

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 990**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2004 E 04810831 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 1694364**

54 Título: **Sistema para tratar y prevenir cáncer de mama**

30 Prioridad:

12.11.2003 US 519427 P

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

15.07.2014

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%)
6011 Executive Boulevard, Suite 325 Office of Technology Transfer
Rockville, MD 20852, US**

72 Inventor/es:

**PANICALI, DENNIS L.;
MAZZARA, GAIL P.;
GRITZ, LINDA R.;
SCHLOM, JEFFREY;
HODGE, JAMES W. y
TSANG, KWONG-YOK**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 476 990 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

Sistema para tratar y prevenir cáncer de mama

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al campo de inmunizaciones, y al uso de inmunoterapia de direccionamiento específico para tratar cáncer de mama, y/o afectar a la progresión de tal cáncer. La presente invención también se refiere a vectores y métodos que implican inmunoterapia del cáncer humano.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El cáncer de mama es una enfermedad que mata alrededor de 45.000 mujeres cada año en los Estados Unidos de América solo. Alrededor de 180.000 nuevos casos de cáncer de mama son diagnosticados anualmente, y se estima que una de cada ocho mujeres desarrollan cáncer de mama anualmente. Sin embargo, el diagnóstico del "cáncer de mama" comprende un número de células cancerosas genéticamente diversas. Como resultado, diferentes tumores de mama tienen diferentes pronósticos y responden de forma diferente a regímenes de tratamiento. Por ejemplo, los tumores de mama que expresan HER-2/neu tienen peor pronóstico que los tumores que no expresan HER-2/neu. Además, debido a la inestabilidad genética conocida, el patrón de expresión génica de las células cancerosas cambia durante diferentes etapas de la enfermedad, así como en respuesta a los regímenes de tratamiento.

20 Actualmente, un patólogo clasifica las células tumorales según sus patrones inmunohistológicos y usando micromatrices de ADNc y otros métodos de medida de la expresión génica, y/o mediante métodos de detección de mutaciones, todos los cuales están comercialmente disponibles. La información se usa para clasificar tumores y, en algunos casos, proporcionar pronóstico para pacientes con el tumor. Sin embargo, en sólo unos pocos métodos de tratamiento, la clasificación es de uso práctico cuando se determinan los regímenes de tratamiento, debido a que la mayoría de los métodos terapéuticos actualmente disponibles son no discriminatorios y están dirigidos generalmente contra células que se dividen rápidamente. Actualmente, un individuo diagnosticado con cáncer de mama se puede tratar con cirugía, terapia hormonal, quimioterapia, y/o radiación. Si el paciente desarrolla enfermedad metastásica, se necesita radiación y quimioterapia de dosis elevada para extirpar el cáncer en áreas remotas tales como el cerebro, hueso, e hígado. La mayoría de terapias actualmente disponibles para el tratamiento de cáncer de mama son tóxicas, peligrosas, no específicas, costosas, y muchas son ineficaces, especialmente en el tratamiento de enfermedad metastásica.

30 Por lo tanto, aunque la exactitud en el diagnóstico de tipos específicos de cáncer de mama ha mejorado significativamente, sólo unos pocos tratamientos se pueden diseñar actualmente para el usuario para satisfacer las necesidades específicas de un paciente individual, teniendo en cuenta las diferencias en el perfil de expresión y/o mutaciones en los diferentes tipos de células cancerosas. Por ejemplo, el cáncer de mama en el que las células cancerosas expresan un mayor número de receptores de estrógenos es sensible al tratamiento con bloqueadores del receptor de estrógenos, tales como tamoxifeno, mientras que el cáncer con células que no tienen número excesivo de receptores de estrógenos no responderá a tal tratamiento.

35 Como resultado de los avances en genética, ya se ha identificado un gran número de genes implicados en diferentes tipos de cáncer de mama, incluyendo BRCA1 (Herencia Mendeliana del Hombre en Línea (OMIM) #113705), BRCA2 (OMIM #600185), BRCA3 (OMIM #605365), BWSR1A (OMIM #602631), el gen TP53 (OMIM #191170), el gen BRIP1 (OMIM #605882), y el gen RB1CC1 (OMIM #606837) en 8q11. Se han encontrado mutaciones en el gen del receptor de andrógenos (AR; OMIM #313700) en el cromosoma X en casos de cáncer de mama masculino (OMIM #313700.0016). Se encontró una mutación en el gen RAD51 (OMIM #179617) en pacientes con cáncer de mama familiar (OMIM #179617.0001). Se ha demostrado que el alelo 1100delC del gen CHEK2 (OMIM #604373.0001) confiere una mayor susceptibilidad a cáncer de mama en mujeres, y especialmente en los hombres. Además, los genes NCOA3 (OMIM #601937) y ZNF217 (OMIM #602967), situados en 20q, sufren amplificación en cáncer de mama; cuando se sobreexpresan, estos genes confieren fenotipos celulares consistentes con un papel en la formación de tumores (Anzick et al., Science 277: 965-968, 1997; Collins et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 95: 8703-8748, 1998). Además, el gen PPM1D (OMIM #605100) en 17q está normalmente amplificado en cáncer de mama, y parece conducir a la transformación celular al abolir la actividad supresora del tumor p53 (OMIM #191170) (Bulavin et al., Nature Genet. 31: 210-215, 2002). Por lo tanto, sería ventajoso desarrollar un sistema de tratamiento que pudiese utilizar la información específica que se puede obtener del análisis genético y de expresión. Además, sería útil desarrollar un sistema que se pudiese adaptar adicionalmente para tratar todos los tipos diferentes de cánceres de mama. Tal sistema sería menos tóxico y proporcionaría un tratamiento más eficaz que los regímenes no específicos disponibles hasta la fecha.

55 Un enfoque reciente al tratamiento del cáncer es la inmunoterapia, que se basa en la observación de que las células tumorales humanas expresan una variedad de antígenos asociados a tumores (TAAs) que no se expresan, o que se expresan mínimamente, en tejidos normales. Estos antígenos, que incluyen antígenos de tumores víricos, proteínas oncogénicas celulares, y antígenos de diferenciación específicos de tejidos, pueden servir como dianas para el sistema inmunitario del hospedante y provocar respuestas que dan como resultado la destrucción del tumor. Esta respuesta inmunitaria está mediada principalmente por linfocitos; las células T en general, y los linfocitos T

citotóxicos restringidos a MHC clase I en particular, desempeñan un papel central en el rechazo de tumores. Desafortunadamente, como se evidencia por la elevada incidencia de cáncer en la población, la respuesta inmunitaria frente a células neoplásicas fracasa a menudo a la hora de eliminar los tumores. El objetivo de la inmunoterapia activa frente al cáncer es aumentar respuestas antitumorales, particularmente respuestas de células T, a fin de dar como resultado de forma más eficaz una reducción tumoral.

La mayoría de los intentos en la inmunización activa frente a antígenos del cáncer han utilizado como inmunógenos células tumorales completas o fragmentos de células tumorales. Sin embargo, este enfoque no proporciona reproducibilidad o control sobre los antígenos precisos incluidos en cada inmunización.

La clonación de genes que codifican antígenos asociados a tumores ha abierto nuevas posibilidades para la inmunoterapia de cáncer basada en el uso de vacunas recombinantes o sintéticas contra el cáncer. Tsang et al., J. Natl. Cancer Inst. 87: 982-90 (1995); Kawakami et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:6458-62 (1994). En años recientes, se ha gastado mucho esfuerzo en la "terapia génica" como medio para combatir el cáncer. La expresión "terapia génica" se ha usado para describir una amplia variedad de métodos que usan técnicas de biotecnología recombinante para suministrar una variedad de diferentes materiales a una célula. Tales métodos incluyen, por ejemplo, el suministro de un gen, ARN antisentido, un agente citotóxico, etc., mediante un vector a una célula de mamífero, preferiblemente una célula humana, ya sea in vivo o ex vivo. La mayoría del trabajo inicial se ha enfocado en el uso de vectores retrovíricos para transformar estas células. Este foco ha resultado de la capacidad de los retrovirus para infectar células e integrar su material genético en la célula hospedante con eficiencia elevada. El vector retrovírico es típicamente un virus modificado, tal como el virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV), al que se le han suprimido sus secuencias de empaquetamiento para evitar el empaquetamiento de todo el genoma retrovírico.

Sin embargo, se han dado a conocer numerosas dificultades con los retrovirus. Un problema que se ha desarrollado se observó inicialmente como una ventaja clave de los retrovirus, principalmente su capacidad para integrarse en el cromosoma. Sin embargo, tal integración puede ser problemática, dependiendo del sitio cromosómico de la inserción vírica. Un gran número de otros virus, que se creyó inicialmente que eran enormemente episómicos en naturaleza, tal como el virus adenoasociado (AAV), también han resultado tener esta propiedad. Aunque es ventajoso a la hora de provocar la expresión a largo plazo, también proporciona el potencial para problemas tales como la transformación celular indeseable. La transformación estable de células somáticas del paciente hace difícil invertir el régimen de tratamiento si los efectos secundarios indeseables obligan a que se detenga.

También se han encontrado problemas a la hora de infectar ciertas células. Los retrovirus entran típicamente en las células a través de receptores de la superficie celular. Si tales receptores no están presentes en la célula, o no están presentes en números suficientes, entonces la infección puede no ser posible o puede ser ineficiente. Estos virus también son relativamente lábiles en comparación con otros virus. También se han dado a conocer brotes de virus de tipo salvaje procedente de estirpes celulares productoras de virus recombinantes, provocando el propio vector una enfermedad. Además, muchos de estos virus sólo permiten la expresión génica en células que se dividen. Los vectores víricos basados en lentivirus tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) no tienen estos problemas, pero siguen existiendo problemas sobre el uso de tales virus como vectores.

Otros virus se han propuesto como vectores, tales como el virus del herpes. Además, se han propuesto diversos vectores no víricos, tales como conjugados de ligandos con ADN. No obstante, estos enfoques plantean todos ellos ciertos problemas. Por ejemplo, un vector no puede ser él mismo una fuente potencial para la infección al individuo tratado. Sin embargo, como ya se ha mencionado, se han dado a conocer en algunas estirpes celulares brotes de retrovirus de tipo salvaje. De forma similar, se ha encontrado que el uso de virus del herpes como vector da como resultado la persistencia del virus. Además, muchos de estos vectores pueden contener y expresar solamente una cantidad relativamente pequeña de material genético. Esto es indeseable para numerosas situaciones en las que se prefiere la capacidad para expresar múltiples productos.

Los poxvirus se han usado durante muchos años como vectores, particularmente con respecto a la provisión de un antígeno extraño o autoantígeno para generar una respuesta inmunitaria en un hospedante. Las ventajas de los vectores poxvíricos incluyen: (i) facilidad de generación y producción; (ii) el gran tamaño del genoma, que permite la inserción de múltiples genes, (iii) suministro eficiente de genes a múltiples tipos celulares, incluyendo células que presentan antígeno; (iv) niveles elevados de expresión proteica; (v) presentación óptima de antígenos al sistema inmunitario; (vi) la capacidad para provocar respuestas inmunitarias mediadas por células, así como respuestas de anticuerpos; y (vii) la experiencia a largo plazo ganada con el uso de este vector en seres humanos como una vacuna contra la viruela.

La atención se ha centrado en orthopox, tal como la cepa de Wyeth, NYVAC (patente U.S. nº 5.364.773) y el virus de la vacuna Ankara modificado (MVA). MVA derivó de la cepa CVA-1 del virus de la vacuna de Ankara, que se usó en los años 1950 como vacuna contra la viruela. En 1958, se iniciaron experimentos de atenuación en el laboratorio del Dr. Anton Mayr (Universidad de Munich), que comprendieron la dilución terminal de CVA en células de fibroblastos de embriones de pollo (CEF), lo que finalmente dio como resultado alrededor de 500 pasadas. El MVA resultante es un virus atenuado, defectuoso en la replicación, que está restringido a la replicación principalmente en células aviares. La comparación del genoma de MVA con su familiar, CVA, reveló 6 supresiones importantes de

ADN genómico (supresión I, II, III, IV, V, y VI), que suman en total 31.000 pares de bases. (Meyer et al., J. Gen. Virol. 72:1031-8 (1991)). MVA se ha administrado a numerosas especies de animales, incluyendo monos, ratones, cerdos, ovejas, ganado vacuno, caballos y elefantes, sin efectos adversos locales o sistémicos. Alrededor de 120.000 seres humanos se han vacunado de forma segura con MVA mediante inyecciones intradérmicas, subcutáneas o intramusculares. También se ha dado a conocer que MVA es avirulento entre animales normales e inmunodeprimidos (Mayr et al., Zentralb. Bakteriologie. 167:375-90 (1978)). En consecuencia, además de la utilidad como una vacuna contra la viruela, las cepas más atenuadas son poxvirus para uso como vectores para modulación inmunitaria y terapia génica.

En consecuencia, los poxvirus se pueden manipular genéticamente para contener y expresar ADN extraño, alterando o sin alterar la capacidad de los virus para replicarse. Tal ADN extraño puede codificar antígenos proteicos que inducen una protección inmunitaria en un hospedante inoculado con tal poxvirus recombinante. Por ejemplo, se han manipulado virus vacunales recombinantes para expresar antígenos inmunizantes del virus del herpes, hepatitis B, rabia, gripe, virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), y otros virus (Kieny et al., Nature 312:163-6 (1984); Smith et al., Nature 302: 490-5 (1983); Smith et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:7155-9 (1983); Zagury et al., Nature 326:249-50 (1987); Cooney et al., Lancet 337:567-72 (1991); Graham et al., J. Infect. Dis. 166:244-52 (1992)). También se ha demostrado que los virus vacunales recombinantes provocan respuestas inmunitarias frente al virus de la gripe, el virus del dengue, el virus sincitial respiratorio, y el virus de la inmunodeficiencia humana. Los poxvirus también se han usado para generar reacciones inmunitarias frente a antígenos asociados a tumores, tales como CEA, PSA y MUC. Véase también la patente U.S. nº 5.656.465.

Scholl, S. et al. (J. Biomed. Biotech. 3 (2003), p. 194-201) describen el uso de terapia inmunitaria a base de MUC1 en cáncer de mama, en el que a pacientes con cáncer de mama metastásico positivo a MUC1 se les administró repetidamente un virus vacunal recombinante atenuado que contiene secuencias que codifican MUC1 humana y la citocina estimulante inmunitaria IL-2.

Hodge, J.W. et al. (Clin. Cancer. Res. 9 (2003), p. 1837-1849) describen la administración de un virus vacunal recombinante-CEA/[B7.1, ICAM-1, y LFA-3 (TRICOM)] mezclado con GM-CSF y seguido de IL-2 a ratones transgénicos CEA transplantados con tumores que expresan CEA, y las administraciones de refuerzo con virus de la viruela aviar recombinante-CEA/TRICOM mezclado con GM-CSF y seguido de IL-2.

Todavía existe la necesidad de tratamientos mejorados para el cáncer de mama. Sería particularmente ventajoso desarrollar un sistema de tratamiento que pudiese utilizar la información específica relacionada con antígenos asociados a tumores expresados en diferentes cánceres de mama. Además, sería útil desarrollar un sistema que se pudiese adaptar para tratar todos los tipos diferentes de cánceres de mama, incluyendo un sistema que se pudiese adaptar o personalizar para tratar a un individuo específico.

SUMARIO DE LA INVENCION

Ahora se ha descubierto un nuevo medio para tratar cáncer de mama en seres humanos, que implica el uso de poxvirus recombinantes que contienen antígenos asociados con cáncer de mama (BCAA) y moléculas moduladoras inmunitarias. En consecuencia, la presente invención proporciona un sistema para identificar individuos para identificar aquellos con riesgo de desarrollar o de sufrir cáncer de mama; preferiblemente, la identificación incluye identificar antígenos específicos asociados con cánceres de mama expresados por el individuo. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano. El sistema también comprende administrar a ese individuo en riesgo de desarrollar o de sufrir cáncer de mama al menos un primer poxvirus recombinante (o sistema poxvírico), y, a intervalos regulares, administrar después al menos un segundo poxvirus recombinante (o sistema poxvírico), en el que los poxvirus recombinantes comprenden al menos un gen que codifica un antígeno asociado con cáncer de mama. El antígeno asociado con cáncer de mama preferido incluye CEA y MUC-1, y sus variantes incluyen wCEA(6D) y wMUC-1(6). Otras variantes preferidas tienen cambios de secuencia para crear un epítipo de CTL más inmunógeno y/o una modificación de ácidos nucleicos para reducir el corte de secuencias de ácidos nucleicos durante recombinación homóloga, dando como resultado un gen más estable. Preferiblemente, el segundo poxvirus recombinante es de un género diferente del primer poxvirus recombinante. Los genes que codifican antígenos asociados con cáncer de mama se insertan preferiblemente en una región no esencial del genoma poxvírico. Los poxvirus preferidos incluyen orthopox, tales como el virus de la vacuna, y avipox, tal como viruela aviar y viruela del canario. Un sistema poxvírico es aquel cuando se usa más de un vector poxvírico para contener todos los BCAAs deseados y las moléculas moduladoras inmunitarias.

La invención también proporciona la coadministración de factor estimulante de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) con los poxvirus recombinantes, así como la coadministración de moléculas moduladoras inmunitarias, tales como al menos una molécula coestimulante, tal como LFA-3, ICAM-1, y B7.1. Preferiblemente, se usa una combinación de LFA-3, ICAM-1, y B7.1 (TRICOM™).

