individual a medicamentos como función de diferencias genéticas. Estas respuestas se refieren a la forma en que un medicamento funciona en un individuo determinado, cómo es metabolizado, su toxicidad y exigencias de dosificación. Con el proyecto de genoma humano, la farmacogenética se ha expandido a la farmacogenómica. La farmacogenómica va más allá de la farmacogenética con potencial de encontrar utilidades a partir del descubrimiento de medicamentos y su desarrollo, descubrimiento y validación de dianas y pruebas clínicas;
- También se puede aplicar metabolómica al campo de la medicina predictiva. A diferencia de la farmacogenética, que está limitada a factores genéticos, la fármaco-metabolómica es capaz de predecir la respuesta de un individuo a un medicamento basándose, no solamente en factores genéticos, sino también en factores no genéticos, tales como otros medicamentos en el cuerpo del paciente, estado actual de salud del paciente, etc;
- El papel de los biomarcadores va resultando cada vez más importante en el desarrollo clínico de terapéuticas. Un biomarcador puede ser un indicador de procesos biológicos normales, procesos de enfermedad, o respuestas farmacológicas a intervención terapéutica. Su función varía desde la clasificación de la población de pacientes para ayudar a identificar respondedores con respecto a no respondedores, hasta determinar la eficacia de la terapéutica. Los biomarcadores pueden ser una herramienta valiosa en la toma de decisiones más apropiadas que reducirán el coste del desarrollo de medicamentos y posibilitarán que las terapias alcancen a la población del paciente adecuada de manera más rápida.

Varias publicaciones describen la determinación de niveles de células T CD3+ y/o CD69+ en relación con diferentes estados de enfermedad o diferentes tratamientos (por ejemplo, Rossi y otros (Cancer Res. 65 (2005), 10555-10561), Ampel y otros, (Mycopathologia 161 (2006), 67-72), Melichar y otros, (Immunopharmacology and Immunotoxicology 23 (2001), 163-173), Devarapu y otros (Immunopharmacology and Immunotoxicology 28 (2006), 387-395), Lavasani y otros, (Scandinavian J. Immunol. 65 (2007), 39-47) y Huang y otros, (Pediatr. Allergy Immunol. 13 (2002), 426-433). No obstante, ninguno de ellos sugiere correlación de los niveles de linfocitos CD3+ CD69+ después de una administración de una composición inmunogénica, en particular, una composición que comprende un vector vírico recombinante y la eficacia de un tratamiento con dicha composición.

La invención proporciona materiales y procedimientos para evaluar la eficacia de un tratamiento que comporta la administración de una composición inmunogénica a un paciente (es decir, tratamiento de inmunoterapia) utilizando marcadores inmunológicos (biomarcadores) que se ha determinado que son señal sustancialmente fiable que se correlaciona con la respuesta terapéutica deseada, más particularmente, la respuesta inmune deseada. Los biomarcadores se encuentran presentes en muestras biológicas obtenidas del paciente. La capacidad de predecir el resultado clínico de un tratamiento, poco tiempo después de su inicio, posibilitar a los médicos y a los pacientes para que identifiquen terapias inefectivas, para tomar decisiones con información respecto al curso del tratamiento, incluyendo el posible abandono o permitir la implementación de terapias alternativas.

Tal como se utiliza en toda esta solicitud de patente, los términos “un y “uno” se utilizan en el sentido de que significan “como mínimo, uno”, “como mínimo, un primer”, “uno o más”, o bien “una serie” de los compuestos de referencia o fases de referencia excepto que el contexto lo determine de otro modo. Por ejemplo, el término “una célula” incluye una pluralidad de células incluyendo una mezcla de las mismas. De manera más específica, “como mínimo, uno” y “uno o más”, significa un número que es uno o mayor de uno, con especial preferencia uno, dos, o tres.

El término “y/o” siempre que se utiliza en esta descripción incluye el significado de “y”, “o” y “todos o cualquier combinación de los elementos relacionados por dicho término”.

El término “cerca de” o “aproximadamente”, tal como se utiliza en esta descripción, significa dentro de 20%, preferentemente dentro de 10%, y más preferentemente dentro de 5%.

Los términos “paciente”, “sujeto” se refieren a un vertebrado, en particular un miembro de la especie de los mamíferos, e incluye sin que ello sea limitativo, animales domésticos, animales de utilización deportiva, primates incluyendo humanos.,

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “tratamiento” o “trato” comprende profilaxis y/o terapia. De acuerdo con ello, las combinaciones inmunogénicas o procedimientos de la presente invención no están limitados a aplicaciones terapéuticas y se pueden utilizar en aplicaciones de profilaxis. Esto está cubierto por los términos “para desarrollar una respuesta profiláctica o terapéutica, preferentemente una respuesta inmune” en esta descripción.

5 “Profilaxis” no está limitada a prevenir enfermedades inmediatas (por ejemplo, enfermedades infecciosas), comprende además la prevención de consecuencias a largo plazo de estas infecciones, tales como cirrosis o cáncer.

Una “cantidad efectiva” o una “cantidad suficiente” de un compuesto activo es una cantidad suficiente para producir resultados beneficiosos o resultados deseados, incluyendo resultados clínicos. Una cantidad efectiva puede ser administrada en una o varias administraciones. Una “cantidad terapéuticamente efectiva” es una cantidad que produce resultados clínicos beneficiosos, incluyendo, sin que ello sea limitativo, el alivio de uno o varios síntomas asociados con infección vírica y también prevención de enfermedad (por ejemplo, prevención de uno o varios síntomas de infección).

10

De acuerdo con una primera realización, la presente invención se refiere a un procedimiento ex-vivo para evaluar la eficacia de un tratamiento que comporta la administración de una composición inmunogénica comprendiendo, como mínimo, un vector vírico recombinante que codifica un antígeno diana a un paciente, que comprende:

15

- medición de niveles de linfocitos T CD3+ CD69+ activados, en una muestra biológica tomada del cuerpo de dicho paciente, de manera que se han administrado una o varias dosis de dicha composición inmunogénica a dicho paciente, y de manera que dicha muestra biológica ha sido extraída siguiendo, como mínimo, una de dichas administraciones;
- en que los niveles de linfocitos T CD3+ CD69+ activados por encima de aproximadamente 10,4% indican que el sujeto indica un resultado clínico satisfactorio para el tratamiento.

20

En una realización preferente, un resultado clínico satisfactorio significa un incremento en la tasa de supervivencia.

Por lo tanto, la invención da a conocer un procedimiento ex-vivo para evaluar la eficacia de un tratamiento que comporta la administración de una composición inmunogénica a un paciente (es decir, un tratamiento de inmunoterapia).

30

De acuerdo con la invención, el término “evaluar” se debe comprender como “controlar, modificar o ajustar” un tratamiento que comporta la administración de una composición inmunogénica a un paciente.

El procedimiento comprende la evaluación de la eficacia del tratamiento de inmunoterapia basándose en el nivel de linfocitos T CD3+ CD69+ activados (a los que se hace referencia a continuación, asimismo, como “linfocitos T (CD3+ CD69+ activados)”) en el paciente como resultado de un tratamiento de inmunoterapia.

35

El procedimiento incluye la medición de los niveles de un paciente de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados como resultado de un tratamiento de inmunoterapia, y evaluar la eficacia del tratamiento de inmunoterapia basándose en los niveles de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados.

40

En ciertos aspectos, el procedimiento puede incluir además, la medición de los niveles de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados de un paciente antes del tratamiento de inmunoterapia.

45

En ciertos aspectos, el procedimiento comprende la medición de los niveles de un paciente de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados, como mínimo, una vez cada varias semanas siguiendo un tratamiento de inmunoterapia, y evaluar la eficacia del tratamiento de inmunoterapia basándose en los niveles de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados.

50

El tiempo entre el inicio del tratamiento de inmunoterapia y las mediciones de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados pueden variar entre 1 día y unas 48 semanas o más (por ejemplo, desde 1 día hasta aproximadamente 1 semana, desde aproximadamente 1 semana hasta aproximadamente 2 semanas, desde aproximadamente 2 semanas hasta aproximadamente 4 semanas, desde aproximadamente 4 semanas hasta aproximadamente 8 semanas, desde aproximadamente 8 semanas hasta aproximadamente 12 semanas, desde aproximadamente 12 semanas hasta aproximadamente 16 semanas, desde aproximadamente 16 semanas hasta aproximadamente 24 semanas, desde aproximadamente 24 semanas hasta aproximadamente 48 semanas, o más). En una realización preferente de la invención, los intervalos de tiempo son aproximadamente de 5 semanas. De manera similar, se pueden realizar mediciones adicionales (es decir, una medición de una tercera, una cuarta, una quinta, etc.) a intervalos similares de tiempo después de la segunda medición.

55

El “tratamiento de inmunoterapia” consiste, como mínimo, en una administración de una composición inmunogénica a un paciente. De acuerdo con una realización especial, el “tratamiento de inmunoterapia” consiste en administraciones sucesivas de una composición inmunogénica a un paciente, más específicamente consiste en la administración semanal durante un mínimo de 2 semanas, preferentemente durante un mínimo de 6 semanas.