El sistema de la presente invención proporciona una nueva herramienta de tratamiento que se puede adaptar para seleccionar como dianas a diferentes tipos de células malignas usando los mismos bloques de construcción principales para permitir un régimen eficiente aunque direccionado específicamente para tratar los tumores de la mama. El sistema de la presente invención permite que el tratamiento se personalice al individuo particular y al

- estado de morbilidad. En una realización, el antígeno de cáncer de mama usado se puede particularizar al paciente individual determinando qué antígenos de cáncer de mama están siendo expresados en niveles elevados en las células cancerosas del paciente. Los antígenos adecuados del cáncer de mama pueden incluir MAGE-3, MAGE-6, NY-ESO-1, Her2neu y p53, así como antígenos de cáncer de mama recientemente definidos, por ejemplo cinesina 2, factor 1 modulador del elemento TATA, proteína tumoral D52 y MAGE D, y nuevos productos génicos adicionales, por ejemplo NY-BR-62, NY-BR-75, NY-BR-85, y NY-BR-96. Como alternativa, o además de, el tipo y etapa actual del cáncer de mama se pueden evaluar usando métodos histoquímicos, inmunohistoquímicos y genéticos. Este dato puede dar información adicional sobre la expresión antigénica que se puede anticipar a medida que la enfermedad progresa. Tales antígenos adicionales se pueden incluir en el vector poxvírico.
- Debido a su gran genoma, los poxvirus recombinantes según la presente invención se pueden construir como un único vehículo para suministrar todas las moléculas terapéuticamente necesarias, incluyendo antígenos asociados con cáncer de mama y/o moléculas coestimulantes, en el mismo vector.
- En una realización, el sistema comprende administrar a un individuo una "sensibilización" inicial con una composición que contiene uno o más poxvirus recombinantes, seguido de una o preferiblemente múltiples "revacunaciones" con una composición que contiene uno o más vectores poxvíricos.
- La vacunación de sensibilización inicial puede comprender uno o más vectores poxvíricos. En una realización preferida, se usa un único vector poxvírico para suministrar los PTAA's y moléculas coestimulantes. En otra realización, dos o más vectores poxvíricos comprenden la vacunación de sensibilización, que se administra simultáneamente en una única inyección. Por ejemplo, administrando simultáneamente a un hospedante una mezcla de dos vectores poxvíricos, al menos uno de los cuales es competente para la replicación. Si ambos vectores son defectuosos en la replicación, entonces no habrá tantas células que se verán transducidas por ambos virus. Un ejemplo de una estrategia de mezclado es usar un primer vector que comprende un ADN que codifica al menos un antígeno asociado con cáncer de mama, y un segundo vector que comprende un ADN que codifica al menos una, preferiblemente tres, moléculas coestimulantes tales como TRICOM.
- Las vacunaciones de refuerzo también pueden comprender uno o más vectores poxvíricos. En una realización preferida, se usa un único vector poxvírico para suministrar los PTAA's y moléculas coestimulantes de la vacunación de refuerzo. En otra realización, dos o más vectores poxvíricos comprenden la vacunación de refuerzo, que se administran simultáneamente en una única inyección, como se describe anteriormente para la estrategia de mezclado.
- En una realización preferida, se pueden usar diferentes poxvirus para proporcionar un protocolo de sensibilización/refuerzo heterólogo usando vectores poxvíricos que poseen diferentes conjuntos de moléculas terapéuticas, para inoculaciones a diferentes intervalos. Una combinación preferida heteróloga de sensibilización/refuerzo es la sensibilización con una primera composición de vector orthopoxvírico, y el refuerzo con una segunda composición de un vector avipoxvírico. El vector de refuerzo se puede administrar cada 2-4 semanas, por ejemplo, durante un total de al menos 5-15 vacunaciones de refuerzo. Por ejemplo, un protocolo de 3 administraciones de virus de la vacuna a intervalos regulares, por ejemplo mensualmente, seguidas de múltiples administraciones de viruela aviar a intervalos regulares, por ejemplo mensualmente. En una realización preferida, el orthopox es el virus de la vacuna, más preferiblemente un virus de la vacuna tal como Wyeth o MVA o NYVAC. También se pueden añadir otros componentes al protocolo, tal como la administración adicional de refuerzo o de sensibilización de ADN o proteína. En una realización alternativa, los genes pueden estar en múltiples vectores poxvíricos que se administran aproximadamente al mismo tiempo, en lugar de un único vector.
- El antígeno de cáncer de mama usado se personaliza preferiblemente según las necesidades de un paciente individual determinando qué antígenos están siendo expresados a niveles elevados en las células cancerosas del paciente. El tipo y etapa presente del cáncer de mama se evalúa usando, por ejemplo, métodos histoquímicos y/o inmunohistoquímicos y/o un patrón de transcripción y/o análisis de mutación de las células cancerosas.
- Se puede usar cualquier poxvirus con la presente invención. Se prefieren poxvirus atenuados o con replicación alterada, tales como avipox, viruela del cerdo, y orthopox. En una realización preferida, el vector poxvírico es virus de la vacuna Wyeth, MVA, o NYVAC.
- En otra realización, el poxvirus recombinante que codifica el antígeno o antígenos asociados con cáncer de mama también codifica al menos una molécula coestimulante. Las moléculas coestimulantes son conocidas en la técnica, e incluyen B7 y otros activadores de CD4+ y CD8+. En una realización preferida, la molécula coestimulante es una combinación de ácidos nucleicos que codifican B7 (por ejemplo B7-1), ICAM-1, y LFA-3, que inducen activación de células T tanto CD4+ como CD8+. En una realización preferida, se añade un ácido nucleico que codifica OX40L al vector poxvírico, además de la combinación de TRICOM.
- En una realización preferida, tanto los ácidos nucleicos que codifican el antígeno o antígenos asociados con cáncer de mama seleccionado como la molécula o moléculas coestimulantes se insertan en el mismo vector poxvírico.
- En realizaciones alternativas, los ácidos nucleicos que codifican el antígeno o antígenos tumorales y la molécula o moléculas coestimulantes se insertan en dos vectores poxvíricos diferentes. Los vectores poxvíricos primero y

segundo pueden ser de diferentes géneros, permitiendo inoculaciones consecutivas de los dos vectores recombinantes sin invocar la reacción inmunitaria potencial del hospedante frente al vector vírico. Los vectores poxvíricos recombinantes primero y segundo se pueden administrar al individuo que lo necesite simultáneamente o a intervalos que oscilan de horas a días, o incluso semanas.

5 Por ejemplo, una realización del sistema usa una sensibilización/refuerzo personalizado para el estado enfermo. Por ejemplo, la sensibilización se puede dirigir a un amplio intervalo de antígenos asociados con cáncer de mama, aprovechando la capacidad del genoma del poxvirus para alojar múltiples genes extraños. El refuerzo puede estar dirigido a antígenos específicos para la etapa particular de la enfermedad. Por ejemplo, monitorizando la progresión de la enfermedad, se podría personalizar un refuerzo para generar una reacción inmunitaria específica que refleja la expresión antigénica para esa etapa particular de la enfermedad.

10 En una realización preferida, el vector poxvírico recombinante que codifica el antígeno tumoral se administra primero, y después se administran TRICOM o TRICOM y OX40L. En otra realización, el vector poxvírico recombinante que contiene la molécula o moléculas coestimulantes se administra antes de administrar el vector poxvírico que contiene el antígeno o antígenos.

15 En una realización preferida, se administra GM-CSF al paciente antes de la administración inicial del antígeno. GM-CSF se puede administrar usando un vector vírico tal como un vector de poxvirus o una proteína aislada en una formulación farmacéutica. Existen mundialmente varias formas de fármaco de GM-CSF recombinante, incluyendo sargramostim, que se vende con la marca LEUKINE® en los Estados Unidos por Berlex, Inc.

20 En una realización preferida, los vectores poxvíricos de la presente invención se usan en combinación con quimioterapia. En una realización preferida, el agente de la quimioterapia es docetaxel.

25 La presente descripción también comprende tratar cáncer de mama, que comprende realizar el perfil de expresión de una muestra de célula tumoral obtenida de un individuo, administrar un vector poxvírico recombinante que comprende un primer conjunto de antígenos tumorales y/o moléculas coestimulantes, seleccionado basado en el análisis de las células/tipo tumoral en la primera etapa del tratamiento, y administrar dichos vectores al individuo. Además, se realiza el perfil de expresión de las posibles células tumorales que quedan, para construir un segundo poxvirus recombinante que expresa un segundo conjunto de antígenos asociados a tumores y/o moléculas coestimulantes para la administración al individuo.

30 La presente descripción también proporciona un sistema para prevenir o retrasar el comienzo de cáncer de mama en un individuo con riesgo elevado de desarrollar cáncer de mama, por ejemplo debido a una mutación hereditaria que predispone al individuo a cáncer de mama (por ejemplo, identificado usando un ensayo de identificación de cáncer de mama). El sistema comprende administrar al individuo con una predisposición a cáncer de mama un vector poxvírico recombinante que codifica al menos un antígeno tumoral específico para el factor de predisposición, y/o una o más moléculas coestimulantes. Preferiblemente, el antígeno tumoral y las moléculas coestimulantes son codificados por el mismo vector poxvírico recombinante. Como alternativa, se puede usar un sistema que comprende dos o más vectores poxvíricos.

35 La presente descripción también proporciona un kit que comprende uno o más vectores poxvíricos recombinantes que codifican cada uno al menos una molécula coestimulante, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, y uno o más vectores poxvíricos recombinantes que codifican al menos un antígeno asociado con cáncer de mama, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El kit comprende además instrucciones sobre qué combinación de los poxvirus recombinantes "listos para el uso" es apropiada para tratar diferentes tipos y etapas de cáncer de mama. Como alternativa, el kit también comprende un componente de diagnóstico que comprende, por ejemplo, un chip de ADN de detección de mutaciones y/o un chip de ADNc que mide el patrón de expresión, para permitir la determinación del tipo y/o etapa del cáncer de mama procedente de una muestra biológica obtenida del individuo que necesita tratamiento.

45 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra el mapa de endonucleasas de restricción del plásmido pT2137, que se usó para la generación de la vacuna recombinante rV-MUC-1.

50 La Figura 2 muestra el vector rV-MUC-1 esquemático. pT2137 dirige la inserción de la secuencia codificante de MUC-1 en el gen TK, que está situado en la región Hind III J del genoma del virus de la vacuna. El gen MUC-1 está bajo el control transcripcional del promotor 40K del virus de la vacuna. Además, se incluye el gen *lacZ* de *E. coli*, bajo el control del promotor C1 del virus de la viruela aviar, como una identificación para la progenie recombinante. Se usó un aislado purificado en placas procedente de la cepa Wyeth (New York City Board of Health) del virus de la vacuna como el virus parental para esta vacuna recombinante. La recombinación *in vivo* entre el vector plasmídico y el ADN vírico dio como resultado la formación de un virus recombinante en el que la secuencia del gen TK del virus de la vacuna se interrumpió mediante el gen MUC-1, bajo la dirección transcripcional del promotor 40K, y el gen *lacZ* como bajo el control del promotor C1.

La Figura 3 muestra el mapa de endonucleasas de restricción del plásmido pT8016, que se usó para la

generación de la vacuna recombinante rV-CEA(6D)/TRICOM.

La Figura 4 muestra el vector rV-CEA(6D)/TRICOM esquemático. rV-CEA(6D)/TRICOM se construyó vía recombinación homóloga *in vivo* entre el ADN del virus de la vacuna parental y un vector plasmídico, pT8016 (véase la Figura 3), que contiene los genes CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1. El vector plasmídico también posee el gen *lacZ* de *E. coli*, que se insertó simultáneamente en el genoma recombinante con los genes CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1. Se usó un ensayo cromogénico para β -galactosidasa, codificada por el gen *lacZ*, para seleccionar el candidato a vacuna final, que se verificó mediante análisis de expresión genómica y proteica.

La Figura 5 muestra el mapa de endonucleasas de restricción del plásmido pT2187, que se usó para la generación de la vacuna recombinante rF-CEA(6D)/TRICOM.

La Figura 6 muestra el vector rF-CEA(6D)/TRICOM esquemático. rF-CEA(6D)/TRICOM se construyó vía recombinación homóloga *in vivo* entre el ADN de la viruela aviar parental y un vector plasmídico que contiene los genes CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1. El vector plasmídico también posee el gen *lacZ* de *E. coli*, que se insertó simultáneamente en el genoma recombinante con los genes CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1. Se usó un ensayo cromogénico para β -galactosidasa, codificada por el gen *lacZ*, para seleccionar el candidato a vacuna final, que se verificó mediante análisis de expresión genómica y proteica.

La Figura 7 muestra la secuencia nucleotídica de MUC-1 bamboleada usada en vectores de la presente invención, que incluye PANVAC-VF, también conocida como wMUC-1(6), como SEC ID NO:1.

La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos de MUC-1 bamboleada usada en vectores de la presente invención, que incluye PANVAC-VF, también conocida como MUC-1(6), como SEC ID NO:2.

La Figura 9 muestra la secuencia nucleotídica de CEA bamboleado usado en vectores de la presente invención, que incluye PANVAC-VF, también conocido como wCEA(6D), como SEC ID NO:3.

La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos de CEA bamboleado usado en vectores de la presente invención, que incluye PANVAC-VF, también conocido como wMUC-1(6), como SEC ID NO:4.

La Figura 11 muestra el vector recombinante PANVAC-F esquemático. Para generar PANVAC-F, se usaron dos vectores plasmídicos. El primer plásmido, denominado pT1154, dirige la inserción de las secuencias codificantes de wCEA(6D) y wMUC-1(6) en la región FP 14 del genoma del virus de la viruela aviar. El segundo plásmido, denominado pT8150, dirige la inserción de las secuencias codificantes de LFA-3, ICAM-1, y B7.1 (colectivamente conocidas como TRICOM) en la región BamH I J del genoma del virus de la viruela aviar. El gen wCEA(6D) está bajo el control transcripcional del promotor 40K del virus de la vacuna. El gen wMUC-1(6) está bajo el control transcripcional del promotor temprano/tardío sintético (sE/L). El gen LFA-3 está bajo el control transcripcional del promotor 30K del virus de la vacuna, el gen ICAM-1 está bajo el control transcripcional del promotor I3 del virus de la vacuna, y el gen B7.1 está bajo el control transcripcional del promotor temprano/tardío sintético (sE/L). Además, pT1154 contiene el gen *lacZ* de *E. coli*, bajo el control del promotor 40K del virus de la vacuna, que se incluye como una identificación para la progenie recombinante, y pT8150 contiene el gen *GUS*, bajo el control del promotor 7.5, para uso en la identificación de la progenie recombinante.

La Figura 12 muestra el vector recombinante PANVAC-V esquemático. Se usó una cepa de Wyeth (New York City Board of Health) del virus de la vacuna como el virus parental para esta vacuna recombinante, denominada TBC-vTRICOM. Este virus parental, denominado TBC-vTRICOM, contiene las secuencias codificantes de LFA-3, ICAM-1, y B7.1 insertadas en la región Hind III F del genoma del virus de la vacuna. La recombinación entre el vector plasmídico y el ADN vírico da como resultado la formación de un virus recombinante en el que el gen wCEA(6D), bajo el control transcripcional del promotor 40K del virus de la vacuna, el gen wMUC-1(6), bajo el control transcripcional del promotor sE/L, y el gen *lacZ*, bajo el control del promotor 40K, se insertaron en la región Hind III J del genoma del virus de la vacuna. El gen *lacZ* de *E. coli* insertado estaba flanqueado por secuencias de poxvirus duplicadas. La recombinación intramolecular entre estas secuencias dio como resultado la supresión del gen *lacZ*. Los virus recombinantes, de los que se suprimió el gen *lacZ*, dieron lugar a placas incoloras que se seleccionaron y se purificaron en placas. El poxvirus recombinante purificado final contenía sólo los genes deseados que codifican las proteínas CEA, MUC-1, LFA-3, ICAM-1 y B7.1 y ningún gen marcador (*lacZ*).

La Figura 13 muestra el mapa de endonucleasas de restricción del plásmido pT1153, que se usó para la generación de la vacuna recombinante PANVAC-V. El vector plasmídico pT1153 dirige la inserción de secuencias codificantes de CEA y MUC-1 modificadas en la región Hind III J del genoma del virus TBC-vTRICOM. El gen CEA modificado, denominado wCEA(6D), está bajo el control transcripcional del promotor 40K del virus de la vacuna, y el gen MUC-1 modificado, denominado wMUC-1(6), está bajo el control transcripcional del promotor sintético temprano/tardío (sE/L). El plásmido también contiene una porción de la región Hind III J del virus de la vacuna, que codifica el gen de timidina cinasa (TK). Además, el gen *lacZ* de *E. coli*, bajo el control del promotor 40K del virus de la vacuna, está incluido como una identificación transitoria

para la progenie recombinante.

La Figura 14 muestra la derivación del virus parental PANVAC-V, TBC-vTRICOM. Este virus derivó de la cepa de la vacuna de Wyeth. En primer lugar, la vacuna de Wyeth se purificó en placas por Flow Laboratories, y después se expandió en células CV-1, para crear TBC-Wy. A continuación, el plásmido pT1068 se insertó usando células CV-1, para suprimir F13L (37K), creando TBC-Wy-Delta37. Entonces se insertaron LFA-3, ICAM-1, B7.1 y F13L en este virus usando el plásmido pT5132 en células CED, creando TBC-vTRICOM.

La Figura 15 muestra un repaso amplio de opciones de tratamiento típicas para cada etapa de cáncer de mama, incluyendo el número estimado de nuevos casos para 2004 y las tasas de supervivencia de 5 años estimadas (basadas en SEER Cancer Statistics Review, 1975-2001, NCDB, CoC, ACoS, American Cancer Society, AJCC Cancer Staging Manual, Quinta Edición).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Ahora se ha descubierto un nuevo medio para tratar cáncer de mama en seres humanos, que implica el uso de poxvirus recombinantes que contienen antígenos asociados con cáncer de mama y moléculas moduladoras inmunitarias. En consecuencia, la presente invención proporciona un sistema para identificar individuos para identificar aquellos con riesgo de desarrollar o sufrir cáncer de mama; preferiblemente, la identificación incluye identificar antígenos específicos asociados con cáncer de mama expresados por el individuo. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano. El sistema también comprende administrar a ese individuo en riesgo de desarrollar o sufrir cáncer de mama al menos un primer poxvirus recombinante, y después, a intervalos regulares, administrar al menos un segundo poxvirus recombinante, en el que los poxvirus recombinantes comprenden al menos un gen que codifica un antígeno asociado con cáncer de mama. El antígeno asociado con cáncer de mama preferido incluye CEA y MUC-1, y sus variantes que incluyen wCEA(6D) y wMUC-1(6). La variantes preferidas tienen cambios de secuencia para crear un epítipo de CTL más inmunógeno y/o cambios en la secuencia de ácido nucleico para reducir el corte durante la recombinación homóloga. Preferiblemente, el segundo poxvirus recombinante procede de un género diferentes del primer poxvirus recombinante. Los genes que codifican los antígenos asociados con cáncer de mama se insertan preferiblemente en una región no esencial del genoma poxvírico. Los poxvirus preferidos incluyen orthopox, tal como virus de la vacuna, y avipox, tal como viruela aviar y viruela del canario. Los antígenos adecuados de cáncer de mama pueden incluir MAGE-3, MAGE-6, NY-ESO-1, Her2neu y p53, así como antígenos de cáncer de mama recientemente definidos, por ejemplo cinesina 2, factor 1 modulador del elemento TATA, proteína tumoral D52 y MAGE D, y nuevos productos génicos adicionales, por ejemplo NY-BR-62, NY-BR-75, NY-BR-85, y NY-BR-96.

La invención también proporciona la coadministración de un adyuvante tal como GM-CSF (por ejemplo, sargramostim) con los poxvirus recombinantes, así como la coadministración de moléculas moduladoras inmunitarias, tales como al menos una molécula coestimulante, tal como LFA-3, ICAM-1, y B7.1. Preferiblemente, se usa la combinación de LFA-3, ICAM-1, y B7.1 (TRICOM).

En una realización preferida, el poxvirus que comprende al menos un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado con cáncer de mama también codifica al menos una molécula coestimulante o inmunoestimulante. Como alternativa, la molécula o moléculas coestimulantes y el antígeno o antígenos son codificados por un sistema de vector poxvírico que comprende múltiples vectores poxvíricos recombinantes.

El sistema de la presente invención proporciona una nueva herramienta de tratamiento que se puede adaptar para seleccionar como diana diferentes tipos de células malignas usando los mismos bloques de construcción principales para permitir un régimen eficiente pero direccionado específicamente a tratar los tumores de la mama. El sistema de la presente invención permite que el tratamiento se personalice al individuo particular y al estado mórbido. En una realización, el antígeno de cáncer de mama usado se puede personalizar al paciente individual determinando qué antígenos de cáncer de mama están siendo expresados en niveles elevados en las células cancerosas del paciente. Diferentes antígenos asociados con cáncer de mama son expresados anormalmente o se expresan en niveles anormalmente elevados en las diferentes células cancerosas o precancerosas del individuo. Los antígenos útiles según el sistema de la presente invención también se pueden seleccionar según el tipo y/o etapa de las células de cáncer de mama del paciente. Además, el antígeno expresado por un individuo puede cambiar a medida que progresa la enfermedad. El tipo y la etapa actual del cáncer de mama se puede evaluar usando métodos histoquímicos, inmunohistoquímicos y genéticos. Este dato puede dar información adicional.

De este modo, los vectores se pueden personalizar para reflejar aquellos antígenos expresados por los antígenos de cáncer de mama expresados por el paciente individual, la etapa de cáncer de mama, y/o los antígenos expresados a medida que progresa la enfermedad del paciente. En general, se usan datos farmacogenéticos y farmacogenómicos, así como datos inmunohistoquímicos procedentes de las células del individuo, para determinar la selección de antígenos preferidos asociados con cáncer de mama en el sistema de la presente invención. En una realización preferida, el paciente tiene más de un tipo de cáncer, y los antígenos apropiados se seleccionan basándose en el cáncer específico expresado por el paciente.

Antígenos asociados a tumor de mama

Cualquier antígeno asociado con cáncer de mama se puede usar en el presente sistema de vectores. Hay numerosos antígenos que están asociados con cáncer de mama, que se denominan aquí como antígenos asociados con cáncer de mama (BCAAs), o TAAAs. Los antígenos asociados con cáncer de mama particularmente preferidos incluyen CEA y MUC-1, así como otras mucinas tales como mini-MUC y MUC-4.

Los antígenos adecuados de cáncer de mama pueden incluir MAGE-3, MAGE-6, NY-ESO-1, Her2neu y p53, así como antígenos de cáncer de mama recientemente definidos, por ejemplo cinesina 2, factor 1 modulador del elemento TATA, proteína tumoral D52 y MAGE D, y nuevos productos génicos adicionales, por ejemplo NY-BR-62, NY-BR-75, NY-BR-85, y NY-BR-96.

Algunos antígenos asociados con cáncer de mama preferidos, útiles según la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, mini-MUC (mini-MUC se refiere a variantes de MUC en las que se ha reducido el número de unidades de repetición en tándem); MUC-1 (Marshall et al., J. Clin. Oncol. 18:3964-73 (2000); HER2/neu; receptor de HER2 (documento US 5.772.997); mamoglobulina (documento US 5.922.836); labirintina (documento US 6.166.176); SCP-1 (documento US 6.140.050); NY-ESO-1 (documento US 6.140.050); SSX-2 (documento US 6.140.050); citoqueratina soluble bloqueada N-terminal (documento US 4.775.620); antígeno de cáncer humano de 43 kD (documento US 6.077.950); antígeno asociado a tumor humano (PRAT) (documento US 6.020.478); antígeno asociado a tumor humano (TUAN) (documento US 5.922.566); antígeno L6 (documento US 5.597.707); antígeno carcinoembrionario (análisis de RT-PCR para el pronóstico de cáncer de mama en Clin Cancer Res 6:4176-85, 2000); poliadenilato polimerasa (PAP) (factor de pronóstico desfavorable independiente en Cancer Res 60:5427-33, 2000); p53 (Clin Cancer Res 6:3103-10, 2000); mdm-2 (Clin Cancer Res 6:3103-10, 2000); p21 (Clin Cancer Res 6:3103-10, 2000); CA15-3 (Eur J Gynaecol Oncol 21:278-81, 2000); oncoproteína 18/estatmina (Op18) (Br J. Cancer 83:311-8, 2000); caliceína glandular humana (hK2) (Breast Cancer Res Treat 59:263-70, 2000); antígenos NY-BR (Cancer Immun. Mar 30; 1:4, 2001), proteína tumoral D52 (Cancer Immun. Mar 30; 1:4, 2001), y antígeno específico de la próstata (Breast Cancer Res Treat 59:263-70, 2000). Todavía otros antígenos preferidos asociados con cáncer de mama incluyen péptido de telomerasa, B899, y antígenos STn, mammaglobina, CA 15-3, CA 125, NY-ESO1, y fragmento 19 de citoqueratina (CYFRA 21-1).

Además, el número de antígenos asociados con cáncer de mama aumenta constantemente, particularmente dados los avances usando técnicas de formación de perfiles genómicos. Por ejemplo, se ha identificado a Epstil como un gen inducido por interacción epitelial-estrómic en cáncer de mama humano (Publicación de Solicitud de Patente US nº 20040219551, publicada el 4 de noviembre de 2004). De forma similar, los perfiles de expresión génica de tejido de cáncer de mama humano se han usado para identificar grupos de genes, por ejemplo 50 genes, que están aumentados en células de cáncer de mama (véanse, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente US nº 20040214179, publicada el 28 de octubre de 2004; la Publicación de Solicitud de Patente US nº 20040209290, publicada el 21 de octubre de 2004). Cualquier antígeno asociado con cáncer de mama se puede usar en los vectores poxvíricos de la presente invención.

En una realización, el sistema vectorial de la presente invención tiene al menos un antígeno asociado con cáncer de mama. Por ejemplo, MUC-1 o CEA. Incluso más preferiblemente, al menos dos antígenos asociados con cáncer de mama. Por ejemplo, MUC-1 y CEA.

Se puede usar un único vector poxvírico para expresar CEA, MUC-1, mini-MUC, etc., si se desea, o los antígenos asociados con cáncer de mama se pueden expresar en múltiples vectores. También se pueden expresar múltiples copias de ciertos antígenos asociados con cáncer de mama, ya sea en los mismos vectores o en múltiples vectores.

Un antígeno asociado con cáncer de mama particularmente preferido es CEA. CEA es una glucoproteína oncofetal que se expresa en niveles elevados en la superficie de casi todos los tumores del tubo digestivo, incluyendo carcinomas colorrectal, gástrico y de mama humanos, así como en muchos carcinomas mamarios y adenocarcinomas pulmonares. Muraro et al., Cancer Res. 45:5769-89 (1985). En una realización, el CEA es un CEA de longitud completa. Un CEA particularmente preferido tiene una modificación en un epítipo inmunodominante restringido HLA-A2. Este epítipo, denominado CAP1-6d, o algunas veces CEA-6D, se une con afinidad potenciada al receptor e induce CTL *in vitro* más eficientemente que el epítipo nativo. Estos CTL son capaces de lisar células tumorales humanas que expresan CEA nativo. Zaremba et al., Cancer Res. 57:4570-7 (1997). Otras variantes preferidas incluyen porciones de CEA que provocan una respuesta particular de MHC clase I o II. En algunas realizaciones, estas secuencias pueden estar enlazadas juntas. Se conocen patrones que provocan reacciones particulares de MHC clase I o MHC clase II. Adicionalmente, se pueden introducir cambios en la secuencia de ácido nucleico para hacer al gen más estable y menos tendente al corte durante la recombinación homóloga.

Una secuencia de CEA particularmente preferida se denomina wCEA(6D), secuencia la cual se representa en la Figura 9 como SEC ID NO:3.

Otro antígeno asociado con cáncer de mama preferido es una mucina. Una mucina particularmente preferida es la mucina epitelial polimórfica humana, denominada MUC-1. El polimorfismo de MUC-1 deriva de una variación en el número de secuencias de aminoácidos repetidas en tándem situadas en la porción extracelular de la glucoproteína.

MUC-1 se expresa sobre la superficie apical de células epiteliales y glandulares normales. Los adenocarcinomas de mama y de ovario malignos glucosilan de forma aberrante, así como también sobreexpresan MUC-1. La glucosilación anormal expone epítomos peptídicos, haciendo a la mucina derivada del tumor antigénicamente distinta de la mucina normal. Se han identificado respuestas de células T frente a MUC-1 en pacientes con cáncer de mama y ovárico. Jerome et al., *Cancer Res.* 51: 2908-16 (1991); Ioannides et al., *J. Immunol.* 151: 3693-3703 (1993).

En una realización, los vectores poxvíricos de la presente invención contienen un fragmento de ADN que codifica un fragmento de MUC-1, algunas veces denominado como mini-MUC. El fragmento del gen MUC-1 codificará una porción suficiente de MUC-1 para generar una reacción inmunitaria frente a MUC-1, pero no sufre corte amplio como resultado de recombinación homóloga. Preferiblemente, el fragmento tiene aproximadamente 5 a 25 unidades de repetición en tándem de MUC-1, más preferiblemente entre aproximadamente 6 y 15 unidades de repetición en tándem de MUC-1, y lo más preferible alrededor de 6 a 12 unidades de repetición en tándem de MUC-1. Un fragmento de MUC-1 inmunogénico especialmente preferido tiene alrededor de 6 unidades de repetición en tándem de MUC-1. Se entiende que, como se usa aquí, la frase "aproximadamente 6-15 repeticiones en tándem de MUC-1" pretende incluir cada número posible de repeticiones en ese intervalo, es decir, un fragmento con 6 repeticiones en tándem; un fragmento con 7 repeticiones en tándem, etc., hasta e incluyendo un fragmento con 15 repeticiones en tándem. Los fragmentos de MUC-1 preferidos tienen la secuencia de ADN de MUC-1 humana. Un fragmento de MUC-1 preferido tienen seis repeticiones en tándem y la secuencia de ácido nucleico modificada como se explica más abajo, para reducir el corte de secuencias durante sucesos de recombinación. También se prefieren cualesquiera cambios, tales como aquellos diseñados para potenciar la inmunogenicidad. Una secuencia de ADN de MUC-1 ejemplar es la secuencia de ADNc de MUC-1 humana que tiene las unidades repetidas descritas, por ejemplo, por Gendler et al. (*J. Biol. Chem.* 265:15286-93 (1990)).

El antígeno asociado con cáncer de mama, por ejemplo, las secuencias de repetición de mucina, se pueden alterar (algunas veces denominado bambolear) para minimizar la homología nucleotídica sin cambiar la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, la secuencia nucleotídica del segmento de ADN que codifica las repeticiones en tándem de mucina se altera a partir de la secuencia nativa de tal manera para reducir duplicaciones de los codones. Por ejemplo, los aminoácidos tienen típicamente dos o más codones que codificarán el mismo resto (por ejemplo, la glicina es codificada por GGT, GGA, GGG, o GGC). Usando otros codones que codifican el mismo aminoácido, se puede reducir adicionalmente la posibilidad de sucesos de recombinación indeseados que dan como resultado el corte al reducir la homología a nivel del ácido nucleico. Adicionalmente, también se pueden introducir algunos cambios de aminoácidos conservativos en diferentes grupos de las repeticiones en tándem para reducir adicionalmente la recombinación indeseada (por ejemplo, glicina/serina, valina/leucina), teniendo cuidado de no alterar un epítomo peptídico que reduciría su inmunogenicidad. La homología nucleotídica también se puede reducir introduciendo cambios en la secuencia de aminoácidos, preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas en algunas de las repeticiones en tándem.

También se pueden introducir cambios en otros aminoácidos para potenciar la inmunogenicidad. Por ejemplo, una secuencia de MUC-1 particularmente preferida se denomina wMUC-1(6), secuencia la cual se representa en la Figura 7 como SEC ID NO:1. Esta variante contiene un cambio que convierte un codón de treonina en un codón de leucina, para crear un epítomo de CTL más inmunogénico, y 87 nucleótidos silenciosos que se introdujeron en la región de repetición para incrementar la estabilidad del gen de MUC-1 sin cambiar la secuencia de aminoácidos. Además, se observa un número de diferencias nucleotídicas al comienzo y al final de la región de repetición entre wMUC-1(6) y la secuencia nucleotídica de Genbank de MUC-1 (número de acceso J05581). Esto es debido a la degeneración de la secuencia repetida al comienzo y al final de la región de repetición. En contraste, el gen wMUC-1(6) se diseñó para contener repeticiones idénticas sin degeneración. Otras diferencias nucleotídicas, que consisten en 11 nucleótidos en 8 codones, son mutaciones silenciosas, y no dan como resultado cambios de aminoácidos.

Las composiciones farmacéuticas descritas aquí se pueden usar para el tratamiento de cáncer, particularmente para la inmunoterapia de cáncer de mama, como se describe con más detalle más abajo. Preferiblemente, primero se identifica el tumor para determinar qué tipo de cáncer tiene un paciente. Por ejemplo, con los vectores que contienen CEA y MUC descritos anteriormente, se pueden seleccionar individuos que tienen un cáncer de mama que expresa TAA. Si el individuo tiene cánceres distintos o además de cáncer de mama, se pueden añadir antígenos adicionales asociados a tumores que están asociados con esas afecciones.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se pueden usar para prevenir el desarrollo de un cáncer, particularmente en un individuo con mayor riesgo de desarrollar tal cáncer que otros individuos, o para tratar un paciente aquejado de cáncer de mama. Las composiciones farmacéuticas y las vacunas se pueden administrar antes o después de la eliminación quirúrgica de tumores primarios y/o del tratamiento tal como administración de radioterapia o fármacos quimioterapéuticos convencionales. Como se explica más abajo, la administración de las composiciones farmacéuticas puede ser mediante cualquier método adecuado, incluyendo administración por vías intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, subcutánea, intranasal, intradérmica, anal, vaginal, tópica y oral.

Pacientes/sujetos con cáncer de mama para administración

Las composiciones farmacéuticas descritas aquí se pueden usar para el tratamiento de cáncer, particularmente para

la inmunoterapia de cáncer de mama. En la presente invención, en primer lugar se identifica el paciente para determinar la presencia de cáncer de mama. Preferiblemente, también se identifica el paciente para determinar qué etapa de cáncer de mama tiene el paciente. El número estimado de nuevos casos de cada etapa de cáncer de mama, desde la etapa 0-IV, se muestra en la Figura 12. En otra realización preferida, se identifica el paciente para determinar qué antígenos asociados con cáncer de mama están siendo expresados por las células tumorales del paciente, a fin de personalizar el tratamiento.

Las composiciones farmacéuticas, vectores poxvíricos y métodos de la presente invención se pueden usar para tratar a un individuo con cualquier tipo y/o etapa de cáncer de mama. Hay varios tipos de cáncer de mama. Además, hay varias etapas de cáncer de mama.

La presente invención se puede usar para tratar un paciente con cualquier tipo de cáncer de mama. Los cánceres de mama incluyen carcinoma in situ, carcinoma ductal infiltrante (o invasivo), carcinoma lobular infiltrante (o invasivo), carcinoma medular, carcinoma coloideo, carcinoma tubular, y carcinoma inflamatorio.

En el carcinoma in situ, el cáncer todavía está en los conductos o lóbulos en los que comenzó, y no se ha extendido a tejidos grasos circundantes en la mama o a otros órganos en el cuerpo. Hay 2 tipos de carcinoma de mama in situ. Carcinoma lobular in situ (LCIS): (también denominado neoplasia lobular) comienza en los lóbulos, pero no crece a través de las paredes de los lóbulos. La mayoría de los especialistas en cáncer de mama piensan que el propio LCIS no se convierte habitualmente en un cáncer invasivo, pero las mujeres con esta afección sí padecen un mayor riesgo de desarrollar un cáncer invasivo en cualquier mama. El carcinoma ductal in situ es el tipo más habitual de cáncer de mama no invasivo. Las células cancerosas dentro de los conductos no se extienden a través de las paredes de los conductos al tejido graso de la mama. Éstas se tratan con cirugía y algunas veces radiación, lo que habitualmente es curativo. El hecho de tener DCIS sin tratar aumenta enormemente el riesgo de cáncer de mama invasivo.

El carcinoma ductal infiltrante (o invasivo) comienza en un pasaje, o conducto, de leche de la mama, pero entonces las células cancerosas pasan a través de la pared del conducto y se extienden al tejido graso de la mama. Entonces pueden invadir canales linfáticos o vasos sanguíneos de la mama y extenderse a otras partes del cuerpo. Alrededor del 80% de todos los cánceres de mama son carcinoma ductal infiltrante o invasivo.

El carcinoma lobular infiltrante (o invasivo) (ILC) comienza en las glándulas productoras de leche. Al igual que el cáncer de mama ductal infiltrante, este cáncer se puede extender más allá de la mama a otras partes del cuerpo. Alrededor de 10% a 15% de los cánceres de mama invasivos son carcinomas lobulares invasivos.

El carcinoma medular es un tipo especial de cáncer ductal infiltrante que tiene una frontera distinta, relativamente bien definida, entre tejido tumoral y tejido de mama normal. También tiene un número de otras características especiales, incluyendo el gran tamaño de las células cancerosas y la presencia de células del sistema inmunitario en los bordes del tumor. Da cuenta de alrededor del 5% de todos los cánceres de mama.

El carcinoma coloideo es un tipo raro de cáncer de mama ductal invasivo, también denominado carcinoma mucinoso, formado por células cancerosas productoras de moco. El carcinoma coloideo tiene un pronóstico ligeramente mejor y una ocasión ligeramente menor de metástasis que los cánceres lobular invasivo o ductal invasivo del mismo tamaño.

El carcinoma tubular es un tipo especial de carcinoma de mama ductal infiltrante. Alrededor del 2% de todos los cánceres de mama son carcinomas tubulares. Las mujeres con este tipo de cáncer de mama tienen un mejor pronóstico debido a que es menos probable que el cáncer se extienda fuera de la mama que los cánceres lobular invasivo o ductal invasivo del mismo tamaño.

El cáncer de mama inflamatorio es un tipo poco común de cáncer de mama invasivo que da cuenta de alrededor de 1-3% de todos los cánceres de mama. La piel de la mama afectada es roja, está caliente, y tiene el aspecto de piel de naranja. Estos cambios no están provocados por la inflamación, sino por las células cancerosas que bloquean los vasos linfáticos en la piel. El cáncer de mama inflamatorio tiene mayor ocasión de extenderse y un peor pronóstico que los cánceres ductal o lobular invasivos típicos. El cáncer de mama inflamatorio es clasificado siempre como etapa IIIB, excepto que ya se haya extendido a otros órganos en el momento del diagnóstico, lo que lo colocaría entonces en la etapa IV.

Además de los diferentes tipos de cáncer de mama, también hay diferentes etapas de cáncer de mama, denominadas etapas 0-IV. El sistema usado más a menudo para describir el crecimiento y extensión de cáncer de mama es el sistema de clasificación de etapas TNM, también conocido como el sistema del American Joint Committee on Cancer (AJCC). En la clasificación de la etapa TNM, la información sobre el tumor, ganglios linfáticos cercanos, y metástasis de órganos distantes se combina, y se asigna una etapa a los agrupamientos de TNM específicos. Las etapas agrupadas se describen usando números romanos desde I hasta IV. La etapa clínica se determina mediante los resultados del examen físico y los ensayos. La etapa patológica incluye los hallazgos del patólogo tras la cirugía. En la mayoría del tiempo, la etapa patológica es la etapa más importante debido a que habitualmente no se sabe que el cáncer se ha extendido a los ganglios linfáticos hasta que el patólogo los examina bajo el microscopio. En el sistema de clasificación de etapas de TNM, T representa el tamaño del cáncer (medido en centímetros; 2,54 centímetros = 1 pulgada); N representa la extensión a los ganglios linfáticos en el área de la

mama, y M representa metástasis (extensión a órganos distantes del cuerpo).

La categoría T describe el tumor original (primario). Tis: Tis se usa sólo para carcinoma in situ o cáncer de mama no invasivo, tal como carcinoma ductal in situ (DCIS) o carcinoma lobular in situ (LCIS). T1: El cáncer tiene 2 cm de diámetro (alrededor de 3/4 pulgadas) o más pequeño. T2: El cáncer tiene más de 2 cm pero no más de 5 cm de diámetro. T3: El cáncer tiene más de 5 cm de diámetro. T4: El cáncer tiene cualquier tamaño y se ha extendido a la pared del pecho, a la piel, o a los ganglios linfáticos.

La categoría N se basa en cuál de los ganglios linfáticos cerca de la mama, si lo están, se ven afectados por el cáncer. N0: El cáncer no se ha extendido a los ganglios linfáticos. N1: El cáncer se ha extendido a los ganglios linfáticos bajo el brazo en el mismo lado que el cáncer de mama. Los ganglios linfáticos no se han unido todavía entre sí o al tejido circundante. N2: El cáncer se ha extendido a los ganglios linfáticos bajo el brazo en el mismo lado que el cáncer de mama y están unidos entre sí o al tejido circundante, o están alargados. O, se puede observar que el cáncer se ha extendido a los ganglios linfáticos mamarios internos (cerca del esternón), pero no a los ganglios linfáticos bajo el brazo. N3: El cáncer se ha extendido a los ganglios linfáticos por encima o justo por debajo de la clavícula en el mismo lado que el cáncer, y puede haberse extendido o no a los ganglios linfáticos bajo el brazo. O, el cáncer se ha extendido a los ganglios linfáticos mamarios internos y a los ganglios linfáticos bajo el brazo, ambos en el mismo lado que el cáncer.