65

El procedimiento incluye la determinación de los niveles de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados en un paciente como resultado de una administración de una composición inmunogénica al paciente, comparar dichos niveles al valor de corte anteriormente mencionado, y evaluar la eficacia del tratamiento de inmunoterapia basado en los niveles de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados en comparación con el valor de corte.

5 Tal como se utiliza en esta descripción, los términos "linfocitos T (CD3+ CD69+) activados" significan una célula linfocito que expresa antígenos de la superficie celular de CD3 y CD69.

10 De acuerdo con la invención, los niveles de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados se puede determinar, por ejemplo, por citometría de flujo (por ejemplo, por citofluorometría de flujo), ensayo de lisis de células diana, y más particularmente, por 2 o más citometrías de flujo de color (por ejemplo, Beckton Dickinson, Beckman Coulter). Ver, por ejemplo, Chizzolini y otros, 1991, Eur J Immunol.; 21(11), 2727-33.

15 De acuerdo con la invención, los niveles de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados se pueden determinar en una muestra de sangre entera o en células mononucleares de sangre periférica aisladas (PBMC) [por ejemplo, por purificación mediante Ficoll-Hypaque de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (Bennett & Breit 1994, J Leukoc Biol., 56(3), 236-40), o utilizando el sistema Sigma Accuspin™ (Sigma-Aldrich Ltd.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y similares].

20 De acuerdo con una realización de la invención, el nivel de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados es determinado utilizando anticuerpos.

De acuerdo con una realización específica de la invención, dichos anticuerpos son anticuerpos monoclonales.

25 Ejemplos de anticuerpos que podrían ser utilizados son anti-CD3 (Beckman Coulter Cat. No. A07748) y anti-CD69 (Beckman Coulter Cat. Nr. IM2656U).

30 De acuerdo con una realización específica de la invención, dichos anticuerpos son marcados, por ejemplo, por fluorescencia, radiomarcado, enzimas, biotina, o cualquier otro procedimiento diseñado para hacer detectables células marcadas con dichos anticuerpos. Estas técnicas son utilizadas ampliamente y bien conocidas en la técnica.

De acuerdo con una realización preferente de la invención, los niveles de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados, son determinados utilizando anticuerpos específicos para CD3 y CD69.

35 Así, por ejemplo, los niveles de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados son determinados recogiendo sangre periférica e incubando células con anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anti-CD3 y CD69). Entonces, se determinan los niveles de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados por medio de un instrumento de citometría de flujo, por ejemplo, el fabricado por Instrumentation Laboratory-Beckman Coulter, con un rayo láser He-Ne, que reconoce longitudes de onda de cuatro fluorocromos diferentes (isotiocianato de fluorosceína FITC, ficoeritrina PE/RD1, ECD, PC5/PE).

40 Los niveles de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados se pueden expresar tanto en (i) tanto por ciento (%) de linfocitos de sangre periférica que expresan antígenos de superficie celular de CD3 y CD69, o (ii) números absolutos de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados por microlitro de sangre periférica entera.

45 Los niveles de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados de más de 10,4% corresponden niveles de más de 148 linfocitos T CD3+ CD69+ por  $\mu$ l de sangre entera. De manera ventajosa, dicho nivel de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados es determinado en el día 43 después del inicio de dicho tratamiento que comporta la administración de una composición inmunogénica a un paciente.

50 En una realización preferente de la invención, el procedimiento de la invención comprende además una etapa inicial que consiste en la medición de los niveles de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados en la sangre del paciente antes de administración de la composición inmunogénica.

55 De acuerdo con la presente invención, los niveles de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados es medido en una muestra biológica obtenida del paciente. Las muestras biológicas incluyen, sin que ello sea limitativo, sangre y otras muestras de líquidos de origen biológico, muestras de tejidos sólidos, tales como muestras de biopsia. En una realización preferente, la muestra biológica es sangre, plasma o suero, en cuyo caso, la obtención de muestras de un paciente es relativamente simple y constituye un procedimiento no invasivo. Los procedimientos de obtención de sangre o suero son bien conocidos en esta técnica y no forman parte de la invención.

60 Tal como se utiliza en esta descripción, los términos "composición inmunogénica", "composición de vacuna", "vacuna" o términos similares, pueden ser utilizados de forma intercambiable y significan un agente adecuado para estimular/ inducir/incrementar el sistema inmune de un sujeto para mejorar el estado actual o para protegerlo contra presentes o futuros daños o infecciones, o reducir los mismos (incluyendo infecciones víricas, bacterianas parasíticas), por ejemplo, reducida proliferación de células tumorales o supervivencia, reducida replicación de patógeno o extensión de los patógenos en un sujeto o síntomas no deseados detectablemente reducidos asociados

con un determinado estado, alargando la supervivencia del paciente. Dicha composición inmunogénica comprende, como mínimo, un vector vírico recombinante que codifica un antígeno direccionado.

5 De acuerdo con una realización alternativa, la composición inmunogénica de la invención comprende además, como mínimo, un modificador de respuesta inmune.

10 Son ejemplos de dichos modificadores de respuesta inmune (IRM) los oligonucleótidos CpG (ver US 6.194.388; US2006094683; WO 2004039829 por ejemplo), lipopolisacáridos, complejos de ácido polinósico: policitídico (Kadowaki, y otros, 2001, J. Immunol. 166, 2291-2295), y polipéptidos y proteínas que se sabe que inducen producción de citoquinas a partir de células dendríticas y/o monocitos/macrófagos. Otros ejemplos de dichos modificadores de respuesta inmune (IRM) son pequeñas moléculas orgánicas, tales como imidazoquinolinaminas, imidazopiridina aminas, cicloalquilimidazopiridina aminas 6,7- fusionadas, imidazonaftiridina aminas, oxazoloquinolina aminas, tiazoloquinolina aminas y imidazoquinolina aminas con puente 1,2 (ver, por ejemplo, documentos US 4.689.338; US 5.389.640; US 6.110.929; y US 6.331.539).

15 Tal como se utiliza en esta descripción, el término "antígeno" se refiere a cualquier sustancia incluyendo antígenos complejos (por ejemplo, células tumorales, células infectadas por virus, etc.) que es capaz de ser la diana de una respuesta inmune. Un antígeno puede ser la diana o, por ejemplo, una respuesta formada por el paciente, mediada por células y/o humoral inmune. El término "antígeno" comprende, por ejemplo, la totalidad o una parte de antígenos víricos, antígenos específicos de tumor o relacionados con tumor, antígenos bacterianos, antígenos parasíticos, y similares:

20 Los antígenos víricos incluyen, por ejemplo, antígenos del virus de hepatitis A, B, C, D y E, VIH, virus del herpes, citomegalovirus, varicela zoster, virus de papiloma, virus de Epstein Barr, virus de gripe, virus de paragripe, adenovirus, virus coxsakie, virus picorna, rotavirus, virus sincitiales respiratorios, virus de la viruela, rinovirus, virus de rubéola, papovirus, virus de paperas, virus de sarampión; algunos ejemplos no limitativos de antígenos víricos conocidos incluyen los siguientes, antígenos derivados de HIV-1 tales como tat, nef, gp120 o gp160, gp40, p24, gag, env, vif, vpr, vpu, rev o parte y/o combinaciones de los mismos; antígenos derivados de virus de herpes humanos tales como gH, gL, gM, gB, gC, gK, gE o gD o partes y/o combinaciones de los mismos o proteína Temprana Inmediata ("Immediate Early") proteína tal como ICP27, ICP47, ICP4, ICP36 de HSV1 o HSV2; antígenos derivados de citomegalovirus, especialmente citomegalovirus humano tales como gB o derivados del mismo; antígenos derivados de Epstein Barr tales como gp350 o derivados del mismo; antígenos derivados de virus de Varicela Zoster tales como gpl, 11, 111 e IE63; antígenos derivados de virus de hepatitis tales como antígenos de virus de hepatitis B, hepatitis C o hepatitis E (por ejemplo, proteína env, E1 o E2, proteína de núcleo, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b, p7, o parte y/o combinaciones de las mismas de HCV); antígenos derivados de virus de papiloma humano (por ejemplo HPV6, 11, 16, 18, por ejemplo, L1, L2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, o parte y/o combinaciones de los mismos); antígenos derivados de otros patógenos víricos tales como virus Sincitial Respiratorio (por ejemplo, proteínas F y G o derivados de las mismas), virus de paragripe, virus de sarampión, virus de paperas, flavivirus (por ejemplo, virus de fiebre amarilla, virus de dengue, virus de encefalitis transportada por ácaros, virus de encefalitis japonesa) o células de virus de gripe (por ejemplo, proteínas HA, NP, NA, o M, o parte y/o combinaciones de las mismas);