Categorías M: La categoría M depende de si el cáncer se ha extendido a cualesquiera tejidos y órganos distantes. M0: No se ha extendido el cáncer a distancia. M1: El cáncer se ha extendido a órganos distantes.

Agrupamiento de etapas para el cáncer de mama. Una vez que se han asignado las categorías T, N y M, esta información se combina para asignar una etapa global de 0, I, II, III, o IV. Una vez que se determinan T, N, y M, se combinan, y se asigna una "etapa" global de I, II, III, o IV. (Algunas veces, estas etapas se subdividen igualmente, usando letras tales como IIIA y IIIB). Los cánceres de la etapa I son los menos avanzados, y a menudo tienen un mejor pronóstico (resultado de supervivencia). Los cánceres de mayores etapas son a menudo más avanzados pero, en muchos casos, todavía se pueden tratar con éxito. El número estimado de nuevos casos en 2004 para cada etapa de cáncer de mama, desde la etapa 0-IV, se muestra en la Figura 15.

Etapa global	Categoría T	Categoría N	Categoría M
Etapa 0	Tis	N0	M0
Etapa I	T1	N0	M0
Etapa IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
Etapa IIB	T2	N0	M0
	T2	N1	M0
Etapa IIIA	T3	N0	M0
	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
Etapa IIIB	T3	N2	M0
	T4	Cualquier N	M0
Etapa IIIC	Cualquier T	N3	M0
Etapa IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Hay tres tipos diferentes de clasificación de etapas. La clasificación clínica de etapas estima cuánto cáncer hay basándose en los resultados del examen físico, ensayos de formación de imágenes (rayos X, barridos de CT, etc.), y algunas veces biopsias de áreas afectadas. Para ciertos cánceres, los resultados de otros ensayos, tales como ensayos de sangre, también se usan en la clasificación de las etapas. La clasificación patológica de las etapas sólo se puede realizar en pacientes que han pasado por cirugía para eliminar o explorar el grado del cáncer. Combina los

5 resultados de la clasificación clínica de las etapas (examen físico, ensayos de formación de imágenes, etc.) con los resultados de la cirugía. En algunos casos, la etapa patológica puede ser diferente de la etapa clínica (por ejemplo, si la cirugía muestra que el cáncer es más amplio que lo que se pensó que era previamente). A menudo se usa una reclasificación de las etapas para determinar el grado de la enfermedad si reaparece (vuelve) un cáncer tras el tratamiento. Esto se hace para ayudar a determinar qué opción de tratamiento mejor sería en este momento.

10 En una realización preferida, los vectores poxvíricos de la presente invención se usan para tratar pacientes con cáncer de mama de etapa IIIB, es decir, pacientes con varios tumores locales. Los vectores poxvíricos de la presente invención se pueden usar conjuntamente con otros tratamientos, que se describen con detalle más abajo. Por ejemplo, el paciente de la etapa IIIB puede tener quimioterapia neoadyuvante para reducir el tamaño del tumor, seguido de lumpectomía o de mastectomía radical modificada, seguido de quimioterapia, terapia de radiación, o quimioterapia más terapia hormonal.

En una realización preferida, los vectores poxvíricos de la presente invención se usan para tratar pacientes con cáncer de mama de etapa IV, es decir, pacientes con cáncer metastásico.

15 En una realización, el paciente que tiene cáncer de mama ya ha fracasado en otros regímenes de tratamiento, por ejemplo quimioterapia.

Si el individuo tiene otros cánceres, se añadiría preferiblemente antígenos adicionales asociados con tumores, que están asociados con esas afecciones. En tales métodos, las composiciones farmacéuticas descritas aquí se administran a un paciente, típicamente a un animal de sangre caliente, preferiblemente un ser humano.

20 En una realización, las composiciones farmacéuticas se pueden usar para prevenir el desarrollo de un cáncer, particularmente en un individuo con mayor riesgo de desarrollar tal cáncer que otros individuos, o para tratar un paciente afligido con cáncer de mama.

25 Las composiciones farmacéuticas y vacunas se pueden administrar antes o después de la eliminación quirúrgica de tumores primarios y/o del tratamiento tal como administración de radioterapia o fármacos quimioterapéuticos convencionales. Como se explica más abajo, la administración de las composiciones farmacéuticas puede ser mediante cualquier método adecuado, incluyendo la administración por vías intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica, anal, vaginal, tópica y oral.

30 El sistema de tratamiento del cáncer de mama que usa poxvirus recombinantes descritos aquí se puede usar para cualquier hospedante. Preferiblemente, el hospedante es un mamífero. Los mamíferos preferidos incluyen primates tales como seres humanos y chimpancés, animales domésticos tales como caballos, vacas, cerdos, etc., y mascotas tales como perros y gatos. Más preferiblemente, el mamífero hospedante es un primate o animal doméstico. Todavía más preferiblemente, el mamífero hospedante es un ser humano.

Vectores a la medida

35 En una realización, el sistema de la presente invención permite que el tratamiento se personalice al individuo particular y estado mórbido. En esta realización, el antígeno asociado con cáncer de mama usado se puede personalizar al paciente individual determinando qué antígenos están siendo expresados en niveles elevados en las células cancerosas del paciente.

40 Con el desarrollo de farmacogenética y de farmacogenómica, ahora es factible obtener información detallada sobre el tipo de cáncer de mama que afecta a un individuo (Hedenfalk, I. et al. J. Trent. 2001. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. New England Journal of Medicine 344(Feb. 22):539).

El diseño a la medida de los antígenos del cáncer de mama para ajustarse a las necesidades de un paciente individual se puede llevar a cabo usando información obtenida de, por ejemplo, análisis inmunohistoquímico de una biopsia de tumor de mama. Como alternativa, se puede llevar a cabo un análisis de matriz de ácidos nucleicos del perfil de expresión de la muestra de tumor de mama particular usando ARNm aislado procedente de la muestra de tejido de cáncer de mama como se describe en Pollack et al. (Proc Natl Acad Sci. USA 99:12963-12968, 2002).

45 Con el desarrollo de la farmacogenética y farmacogenómica, ahora es factible obtener información detallada sobre el tipo de cáncer de mama que afecta a un individuo. En consecuencia, el tipo y etapa presente del cáncer de mama se pueden evaluar usando métodos histoquímicos, inmunohistoquímicos y genéticos. Este dato puede dar información adicional sobre la expresión del antígeno que se puede anticipar a medida que progresa la enfermedad. De esta manera, se pueden añadir antígenos adicionales asociados con cáncer de mama que se espera que sean expresados a medida que avanza la enfermedad para maximizar la respuesta inmunitaria.

50 Los antígenos de cáncer de mama útiles según la presente invención se personalizan preferiblemente al paciente individual determinando qué antígenos están siendo anormalmente expresados o expresados a niveles anormalmente elevados en las células cancerosas o precancerosas del individuo. Los antígenos útiles según el sistema de la presente invención también se pueden seleccionar según la etapa de las células cancerosas. Generalmente, se usa farmacogenética y farmacogenómica, así como datos inmunohistoquímicos procedentes de

las células individuales, para determinar la selección de antígenos preferidos asociados con cáncer de mama en el sistema de la presente invención. En una realización preferida, el paciente tiene más de un tipo de cáncer, y los antígenos apropiados se seleccionan basándose en el cáncer específico expresado por el paciente.

5 El diseño a la medida de los antígenos de cáncer de mama para ajustarse a las necesidades de un paciente individual se puede realizar usando información obtenida de, por ejemplo, análisis inmunohistoquímico de una biopsia de tumor de mama. Como alternativa, se puede llevar a cabo un análisis de matriz de ácidos nucleicos del perfil de expresión de la muestra de tumor de mama particular usando ARNm aislado procedente de la muestra de tejido de cáncer de mama.

10 Otras matrices de ácidos nucleicos útiles adecuadas para diseñar a la medida los antígenos para los métodos de la presente invención que usan vectores poxvíricos incluyen, por ejemplo, una matriz de cáncer que permite la caracterización de perfiles de expresión de genes implicados en cánceres de mama.

15 La administración del poxvirus recombinante de la invención puede ser profiláctica o terapéutica, dependiendo del sujeto. Cuando se proporciona profilácticamente, el poxvirus recombinante de la presente invención se proporciona antes de la formación del tumor, para permitir que el sistema inmunitario del individuo luche contra un tumor que el individuo es susceptible de desarrollar. Por ejemplo, los individuos con susceptibilidad hereditaria al cáncer son un grupo preferido de pacientes tratados con tal inmunización profiláctica, y otro grupo es aquel que se ha expuesto a agentes medioambientales que están relacionados con tal cáncer o viven en un "punto caliente" o agrupamiento de tumores de mama. Tales individuos incluyen, por ejemplo, portadores de mutaciones que incluyen BRCA1 (Herencia Mendeliana del Hombre en Línea (OMIM) #113705) en 17q, BRCA2 (OMIM #600185) en 13q12, BRCA3 (OMIM #600048) en 11q, BRCA3 (OMIM #605365) en 13q21, BWSR1A (OMIM #602631) en 11p15.5, el gen TP53 (OMIM #191170) en 17p, el gen BRIP1 (OMIM #605882) en 17q22, y el gen RB1CC1 (OMIM #606837) en 8q11. Se han encontrado mutaciones en el gen del receptor de andrógenos (AR; OMIM #313700) en el cromosoma X en casos de cáncer de mama masculino (OMIM #313700.0016). Se encontró una mutación en el gen RAD51 (OMIM #179617) en pacientes con cáncer de mama familiar (OMIM #179617.0001). Se ha demostrado que el alelo 1100delC del gen CHEK2 (OMIM #604373.0001) confiere una mayor susceptibilidad a cáncer de mama en mujeres, y especialmente en los hombres. Los genes NCOA3 (OMIM #601937) y ZNF217 (OMIM #602967), situados en 20q, sufren amplificación en cáncer de mama. Cuando se sobreexpresan, estos genes confieren fenotipos celulares consistentes con un papel en la formación de tumores (Anzick et al., Science 277: 965-968, 1997; Collins et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 95: 8703-8708, 1998).

30 Moléculas coestimulantes

Otra realización particularmente preferida proporciona la coadministración de al menos una molécula coestimulante, incluyendo LFA-3, ICAM-1, y B7.1. Preferiblemente, dos moléculas coestimulantes. Incluso más preferiblemente tres moléculas coestimulantes. Es muy preferido que los PTAA(s) se coadministren con LFA-3, ICAM-1, y B7.1 (TRICOM). Se pueden usar moléculas moduladoras inmunitarias adicionales tales como OX40L. Adicionalmente, en realizaciones alternativas, se puede administrar solamente una molécula coestimulante (por ejemplo B7, LFA-3, ICAM-1), o sus combinaciones, tales como B7.1 y LFA-3, B7.1 e ICAM-1, y LFA-3 e ICAM-1.

40 En una realización preferida, el poxvirus que comprende al menos un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado con cáncer de mama también codifica al menos una molécula coestimulante o inmunoestimulante. Como alternativa, la molécula o moléculas coestimulantes y el antígeno o antígenos están codificados por un sistema de vectores poxvíricos que comprende múltiples vectores poxvíricos recombinantes.

45 Un grupo preferido de ácidos nucleicos para la inserción en el poxvirus incluye moléculas coestimulantes, moléculas accesorias, y/o genes que codifican una citocina. Los términos "coestimulante" e "inmunoestimulante" se usan de forma intercambiable en esta memoria descriptiva. Los ejemplos de moléculas coestimulantes incluyen, pero no se limitan a, B7-1, B7-2, ICAM-1, LFA-3, CD72, OX40L (con o sin OX40), y similares. Los ejemplos de citocinas englobadas por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, IL-2, GM-CSF, TNF-alfa, IFN-gamma, IL-12, RANTES, y similares. Las moléculas coestimulantes se pueden administrar usando un vector poxvírico recombinante que codifica las moléculas coestimulantes o sin el vector como proteínas en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, los agonistas de OX40, incluyendo OX40L y anticuerpos frente a OX40, previenen la formación de tolerancia mediante la reacción inmunitaria a antígenos presentados (Weinberg et al. J Immunol. 164:2160-2169, 2000). Por lo tanto, para incrementar la respuesta inmunitaria frente a un antígeno, el sistema de la presente invención puede suministrar un poxvirus recombinante que expresa OX40L o un anticuerpo frente a OX40 en un vehículo farmacéuticamente aceptable antes, después o simultáneamente con el suministro de un vector poxvírico recombinante que codifica un antígeno asociado con cáncer. Para potenciar los efectos de OX40L, se puede añadir a un vector poxvírico un ácido nucleico que codifica OX40. La secuencia de ácido nucleico de OX40 se puede obtener fácilmente a partir de la Entrez Nucleic Acid Database con un número de acceso AJ277151, y la secuencia de OX40L se puede obtener fácilmente a partir de la Entrez Nucleic Acid Database con un número de acceso SEG_AB042987S. Homo sapiens OX40...[gi:14279071].

No se tiene que usar un gen que codifica una proteína coestimulante completa o antígeno asociado con cáncer de mama, sino más bien sólo el dominio deseado. Por ejemplo, si se desea una reacción inmunitaria, sólo es necesario

codificar el fragmento necesario para estimular la reacción inmunitaria.

En una realización preferida, se administra un vector poxvírico que contiene B7, LFA-3 e ICAM-1 junto con el antígeno asociado al tumor.

5 Los poxvirus que expresan B7-1, ICAM-1, y LFA-3 inducen activación tanto en células T CD4+ como CD8+. (Patente U.S. nº 6.045.802; Hodge et al., J. Natl. Cancer Inst. 92: 1228-39 (2000); Hodge et al., Cancer Research 59: 5800-07 (1999)). OX40 es un coestimulante primario de células T que han encontrado un antígeno, en lugar de células T sin tratamiento, y promueve la expansión de células T después de que se induce la tolerancia de las células T. (Bansal-Pakal et al., Nature Med. 7: 907-12 (2001)). OX40L desempeña un papel durante la activación de células T a) sosteniendo la proliferación a largo plazo de células T CD4+ y CD8+, b) potenciando la producción de citocinas Th1 tales como IL-2, $\text{IGN-}\gamma$, y $\text{TNF-}\alpha$ a partir de células T tanto CD4+ como CD8+ sin cambiar la expresión de IL-4, c) protegiendo las células T de la apoptosis. La combinación de B7-1, ICAM-1, LFA-3, y OX40L potencia la activación inicial, y después potencia adicionalmente la activación sostenida de células T sin tratamiento y efectoras.

Adyuvantes

15 Las formulaciones de vacuna de la presente invención pueden incluir cualesquiera composiciones adyuvantes. Las moléculas coestimulantes, moléculas accesorias, y citocinas de la presente invención son útiles como adyuvantes biológicos, que se pueden administrar sistémicamente al hospedante insertando ácidos nucleicos que codifican tales en los mismos vectores poxvíricos recombinantes o diferentes. Como alternativa, los adyuvantes se pueden administrar mediante otros medios no vectoriales.

20 El adyuvante se puede administrar usando un vector vírico o como una proteína aislada en una formulación farmacéutica. En una realización preferida, el adyuvante se administra como una proteína aislada, tal como una proteína recombinante.

25 En una realización preferida, los métodos de la presente invención proporcionan que el adyuvante se administre al paciente a aproximadamente a la vez que se administra al paciente el vector o vectores poxvíricos. Los métodos de la invención también proporcionan la administración del adyuvante durante varios días antes o después de la administración del vector poxvírico. Por ejemplo, el adyuvante se puede administrar cada día en el que se administre al paciente un vector poxvírico, y cada día después durante alrededor de 1 a alrededor de 5 días. Preferiblemente, durante alrededor de 3 días.

En otra realización preferida, el adyuvante se administra al paciente antes de la administración inicial del antígeno.

30 Se puede usar cualquier adyuvante junto con el presente sistema de vectores. Un adyuvante particularmente preferido es GM-CSF, que se ha demostrado que es un adyuvante de vacuna eficaz debido a que potencia el procesamiento y presentación de antígenos por las células dendríticas. Estudios experimentales y clínicos sugieren que GM-CSF recombinante puede reforzar la inmunidad del hospedante dirigida a una variedad de inmunógenos. Morrissey, J. Immunol. 139:113-119 (1987); Dranoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3539-40 (1983); Vieweg, Cancer Res. 54:1760-65 (1994). Otro adyuvante preferido es una saponina y/o una molécula inmunoestimulante que contiene un dinucleótido CG no metilado (patente U.S. nº 6.544.518).

35 Una realización preferida proporciona el uso de GM-CSF como adyuvante. Por ejemplo, el GM-CSF recombinante (sargramostim), vendido por Berlex Labs, Inc. con la marca LEUKINE®. GM-CSF se puede administrar usando un vector vírico o una proteína aislada en una formulación farmacéutica. En una realización particularmente preferida, la proteína de GM-CSF recombinante se administra al paciente en cada día de la vacunación con el vector o vectores poxvíricos, y para cada uno de los siguientes tres días (es decir, un total de 4 días). Preferiblemente, se administran 50-500 μg de GM-CSF recombinante por día, por ejemplo 100 μg por día. Preferiblemente, el GM-CSF recombinante se administra subcutáneamente o cerca del sitio de la vacunación del poxvirus.

En otra realización, el gen que codifica GM-CSF o una variante activa conocida del mismo se inserta en un poxvirus o en otro vector para el suministro del gen al hospedante.

45 Vectores poxvíricos

Los poxvirus de la presente invención se denominan algunas veces aquí como vector vírico o sistema vectorial, o simplemente un vector. Los poxvirus que tienen utilidad en la presente invención incluyen vectores replicantes y no replicantes. Tales poxvirus incluyen, pero no se limitan a, orthopox tal como virus de la vacuna, avipox, por ejemplo viruela aviar y viruela del canario, viruela del mapache, viruela del conejo y similar, suipox, por ejemplo viruela del cerdo, capropox, por ejemplo viruela de las ovejas, leporipox, e iridovirus. Otros virus de ADN incluyen iridovirus y similares.

55 Los poxvirus parentales útiles en el método de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, orthopoxvirus tales como virus de la vacuna replicante (Perkus et al Science 229:981-984, 1985; Kaufman et al Int. J. Cancer 48:900-907, 1991, Moss Science 252:1662, 1991), virus de la vacuna Wyeth, y virus de la vacuna muy atenuados tales como el virus de la vacuna de Ankara modificado (MVA) (Sutter y Moss, Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.,

89:10847-10851; Sutter et al Virology 1994) o NYVAC; avipoxvirus tales como virus de la viruela aviar, virus de la viruela del canario, tales como ALVAC y similares (Baxby y Paoletti, Vaccine 10:8-9, 1992; Rinns, M.M. et al (Eds) Recombinant Poxviruses CRC Press, Inc, Boca Raton 1992- Paoletti, E. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93:113491-11353, 1996), y suipoxvirus, capripoxvirus, y similares.

5 Un virus de la vacuna preferido es una cepa de Wyeth o derivado de la misma. Un derivado de la cepa de Wyeth incluye, pero no se limita a, derivados que carecen de un gen K1L funcional, y similares. En todavía otra realización, el virus es DryVax, disponible como una vacuna de la viruela procedente del Centers for Disease Control, Atlanta, GA. En otra realización, el poxvirus parental es una cepa de la viruela aviar, por ejemplo POXVAC-TC (Schering-Plough Corporation), y similar.

10 El poxvirus de la presente invención es capaz de infectar, transfectar o transducir células hospedantes en un hospedante. El hospedante incluye, pero no se limita a, mamíferos, incluyendo seres humanos, pájaros, peces y similares. Las células hospedantes son cualquier célula susceptible de infección, transfección o transducción por el poxvirus y capaces de expresar el poxvirus, incluyendo cualesquiera genes extraños insertados en él, a niveles funcionales.

15 El poxvirus de la presente invención tiene preferiblemente una baja eficiencia replicativa en la célula diana. Esto significa preferiblemente que no se producirá más de alrededor de 1 progenie por célula, todavía más preferiblemente, no más de 0,1 progenie por célula. La eficiencia de la replicación se puede determinar fácilmente de forma empírica determinando el título del virus tras la infección de la célula diana.

20 Como resultado de la baja eficiencia de replicación y de la naturaleza citoplásmica no integrante del vector, el sistema del vector no dará como resultado la replicación sostenida y la infección de otras células. De este modo, el vector poxvírico y las células transformadas no afectarán de forma adversa a células en el animal hospedante en localizaciones distantes de donde se encuentra la célula diana.

25 Para asegurar además que el vector poxvírico usado para un animal hospedante particular es avirulento en ese animal, se puede identificar fácilmente un vector vírico observando el intervalo de hospedantes del virus y la especificidad tisular. Por ejemplo, un método sería observar un intervalo de hospedantes naturales del virus. Preferiblemente, el vector vírico seleccionado procede de un virus cuyo intervalo primario de infección es para un animal hospedante distinto del animal en el que se va a usar el sistema de suministro génico. Por ejemplo, se puede usar viruela del cerdo como vector vírico cuando el hospedante es un primate tal como un ser humano. Sin embargo, para fines veterinarios en los que el hospedante es un cerdo, no sería preferible. Sin embargo, se pueden usar ciertas cepas muy atenuadas o modificadas tales como orthopoxvirus modificado (por ejemplo, la cepa MVA o NYVAC del virus de la vacuna o cepas genéticamente modificadas o seleccionadas para ser no virulentas en su intervalo de hospedantes normal o en una célula hospedante deseada) que no son virulentas en su intervalo de hospedantes normal. También se puede usar la especificidad tisular para identificar de forma preliminar la infecciosidad y la eficiencia de la replicación.

35 Cuando el hospedante es un ser humano, los vectores preferidos incluyen vectores poxvíricos, por ejemplo suipox, tal como viruela del cerdo, avipox tal como viruela aviar, viruela del canario, o viruela de la paloma, y capripoxvirus. Además, también se prefieren iridovirus, tales como virus de la rana, y virus de la fiebre del cerdo africano. En una realización, los vectores víricos preferidos para uso con células humanas son poxvirus avirulentos, no líticos, tales como avipox (Taylor, et al., Vaccine, 6:497-503 (1985) y Jenkins, et al., AIDS Research And Human Retroviruses 7:991-998 (1991)) y suipox (Feller, et al., Virology 183:578-585 (1991)).

45 Según la presente invención, cualquier ácido nucleico que codifique un antígeno asociado con cáncer de mama y/o una molécula inmunoestimulante se puede insertar en el vector poxvírico. Debido a que los poxvirus tienen un gran genoma, se pueden usar fácilmente para suministrar un amplio intervalo de material genético, incluyendo múltiples genes (es decir, actúan como un vector multivalente). Los tamaños de los vectores poxvíricos oscilan entre alrededor de 130-300 kpb con hasta 300 genes, dependiendo de la cepa del virus. Por lo tanto, es posible insertar grandes fragmentos de ADN extraño en estos virus y todavía mantener la estabilidad del genoma vírico. El tamaño del genoma poxvírico permite la construcción de los vectores de "arco iris" diseñados a la medida que codifican combinaciones individualizadas de antígeno/molécula inmunoestimulante para proporcionar un tratamiento diseñado a la medida para individuos con diferentes tipos o etapas de cáncer de mama.

50 En una realización, al menos se inserta en un vector poxvírico un fragmento de ácido nucleico que codifica una molécula que tiene valor terapéutico en el tratamiento del cáncer de mama. En otra realización, al menos se insertan en el vector poxvírico dos y hasta alrededor de diez ácidos nucleicos diferentes que codifican diferentes moléculas.

55 Por lo tanto, los vectores poxvíricos recombinantes útiles según la presente invención codifican uno o más antígenos asociados con cáncer de mama y, preferiblemente, también una o más moléculas coestimulantes se pueden evaluar o tratar mediante métodos descritos en la presente solicitud. Por ejemplo, el gen que codifica un antígeno asociado con cáncer de mama se incorpora en el genoma del poxvirus recombinante o porción del mismo junto con un gen que codifica una o más moléculas inmunoestimulantes. Como alternativa, el gen que codifica un antígeno asociado con cáncer de mama y el gen que codifica una o más moléculas inmunoestimulantes se incorporan en poxvirus

recombinantes distintos. El antígeno asociado con cáncer de mama se puede expresar sobre la superficie de una célula cancerosa, o puede ser un antígeno interno. En una realización, el antígeno asociado con el cáncer de mama es un antígeno asociado a tumores (TAA) o una porción del mismo.

5 No hace falta usar un gen o ácido nucleico que codifica una proteína completa, sino más bien sólo el dominio deseado, para los genes que codifican los PTAA, moléculas coestimulantes, moléculas accesorias, y citocinas de la presente invención. Por ejemplo, si se desea una reacción inmunitaria, sólo es necesario codificar el fragmento necesario para estimular la reacción inmunitaria.

Protocolos de sensibilización-refuerzo

10 La presente invención emplea un régimen de sensibilización-refuerzo, en el que un paciente recibe una "sensibilización" inicial con una composición que contiene uno o más vectores poxvíricos, seguido de uno o preferiblemente múltiples "refuerzos" con una composición que contiene uno o más vectores poxvíricos.

15 En un ejemplo de una sensibilización, un vector poxvírico individual se usa para el suministro de los PTAA y moléculas coestimulantes. En otra realización, dos o más vectores poxvíricos comprenden la vacunación de sensibilización, que se administra simultáneamente en una única inyección. Por ejemplo, la administración simultánea a un hospedante de una mezcla de dos vectores poxvíricos, al menos uno de los cuales es competente para la replicación. Si ambos vectores son defectuosos para la replicación, entonces no se verán transducidas tantas células por ambos virus. Un ejemplo de estrategia de mezclado es usar un primer vector que comprende un ADN que codifica al menos un antígeno asociado con cáncer de mama, y un segundo vector que comprende un ADN que codifica al menos una, preferiblemente tres, moléculas coestimulantes tales como TRICOM.

20 Las vacunaciones de refuerzo también pueden comprender uno o más vectores poxvíricos. En una realización preferida, un vector poxvírico individual se usa para el suministro de los PTAA y moléculas coestimulantes de la vacunación de refuerzo. En otra realización, dos o más vectores poxvíricos comprenden la vacunación de refuerzo, que se administran simultáneamente en una única inyección. Por ejemplo, administrando simultáneamente a un hospedante una mezcla de dos vectores poxvíricos, al menos uno de los cuales es competente para la replicación. Si ambos vectores son defectuosos para la replicación, entonces no habrá tantas células que serán transducidas por ambos virus. Un ejemplo de una estrategia de mezclado es usar un primer vector que comprende un ADN que codifica al menos un antígeno asociado con cáncer de mama, y un segundo vector que comprende un ADN que codifica al menos una, preferiblemente tres, moléculas coestimulantes tales como TRICOM.

30 Por ejemplo, el individuo se puede inmunizar al menos una vez con un primer vector poxvírico recombinante (sensibilización), tal como un vector poxvírico que posee el PTAA y preferiblemente al menos una molécula inmunomoduladora o coestimulante. En una realización preferida, se usan TRICOM o TRICOM y OX40L o TRICOM y OX40L y OX40. Las inmunizaciones subsiguientes se consideran parte del protocolo de refuerzo. Preferiblemente, los refuerzos se llevan a cabo con un segundo vector poxvírico recombinante usando un tipo diferente de poxvirus que codifica el antígeno o antígenos, y preferiblemente también la molécula o moléculas coestimulantes. Las inoculaciones se dan típicamente al menos un mes de diferencia. Se pueden incluir otras variaciones en el protocolo, incluyendo el uso de ADN que codifica el PTAA o una porción inmunogénica del mismo, la administración directa del PTAA o una porción inmunogénica del mismo, u otros vectores que contienen tales moléculas. Tal protocolo puede tener el péptido administrado como un refuerzo.

40 Preferiblemente, se usa un vector que no se replica o que tiene una replicación defectuosa, tanto para la sensibilización como para el refuerzo. En una combinación preferida, el refuerzo es un orthopox, por ejemplo el virus de la vacuna, preferiblemente un virus de la vacuna tal como la cepa del virus de la vacuna Wyeth. La revacunación es preferiblemente un vector avipox, tal como viruela aviar o una viruela del canario tal como ALVAC.

45 En seres humanos, los vectores del virus de la vacuna que incluyen vectores de vacunas atenuadas tales como MVA y NYVAC se pueden administrar varias veces. Otros poxvirus, tales como avipox, no provocan una respuesta de anticuerpo neutralizante en seres humanos, y de este modo se pueden administrar repetidamente sin ningún efecto adverso. A la hora de planificar un protocolo, esto se debe tener en cuenta. Típicamente, con estos tipos de cánceres, es necesaria la administración repetida. De este modo, se puede determinar si el sujeto ha sido expuesto previamente al virus de la vacuna (como en una vacuna de viruela), y a qué factor.

50 Un protocolo puede ser una sensibilización con un virus de la vacuna, tal como Wyeth o MVA, que codifica un PTAA(s) y al menos una molécula coestimulante, seguido de al menos 6 refuerzos con un avipox tal como viruela aviar que codifica un PTAA(s) y preferiblemente al menos una molécula coestimulante.

55 Como alternativa, las moléculas inmunoestimulantes se pueden administrar en un vehículo farmacéuticamente aceptable sin el vector poxvírico. Por ejemplo, un anticuerpo frente a OX40 se puede administrar a un individuo antes, después o simultáneamente con la inoculación con un poxvirus recombinante que codifica un antígeno asociado con cáncer.

En una realización preferida, el sistema de la presente invención comprende administrar a un hospedante un poxvirus recombinante que comprende un ADN que codifica al menos un antígeno relacionado con cáncer de mama

y al menos una molécula coestimulante.

En una realización particularmente preferida, descrita adicionalmente más abajo como Ejemplo 11, el vector de sensibilización es el virus de la vacuna Wyeth que posee los genes para wMUC-1(6), wCEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1, y el vector de refuerzo es viruela aviar que posee los genes para wMUC-1(6), wCEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1.

En otra realización, la presente invención proporciona un sistema que comprende administrar simultáneamente a un hospedante una mezcla de dos vectores poxvíricos, uno de los cuales es competente para la replicación. Si ambos vectores son defectuosos para la replicación, entonces no habrá tantas células que se verán transducidas por ambos virus. Un ejemplo de una estrategia de mezclamiento es usar un primer vector que comprende un ADN que codifica al menos un antígeno asociado con cáncer de mama, y un segundo vector que comprende un ADN que codifica al menos una molécula coestimulante. En una realización preferida, los dos ADN diferentes se insertan en vectores poxvíricos de diferentes géneros. Por ejemplo, el ADN que codifica el antígeno o antígenos asociados con cáncer de mama se inserta en un vector derivado de suipox, y el ADN que codifica la molécula o moléculas coestimulantes se inserta en un vector derivado de avipox.

El calendario para administrar los poxvirus de sensibilización y los virus de refuerzo incluyen típicamente la administración repetida a lo largo de intervalos regulares. El vector de refuerzo se puede administrar después de cada 2-4 semanas, por ejemplo durante un total de al menos 5-15 vacunaciones de refuerzo. Como se usa aquí, el número de refuerzos incluye todas las variantes dentro del intervalo de 5-15 refuerzos, incluyendo al menos 5, al menos 6, al menos 7 veces, etc. En una realización preferida, el sujeto recibe una vacunación con el vector de sensibilización, seguido después cada 2 semanas con el vector de refuerzo durante 6 refuerzos, seguido después por cada 4 semanas de refuerzos y continuando dependiendo de la progresión de la enfermedad.

El sistema de la presente invención es particularmente útil para generar reacciones inmunitarias mediadas por células frente a células cancerosas. En consecuencia, la presente descripción proporciona además un kit que tiene al menos un primer poxvirus recombinante que tiene incorporado en su genoma o porción del mismo un gen que codifica un antígeno específico de células de cáncer de mama, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El primer poxvirus recombinante también puede comprender uno o más genes que codifican una o más moléculas inmunoestimulantes o coestimulantes. Se describe además un kit que tiene, además del primer poxvirus recombinante, un segundo poxvirus recombinante que comprende uno o más genes que codifican una o más moléculas inmunoestimulantes, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El kit proporciona además recipientes, agujas para inyección, e instrucciones sobre cómo usar el kit. Adicionalmente, el kit también puede comprender un componente de diagnóstico que incluye sistemas de detección de mutaciones y/o sistemas para realizar perfiles de expresión. En un aspecto, el kit proporciona además un adyuvante, tal como GM-CSF, y/o instrucciones para uso de un adyuvante comercialmente disponible con los componentes del kit adquirido.

Una célula hospedante infectada con ambos virus recombinantes expresa tanto el antígeno o antígenos de cáncer de mama como la molécula o moléculas inmunoestimulantes. El antígeno se puede expresar en la superficie celular de la célula hospedante infectada. La molécula inmunoestimulante se puede expresar en la superficie celular, o se puede segregar activamente por la célula hospedante. La expresión tanto del antígeno como de la molécula inmunoestimulante proporciona el péptido restringido a MHC necesario a células T específicas, y la señal apropiada de la célula T para ayudar en el reconocimiento y proliferación del antígeno o expresión clonal de células T específicas del antígeno. El resultado global es un aumento del sistema inmunitario. En una realización preferida, el aumento de la respuesta inmunitaria es un incremento en linfocitos auxiliares T específicos del antígeno y/o linfocitos citotóxicos, que son capaces de exterminar o inhibir el crecimiento de una célula de cáncer de mama. En la realización preferida, la molécula o moléculas inmunoestimulantes y el antígeno o antígenos de cáncer de mama se proporcionan en el mismo vector poxvírico.

45 Construcción de vectores víricos

Las técnicas básicas para insertar genes en virus con conocidas por el experto, e implican, por ejemplo, la recombinación entre las secuencias de ADN vírico que flanquean un gen en un plásmido donante y las secuencias homólogas presentes en el virus parental (Mackett, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7415-7419 (1982)). Por ejemplo, un virus recombinante, tal como un poxvirus para uso en el suministro del gen, se puede construir en dos etapas conocidas en la técnica y análogas a los métodos para crear recombinantes sintéticos del virus de la viruela aviar descritos en la patente U.S. nº 5.093.258. Otras técnicas incluyen usar un sitio de endonucleasas de restricción único que está naturalmente presente o artificialmente insertado en el vector vírico parental.

En primer lugar, el ácido nucleico insertado en el virus se puede colocar en un plásmido, por ejemplo un constructo plasmídico de E. coli, en el que se ha insertado ADN homólogo a una sección de ADN tal como la del poxvirus. De forma separada, la secuencia génica de ADN a insertar se liga a un promotor. El enlazamiento promotor-gen se coloca en el constructo plasmídico de manera que el enlazamiento promotor-gen esté flanqueado en ambos extremos por ADN homólogo a una secuencia de ADN que flanquea una región del ADN del poxvirus que está en la región de inserción deseada. El constructo plasmídico resultante se amplifica entonces mediante crecimiento en bacterias de E. coli, y se aísla. Preferiblemente, el plásmido también contiene un origen de replicación, tal como el

origen de replicación de *E. coli*, y un marcador tal como un gen de resistencia a antibióticos, para la selección y propagación en *E. coli*.

5 En segundo lugar, el plásmido aislado que contiene la secuencia génica de ADN a insertar se transfiere a un cultivo celular, por ejemplo fibroblastos de embrión de pollito, junto con el poxvirus. La recombinación entre ADN de poxvirus homólogo en el plásmido y el genoma vírico da como resultado un poxvirus modificado por la presencia de un constructo de promotor-gen en su genoma, en un sitio que no afecta a la viabilidad del virus.

10 El gen se inserta en un sitio o región (región de inserción) en el virus que no afecta a la viabilidad vírica del virus recombinante resultante. El experto puede identificar fácilmente tales regiones en un virus, por ejemplo, ensayando al azar segmentos de ADN vírico en busca de regiones que permitan la formación recombinante sin afectar seriamente a la viabilidad vírica del recombinante.

15 Una región de inserción que se puede usar fácilmente y está presente en muchos virus es el gen de timidina cinasa, también denominado aquí como gen de TK. Por ejemplo, se ha encontrado en todos los genomas poxvíricos examinados [leporipoxvirus: Upton, et al., *J. Virology*, 60:920 (1986) (virus del fibroma de Chope); capripoxvirus: Gershon, et al., *J. Gen. Virol.*, 70:525 (1989) (oveja-1 de Kenia); orthopoxvirus: Weir, et al., *J. Virol.*, 46:530 (1983) (virus de la vacuna); Esposito, et al., *Virology*, 135:561 (1984) (virus de la viruela del mono y de la viruela); Hruby, et al., *PNAS*, 80:3411 (1983) (virus de la vacuna); Kilpatrick, et al., *Virology*, 143:399 (1985) (virus del tumor del mono de Java); avipoxvirus: Binns, et al., *J. Gen. Virol.* 69:1275 (1988) (viruela aviar); Boyle, et al., *Virology*, 156:355 (1987) (viruela aviar); Schnitzlein, et al., *J. Virological Methods*, 20:341 (1988) (viruela aviar, viruela de la codorniz); entomopox (Lytvyn, et al., *J. Gen. Virol.* 73:3235-3240 (1992)].

20 En la viruela aviar, además de la región de TK, otras regiones de inserción incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a lo siguiente: el fragmento de BamHI J [Jenkins, et al., *AIDS Research and Human Retroviruses* 7:991-998 (1991)] el fragmento de EcoRI-HindIII, fragmento de BamHI, fragmento de EcoRV-HindIII, fragmento de BamHI y el fragmento HindIII expuesto en la Solicitud EPO nº 0308220 A1. (Calvert, et al., *J. of Virol.* 67:3069-3076 (1993); Taylor, et al., *Vaccine* 6:497-503 (1988); Spehner, et al., (1990) y Bournnell, et al., *J. of Gen. Virol.* 71:621-628 (1990)). Otro poxvirus preferido útil según el sistema de tratamiento de la presente invención es un avipox, que incluye, pero no se limita a, viruela aviar, y viruela del canario, incluyendo ALVAC. Un virus avipox particularmente preferido es la viruela aviar.

30 Otros sitios de inserción de la viruela aviar particularmente preferidos de la presente invención se denominan el sitio de inserción de LUS, el sitio de inserción de FP14, y el sitio de inserción de 43K. Estos sitios también se denominan algunas veces como FPV006/FPV007 (sitio de inserción de LUS), FPV254/FPV255 (sitio de inserción de LUS), FPV060/FPV061 (sitio de inserción de FP14), y FPV107/FPV108 (sitio de inserción de 43K).