45 - antígenos específicos de tumor o relacionados con tumor, incluyen, sin que sea limitativo, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más específicos de estos cánceres incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de células escamosas, cáncer de células pequeñas del pulmón, cáncer de células no pequeñas del pulmón, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer colorectal, cáncer de endometrio, carcinoma de glándula salivaria, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer hepático, y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, cáncer renal, melanoma maligno, cáncer de laringe, cáncer de próstata. Los antígenos del cáncer son antígenos que pueden potencialmente estimular respuestas aparentemente inmunes específicas del tumor. Algunos de estos antígenos son codificados aunque no necesariamente expresados por células normales. Estos antígenos se pueden caracterizar como los que se encuentran normalmente silentes (es decir, no expresados) en células normales, los que están expresados solamente a niveles bajos o en ciertas etapas de diferenciación y aquellos que son expresados temporalmente tales como antígenos embrionarios y fetales. Otros antígenos de cáncer son codificados por genes celulares mutantes tales como oncógenos (por ejemplo, oncógeno ras activado), genes supresores (por ejemplo, mutante p53, proteínas de fusión resultantes de deleciones internas o de translocación cromosómica. Otros antígenos de cáncer pueden ser codificados por genes víricos tales como los soportados en ARN y ADN de virus de tumor. Algunos ejemplos no limitativos de antígenos específicos de tumor o relacionados con el mismo, incluyen MART1/Melan-A, gp100, Dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), proteína de unión de adenosina deaminasa (ADA), ciclofilina b, antígeno Colorectal asociado (CRC)-C017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus epitopos inmunogénicos CAP-1 y CAP-2, etv6, aml1, Antígeno específico de Próstata (PSA) y sus epitopos inmunogénicos PSA-1, PSA-2, y PSA-3, antígeno de membrana específico de próstata (PS-MA), receptor de células T/cadena CD3-zeta, familia, MAGE de antígenos de tumor (por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-

A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-82), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), familia GAGE de antígenos de tumor (por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC (por ejemplo, MUC-1), HER2/neu, p21ras, RCAS1, alfa-fetoproteína, E-caderina, alfa-catenina, beta-catenina y gamma-catenina, p120ctn, gp100.sup.Pmel117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína de poliposis coli adenomatoso (APC), fodrina, Connexin 37, Ig-idiotipo, p15, gp75, gangliosidos GM2 y GD2, productos víricos tales como proteínas de virus de papiloma humano, familia Smad de antígenos de tumor, Imp-1, P1A, antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA)-1; fosforilasa de glicógeno de cerebro, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7, y c-erbB-2;

- los antígenos bacterianos incluyen, por ejemplo, antígenos de microbacterias que provocan TB y leprosis, neumococos, bacilos gran negativos aeróbicos, micoplasma, infecciones por estafilococos, infecciones por estreptococos, salmonelas, clamidias, neisserias;

- otros antígenos incluyen, por ejemplo, antígenos de malaria, de leishmaniasis, de tripanosomiasis, de toxoplasmosis, esquistosomiasis, de filariasis.

Dicho antígeno es codificado por una secuencia nucleótido heteróloga y es expresado in vivo por un vector vírico recombinante.

En una realización especialmente preferente, la secuencia de nucleótido heteróloga codifica uno o más de la totalidad o parte de los siguientes antígenos HBV-PreS1 PreS2 y proteínas env de superficie, núcleo y polHIV-gp120 gp40, gp160, p24, gag, pol, env, vif, vpr, vpu, tat, rev, nef; HPV-E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, L1, L2 (ver, por ejemplo, los documentos WO 90/10459, WO 98/04705, WO 99/03885); proteína E1 o E2 de HPV, proteína de núcleo, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b, p7 (ver, por ejemplo, los documentos WO2004111082, WO2005051420); Muc-1 (ver, por ejemplo, US 5.861.381; US 6.054.438; WO98/04727; WO98/37095).

De acuerdo con variantes de la invención, la composición inmunogénica contiene un vector vírico recombinante que codifica, como mínimo, dos antígenos, es decir, contiene una secuencia de nucleótido heteróloga que codifica, como mínimo, dos antígenos o como mínimo, dos secuencias de nucleótido heterólogas que codifican, como mínimo, dos antígenos.

De acuerdo con otra realización especial, dicha secuencia de nucleótido heteróloga codifica la totalidad o una parte de antígeno o antígenos de HPV seleccionados del grupo que consiste en la región de codificación temprana E6 de HPV, región de codificación temprana E7 de HPV y derivados y combinaciones de las mismas.

El antígeno de HPV codificado por el vector vírico recombinante es seleccionado del grupo que consiste de un polipéptido HPV E6, un polipéptido HPV E7, o ambos, es decir, un polipéptido HPV E6 y un polipéptido HPV E7. La presente invención comprende la utilización de cualquier polipéptido HPV E6, cuya unión a p53 es alterada, o por lo menos reducida selectivamente y/o la utilización de cualquier polipéptido HPV E7, cuya unión a Rb es alterada o por lo menos reducida significativamente (Munger y otros, 1989, EMBO J. 8, 4099-4105; Crook y otros, 1991, Cell 67, 547-556; Heck y otros, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446; Phelps y otros, 1992, J. Virol. 66, 2148-2427). Una variante de HPV-16 E6 no oncogena, que es adecuada para el objetivo de la presente invención, es objeto de delección de uno o varios residuos de aminoácidos situados desde aproximadamente la posición 118 hasta aproximadamente la posición 122 (+1 representa el primer residuo de metionina del polipéptido natural HPV-16 E6), con especial preferencia por la completa delección de residuos 118 a 122 (CPEEK). Una variante no oncogena de HPV-16 E7 que es adecuada para el objetivo de la presente invención, es sometida a delección de uno o varios residuos de aminoácidos situados desde aproximadamente la posición 21 a aproximadamente la posición 26 (+1 representa el primer aminoácido del polipéptido natural HPV-16 E7, con especial preferencia por la completa delección de los residuos 21 a 26 (DLYCYE). De acuerdo con una realización preferente, dichos uno o varios polipéptidos tempranos HPV-16 que se utilizan en la invención, son modificados adicionalmente para mejorar la presentación MHC clase I y/o MHC clase II y/o para estimular la inmunidad anti-HPV. Los polipéptidos HPV E6 y E7 son proteínas nucleares y se ha demostrado anteriormente que la presentación de membrana permite mejorar su eficacia terapéutica (ver, por ejemplo, el documento WO99/03885). Por lo tanto, puede ser aconsejable modificar, como mínimo, uno de los polipéptidos tempranos HPV para que quede anclado a la membrana de la célula. El anclaje en la membrana puede ser conseguido fácilmente incorporando en el polipéptido temprano HPV una secuencia de anclaje a la membrana y si el polipéptido natural carece de una secuencia secretora (es decir, un péptido señal). Las secuencias de anclaje en membrana y secuencias secretoras son conocidas en esta técnica. De manera breve, las secuencias secretoras se encuentran presentes en el terminal-N de los polipéptidos presentados o segregados de la membrana e inician su paso hacia dentro del retículo endoplasmático (ER). Habitualmente comprenden de 15 a 35 aminoácidos hidrofóbicos, esencialmente, que son eliminados a continuación por una endopeptidasa en situación ER específica para facilitar el polipéptido maduro. Las secuencias de anclaje en membrana son usualmente altamente hidrofóbicas en su naturaleza y sirven para anclar los polipéptidos en la membrana de la célula (ver, por ejemplo, Branden y Tooze, 1991, en Introduction to Protein Structure p. 202-214, NY Garland).

La elección de las secuencias de anclaje en membrana y secretoras que pueden ser utilizadas en el contexto de la presente invención, es muy amplia. Se pueden obtener a partir de cualquier polipéptido anclado y/o segregado en membrana, que comprende (por ejemplo, polipéptidos celulares o víricos), tales como glicoproteína de la rabia, glicoproteína de la envoltura del virus de VIH, o la proteína F del virus del sarampión o puede ser sintética. Las secuencias de anclaje y/o secretoras de membrana insertadas en cada uno de los polipéptidos tempranos HPV-16 utilizado de acuerdo con la invención, puede tener un origen común o diferente. El lugar preferente de inserción de la secuencia secretora es el terminal N, más abajo del codón para iniciación de traducción, y el de la secuencia de anclaje en membrana es el terminal-C, por ejemplo, inmediatamente antes del codón de terminación.

El polipéptido HPV E6 que se usa en la presente invención, es modificado preferentemente por inserción de las señales secretora y de anclaje en membrana de la proteína F de sarampión. Opcionalmente, o en combinación, el polipéptido HPV E7 que se usa en la presente invención es preferentemente modificado por inserción de las señales secretora y de anclaje en membrana de la glicoproteína de la rabia.

La eficacia terapéutica del vector vírico recombinante puede ser mejorada también utilizando uno o más polipéptidos inmunopotenciadores que codifican ácido nucleico. Por ejemplo, puede ser ventajoso unir el polipéptido o polipéptidos tempranos HPV a un polipéptido, tal como calreticulina (Cheng y otros, 2001, J. Clin. Invest. 108, 669-678), proteína de choque térmico de Mycobacterium tuberculosis 70 (HSP70) (Chen y otros, 2000, Cancer Res. 60, 1035-1042), ubiquitina (Rodríguez y otros, 1997, J. Virol. 71, 8497-8503) o el dominio de translocación de una toxina bacteriana tal como la exotoxina de Pseudomonas aeruginosa A (ETA (dIII)) (Hung y otros, 2001 Cancer Res. 61, 3698-3703).

De acuerdo con otra realización, el vector vírico recombinante utilizado en la invención comprende un ácido nucleico que codifica uno o varios polipéptidos tempranos, tal como se ha definido anteriormente, y más particularmente, polipéptidos HPV-16 y/o HPV-18 E6 temprano y/o polipéptidos E7.