35 En una realización preferida, el sitio de inserción en la viruela aviar se denomina el sitio de inserción LUS. En la viruela aviar, hay dos secuencias únicas largas (LUS) en cada extremo del genoma vírico (número de acceso de Genbank AF 198100), y de este modo hay dos sitios de inserción LUS en cada genoma. El sitio de inserción de LUS en el extremo izquierdo del genoma está entre las posiciones 7470-7475 en la secuencia genómica de la viruela aviar, y se encuentra 3' de FPV006 y 5' de FPV007 125L. El sitio de inserción de LUS en el extremo derecho del genoma está entre las posiciones 281065 y 281070 en la secuencia genómica de la viruela aviar, y se encuentra 5' de FPV254 y 3' de FPV255. En esta realización, un inserto que representa una secuencia de interés se puede insertar en cualquier posición dentro del sitio de inserción especificado.

40 En otra realización preferida, el sitio de inserción en la viruela aviar se denomina el sitio de inserción FP14. Este sitio está entre las posiciones 67080-67097 en la secuencia genómica de la viruela aviar, y se encuentra en 5' de FPV060 y 3' de FPV061. En esta realización, la secuencia de ADN en el sitio de inserción específico, es decir, entre los nucleótidos, está suprimida en el virus recombinante y se sustituye por insertos definidos que representan una secuencia de interés.

45 En todavía otra realización preferida, el nuevo sitio de inserción en viruela aviar se denomina el sitio de inserción 43K. Este sitio está en la posición 128178 de la secuencia genómica de la viruela aviar, y se encuentra en 5' de FPV107 y 5' de FPV108. Estos genes se transcriben de forma divergente, y el sitio de inserción se encuentra entre los dos elementos promotores para los dos ORFs. En esta realización, un inserto que representa una secuencia de interés se puede insertar en esta posición dentro del genoma de la viruela aviar.

50 Las regiones de inserción de la viruela aviar particularmente preferidas son la región FP 14 y la región BamHI J. En un vector preferido, los antígenos asociados con cáncer de mama CEA y MUC-1 se insertan en la región FP14, y las moléculas coestimulantes LFA-3, ICAM-1, y B7.1 se insertan en la región BamHI J.

55 En una realización preferida, el sitio de inserción en el virus de la vacuna se denomina sitio de inserción 44/45. Este sitio de inserción se identificó primeramente en MVA, en el que el sitio de inserción 44/45 se encuentra entre ORFs 044L y 045L, y el sitio de inserción está entre las posiciones 37346-37357 en la secuencia genómica de MVA (número de acceso de Genbank U94848). Esta región está 5' del codón de partida traduccional de MVA 044L y 3' del codón de parada traduccional de MVA 045L. En el virus de la vacuna Copenhague, para el sitio de inserción 44/45 los ORFs correspondientes son F14L (homólogo a MVA 044L) y F15L (MVA 045L), y el sitio de inserción está

5' del codón de partida traduccional del virus de la vacuna F14L y 3' del codón de parada traduccional del virus de la vacuna F15L. El virus de la vacuna Copenhague, que contiene esta región y tiene secuencia disponible como número de acceso Genbank M35027, es un virus de la vacuna prototípico. El sitio de inserción análogo a sitios tales como 44/45 también se puede usar en otras cepas del virus de la vacuna, incluyendo el virus de la vacuna Wyeth, NYVAC (en el que no se sabe que el sitio de inserción esté modificado) y TROYVAC. En esta realización, la secuencia de ADN en el sitio de inserción específico, es decir, entre los nucleótidos, está suprimida en el virus recombinante y está sustituida por insertos definidos que representan una secuencia de interés.

Otro sitio de inserción útil según la presente invención es el sitio de inserción en el virus de la vacuna denominado sitio de inserción 49/50. Este sitio de inserción se identificó primeramente en MVA, en el que el sitio de inserción 49/50 está entre los ORFs 049L y 050L, y el sitio de inserción está entre las posiciones 42687-42690 en la secuencia genómica de MVA (número de acceso Genbank U94848). Esta región está 5' del codón de partida traduccional de MVA 049L y 3' del codón de parada traduccional de MVA 050L. En el virus de la vacuna Copenhague, para el sitio de inserción 49/50, los ORFs correspondientes son E2L (homólogo a MVA 049L) y E3L (MVA 050L), y el sitio de inserción está 5' del codón de partida traduccional de E2L del virus de la vacuna y 3' del codón de parada traduccional de E3L del virus de la vacuna. El virus de la vacuna Copenhague es un virus de la vacuna prototípico. De forma similar, el sitio de inserción 49/50 también se puede usar en otras cepas del virus de la vacuna, incluyendo NYVAC (en el que no se conoce que el sitio de inserción esté modificado) y TROYVAC. En esta realización, la secuencia de ADN en el sitio de inserción específico, es decir, entre los nucleótidos, está suprimida en el virus recombinante y está sustituida por insertos definidos que representan una secuencia de interés.

En todavía otra realización preferida, el sitio de inserción en el virus de la vacuna se denomina sitio de inserción 124/125. Este sitio de inserción se identificó primeramente en MVA, en el que el sitio de inserción 124/125 está entre los ORFs 124L y 125L, y el sitio de inserción está entre las posiciones 118481 – 118482 en la secuencia genómica de MVA (número de acceso Genbank U94848). Esta región está 5' del codón de partida traduccional de MVA 124L y 3' del codón de parada traduccional de MVA 125L. En el virus de la vacuna Copenhague, para el sitio de inserción 124/125, los ORFs correspondientes son A13L (homólogo a MVA 124L) y A14L (MVA 125L), y el sitio de inserción está 5' del codón de partida traduccional de A13L del virus de la vacuna y 3' del codón de parada traduccional de A14L del virus de la vacuna. De forma similar, el sitio de inserción 124/125 también se puede usar en otras cepas del virus de la vacuna, incluyendo NYVAC (en el que no se conoce que el sitio de inserción esté modificado) y TROYVAC. En esta realización, la secuencia de ADN en el sitio de inserción especificado, es decir, entre los nucleótidos, está suprimida en el virus recombinante y está sustituida por insertos definidos que representan una secuencia de interés.

Además del requisito de que el gen esté insertado en un sitio de inserción, la expresión exitosa del gen o genes insertados por el poxvirus recombinante modificado requiere la presencia de un promotor enlazado operablemente al gen deseado, es decir, en la relación apropiada al gen insertado. El promotor se debe colocar de manera que esté situado en dirección 5' del gen a expresar. Los promotores son bien conocidos en la técnica y se pueden seleccionar dependiendo del hospedante y del tipo celular que se desea seleccionar como diana.

Por ejemplo, en poxvirus, se pueden usar promotores poxvíricos, incluyendo, pero sin limitarse a, el promotor 7.5K del virus de la vacuna, el promotor 30K del virus de la vacuna, el promotor 40K del virus de la vacuna, el promotor I3 del virus de la vacuna. Otros promotores preferidos incluyen el promotor temprano/tardío sintético (sE/L) y el promotor 7.5. También se pueden usar elementos potenciadores en combinación, para incrementar el nivel de expresión. Además, en algunas realizaciones se prefiere el uso de promotores inducibles, que también son bien conocidos en la técnica.

Los promotores útiles según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, promotores poxvíricos tales como un promotor entomopox, un promotor avipox, o un promotor orthopox tal como un promotor del virus de la vacuna, por ejemplo, HH, 11K o Pi. Por ejemplo, el promotor Pi de la región Ava I H del virus de la vacuna, se describe en Wachsmann et al., J. of Inf. Dis. 155, 1188-1197 (1987). Más particularmente, este promotor deriva del fragmento Ava I H(Xho I G) de la cepa del virus de la vacuna WR variante L, en el que el promotor dirige la transfección de derecha a izquierda. La localización del promotor en el mapa es aproximadamente 1,3 Kpb (kilopares de bases) desde el extremo 5' de Ava IH, aproximadamente 12,5 Kpb desde el extremo 5' del genoma del virus de la vacuna, y alrededor de 8,5 Kpb de 5' de la unión Hind III C/N. La secuencia del promotor Hind III H (también "HH" y "H6" aquí) está en dirección 5' del marco de lectura abierto H6 por Rosel et al., J. Virol. 60, 436-449 (1986). El promotor 11K es como se describe por Wittek, J. Virol. 49, 371-378 (1984) y Bertholet, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2096-2100 (1985). Se puede aprovechar si el promotor es un promotor temprano o tardío para cronometrar la expresión de genes particulares. Adicionalmente, como se explica más abajo, se pueden usar promotores inducibles.

La presente invención también proporciona un vector poxvírico en el que el promotor está modulado por un factor o pista externo, que permite el control del nivel de polipéptido que se produce por los vectores mediante la activación de ese factor o pista externo. Por ejemplo, las proteínas de choque térmico son proteínas codificadas por genes en los que el promotor está regulado por la temperatura. El promotor del gen que codifica la proteína que contiene metal metalotioneína es sensible a iones Cd+. La incorporación de este promotor u otro promotor influido por pistas externas también hace posible regular la producción de las proteínas.

En otra realización preferida, el genoma poxvírico se modifica para que posea un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado con cáncer de mama que está operablemente enlazado a un promotor "inducible". Tales sistemas inducibles permiten la regulación cuidadosa de la expresión génica. Véase, Miller y Whelan, Human Gene Therapy, 8:803-815 (1997). La frase "promotor inducible" o "sistema inducible", como se usa aquí, incluye sistemas en los que la actividad del promotor se puede regular usando un agente suministrado de forma externa. Tales sistemas incluyen, por ejemplo, sistemas que usan el represor lac de E. coli como modulador de la transcripción para regular la transcripción a partir de promotores de células de mamífero que poseen el operador lac (Brown et al. Cell, 49:603-612, 1987); sistemas que usan el represor de tetraciclina (tetR) (Gossen y Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551, 1992; Yao et al., Human Gene Ther. 9:1939-1950, 1998; Shokelt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6522-6526, 1995). Otros de tales sistemas incluyen el dímero FK506, VP16 o p65 que usa castradiol, RU486/mifepristona, difenol muristerona o rapamicina (véase, Miller y Whelan, más arriba, en la Figura 2). Aún otro ejemplo es un sistema inducible por ecdisona (véase, por ejemplo, Karns et al, MBC Biotechnology 1:11,2001). Los sistemas inducibles están disponibles, por ejemplo, de Invitrogen, Clontech, y Ariad. Se prefieren sistemas que usan un represor con el operón. Se podrían adaptar estos promotores sustituyendo porciones de los promotores poxvíricos para el promotor de mamífero.

Una realización de la presente invención proporciona el uso de un elemento regulador tal como un elemento regulador transcripcional o un potenciador.

En una realización preferida de la presente invención, un "elemento regulador transcripcional" o "TRE" se introduce para la regulación del gen de interés. Como se usa aquí, un TRE es una secuencia polinucleotídica, preferiblemente una secuencia de ADN, que regula (es decir, controla) la transcripción de una secuencia polinucleotídica enlazada operablemente mediante una ARN polimerasa para formar ARN. Como se usa aquí, un TRE aumenta la transcripción de una secuencia polinucleotídica enlazada operablemente en una célula hospedante que permite que funcione el TRE. El TRE comprende un elemento potenciador y/o un elemento promotor poxvírico, que puede derivar o no del mismo gen. Los componentes promotor y potenciador de un TRE pueden estar en cualquier orientación y/o distancia de la secuencia codificante de interés, y comprenden multímeros de los anteriores, en tanto que se obtenga la actividad transcripcional deseada. Como se explica aquí, un TRE puede carecer o no de un elemento silenciador. Por ejemplo, el elemento regulador específico de la glándula mamaria proporciona un grupo de TRE útil según la presente invención. Un ejemplo es un promotor de alfa-lactalbúmina (ALA) humana (para el constructo específico, véase, por ejemplo, Anderson et al. Cancer Gene Ther 7:845-852, 2000).

Otra realización preferida de la presente invención proporciona un "potenciador" para la regulación del gen de interés. Un potenciador es un término bien comprendido en la técnica, y es una secuencia polinucleotídica derivada de un gen que incrementa la transcripción de un gen que está enlazado operablemente a un promotor en un grado que es mayor que la activación de transcripción efectuada por el propio promotor cuando está enlazado operablemente al gen, es decir, incrementa la transcripción desde el promotor.

La activación transcripcional se puede medir de muchas maneras conocidas en la técnica (y descritas con más detalle más abajo), pero generalmente se mide mediante detección y/o cuantificación de ARNm o el producto proteico de la secuencia codificante bajo control de (es decir, enlazada operativamente a) el elemento regulador. Como se explica aquí, el elemento regulador puede tener longitudes variables, y puede ser de composición de secuencia variable. Mediante activación transcripcional, se pretende que la transcripción se incrementará por encima de los niveles basales en la célula diana en al menos alrededor de 2 veces, preferiblemente al menos alrededor de 5 veces, preferiblemente al menos alrededor de 10 veces, más preferiblemente al menos alrededor de 20 veces. Más preferiblemente al menos alrededor de 50 veces, más preferiblemente al menos alrededor de 100 veces, incluso más preferiblemente al menos alrededor de 200 veces, incluso más preferiblemente al menos alrededor de 400 a alrededor de 500 veces, incluso más preferiblemente al menos alrededor de 1000 veces. Los niveles basales son generalmente el nivel de actividad, si la hay, en células no diana, o el nivel de actividad (si la hay) de un constructo informador que carece del TRE de interés según se ensaya en un tipo de célula diana.

En la presente invención, los vectores poxvíricos dirigidos a células diana de cáncer específicas también se pueden generar con el uso de TREs que son preferentemente funcionales en las células tumorales diana. En esta realización, el vector o vectores poxvíricos se administran directamente al sitio del tumor (es decir, inyecciones intratumorales), y se desea una reacción directa local. Los ejemplos no limitantes de TREs heterólogos específicos de células tumorales, y los ejemplos no limitantes de células de cáncer de mama diana potenciales respectivas, incluyen TREs de los siguientes genes: glucoproteína similar a mucina DF3 (MUC-1), antígeno carcinoembrionario (CEA), urocinasa de activador de plasminógeno (uPA) y su gen receptor (cánceres de mama, colon e hígado), y HER-2/neu (c-erbB2/neu).

En la presente invención, los TREs específicos del tumor se pueden usar conjuntamente con TREs específicos del tumor tales como receptor del factor de crecimiento endotelial vascular. Otros TREs específicos tisulares son conocidos en la técnica.

Genes adicionales

Un grupo preferido de ácidos nucleicos para inserción en el vector poxvírico útil según la presente invención codifica

anticuerpos. Los anticuerpos se han usado desde hace mucho tiempo en la ciencia biomédica como herramientas in vitro para la identificación, purificación y manipulación funcional de antígenos diana. Los anticuerpos se han explotado in vivo para aplicaciones tanto de diagnóstico como terapéuticas. En muchos casos se conocen el aminoácido específico e incluso las secuencias nucleotídicas de las porciones relevantes de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, se puede producir un poxvirus que codifica al menos las CDRs de los fármacos contra el cáncer de tipo anticuerpo monoclonal rituximab, trastuzumab y cetuximab. Un poxvirus puede codificar anticuerpos tetrámeros de longitud completa o anticuerpos monocatenarios. En una realización, los avances recientes en ingeniería de anticuerpos han permitido ahora que se manipulen genes que codifican anticuerpos de manera que el dominio de unión al antígeno se pueda expresar también intracelularmente. Estos anticuerpos se llaman "intracuerpos" (Marasco et al. Gene Therapy, 4:11-15, 1997; patentes U.S. n^{os} 5.965.371; 5.851.829; 6.329.173; y 6.072.036). Preferiblemente, los ácidos nucleicos que codifican intracuerpos codifican un anticuerpo humanizado monocatenario. Un anticuerpo preferido es un anticuerpo contra OX40 como se describe anteriormente (intracuerpo de OX40).

Administración de vectores poxvíricos

La introducción del vector vírico que posee el gen a suministrar a la célula hospedante diana se puede efectuar por cualquier método conocido por aquellos de pericia en la técnica.

La administración del poxvirus recombinante de la invención puede ser "profiláctica" o "terapéutica", dependiendo del sujeto. Cuando se proporciona profilácticamente, el poxvirus recombinante de la presente invención se proporciona antes de la formación del tumor, para permitir que el sistema inmunitario del individuo luche contra un tumor que el individuo es susceptible de desarrollar. Por ejemplo, los individuos con susceptibilidad a cáncer hereditario son un grupo preferido de pacientes tratados con tal inmunización profiláctica, otro grupo es aquel que se ha expuesto a agentes medioambientales que están relacionados con tal cáncer o viven en un "punto caliente" o agrupamiento de tumores de mama.

La administración profiláctica del poxvirus recombinante sirve para prevenir, mejorar o retrasar el cáncer de mama. Cuando se proporciona terapéuticamente, el poxvirus recombinante se proporciona en o después del diagnóstico de cáncer de mama. De este modo, la presente invención se puede proporcionar ya sea antes del cáncer de mama anticipado o después del inicio de la formación del tumor de mama.

Para la administración a un sujeto, el poxvirus de la presente invención se prepara como un inóculo. El inóculo se prepara típicamente como una disolución en un diluyente tolerable (aceptable) tal como disolución salina, disolución salina tamponada con fosfato u otro diluyente fisiológicamente tolerable, y similar, para formar una composición farmacéutica acuosa. La formulación también puede contener glicerol al 10% como estabilizante o crioprotector, puesto que muchas preparaciones víricas requieren el almacenamiento en un estado congelado.

La vía de inoculación puede ser escarificación, intravenosa (I.V.), intramuscular (I.M.), subcutánea (S.C.), intradérmica (I.D.), intraperitoneal (I.P.), intratumoral, y similar, que da como resultado la provocación de una respuesta protectora frente al agente que provoca la enfermedad. En una realización preferida, se usa la administración subcutánea. La dosis se administra al menos una vez. Se pueden administrar dosis subsiguiente según se indique.

El poxvirus se puede administrar directamente en el tumor, por ejemplo mediante inyección intratumoral, en el que se desea una reacción local directa, o el poxvirus se puede administrar en un sitio distinto del tumor, por ejemplo mediante inyección subcutánea. La inyección subcutánea ofrece conveniencia y es la vía de administración particularmente preferida.

A la hora de proporcionar a un mamífero con el poxvirus recombinante de la presente invención, preferiblemente un ser humano, la dosis de poxvirus recombinante administrado variará dependiendo de factores tales como la edad, peso, altura, sexo, estado médico general, historial médico previo, progresión de la enfermedad, carga tumoral, y similares, del mamífero.

La expresión "dosis unitaria", según pertenece al inóculo, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de poxvirus recombinante calculada para producir el efecto inmunogénico deseado en asociación con el diluyente requerido. Las especificaciones para la nueva dosis unitaria de un inóculo de esta invención están dictadas por, y dependen de las características únicas del virus recombinante y del efecto inmunológico particular a lograr.

En general, es deseable proporcionar al receptor una dosis de virus recombinante en el intervalo de alrededor de 10^5 a alrededor de 10^{10} unidades formadoras de placas (pfu), aunque se puede administrar una dosis más pequeña o más grande. Una dosis preferida es alrededor de 2×10^8 pfu, por ejemplo en un volumen de alrededor de 0,5 ml.

Se podría inyectar una cantidad suficiente de los vectores víricos para obtener una concentración sérica en el órgano de interés de la proteína que oscile entre alrededor de 1 pg/ml a 20 µg/ml. Más preferiblemente, entre alrededor de 0,1 µg/ml a 10 µg/ml. Todavía más preferiblemente, entre alrededor de 0,5 µg/ml y 10 µg/ml.