De acuerdo con otra realización especial y preferente, dicha secuencia de nucleótido heteróloga codifica la totalidad o una parte del antígeno MUC 1 o derivados del mismo.

De acuerdo con otra realización especial, dicha secuencia de nucleótido heteróloga codifica uno o varios de la totalidad o una parte de las siguientes: proteína E1 o E2 de HCV env, proteína de núcleo, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b, p7 o derivados de las mismas. De acuerdo con otra realización especial, dicha secuencia de nucleótido heteróloga codifica una o varias proteínas de fusión, de manera que la configuración no es natural en el sentido de que, por lo menos uno de los polipéptidos NS aparece en un orden que es distinto del de la configuración natural. Por lo tanto, si la proteína de fusión comprende un polipéptido NS3, un polipéptido NS4A y un polipéptido NS5B, la configuración natural sería NS3-NS4A-NS5B con NS3 en el terminal-N y NS5B en el terminal-C. Como contraste, una configuración no natural puede ser NS5B-NS3-NS4A, NS5B-NS4A-NS3, NS4A-NS3-NS5B, NS4A-NS5B-NS3 o NS3-NS5B-NS4A. En particular, la proteína de fusión comprende, como mínimo, uno de los siguientes:

o un polipéptido NS4A fusionado directamente a través de un enlazador al terminal-N de un polipéptido NS3;  
o un polipéptido NS3 fusionado directamente o a través de un enlazador al terminal-N de un polipéptido NS5B;  
o un polipéptido NS4B fusionado directamente o a través de un enlazador al terminal-N de un polipéptido NS5B;  
o un polipéptido NS4A fusionado directamente o a través de un enlazador al terminal-N de un polipéptido NS3 que está fusionado directamente o a través de un enlazador al terminal-N de un polipéptido NS4B; y/o  
o un polipéptido NS3 fusionado directamente o a través de un enlazador al terminal-N de un polipéptido NS4B que está fusionado directamente o a través de un enlazador al terminal-N de un polipéptido NS5B.

En estas partes específicas de la proteína de fusión cada uno de los polipéptidos NS puede ser independientemente natural o modificado. Por ejemplo, el polipéptido NS4A incluido en la parte NS4A-NS3 puede ser natural, mientras que el polipéptido NS3 comprende, como mínimo, una de las modificaciones que se describen más adelante.

En caso necesario, la molécula de ácido nucleico que se utiliza en la invención se puede optimizar para proporcionar expresión de alto nivel del antígeno diana (por ejemplo, polipéptido o polipéptidos tempranos HPV) en una célula huésped u organismo específico, por ejemplo, una célula u organismo huésped humano. De manera típica, la optimización del codón es llevada a cabo sustituyendo uno o varios codones "naturales" (por ejemplo, HPV) que corresponden a un codón utilizado de manera poco frecuente en la célula huésped de mamífero por uno o varios codones que codifican el mismo aminoácido que es utilizado más frecuentemente. Esto se puede conseguir por mutagénesis convencional o por técnicas sintéticas químicas (que resultan, por ejemplo, en un ácido nucleico sintético). No es necesario sustituir todos los codones naturales correspondientes a codones utilizados con poca frecuencia, dado que se puede conseguir expresión incrementada incluso con sustitución parcial. Además, se pueden realizar algunas desviaciones con respecto a la estricta observación de la utilización del codón optimizado para adaptarse a la introducción de lugar o lugares de restricción.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término "vector vírico recombinante" se refiere a vectores extracromosomales (por ejemplo, episoma) multicapa y de integración, (es decir, para su incorporación en los

cromosomas huésped). Son particularmente importantes en el contexto de la invención los vectores para utilizar en terapia génica (es decir, capaces de suministrar el ácido nucleico a un organismo huésped), así como vectores de expresión a utilizar en diferentes sistemas de expresión.

5 Se pueden derivar vectores víricos apropiados de una serie de virus distintos (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, AAV, virus de la viruela, virus de herpes, virus de paperas, virus esponjosos y similares). Tal como se utiliza en esta descripción, el término "vector vírico" comprende vector ADN/ARN, así como partículas víricas generadas del mismo. Los vectores víricos pueden ser competentes para replicación o pueden estar genéticamente desactivados siendo defectivos para replicación o de replicación dañada. El término "competente para replicación" utilizado en  
10 esta descripción, comprende vectores víricos selectivos de replicación y replicativos de forma condicional, que están diseñados para replicar mejor o selectivamente en linfocitos T hospedantes específicos (por ejemplo, células tumorales).

15 En un aspecto, el vector vírico recombinante que se utiliza en la invención, es un vector adenovírico recombinante (ver un resumen en "Adenovírico vectors for gene therapy", 2002, Ed D. Curiel and J. Douglas, Academic Press). Se puede derivar de una serie de fuentes humanas o animales y se puede utilizar cualquier serotipo de los serotipos de adenovirus 1 a 51. Son particularmente preferentes, los adenovirus humanos 2 (Ad2), 5 (Ad5), 6 (Ad6), 11 (Ad11), 24 (Ad24) y 35 (Ad35). Estos adenovirus se pueden conseguir de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md.), y han sido objeto de numerosas publicaciones que describen su secuencia, organización y  
20 procedimiento de producción, permitiendo su aplicación a los expertos (ver, por ejemplo, US 6.133.028; US 6.110.735; WO 02/40665; WO 00/50573; EP 1016711; Vogels y otros, 2003, J. Virol. 77, 8263-8271).

25 El vector adenovírico utilizado en la presente invención puede ser competente en cuanto a replicación. Se disponen actualmente por los técnicos en la materia de numerosos ejemplos de vectores adenovíricos competentes en cuanto a replicación (ver, por ejemplo, Hernandez-Alcoceba y otros, 2000, Human Gene Ther. 11, 2009-2024; Nemunaitis y otros, 2001, Gene Ther. 8, 746-759; Alemany y otros, 2000, Nature Biotechnology 18, 723-727). Por ejemplo, se pueden diseñar a partir de un genoma de adenovirus de tipo salvaje por delección en el dominio E1A CR2 (ver, por ejemplo, WO 00/24408) y/o por sustitución de los promotores naturales E1 y/o E4 con promotores de tejidos, tumor o  
30 específicos de estado celular (ver, por ejemplo, US 5.998.205, WO99/25860, US 5.698.443, WO00/46355, WO00/15820 y WO01/36650).

35 De manera alternativa, el vector adenovírico que se utiliza en la invención es defectivo en cuanto a replicación (ver, por ejemplo, WO94/28152; Lusky y otros, 1998, J. Virol 72, 2022-2032). Los vectores adenovíricos defectivos en cuanto a replicación preferentes, son defectivos E1 (ver, por ejemplo, US 6.136.594 y US 6.013.638), con una delección de E1 que se extiende desde aproximadamente las posiciones 459 a 3328 o desde aproximadamente desde las posiciones 459 a 3510 (por referencia a la secuencia de adenovirus humano tipo 5 que se da a conocer en GeneBank bajo el número de acceso M 73260 y en Chroboczek y otros, 1992, Virol. 186, 280-285). La capacidad de clorado puede ser mejorada adicionalmente por delección de partes adicionales del genoma adenovírico (la totalidad o parte de la región E3 no esencial o de otras regiones esenciales E2, E4). La inserción de un ácido nucleico en  
40 cualquier localización del vector adenovírico se puede llevar a cabo mediante recombinación homóloga, tal como se describe por Chartier y otros (1996, J. Virol. 70, 4805-4810). Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica el polipéptido HPV-16 E6 puede ser insertado en sustitución de la región E1, y el ácido nucleico que codifica el polipéptido HPV-16 E7 en sustitución de la región E3 o viceversa.

45 En otro aspecto preferente, el vector que se utiliza en la invención es un vector de virus de viruela (ver, por ejemplo, Cox y otros, en "Viruses in Human Gene Therapy" Ed J. M. Hos, Carolina Academic Press). De acuerdo con otra realización preferente, se selecciona en el grupo que consiste en virus de vacuna, incluyendo los virus de vacuna adecuados sin limitación la cepa Copenhagen (Goebel y otros, 1990, Virol. 179, 247-266 y 517-563; Johnson y otros, 1993, Virol. 196, 381-401), la cepa Wyeth y el virus altamente atenuado derivado del mismo, incluyendo MVA (ver resumen de Mayr, A., y otros, 1975, Infection 3,6-14) y derivados del mismo (tal como la cepa de vacuna MVA 575 (ECACC V00120707 - US 6.913.752), NYVAC (ver WO 92/15672 - Tartaglia y otros, 1992, Virology, 188, 217-232). La determinación de la secuencia completa del genoma MVA y comparación con el genoma Copenhagen VV ha permitido la identificación precisa de las siete delecciones (I a VII) que tuvieron lugar en el genoma MVA (Antoine y  
50 otros, 1998, Virology 244, 365-396), cualquiera de las cuales puede ser utilizada para insertar el ácido nucleico que codifica el antígeno. El vector puede ser obtenido también a partir de cualquier otro miembro de los virus de viruela, en particular viruela de aves (por ejemplo, TROVAC, ver Paoletti y otros, 1995, Dev Biol Stand., 84, 159-163); viruela de canario (por ejemplo, ALVAC, WO 95/27780, Paoletti y otros, 1995, Dev Biol Stand., 84, 159-163); viruela de pichón; viruela de cerdo y similares. A título de ejemplo, los expertos en la materia pueden consultar WO 92 15672 (incorporada a título de referencia) que describe la producción de vectores de expresión basados en virus de viruela capaces de expresar dicha secuencia heteróloga de nucleótido, especialmente la secuencia de nucleótido que  
60 codifica antígeno.

65 La técnica básica para insertar el ácido nucleico y elementos regulatorios asociados, requeridos para la expresión en un genoma vírico de viruela, se describe en numerosos documentos accesibles para los técnicos en la materia (Paul y otros, 2002, Cancer gene Ther. 9, 470-477; Piccini y otros, 1987, Methods of Enzymology 153, 545-563; US 4.769.330; US 4.772.848; US 4.603.112; US 5.100.587 y US 5.179.993). Usualmente, un proceso a través de

recombinación homóloga entre secuencias solapadas (es decir, lugar de inserción deseado) presenta tanto en el genoma vírico como en el plásmido portador el ácido nucleico a insertar.

5 El ácido nucleico que codifica el antígeno utilizado en la presente invención es insertado preferentemente en un lugar no esencial del genoma vírico de viruela a efectos de que el virus de viruela recombinante continúe viable e infeccioso. Las regiones no esenciales son regiones intergénicas no codificantes o cualquier gen para el que la inactivación o delección no dificulta significativamente el crecimiento vírico, la replicación o la infección. También se puede prever la inserción en un lugar vírico esencial, a condición de que la función defectiva sea suministrada in trans durante la producción de partículas víricas, por ejemplo, utilizando una línea celular helper que lleva las secuencias de complemento correspondientes a las delecionadas en el genoma de virus de viruela.

10 Cuando se utiliza el virus de la vacuna Copenhagen, el ácido nucleico que codifica antígeno es insertado preferentemente en el gen timidina quinasa (tk) (Hruby y otros, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci USA 80, 3411-3415; Weir y otros, 1983, J. Virol. 46, 530-537). No obstante, son también apropiados otros sitios de inserción, por ejemplo, en el gen de hemaglutinina (Guo y otros, 1989, J. Virol. 63, 4189-4198), en el locus K1L, en el gen u (Zhou y otros, 1990, J. Gen. Virol. 71, 2185-2190) o en el extremo izquierdo del genoma del virus de la vacuna en la que se han indicado en la literatura una serie de delecciones espontáneas o realizadas voluntariamente (Altenburger y otros, 1989, Archives Virol. 105, 15-27; Moss y otros, 1981, J. Virol. 40, 387-395; Panicali y otros, 1981, J. Virol. 37, 1000-1010; Perkus y otros, 1989, J. Virol. 63, 3829-3836; Perkus y otros, 1990, Virol. 179, 276-286; Perkus y otros, 1991, Virol. 180, 406-410).

15 Cuando se utiliza MVA, el ácido nucleico que codifica antígeno puede ser insertado en cualquiera de las delecciones identificadas I a VII, así como en el locus D4R, pero la inserción en II o III es preferente (Meyer y otros, 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038; Sutter y otros, 1994, Vaccine 12, 1032-1040).

20 Cuando se utiliza virus de viruela de aves, si bien se puede considerar la inserción dentro del gen de timidina quinasa, el ácido nucleico que codifica antígeno es introducido preferentemente en la región intergénica situada entre ORF 7 y 9 (ver, por ejemplo, EP 314 569 y US 5.180.675).

25 De acuerdo con una realización especial, dicho vector vírico recombinante es un vector adenovírico recombinante.

De acuerdo con otra realización especial, dicho vector vírico recombinante es un vector de vacuna recombinante.

30 De acuerdo con una realización preferente, dicho vector de vacuna recombinante es un vector MVA recombinante.

35 Preferentemente, el ácido nucleico que codifica antígeno que se utiliza en la invención, adopta una forma adecuada para su expresión en un organismo o célula huésped, lo que significa que la secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno son situados bajo control de una o varias secuencias reguladoras necesarias para su expresión en la célula u organismo huésped. Tal como se utiliza en esta descripción, el término "secuencia reguladora" se refiere a cualquier secuencia que permite, contribuye o modula la expresión de ácido nucleico en una célula huésped determinada, incluyendo replicación, duplicación, transcripción, corta y pega, traducción, estabilidad y/o transporte del ácido nucleico o uno de sus derivados (es decir, mARN) a la célula huésped. Se apreciará por los técnicos en la materia, que la elección de las secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la célula huésped, el vector y el nivel de expresión deseado. El ácido nucleico que codifica el antígeno está enlazado operativamente a una secuencia de expresión de gen que dirige la expresión del ácido nucleico antígeno dentro de una célula eucariótica. La secuencia de expresión de gen es cualquier secuencia de nucleótido regulador, tal como una secuencia promotora o combinación promotor-amplificador que facilita la transcripción y traducción eficientes del ácido nucleico antígeno al que está enlazado operativamente. La secuencia de expresión de gen puede ser, por ejemplo, un promotor de mamífero o vírico, tal como un promotor constitutivo o inducible. Los promotores constitutivos de mamíferos incluyen, sin que ello sea limitativo, los promotores para los genes siguientes: hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT), adenosina deaminasa, piruvato quinasa, promotor de b-actina y otros promotores constitutivos. Se incluyen, por ejemplo, entre los promotores víricos que funcionan de forma constitutiva en células eucarióticas los promotores de citomegalovirus (CMV), virus de simio (por ejemplo, SV40), virus de papiloma, adenovirus, virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus de sarcoma de Rous, citomegalovirus, repeticiones del terminal largo (LTR) de virus de leucemia de Moloney y otros retrovirus, y el promotor timidina quinasa de virus de herpes simplex. Otros promotores constitutivos son conocidos por los técnicos ordinarios en la materia. Los promotores útiles como secuencias de expresión de gen de la invención incluyen también promotores inducibles. Los promotores inducibles son expresados en presencia de un agente inductor. Por ejemplo, el promotor metalotioneina es inducido a promover la transcripción y traducción en presencia de ciertos iones metálicos. Otros promotores inducibles son conocidos por los técnicos ordinarios en la materia. En general, la secuencia de expresión de gen incluirá, de forma necesaria, secuencias 5' no transcriptoras y 5' no traductoras involucradas en la iniciación de la transcripción y traducción, respectivamente, tal como secuencia TATA, secuencia de nivelación, secuencia CAAT, y similares. En especial, estas secuencias 5' no transcriptoras, incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para control transcripcional del ácido nucleico de antígeno unido operativamente.

40

45

50

55

60

65

Las secuencias de expresión de gen incluyen secuencias intensificadoras o secuencias activadoras de línea de entrada, según se desee. Los promotores preferentes a utilizar en un vector vírico de viruela (ver más adelante) incluye sin

que sea limitativo, promotores de vacuna 7,5K, H5R, TK, p28, p11 y K1L, promotores quiméricos, entre promotores temprano y tardío de virus de viruela, así como promotores sintéticos, tales como los descritos en Chakrabarti y otros (1997, Biotechniques 23, 1094-1097), Hammond y otros (1997, J. Virological Methods 66, 135-138) y Kumar y Boyle (1990, Virology 179, 151-158).

5 El promotor es de especial importancia y la presente invención comprende la utilización de promotores constitutivos que dirigen la expresión del ácido nucleico en muchos tipos de células huésped, y los que dirigen solamente la expresión en ciertas células huésped o en respuesta a eventos específicos o factores exógenos (por ejemplo, por temperatura, aditivo nutriente, hormona, u otro ligando). Se describen promotores adecuados de manera amplia en la literatura y se pueden citar más específicamente promotores víricos tales como promotores RSV, SV40, CMV y MLP. Se incluyen entre los promotores preferentes a utilizar en un vector vírico de viruela, sin que ello sea limitativo, los promotores de vacunas 7,5K, H5R, TK, p28, p11 y K1L, promotores quiméricos, entre promotores tempranos y tardíos víricos de viruela, así como promotores sintéticos, tales como los que se describen en Chakrabarti y otros (1997, Biotechniques 23, 1094-1097), Hammond y otros (1997, J. Virological Methods 66, 135-138) y Kumar y Boyle (1990, Virology 179, 151-158).

Los técnicos en la materia apreciarán que los elementos reguladores que controlan la expresión de la molécula de ácido nucleico de la invención pueden comprender además elementos adicionales para iniciación apropiada, regulación y/o terminación de la transcripción (por ejemplo, secuencias de terminación de transcripción polyA), de transporte mRNA (por ejemplo, secuencias de la señal de localización nuclear), de proceso (por ejemplo, señales de copia y pega), y de estabilidad (por ejemplo, intrones y secuencias no codificantes 5' y 3'), de traducción (por ejemplo, señal de péptido, propéptido, secuencias directrices tripartitas, lugares de unión de ribosomas, secuencias de Shine-Dalgarno, etc.) en la célula u organismo huésped.