Los ejemplos de métodos para administrar el poxvirus recombinante a mamíferos incluyen, pero no se limitan a, exposición de las células tumorales al virus recombinante ex vivo, o inyección del virus recombinante en el hospedante afectado mediante administración intravenosa, S.C., I.D. o I.M. del virus. Como alternativa, el virus recombinante o combinaciones de vectores recombinantes se puede administrar localmente mediante inyección directa en la lesión cancerosa o tumor, o mediante aplicación tópica en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La cantidad de poxvirus recombinante que posee la secuencia de ácido nucleico de uno o más antígenos en combinación con las secuencias de ácido nucleico que codifican múltiples moléculas coestimulantes a administrar se basa en el título de las partículas víricas. Un intervalo preferido del inmunógeno a administrar es alrededor de 10^5 a 10^{12} (por ejemplo, alrededor de 10^7 a 10^{10} unidades formadoras de placa (pfu) por sujeto. La equivalencia de pfu a partículas víricas difiere según el método de titulación de pfu específico usado, aunque habitualmente un pfu es igual a alrededor de 5 a 100 partículas víricas. Si el mamífero a inmunizar ya está afectado con cáncer o cáncer metastásico, la vacuna se puede administrar conjuntamente con otros tratamientos terapéuticos, tal como quimioterapia o radiación.

El calendario para la administración de los vectores poxvíricos implica típicamente la administración repetida del vector de refuerzo, como se describe anteriormente. Por ejemplo, el vector de sensibilización inicial se puede administrar 1-3 veces, por ejemplo cada 2-4 semanas, durante un total de 6-12 semanas. El vector de refuerzo se administra entonces cada 2-4 semanas después, por ejemplo durante un total de al menos 5-15 vacunaciones de refuerzo. En una realización preferida, el sujeto recibe una vacunación con el vector de sensibilización, seguido después cada 2 semanas con el vector de refuerzo durante 6 refuerzos, seguido de cada 4 semanas después y continuando dependiendo del progreso de la enfermedad.

El sistema de la invención se puede usar ventajosamente en combinación con otro régimen de tratamiento para cáncer de mama. Los tratamientos para cáncer de mama son bien conocidos en la técnica, y continúan desarrollándose. Los tratamientos incluyen, pero no se limitan a, cirugía, incluyendo disección axilar, biopsia del ganglio linfático centinela, cirugía reconstructiva, cirugía para aliviar los síntomas de cáncer avanzado, lumpectomía (también denominada terapia de conservación de mama), mastectomía parcial (segmentaria), mastectomía simple o total, mastectomía radical modificada, y mastectomía radical; terapia hormonal usando un fármaco tal como tamoxifeno, que bloquea los efectos de estrógeno; inhibidores de aromataza, que impiden que el cuerpo forme estrógenos; inmunoterapia, por ejemplo usando Herceptin™ (trastuzumab), y anticuerpo monoclonal humanizado anti-HER2, desarrollado para bloquear el receptor de HER2; trasplante de médula ósea; terapia de células madre de sangre periférica; biofosfonatos; agentes de quimioterapia adicionales; terapia de radiación; acupresión; y acupuntura. Cualquier combinación de terapias se puede usar conjuntamente con la presente invención.

La Figura 12 proporciona un sumario amplio de opciones de tratamiento típicas para cada etapa de cáncer de mama, incluyendo el número estimado de nuevos casos para el año 2004 y las tasas de supervivencia de 5 años estimadas (basadas en SEER Cancer Statistics Review, 1975-2001, NCDB, CoC, ACoS, American Cancer Society, AJCC Cancer Staging Manual, Quinta Edición).

Continúan desarrollándose nuevos tratamientos para cánceres, incluyendo cánceres de mama. Los vectores poxvíricos de la presente invención se pueden usar con cualquiera de tales nuevas terapias. Por ejemplo, Gemzar, Tarceva, Avastina, y Targretina.

Los agentes de quimioterapia particularmente preferidos para uso en combinación con los vectores poxvíricos de la presente invención incluyen doxorubicina, paclitaxel, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida, y tamoxifeno.

En una realización particularmente preferida, el sistema del vector poxvírico PANVAC™-VF, descrito más abajo en el Ejemplo 11 y en la Tabla 1, se usa en combinación con quimioterapia. En una realización preferida, el agente de quimioterapia es docetaxel.

El sistema de la presente invención es particularmente ventajoso a la hora de tratar individuos cuyas células cancerosas no son sensibles a hormonas y por lo tanto no responden a, por ejemplo, tratamiento con tamoxifeno o a ovariectomía. La invención también se puede usar en el tratamiento de cáncer que no sobreexpresa HER2 y por lo tanto no es sensible al tratamiento anti-HER2. La invención también proporciona una opción de tratamiento útil para etapas tempranas de cáncer y cáncer recurrente. Otro cáncer diana útil es una forma heredada de cáncer de mama provocada por mutaciones, tales como las mutaciones descritas anteriormente.

Además, como se sabe en la técnica, el diagnóstico del cáncer de mama se divide en diversas etapas, cáncer de mama inflamatorio y cáncer recurrente. La etapa temprana se denomina Etapa 0, que incluye carcinoma ductal in situ (DCIS) y carcinoma lobular in situ (LCIS) o más apropiadamente "neoplasia lobular". DCIS es una neoplasia no invasiva de origen ductal que puede progresar hasta cáncer invasivo en algunos casos. Tradicionalmente, la mastectomía se ha usado para tratar DCIS. Recientemente también se ha usado lumpectomía (cirugía de conservación de mama) con terapia de irradiación consiguiente. No se sabe que LCIS sea una lesión premaligna, sino más bien un marcador que identifica a las mujeres con un riesgo creciente de desarrollo subsiguiente de cáncer de mama invasivo. Los pacientes son tratados a menudo con tamoxifeno, que se ha demostrado que previene la aparición de cáncer en grupos de riesgo. En algunos casos se lleva a cabo la mastectomía total.

Por ejemplo, si el paciente se diagnostica con DCIS, el sistema de la presente invención se puede usar en combinación con lumpectomía con o sin irradiación, preferiblemente sin irradiación. El sistema de la presente invención es particularmente útil a la hora de tratar LCIS en casos en los que la neoplasia no está asociada con células precancerosas sensibles a estrógenos. El sistema de la presente invención se puede usar en combinación con o en lugar de terapia de tamoxifeno en pacientes diagnosticados con LCIS, preferiblemente en combinación con tamoxifeno, para evitar intervenciones quirúrgicas radicales y el sufrimiento físico y psicológico asociado por el paciente.

El tratamiento de cáncer de mama metastásico implica habitualmente la terapia hormonal y/o la quimioterapia con o sin trastuzumab. La terapia de radiación y/o cirugía pueden estar indicadas para pacientes con metástasis sintomáticas limitadas. La presente invención proporciona una herramienta adicional o alternativa a intervenciones quimioterapéuticas más tóxicas al proporcionar un sistema para provocar al propio sistema inmunitario del hospedante contra a las células tumorales. El sistema de la presente invención es particularmente útil para tratar etapas avanzadas del cáncer de mama (metastásico) conjuntamente con agentes anti-angiogénicos y/o terapia hormonal, debido a que tales agentes y terapia, a diferencia de los agentes quimioterapéuticos, no afectan de manera adversa al sistema inmunitario.

Otros ejemplos de fármacos anticancerosos que se pueden usar en las diversas realizaciones de la invención, incluyendo composiciones farmacéuticas y formas de dosificación y kits de la invención, incluyen, pero no se limitan a: acivicina; aclarrubicina; hidrocloreto de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; hidrocloreto de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sodio; bropirimina; busulfano; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; hidrocloreto de carrubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; hidrocloreto de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquona; docetaxel; doxorubicina; hidrocloreto de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; hidrocloreto de eflornitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; hidrocloreto de epirubicina; erbulozol; hidrocloreto de esorubicina; estramustina; fosfato de estramustina sódica; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; hidrocloreto de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sodio; gemcitabina; hidrocloreto de gemcitabina; hidroxiurea; hidrocloreto de idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; interleucina II (incluyendo interleucina II recombinante, o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-I a; interferón gamma-I b; ioplatino; hidrocloreto de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; hidrocloreto de liarozol; lometrexol sodio; lomustina; hidrocloreto de losoxantrona; masoprocol; maitansina; mecloretamina, hidrocloreto de óxido de mecloretamina, hidrocloreto de retamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sodio; metoprina; meturedpa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; hidrocloreto de mitoxantrona; ácido mifofenólico; nocodazol; nogalamina; ormaplatino; oxisurano; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamicina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromano; pipsulfano; hidrocloreto de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfimer sodio; porfiromicina; prednimustina; hidrocloreto de procarbazona; puromicina; hidrocloreto de puromicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; hidrocloreto de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sodio; esparsomicina; hidrocloreto de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan sodio; tegafur; hidrocloreto de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; hidrocloreto de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfim; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; hidrocloreto de zorrubicina, improsulfano, benzodepa, carboquona, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida, trimetilolomelamina, clornafazina, novembiquina, fenesterina, trofosfamida, estermustina, clorozotocina, gemzar, nimustina, ranimustina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, aclacinomicinas, actinomicina F(1), azaserina, bleomicina, carubicina, carzinofilina, cromomicina, daunorrubicina, daunomicina, 6-diazo-5-oxo-1-norleucina, doxorubicina, olivomicina, plicamicina, porfiromicina, puromicina, tubercidina, zorrubicina, denopterina, pteropterina, 6-mercaptopurina, ancitabina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, encitabina, pulmozima, aceglatona, aldofosfamida glucósido, bestrabucilo, defofamida, demecolcina, eflornitina, acetato de eliptinio, etoglucida, flutamida, hidroxiurea, lentinano, fenamet, ácido podofilínico, 2-etil-hidrazida, razoxano, espirogermanio, tamoxifeno, ácido tenuazónico, triazuona, 2,2',2"-triclorotrietilamina, uretano, vinblastina, vincristina, vindesina y agentes relacionados. 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarrubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografolida; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína morfogenética anti-dorsalizante 1; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastona; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores del gen de apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatocina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL;

benzoclorinas; benzoilestaurosporina; derivados de beta lactama; beta-aletina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; IL-2 de la viruela del canario; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboximidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína cinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetrorelix; clorinas; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; dehidrodidemina B; deslorrelina; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamilo; diaziquna; didemina B; didox; dietilnoespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxifluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselena; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; episterida; análogo de estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de estrógeno; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezlastina; fluasterona; fludarabina; hidrocloreuro de fluorodanuronicinas; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; gadolinio texafirina; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatona; hepsulfam; heregulina; hexametileno bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeneo; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunostimulantes; inhibidor del receptor del factor 1 de crecimiento semejante a insulina; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; yobenguano; yododoxorrubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplacínolida; kahalalida F; triacetato de lamelarina-N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptolestatina; letrozol; factor inhibidor de leucemia; alfa interferón de leucocitos; leuprolida+estrógeno+progesterona; leuprorrelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos de platino lipófilos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecán; lutecio texafirina; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinasas de la matriz; menogarilo; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario desparejado; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; mitoxina factor de crecimiento de fibroblastos-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotrofina coriónica humana; monofosforil lípido A+pared celular de miobacteria sk; mopidamol; inhibidor del gen de resistencia a múltiples fármacos; terapia a base de supresor 1 de múltiples tumores; agente de mostaza anti-cáncer; micaperóxido B; extracto de pared celular micobacteriana; miriaporona; N-acetilidinalina; benzamidas N-sustituídas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorrubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutral; nilutamida; nisamicina; modulador de de óxido nítrico; antioxidante de nitróxido; nitrulina; 06-bencilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor de citosina oral; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; taxel; análogos de taxel; derivados de taxel; palauamina; palmitoilrixoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; pentosan polisulfato de sodio; pentostatina; pentozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perilífico; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; hidrocloreuro de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor del activador de plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfimer sodio; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores de proteasoma; modulador inmunitario a base de proteína A; inhibidor de proteína cinasa C; inhibidores de proteína cinasa C, microalgal; inhibidores de proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polietileno y hemoglobina piridoxilado; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de ras farnesil proteína transferasa; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; RII retinamida; roglitimida; rohitukina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxilo; safangol; saintopina; SarCNU; sarcófitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de senescencia; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de la transducción de señales; proteína de unión a antígeno de una sola cadena; sizofirán; sobuzoxano; borocaptato sódico; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiostatina 1; esqualamina; inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiamicina; inhibidores de estromelina; esulfinosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramin; swainsonina; glucosaminoglucanos sintéticos; talimustina; tamoxifeno metioduro; tauromustina; tazaroteno; tecogalán sodio; tegafur; telurapirilio; inhibidores de telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinano; hormona estimulante de tiroide; estaño etil etiopurpurina; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor de células madre totipotentes; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetrón; turosterida; inhibidores de tirosina cinasa; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor de crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de urocina; vapreotida; variolina B; sistema vectorial, terapia génica eritrocítica; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y zinostatina estimalamer. Los fármacos contra el cáncer adicionales preferidos son 5-fluorouracilo y leucovorina. Las sustancias terapéuticas contra el cáncer adicionales incluyen anticuerpos monoclonales tales como rituximab, trastuzumab y cetuximab.

La magnitud de una dosis profiláctica o terapéutica de cada ingrediente activo en el tratamiento de un paciente con un tumor sólido variará típicamente con los ingredientes activos específicos, la gravedad y tipo de tumor, y la vía de administración. La dosis y la frecuencia de la dosis pueden variar según la edad, peso corporal, respuesta, y la historia médica pasada del paciente; igualmente se debe considerar la probabilidad de recurrencia metastásica. Los regímenes de dosificación adecuados se pueden seleccionar fácilmente por aquellos expertos en la técnica con la consideración debida de tales factores siguiendo, por ejemplo, dosificaciones dadas a conocer en la bibliografía y recomendadas en el Physician's Desk Reference® (54ª ed., 2000). Excepto que se indique de otro modo, la magnitud de una dosis profiláctica o terapéutica de cada sustancia farmacéutica usada en una realización de la invención será aquella que los expertos en la técnica saben que es segura y eficaz, o está aprobada en la normativa.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un poxvirus recombinante, incluyendo un poxvirus recombinante, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Además de ser un sistema de tratamiento sin prácticamente efectos secundarios tóxicos, el efecto del material genético suministrado usando el sistema de la invención se puede monitorizar y regular fácil y cuidadosamente. Los vectores poxvíricos preferidos, tales como viruela del cerdo, sólo expresan el material genético durante alrededor de dos semanas. De este modo, si se proporciona tratamiento eficaz dentro de ese marco de tiempo y debido a que el sistema vectorial es autolimitante, no se producirá material innecesario después de ese período de tiempo. Cuando se necesiten dosificaciones adicionales, la administración adicional del material se puede lograr repitiendo la inyección. Como se describe anteriormente, en ciertos casos, la adición de un segundo, tercer, etc., material antigénico o inmunoestimulante también se puede añadir con los vectores subsiguientes.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: rV-MUC-1

rV-MUC-1 consiste en un virus de la vacuna recombinante vivo que expresa el antígeno tumoral MUC-1 humano. MUC-1 está sobreexpresado en un número de cánceres, incluyendo mama, ovario, y carcinomas pancreáticos. Además, la glucosilación anormal de MUC-1 en células de carcinoma hace a MUC-1 derivada de tumores antigénicamente distinta de MUC-1 normal.

En resumen, el virus parental usado para la generación de la vacuna de rV-MUC-1 se fue un aislado en placas procedente del lote de siembra de virus usado por Wyeth para producir la vacuna de la viruela Dryvax® autorizada. rV-MUC-1 se construyó vía recombinación homóloga *in vivo* entre el ADN del virus de la vacuna parental y un vector plasmídico que contiene el gen de MUC-1. El vector plasmídico también tiene el gen *lacZ* de *E. coli*, que se insertó simultáneamente en el genoma recombinante con el gen de MUC-1. Se usó un ensayo cromogénico para β -galactosidasa, codificada por el gen *lacZ*, para seleccionar el candidato de vacuna final, que se verificó mediante análisis de expresión genómica y proteica. El virus recombinante se usó entonces para generar un lote de virus maestro, que se caracterizó mediante análisis de expresión genómica y proteica y mediante ensayo en busca de la potencia, esterilidad, micoplasma, y actividad de transcriptasa inversa. Todos los resultados de los ensayos han sostenido la identidad y seguridad del virus recombinante para uso en la producción de la vacuna.

El vector plasmídico (pT2137) usado para la inserción del gen de MUC-1 en el genoma del virus de la vacuna parental mediante recombinación *in vivo* se ilustra en la Figura 1. Este vector contiene los siguientes elementos: (1) un origen de replicación procarionta para permitir la amplificación del vector en un hospedante bacteriano; (2) el gen que codifica resistencia al antibiótico ampicilina, para permitir la selección de las células hospedantes procariontas que contienen el plásmido; (3) secuencias de ADN homólogas a la región Hind III J del genoma del virus de la vacuna, que dirige la inserción de secuencias extrañas en esta región vía recombinación homóloga; (4) un gen quimérico que comprende el promotor transcripcional 40K del virus de la vacuna enlazado al gen de MUC-1; (5) un segundo gen quimérico que comprende el promotor transcripcional C1 de la viruela aviar enlazado al gen *lacZ* de *E. coli*.

El esqueleto plasmídico, que incluye el origen bacteriano de replicación y el gen de resistencia a ampicilina, derivó del vector plasmídico pUC8 mediante supresión de un fragmento Hae II de 442 pares de bases (pb) que contiene los poliligadores de pUC8 y el gen *lacZ*. Un ligador que contiene un único sitio Hind III se insertó en el sitio Nde I único en este vector para facilitar la clonación adicional. Las secuencias de Hind III J del virus de la vacuna y el promotor 40K se aislaron de ADN genómico preparado a partir de la cepa WR (Panicali et al., 1981) del virus de la vacuna. Las secuencias de la región Hind III J, que flanquean los genes de MUC-1 y *lacZ*, incluyen un fragmento Dra I-EcoR I de 508 pb en dirección 5' de la secuencia 40K-MUC-1, y un fragmento EcoR I-Dra I de 633 pb en dirección 3' de la secuencia C1-*lacZ*. El elemento promotor 40K se aisló como un fragmento Dra I-FnuD II de 161 pb a partir de la región Hind III H del virus de la vacuna (Rosel et al., J. Virol. 60:436-49 (1986)). El elemento promotor C1 se aisló como un fragmento Sau3A I de 240 pb a partir del virus de la viruela aviar (Jenkins et al., 1991). El gen *lacZ* de *E. coli* se aisló como un fragmento BamH I de 3100 pb a partir de pDP500 (Panicali et al., 1986).

El gen que codifica MUC-1 se aisló en el Dana-Farber Cancer Institute a partir de una biblioteca de ADNc derivada de ARN procedente de la estirpe celular de carcinoma de mama MCF-7 (Siddiqui et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2320-23 (1989)). Se usó una versión truncada del gen, que consiste en la secuencia señal, seis secuencias de

repetición en tándem relacionadas pero no idénticas, y la secuencia codificante única de 3'. El gen estaba contenido en un fragmento de 1831 pb que incluye la secuencia codificante truncada, 6 nucleótidos de la región no traducida de 5', y 298 nucleótidos de la región no traducida de 3' (Gendler et al., J. Biol. Chem. 265:15286-93 (1990)).

5 La estructura del vector de transferencia plasmídico se verificó mediante digestión con endonucleasas de restricción usando Hind III y Xba I. Además, los productos de digestión con estas enzimas se sometieron a análisis de transferencia Southern usando sondas marcadas que corresponden al gen de MUC-1 y a las secuencias de Hind III J del virus de la vacuna. Los fragmentos de ADN visualizados mediante estos métodos tuvieron los tamaños predichos, y se demostró inequívocamente la presencia del gen de MUC-1, confirmando así la estructura predicha del plásmido.

10 Se usó un aislado purificado en placas a partir de la cepa Wyeth (New York City Board of Health) del virus de la vacuna como el virus parental para esta vacuna recombinante. La recombinación *in vivo* entre el vector plasmídico y el ADN vírico dio como resultado la formación de un virus recombinante en el que la secuencia del gen TK del virus de la vacuna se interrumpió por el gen de MUC-1, bajo la dirección transcripcional del promotor 40K, y el gen *lacZ*, bajo el control del promotor C1, como se ilustra en la Figura 2.