25 De manera alternativa, el vector vírico recombinante que se utiliza en la presente invención puede comprender además, como mínimo, un ácido nucleico que codifica, como mínimo, una citoquina. Se incluyen entre las citoquinas adecuadas, sin que ello sea limitativo, las interleuquinas (por ejemplo, IL-2, IL-7, IL-15, IL-18, IL-21) e interferones (por ejemplo, IFN $\gamma$ , INF $\alpha$ ), con especial preferencia para interleuquina IL-2. Cuando la vacuna recombinante de la invención comprende un ácido nucleico que expresa citoquina, dicho ácido nucleico puede ser transportado por el vector vírico recombinante que codifica el antígeno o antígenos, o por un vector recombinante independiente que puede ser del mismo o diferente origen.

De acuerdo con una realización preferente, el vector vírico recombinante que se utiliza en la presente invención codifica la totalidad o una parte del antígeno MUC1 o derivado del mismo, y como mínimo, una de las citoquinas indicadas anteriormente, y preferentemente una interleuquina, especialmente IL2.

Se pueden producir partículas víricas infecciosas por procesos rutinarios que comprenden el vector vírico recombinante antes descrito. Un proceso a título de ejemplo comprende las siguientes etapas:

- 40 a. introducción del vector vírico en una línea celular adecuada,
- b. cultivo de dicha línea celular en condiciones adecuadas a efectos de permitir la producción de dicha partícula vírica infecciosa,
- 45 c. recuperación de la partícula vírica infecciosa producida del cultivo de dicha línea celular, y
- d. purificar opcionalmente dicha partícula vírica infecciosa recuperada.

50 Son células apropiadas para la propagación de vectores adenovíricos, por ejemplo, células 293, células PERC6, células HER96, o células que se dan a conocer en los documentos WO 94/28152, WO 97/00326, US 6.127.175.

Las células apropiadas para la propagación de vectores de virus de viruela son células aviares, y más preferentemente fibroblastos de embriones de pollo primarios (CEF) preparados a partir de embriones de pollo obtenidos a partir de huevos fertilizados.

55 Las partículas víricas infecciosas pueden ser recuperadas del sobrenadante de cultivo o de células después de lisis (por ejemplo, por medios químicos, congelación/descongelación, choque osmótico, choque mecánico, sonicación y similares). Las partículas víricas pueden ser aisladas por tandas consecutivas de purificación de placas, y a continuación pueden ser purificadas utilizando las técnicas conocidas (métodos cromatográficos, ultracentrifugación sobre cloruro de cesio o gradiente de sacarosa).

60 De acuerdo con otra realización, los procedimientos de la invención se pueden combinar con otros procedimientos para la predicción de la eficacia del tratamiento, y más específicamente para la predicción de la eficacia de tratamientos de inmunoterapia. Por ejemplo, niveles de biomarcadores tales como niveles de células NK activadas (ver solicitud de patente que solicita prioridad de EP 08305876.8) o niveles de sICAM-1 (ver solicitud de patente que solicita prioridad de EP 09305032.6).

De acuerdo con otra realización preferente, los procedimientos de la invención comprenden además la medición de niveles de interferón  $\gamma$  del paciente, tal como se da a conocer en la solicitud de patente que solicita prioridad de EP 09305256.1.

5 En ciertos aspectos, el procedimiento incluye la medición de los niveles de interferón  $\gamma$  como mínimo una vez varias semanas después de un tratamiento de inmunoterapia; y evaluar la eficacia del tratamiento de inmunoterapia basándose en los niveles de linfocitos T activados (CD3+ CD69+) y de interferón  $\gamma$ .

10 El tiempo entre el inicio del tratamiento de inmunoterapia y los tratamientos de interferón  $\gamma$  puede ser de 1 día a 48 semanas o más (por ejemplo, de 1 día a 1 semana, desde aproximadamente 1 semana hasta aproximadamente 2 semanas, desde aproximadamente 2 semanas hasta aproximadamente 4 semanas, desde aproximadamente 4 semanas hasta aproximadamente 8 semanas, desde aproximadamente 8 semanas hasta aproximadamente 12 semanas, desde aproximadamente 12 semanas hasta aproximadamente 16 semanas, desde aproximadamente 16 semanas hasta aproximadamente 24 semanas, desde aproximadamente 24 semanas hasta aproximadamente 48 semanas, o más). En una realización preferente de la invención, el intervalo de tiempo es de unas 5 semanas. De manera similar, se pueden tomar mediciones adicionales (es decir, una tercera, una cuarta, una quinta medición, etc.) a intervalos similares de tiempo después de la segunda medición.

20 En aspectos relacionados, el procedimiento comprende la determinación de los niveles de interferón  $\gamma$  en un paciente después de la administración de una composición inmunogénica al paciente; comparación de dichos niveles a un nivel de corte; y evaluación de la eficacia del tratamiento de inmunoterapia basándose en los niveles de linfocitos T activados (CD3+ CD69+), tal como se describe en esta descripción, y en los niveles de interferón  $\gamma$  comparados al valor de corte.

25 De acuerdo con una realización especial de la invención, los "niveles de interferón  $\gamma$ " significa nivel de interferón  $\gamma$  "detectable", definiéndose el término "detectable" como  $\geq$  al límite de detección.

30 De acuerdo con la realización especial, el valor de corte y/o límite de detección del nivel de interferón  $\gamma$  son de unos 4 pg/ml (por ejemplo, 4,6 pg/ml en plasma).

De manera ventajosa, dichos "niveles de interferón  $\gamma$ " son determinados en el día 43, después del inicio de dicho tratamiento, que comporta la administración de una composición inmunogénica a un paciente.

35 De acuerdo con una realización especial, se ha demostrado una correlación estadísticamente significativa entre pacientes que tienen nivel de interferón  $\gamma$  detectable en el día 43 y pacientes que tienen niveles de linfocitos CD3+ CD69+ por encima del nivel de corte anteriormente indicado en el día 43 (Mann-Whitney,  $p = 0,02$ ).

40 En una realización preferente de la invención, el procedimiento de la invención comprende además una etapa inicial que consiste en medición de los niveles de interferón  $\gamma$  en el cuerpo del paciente antes de la administración de la composición inmunogénica.

45 De acuerdo con la presente invención, el nivel de interferón  $\gamma$  se mide en una muestra biológica obtenida del paciente. Las muestras biológicas incluyen pero no están limitadas a ello, sangre y otras muestras de líquidos de origen biológico, muestras de tejido sólidos, tales como muestra de biopsia. En una realización preferente, la muestra biológica es sangre, plasma o suero, en cuyo caso, la obtención de muestras de un paciente es relativamente simple y no invasiva. Los procedimientos de obtención de sangre o suero son bien conocidos en esta técnica y no forman parte de la invención.

50 De manera adicional, se conocen numerosos procedimientos para detectar y cuantificar polipéptidos, incluyendo los presentes biomarcadores. Estos procedimientos incluyen, aunque no están limitados a ello, procedimientos basados en anticuerpos, más específicamente procedimientos basados en anticuerpos monoclonales. Los procedimientos específicos de detectar y cuantificar los biomarcadores no son importantes para la invención. Por ejemplo, los materiales y procedimientos de la presente invención pueden ser utilizados con tecnología Luminex (Luminex Corporation, Austin, Tex.) o ensayos inmunoabsorbentes relacionados con enzimas (ELISA, numerosos kits ELISA se encuentran comercializados, por ejemplo por CliniScience, Diaclone, Biosource).

60 En caso deseado, la administración de la composición inmunogénica, de acuerdo con la invención, puede ser llevada a cabo conjuntamente con una o varias terapias convencionales (por ejemplo, radiación, quimioterapia y/o cirugía). La utilización de múltiples enfoques terapéuticos proporciona al paciente seleccionado una intervención con una base más amplia. En una realización, la administración de la composición inmunogénica, según la invención, puede ser precedida o seguida de una intervención quirúrgica. En otra realización, puede ser precedida o seguida por radioterapia (por ejemplo, radiación gamma). Los técnicos en la materia pueden formular fácilmente protocolos de terapia por radiación y parámetros que pueden ser utilizados (ver, por ejemplo, Perez y Brady, 1992, Principles and Practice of Radiation Oncology, 2da Ed. JB Lippincott Co; utilizando adaptaciones y modificaciones apropiadas, tal como quedará evidente para los técnicos de este sector). En otra realización, la administración de la

composición inmunogénica, según la invención, está asociada a quimioterapia con uno o varios medicamentos (por ejemplo, medicamentos que se utilizan convencionalmente para el tratamiento o prevención de infecciones víricas, estados patológicos asociados a virus, cáncer, y similares).

5 El procedimiento de la presente invención puede ser útil en particular para mejorar el tratamiento de un paciente de cáncer que está siendo sometido a tratamiento quimioterapéutico con un agente quimioterapéutico.

De acuerdo con una realización de este procedimiento, la administración de dicho agente quimioterapéutico se lleva a cabo antes de la administración de dicha composición inmunogénica.

10 De acuerdo con otra realización de dicho procedimiento, la administración de dicho agente quimioterapéutico se lleva a cabo después de la administración de dicha composición inmunogénica.

15 De acuerdo con otra realización de dicho procedimiento, la administración de dicho agente quimioterapéutico se lleva a cabo simultáneamente con la administración de dicha composición inmunogénica.

En otra realización, el procedimiento o utilización de la invención es llevado a cabo de acuerdo con una modalidad terapéutica de intensificación por cebador ("prime boost") que comprende la administración secuencial de una o varias composiciones de cebado y de una o varias composiciones intensificadoras ("booster"). De manera típica, las composiciones de cebado y las composiciones intensificadoras utilizan diferentes vehículos que comprenden o codifican, como mínimo, un dominio antigénico en común. La composición de cebado es administrada inicialmente al organismo huésped y la composición intensificadora es administrada a continuación al mismo organismo huésped después de un período que varía desde un día a doce meses. El procedimiento de la invención puede comprender de una a diez administraciones secuenciales de la composición de cebado, seguida de una a diez administraciones secuenciales de una composición intensificadora. De manera deseable, los intervalos de inyección son una materia de una semana a seis meses. Además, las composiciones de cebado y de intensificación se pueden administrar en el mismo lugar o en lugares alternativos por la misma ruta o por diferentes rutas de administración.

20 De acuerdo con una realización especial, la invención se refiere a un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente, en el que dicha enfermedad humana es cáncer.

De acuerdo con una realización especial, dicho cáncer es, por ejemplo, un cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer rectal, cáncer de pulmón, cáncer de la cabeza y cuello, cáncer renal, melanoma maligno, cáncer de laringe, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de próstata, Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas (NSCLC), cánceres hematológicos, cánceres gástricos, mieloma.

35 De acuerdo con una realización preferente, dicho cáncer es un Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas (NSCLC).

40 De acuerdo con una realización especial, la invención se refiere a un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente, en el que dicha enfermedad humana es una enfermedad infecciosa.

De acuerdo con una realización preferente, dicha enfermedad infecciosa es una enfermedad inducida de forma vírica tal como, por ejemplo, una enfermedad inducida por HIV, HCV, HBV, HPV, y similares.

45 De acuerdo con una realización especial, la respuesta inmune observada en la población de pacientes tratada es dirigida hacia un antígeno específico de tumor o antígenos relacionados y/o antígeno vírico. De acuerdo con una realización, dicha "respuesta inmune" en dicha población de pacientes está dirigida hacia antígenos distintos. De acuerdo con una realización especial, dicha "respuesta inmune" en dicha población de pacientes está dirigida al antígeno MUC1. De acuerdo con otra realización especial, dicha "respuesta inmune" en dicha población de pacientes es una respuesta inmune de célula T, y preferentemente, respuesta inmune de CD8+(Linfocitos Citotóxicos T). De acuerdo con otra realización especial, dicha "respuesta inmune" en dicha población de pacientes es una respuesta inmune no específica. De acuerdo con otra realización especial, dicha "respuesta inmune" en dicha población de pacientes es una estimulación de la respuesta inmune innata.

55 La capacidad de producir o estimular una respuesta inmune con la administración en un animal u organismo humano puede ser evaluada in vitro o in vivo utilizando una serie de ensayos que son normales en esta técnica. Para una descripción general de técnicas disponibles para evaluar el inicio y activación de una respuesta inmune, ver por ejemplo, Coligan y otros (1992 y 1994, Current Protocols in Immunology; ed J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health). La medición de la inmunidad celular puede ser llevada a cabo por medición de perfiles de citoquinas secretadas por células efectoras activadas incluyendo las derivadas de células T CD4+ y CD8+ (por ejemplo, cuantificación de IL-10 o células productoras de IFN gamma por ELISpot), por determinación de la situación de activación de células efectoras inmunes (por ejemplo, ensayos de proliferación de células T por absorción clásica de [<sup>3</sup>H] timidina), por ensayos en cuanto a linfocitos T específicos de antígeno en un sujeto sensibilizado (por ejemplo, lisis específica de péptido en un análisis de citotoxicidad) o por detección de linfocitos T específicos de antígeno por MHC fluorescente y/o multímeros de péptido (por ejemplo, tetrámeros). La capacidad de estimular una respuesta

humoral puede ser determinada por unión de anticuerpos y/o competición en la unión (ver, por ejemplo, Harlow, 1989, Antibodies, Cold Spring Harbor Press). El procedimiento de la invención puede ser validado además en modelos de animales atacados con un agente apropiado inductor de tumor (por ejemplo, células TC1 que expresan MUC1) para determinar actividad antitumoral, reflejando la inducción o intensificación de una respuesta inmune antiantígeno.

El procedimiento de la presente invención puede ser también útil para ampliar la supervivencia de un paciente tratado para enfermedad humana por la administración de una composición inmunogénica.

También se da a conocer la utilización de niveles de linfocitos T activados (CD3+ CD69+) como biomarcador para la predicción de si un sujeto tratado mediante la administración de una composición inmunogénica que comprende, como mínimo, un vector vírico recombinante que codifica un antígeno diana es susceptible o no de desarrollar respuesta profiláctica o terapéutica, preferentemente respuesta inmune profiláctica o terapéutica como seguimiento a dicha administración de una composición inmunogénica.

De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere a la utilización de niveles de linfocitos T activados (CD3+ CD69+) como biomarcador para controlar, modificar o ajustar un tratamiento que comporta la administración de una composición inmunogénica que comprende, como mínimo, un vector vírico recombinante que codifica un antígeno diana a un paciente, en el que los niveles de linfocitos T CD3+ CD69+ activados, por encima de 10,4% aproximadamente indican que el sujeto es indicativo de un resultado clínico satisfactorio para el tratamiento.

De manera más específica, la presente invención se refiere a la utilización del nivel de linfocitos T (CD3+ CD69+) activados y/o de niveles de linfocitos T activados (CD3+ CD69+) como biomarcador para el control, modificación o ajuste de un tratamiento que comporta la administración de una composición inmunogénica que comprende, como mínimo, un vector vírico recombinante que codifica un antígeno diana a un paciente, en el que los niveles de linfocitos T activados (CD3+ CD69+) medidos después de dicha administración por encima de aproximadamente 10,4% indican que el sujeto es indicativo de un resultado clínico satisfactorio para el tratamiento, es decir, el incremento en tasa de supervivencia.

También se describen kits que comprenden partes para llevar a cabo los procedimientos descritos y que quedarán evidentes por los ejemplos que se facilitan. El kit de partes o kits pueden incluir reactivos para recoger y/o medir niveles en suero de interferón gamma. Estos reactivos pueden incluir anticuerpos. Los kits pueden incluir, además, equipos para recoger y/o procesar muestras biológicas. Los kits comprenderán también probablemente instrucciones de utilización, valores de corte y/o instrucciones para su determinación e instrucciones para interpretar los datos obtenidos por la utilización de los kits.

Dicho kit o kits de partes pueden incluir además una composición inmunogénica, tal como se ha dado a conocer anteriormente y/o tal como se da a conocer en la sección de ejemplos que seguirá.

También se describe un programa de ordenador y algoritmos para controlar pruebas y niveles clínicos de linfocitos T activados (CD3+ CD69+) (y eventualmente otros niveles de biomarcadores, tales como, por ejemplo, niveles de interferón gamma), determinando si estos niveles se encuentran por encima o por debajo de un nivel de umbral y/o recomendando modificaciones a un régimen de tratamiento para mejorar la respuesta del paciente a un tratamiento de inmunoterapia. Los programas o algoritmos de ordenador pueden ser facilitados junto con el necesario hardware, por ejemplo, en forma de un kit o aparato que también puede aceptar muestras biológicas y puede medir los niveles relativos de linfocitos T activados (CD3+ CD69+) (y eventualmente otros niveles de biomarcadores tales como, por ejemplo, niveles de interferón gamma). Los programas de ordenador y/o aparatos antes descritos es probable que se faciliten a los médicos o laboratorios clínicos con instrucciones y reactivos apropiados, incluyendo anticuerpos.

La invención ha sido descrita de forma ilustrativa y se tiene que comprender que la terminología que ha sido utilizada está destinada a la naturaleza de los términos de la descripción en vez de forma limitativa. Evidentemente, son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención en base a las enseñanzas que se han facilitado. Por lo tanto, se tiene que comprender que dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas, la invención puede ser practicada de diferentes maneras, con respecto a lo que se ha descrito específicamente en esta descripción.

Figuras:

Figura 1: curvas de supervivencia que describen inmunoterapia por vacunas en cáncer de pulmón: Vacuna terapéutica (es decir, composición inmunogénica) + quimioterapia en pacientes con niveles por encima o por debajo de la media de linfocitos CD3+ CD69+ en el día 43. El nivel medio de linfocitos CD3+ CD69+ para el estudio en el día 43 era de 10,4 %.

- - - Grupo 1: Vacuna terapéutica (es decir, composición inmunogénica) + quimioterapia en pacientes con niveles por encima o por debajo de la media de linfocitos CD3+ CD69+ en el día 43. La supervivencia general para los pacientes de este grupo era de = 21,9 meses. 28 pacientes.

\_\_\_\_\_ Grupo 2: Vacuna terapéutica (es decir, composición inmunogénica) + quimioterapia en pacientes con niveles por encima o por debajo de la media de linfocitos CD3+ CD69+ en el día 43. La supervivencia media para los pacientes de este grupo era de = 10,4 meses. 29 pacientes.

Diferencia significativa (por rango logarítmico), grupo 1 y grupo 2 por rango de logaritmo:  $p = 0,005$   
Completo + Incompleto

Figura 2: curvas de supervivencia que describen inmunoterapia por vacunas en cáncer de pulmón: en pacientes con niveles por encima o por debajo de la media de linfocitos CD3+ CD69+ en el día 43. El nivel medio de linfocitos CD3+ CD69+ para el estudio en el día 43 era de 10,4 %.

--- Grupo 1: Quimioterapia en pacientes con niveles por encima o por debajo de la media de linfocitos CD3+ CD69+ en el día 43. La supervivencia general para los pacientes de este grupo era de = 11,4 meses. 28 pacientes.

\_\_\_\_\_ Grupo 2: Quimioterapia en pacientes con niveles por encima o por debajo de la media de linfocitos CD3+ CD69+ en el día 43. La supervivencia media para los pacientes de este grupo era de = 11,3 meses. 29 pacientes.

La supervivencia media entre los dos grupos de pacientes no es significativamente diferente (por rango logarítmico), grupo 1 y grupo 2 por rango de logaritmo:  $p = 0,79$   
Completo + Incompleto

## EJEMPLOS

En el estudio clínico TG4010.09 (MVA-MUC1- IL2 en una etapa adelantada de cáncer de pulmón de Células No Pequeñas) se comprobó el TG4010 inmunoterapéutico contra el cáncer, en combinación con quimioterapia estándar y se comparó con quimioterapia sola. El análisis del fenotipo linfocito por citometría de flujo después del inicio de la terapia (día 43, una semana después de la sexta inyección de TG4010) mostró heterogeneidad en niveles de linfocitos T activados (CD3+CD69+). La comparación de niveles de linfocitos CD3+ CD69+ y supervivencia de pacientes por el coeficiente de correlación de Spearman mostró una correlación significativa entre niveles de pacientes de linfocitos CD3+ CD69+ en el día 43 y la supervivencia, solamente en pacientes tratados con TG4010 + quimioterapia, no en pacientes tratados con quimioterapia sola. Los gráficos de supervivencia de Kaplan-Meier referentes a la supervivencia de pacientes de acuerdo con los niveles de linfocitos CD3+ CD69+ muestra una asociación significativa entre la supervivencia de pacientes tratados con TG4010 + quimioterapia y los niveles de linfocitos CD3+ CD69+ en el día 43.

Ejemplo 1:

La composición inmunogénica, indicada vacuna TG4010, fue utilizada para tratar pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en combinación con quimioterapia estándar.

TG4010 es un Virus Ankara modificado recombinante (MVA) que expresa IL2 y el antígeno asociado a tumor MUC1.

Se seleccionaron al azar ciento cuarenta y ocho pacientes que recibieron:

- quimioterapia (Cisplatina  $75\text{mg}/\text{m}^2$  en dl y Gemcitabine  $1250\text{mg}/\text{m}^2$  en día 1 y día 8, cada 3 semanas, hasta 6 ciclos) sola (Segmento de Estudio 2) o bien
- quimioterapia junto con TG4010 (Segmento de Estudio 1).

Los tumores fueron evaluados (criterios WHO) cada 6 semanas. Los puntos finales fueron supervivencia libre de progresión (PFS) a los 6 meses y supervivencia general con intención de análisis del tratamiento.

Se extrajeron muestras de sangre en el día 43 (una semana después de la sexta inyección semanal) y se enviaron inmediatamente a un laboratorio de inmunología central, en el que las Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) fueron purificadas y almacenadas en congelación hasta análisis en lotes.

Se evaluaron las muestras de PBMC en cuanto al contenido de subconjuntos de linfocitos por citometría de flujo de 5 colores, utilizando anticuerpos específicos para marcadores CD de linfocitos CD3, CD8, CD16, CD56 y CD69.

Son ejemplos de anticuerpos que podrían ser utilizados anti-CD3 (Beckman Coulter Cat. No. A07748), anti- CD8 (Beckman Coulter Cat. No. 6607102), anti-CD16 (Beckman Coulter Cat. Nr. IM0814U), anti-CD56 (Beckman Coulter Cat. Nr. A07788U) y anti-CD69 (Beckman Coulter Cat. Nr. IM2656U).

La figura 1 muestra que los pacientes [Segmento 1 (TG4010 + quimioterapia)] con niveles por encima de la media de linfocitos T activados (identificados por los marcadores CD3+ CD69+ en el día 43) tienen una supervivencia más

prolongada (supervivencia media = 21,9 meses) que los pacientes con niveles por debajo de la media de linfocitos CD3+ CD69+ (supervivencia media = 10,4 meses) cuando se tratan con vacuna TG4010 y quimioterapia.

- 5 Los datos de la figura 2 demuestran que la asociación positiva entre niveles superiores a la media de linfocitos CD3+ CD69+ en el día 43 y la supervivencia general está restringida a pacientes que reciben a vacuna terapéutica. Los pacientes del segmento 2 que reciben quimioterapia solamente, que tenían niveles por encima de la media de linfocitos CD3+ CD69+ en el día 43, no sobrevivieron durante más tiempo que los pacientes con niveles por debajo de la media de linfocitos CD3+ CD69+ en el día 43 (11,4 meses en comparación con 11,3 meses, respectivamente).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento ex vivo para evaluar la eficacia de un tratamiento que comporta la administración a un paciente de una composición inmunogénica que comprende, como mínimo, un vector vírico recombinante que codifica un antígeno diana, que comprende:
- 10 - medición de los niveles de linfocitos T activados CD3+ CD69+ en una muestra biológica extraída del cuerpo de dicho paciente en el que una o varias dosis de dicha composición inmunogénica han sido administradas a dicho paciente y en el que dicha muestra biológica ha sido extraída siguiendo, como mínimo, una de dichas administraciones;
  - en el que los niveles de linfocitos T activados CD3+ CD69+ por encima de 10,4 % aproximadamente, indican que el sujeto es indicativo de un resultado clínico satisfactorio del tratamiento.
- 15 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el resultado clínico satisfactorio es el aumento de la tasa de supervivencia.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha composición inmunogénica comprende además, como mínimo, un modificador de respuesta inmune.
- 20 4. Procedimiento, según una de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho paciente sufre cáncer.
5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que dicho cáncer es un Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas o cáncer de riñón.
- 25 6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho antígeno diana es un antígeno específico de tumor.
7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que dicho antígeno específico de tumor es MUC1.
- 30 8. Utilización de niveles de linfocitos T activados CD3+ CD69+ como biomarcadores para control, modificación o ajuste de un tratamiento que comporta la administración de una composición inmunogénica que comprende, como mínimo, un vector vírico recombinante que codifica un antígeno diana a un paciente, en el que los niveles de linfocitos T activados CD3+ CD69+ por encima de aproximadamente 10,4% indican que el sujeto muestra un resultado clínico satisfactorio del tratamiento.
- 35 9. Utilización de la reivindicación 8, en la que dicho resultado clínico satisfactorio es el incremento en la tasa de supervivencia.

Figura 1

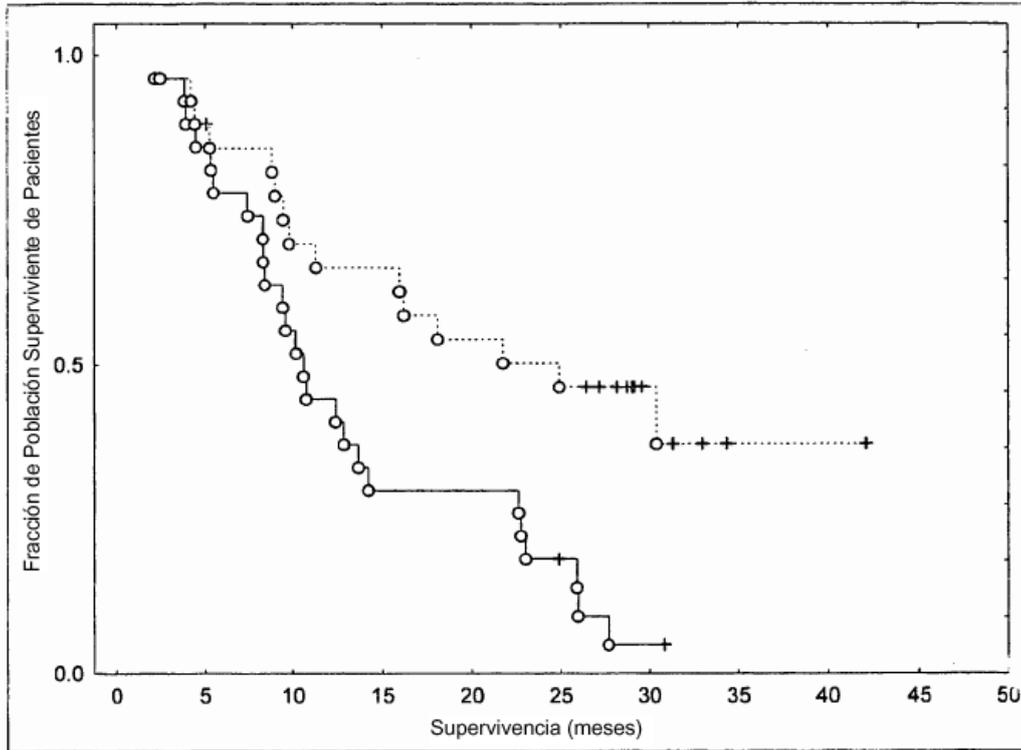


Figura 2