15 Para identificar y aislar virus recombinantes que contienen las secuencias de *lacZ* y de MUC-1, se usó un ensayo cromogénico para β -galactosidasa. Este método aprovecha la capacidad del virus de la vacuna para formar placas distintas cuando se hace crecer en monocapas celulares permisivas. Después de la recombinación *in vivo*, las células se infectaron con virus de la progenie hasta que fueron visibles placas distintas, en cuyo momento a las placas se les superpuso un sustrato cromogénico para β -galactosidasa (Bluo-Gal™). Las placas víricas que expresan *lacZ* aparecen azul frente a un fondo claro. Las placas positivas se recogieron de la monocapa celular, y su progenie se propagó adicionalmente. Rondas repetidas de aislamiento de placas y recolocación en presencia de Bluo-Gal dieron como resultado la purificación del recombinante deseado, que entonces se amplificó y se sometió a análisis de expresión genómica y proteica.

20 La estirpe de célula hospedante usada para la preparación del virus recombinante rV-MUC-1 fue la estirpe celular de riñón de mono verde africano CV-1, obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC # CCL 70). Se establecieron bancos de células maestras y de trabajo (MCB y WCB) y se caracterizaron según las recomendaciones de Puntos a Considerar. Todos los datos apoyaron la seguridad de la estirpe celular para uso en la producción de la vacuna (BB-MF 6587, Volumen 1, p. 40-49 y Amendment # 2).

25 rV-MUC-1 se fabricó mediante inyección de células dérmicas de embrión de pollo (CED) primarias, obtenidas de pollos libres de patógenos específicos, con el virus recombinante. Las células CED se sembraron en botellas giratorias y se infectaron con el lote de virus maestro. Al final del período de infección, las células se cosecharon y las muestras se retiraron para el ensayo en el proceso. Las células se lisaron entonces congelando y descongelando para liberar el virus. El lisado celular se aclaró mediante centrifugación a baja velocidad, y el virus se purificó mediante centrifugación a través de una almohadilla de sacarosa al 36%. El virus a granel purificado se almacenó a -70°C o menos, hasta que se determinó el título. El virus a granel purificado se descongeló entonces, y la concentración se ajustó en consecuencia. El producto se suministró asépticamente en viales estériles y se almacenó a -70°C o menos.

30 El ensayo en el proceso y del producto final de rV-MUC-1 se llevó a cabo según 21 CFR Parte 610 y las recomendaciones de Puntos a Considerar. El producto a granel bruto se analizó para determinar la presencia de diversos contaminantes, incluyendo bacterias y hongos, micoplasma, *M. tuberculosis*, y virus inesperados. El ensayo *in vitro* para virus inesperados requirió un tratamiento especializado (dilución y neutralización) del material de ensayo a fin de eliminar la interferencia por el producto del virus de la vacuna. El recipiente final se ensayó para determinar la esterilidad, identidad (análisis de expresión genómica y proteica), potencia (titulación de virus), seguridad general, aspecto, y pureza. El ensayo de seguridad general se llevó a cabo usando una dilución 1:10 del material del recipiente final, nuevamente para eliminar la interferencia por el producto del virus de la vacuna. La caracterización adicional del producto incluyó la cuantificación de ADN sérico y celular presente en el producto final, y la evaluación de la estabilidad de la vacuna.

35 El ensayo de seguridad preclínica de rV-MUC-1 comprendió la evaluación de la neurovirulencia, que se evaluó mediante un ensayo de LD₅₀ intracraneal estándar en ratones destetados. Los resultados indicaron que el producto fue menos neurovirulento que la vacuna de la viruela Dryvax autorizada, y apoyaron la seguridad de esta vacuna para la administración humana.

EJEMPLO 2: rV-CEA(6D)/TRICOM

40 rV-CEA(6D)/TRICOM consiste en un virus de la vacuna recombinante vivo que coexpresa una forma modificada de antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno 3 asociado a la función leucocitaria (LFA-3), molécula 1 de adhesión intracelular (ICAM-1), y B7.1. CEA es una proteína oncofetal que está sobreexpresada en carcinomas colorrectal, gástrico, pancreático, de mama, y de células pulmonares no pequeñas humanas. LFA-3, ICAM-1, y B7.1 son moléculas coestimulantes expresadas en células que presentan antígeno que son requeridas para la activación eficaz de células T.

En resumen, el virus parental usado para la generación de esta vacuna fue un aislado en placas a partir del lote de siembra del virus usado por Wyeth para producir la vacuna de la viruela Dryvax® autorizada. Como se muestra en la Figura 4, rV-CEA(6D)/TRICOM se construyó vía recombinación homóloga *in vivo* entre el ADN del virus de la vacuna parental y un vector plasmídico, pT8016 (véase la Figura 3), que contiene los genes de CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1. El vector plasmídico también posee el gen *lacZ* de *E. coli*, que se insertó simultáneamente en el genoma recombinante con los genes de CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1. Se usó un ensayo cromogénico para β -galactosidasa, codificada por el gen *lacZ*, para seleccionar el candidato de vacuna final, que se verificó mediante análisis de expresión genómica y proteica. El virus recombinante se usó entonces para generar un lote de virus maestro, que se caracterizó mediante análisis de expresión genómica y proteica y mediante ensayo para determinar la potencia, esterilidad, micoplasma, y actividad de la transcriptasa inversa. Todos los resultados de los ensayos apoyaron la identidad y seguridad del virus recombinante para uso en la producción de la vacuna.

El vector plasmídico (pT8016) usado para la inserción de los genes de CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1 en el genoma del virus de la vacuna parental mediante recombinación *in vivo* se ilustran en la Figura 3. Este vector contiene los siguientes elementos: (1) un origen procariota de replicación para permitir la amplificación del vector en un hospedante bacteriano; (2) el gen que codifica resistencia al antibiótico ampicilina, para permitir la selección de células hospedantes procariontes que contienen el plásmido; (3) secuencias de ADN homólogas a la región Hind III J del genoma del virus de la vacuna, que dirigen la inserción de secuencias extrañas en esta región vía recombinación homóloga; (4) un gen quimérico que comprende el promotor transcripcional 40K del virus de la vacuna enlazado al gen de CEA(6D); (5) un segundo gen quimérico que comprende el promotor transcripcional 30K del virus de la vacuna enlazado al gen de LFA-3; (6) un tercer gen quimérico que comprende el promotor transcripcional I3 del virus de la vacuna enlazado al gen de ICAM-1; (7) un cuarto gen quimérico que comprende el promotor transcripcional sE/L enlazado al gen de B7.1; (8) un quinto gen quimérico que comprende el promotor transcripcional C1 de la viruela aviar enlazado al gen *lacZ* de *E. coli*.

El esqueleto plasmídico de pT8016, que incluye el origen bacteriano de replicación y el gen de resistencia a ampicilina, derivó del vector plasmídico pUC8 mediante supresión de un fragmento Hae II de 442 pares de bases (pb) que contiene los poliligadores de pUC8 y el gen *lacZ*. Un ligador que contiene un único sitio Hind III se insertó en el sitio único Nde I en este vector para facilitar la clonación adicional. Las secuencias Hind III J del virus de la vacuna y las secuencias del promotor del virus de la vacuna se aislaron a partir de ADN genómico preparado a partir de la cepa WR del virus de la vacuna (Panicali et al., J. Virol. 37:1000-10 (1981)) o a partir de TBC-Wy. Las secuencias procedentes de la región Hind III J, que flanquean los genes de CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, B7.1 y *lacZ*, incluyen un fragmento Dra I-EcoR I de 508 pb en dirección 5' de la secuencia de 40K-CEA(6D), y un fragmento EcoR I-Dra I de 633 pb en dirección 3' de la secuencia C1-*lacZ*. El elemento promotor 40K se aisló como un fragmento Dra I - FnuD II de 161 pb a partir de la región Hind III H²⁰ de la cepa WR del virus de la vacuna. El elemento promotor 30K (M2L) se aisló como un fragmento Sal I-Rsa I de 415 pb a partir de la región Hind III M del genoma del virus de la vacuna (Goebel et al., Virology 179:247-66 (1990)). El elemento promotor I3 se aisló mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una secuencia de 201 pb inmediatamente en 5' del codón de iniciación de la traducción del gen I3 (Schmitt et al., J. Virol. 62:1889-97). El promotor sE/L se aisló como un fragmento Hind III-Sal I de 60 pb a partir de pJS-8, un derivado de pSC65 (Chakrabarti et al., BioTechniques 23:1094-97 (1997)). El elemento promotor C1 se aisló como un fragmento Sau3A I de 240 pb a partir del virus de la viruela aviar (Jenkins et al., AIDS Res. Hum. Retrovir. 7:991-9 (1991)). El gen *lacZ* de *E. coli* se aisló como un fragmento BamH I de 3100 pb a partir de pDP500 (Panicali et al., Gene 47:193-9 (1986)).

Las secuencias de CEA se aislaron a partir de un clon de ADNc humano procedente de una librería de ADNc de célula de carcinoma de colon construida en el National Cancer Institute (Kaufman et al., Int. J. Cancer 48:900-7 (1991)). El gen de CEA se alteró entonces mediante mutagénesis *in vitro* para expresar proteína de longitud completa que contiene un epítipo modificado. Esta mutación cambió el aminoácido codificado en la posición 609 (en el que los aminoácidos se numeran comenzando en la primera metionina, incluyendo la secuencia líder) de asparagina a ácido aspártico. El gen modificado, denominado CEA(6D), se diseñó para potenciar la inmunogenicidad de CEA. El gen de CEA(6D) estaba contenido en un fragmento de 2109 pb que incluye toda la secuencia codificante para CEA y ninguna región no traducida de 5' ó 3'. El gen que codifica LFA-3 se aisló en el National Cancer Institute mediante amplificación por PCR de Human Spleen Quick-Clone cDNA (Clontech Inc.) usando la secuencia publicada (Wallner et al., J. Exp. Med. 166:923-32 (1987)). El gen estaba contenido en un fragmento de 759 pb que incluye toda la secuencia codificante para LFA-3, 2 nucleótidos de la región no traducida de 5', y 4 nucleótidos de la región no traducida de 3'. El gen que codifica ICAM-1 se aisló en el National Cancer Institute mediante amplificación por PCR de ADNc transcrito de forma inversa a partir de ARN procedente de una estirpe de célula B transformada con el virus de Epstein-Barr derivada de un hombre sano, usando la secuencia publicada (Staunton et al., Cell 52:925-33 (1988)). El gen estaba contenido en un fragmento de 1721 pb que incluye toda la secuencia codificante para ICAM-1, 29 nucleótidos de la región no traducida de 5', y 93 nucleótidos de la región no traducida de 3'. El gen que codifica B7.1 se aisló en el National Cancer Institute mediante amplificación por PCR de ADNc derivado de ARN procedente de la estirpe celular Raji humana (ATCC # CCL 86), usando la secuencia publicada (Chen et al., Cell 71:1093-1102 (1992)). El gen estaba contenido en un fragmento de 1180 pb que incluye toda la secuencia codificante para B7.1, 22 nucleótidos de la región no traducida de 5', y 291 nucleótidos de la región no traducida de 3'.

La estructura del vector de transferencia plasmídico se verificó mediante digestión con endonucleasas de restricción. Además, los productos de la digestión se sometieron a análisis de transferencia Southern usando sondas marcadas que corresponden a los genes de CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1 y a las secuencias de Hind III J del virus de la vacuna. Los fragmentos de ADN visualizados mediante estos métodos fueron de los tamaños predichos, y la presencia de los genes de CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1 se demostró inequívocamente, confirmando así la estructura predicha del plásmido.

Un aislado purificado en placa procedente de la cepa Wyeth (New York City Board of Health) del virus de la vacuna se usó como el virus parental para esta vacuna recombinante. La recombinación *in vivo* entre el vector plasmídico y el ADN vírico dio como resultado la formación de un virus recombinante en el que el gen de timidina cinasa estaba interrumpido por el gen de CEA(6D), bajo el control transcripcional del promotor 40K del virus de la vacuna, el gen de LFA-3, bajo el control transcripcional del promotor 30K del virus de la vacuna, el gen de ICAM-1, bajo el control transcripcional del promotor I3 del virus de la vacuna, el gen de B7.1, bajo el control transcripcional del promotor sE/L, y el gen *lacZ*, bajo el control del promotor C1, como se ilustra en la Figura 4.

Para identificar y aislar virus recombinantes que contienen las secuencias de *lacZ*, CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1, se usó el método de β -galactosidasa cromogénico (Bluo-Gal™) descrito en el Ejemplo 1, anteriormente.

Como se describe con detalle anteriormente en el Ejemplo 1, la estirpe celular hospedante usada para la preparación del virus recombinante rV-CEA(6D)/TRICOM fue la estirpe celular de riñón de mono verde africano CV-1.

rV-CEA(6D)/TRICOM se fabricó, incluyendo el ensayo de seguridad de producto final y en proceso, mediante infección de células dérmicas de embrión de pollo (CED) primarias con el virus recombinante, como se describe con detalle en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 3: rF-CEA(6D)/TRICOM

rF-CEA(6D)/TRICOM consiste en un virus de la viruela aviar recombinante vivo que coexpresa una forma modificada de antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno 3 asociado a la función leucocitaria (LFA-3), molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1), y B7.1. CEA es una proteína oncofetal que está sobreexpresada en carcinomas de pulmón, colorrectal, gástrico, pancreático, de mama y de células no microcíticas, humanos. LFA-3, ICAM-1, y B7.1 son moléculas coestimulantes expresadas en células que presentan antígeno que son necesarias para la activación eficiente de células T.

En resumen, el virus parental usado para la generación de esta vacuna fue purificado en placa a partir de una cepa de FPV del virus de la vacuna adaptada a cultivo tisular. rF-CEA(6D)/TRICOM se construyó vía recombinación homóloga *in vivo* entre el ADN de la viruela aviar parental y un vector plasmídico que contiene los genes de CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1. El vector plasmídico también posee el gen de *lacZ* de *E. coli*, que se insertó simultáneamente en el genoma recombinante con los genes de CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1. Se usó un ensayo cromogénico para β -galactosidasa, codificada por el gen *lacZ*, para seleccionar el candidato de vacuna final, que se verificó mediante análisis de expresión genómica y proteica. El virus recombinante se usó entonces para generar un lote de virus maestro, que se caracterizó mediante análisis de expresión genómica y proteica y mediante ensayo para determinar la potencia, esterilidad, micoplasma, y actividad de transcriptasa inversa. Todos los resultados del ensayo han apoyado la identidad y seguridad del virus recombinante para uso en la producción de la vacuna.

La generación de los virus de viruela aviar recombinantes se logra vía recombinación homóloga *in vivo* entre ADN de la viruela aviar y un vector plasmídico que posee las secuencias heterólogas a insertar. El vector plasmídico contiene uno o más genes quiméricos, comprendiendo cada uno un promotor poxvírico ligado a una secuencia que codifica proteína, flanqueado por secuencias víricas de una región no esencial del genoma del virus de la viruela aviar. El plásmido se transfecta en células infectadas con el virus de la viruela aviar parental, y la recombinación entre secuencias de la viruela aviar en el plásmido y el ADN correspondiente en el genoma vírico da como resultado la inserción en el genoma vírico de los genes quiméricos en el plásmido.

El vector plasmídico (pT2187) usado para la inserción de los genes de CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1 en el genoma del virus de la viruela aviar parental mediante recombinación *in vivo* se ilustra en la Figura 5. Este vector contiene los siguientes elementos: (1) un origen procarionta de replicación para permitir la amplificación del vector en un hospedante bacteriano; (2) el gen que codifica resistencia al antibiótico ampicilina, para permitir la selección de células hospedantes procariontas que contienen el plásmido; (3) secuencias de ADN homólogas a la región de BamH I J del genoma de la viruela aviar, que dirigen la inserción de secuencias extrañas en esta región vía recombinación homóloga; (4) un gen quimérico que comprende el promotor transcripcional 40K del virus de la vacuna ligado al gen de CEA(6D); (5) un segundo gen quimérico que comprende el promotor transcripcional 30K del virus de la vacuna ligado al gen de LFA-3; (6) un tercer gen quimérico que comprende el promotor transcripcional I3 del virus de la vacuna ligado al gen de ICAM-1; (7) un cuarto gen quimérico que comprende el promotor transcripcional sE/L ligado al gen de B7.1; (8) un quinto gen quimérico que comprende el promotor transcripcional C1 de viruela aviar ligado al gen de *lacZ* de *E. coli*.

El esqueleto plasmídico, que incluye el origen bacteriano de replicación y el gen de resistencia a ampicilina, derivó

del vector plasmídico pUC8 mediante supresión de un fragmento de Hae II de 442 pares de bases (pb) que contiene los poliligadores de pUC8 y el gen *lacZ*. Un ligador que contiene un único sitio de BamH I se insertó en el sitio único de Nde I en este vector para facilitar la clonación adicional. Las secuencias de BamH I J de la viruela aviar (Jenkins et al., 1991) se aislaron a partir de ADN genómico preparado a partir de la cepa de la vacuna POXVAC-TC (Schering Corporation) del virus de la viruela aviar. Las secuencias de la región de BamH I J que flanquean los genes CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, B7.1 y *lacZ* incluyen un fragmento de BamH I-Bgl II de 850 pb en dirección 5' de la secuencia de 40K-CEA(6D), y un fragmento de Bgl II-Xba I de 750 pb en dirección 3' de la secuencia de C1-*lacZ*. El elemento del promotor 40K se aisló como un fragmento de Dra I-FnuD II de 161 pb a partir de la región de región Hind III H (Rosel et al., 1986) de la cepa WR del virus de la vacuna (Panicali et al., 1981). El elemento del promotor 30K (M2L) se aisló como un fragmento de Sal I-Rsa I de 415 pb de la región de Hind III M del genoma del virus de la vacuna (Goebel et al., 1990). El elemento del promotor I3 se aisló mediante amplificación con reacción de cadena de la polimerasa (PCR) de una secuencia de 201 pb inmediatamente 5' al codón de iniciación de la traducción del gen I3 (Schmitt et al., J. Virol. 62:1889-97 (1988)). El promotor sE/L se aisló como un fragmento de Hind III-Sal I de 60 pb a partir de pJS-8, un derivado de pSC65 (Chakrabarti et al., 1997). El elemento del promotor C1 se aisló como un fragmento de Sau3A I de 240 pb a partir del virus de la viruela aviar (Jenkins et al., 1991). El gen *lacZ* de *E. coli* se aisló como un fragmento de BamH I de 3100 pb a partir de pDP500 (Panicali et al., 1986).

Las secuencias de CEA se aislaron a partir de un clon de ADNc humano procedente de una librería de ADNc de células de carcinoma de colon construida en el National Cancer Institute (Kaufman et al., 1991). El gen de CEA se alteró entonces mediante mutagénesis *in vitro* para expresar proteína de longitud completa que contiene un epítipo modificado. Esta mutación cambió el aminoácido codificado en la posición 609 de asparagina a ácido aspártico (en el que los aminoácidos se numeran comenzando en la primera metionina, incluyendo la secuencia líder). El gen modificado, denominado CEA(6D), se diseñó para potenciar la inmunogenicidad de CEA. El gen de CEA(6D) estaba contenido en un fragmento de 2109 pb que incluye toda la secuencia codificante para CEA y ninguna de las regiones no traducidas de 5' ó 3'. El gen que codifica LFA-3 se aisló en el National Cancer Institute mediante amplificación por PCR de Human Spleen Quick-Clone cDNA (Clontech Inc.) usando la secuencia publicada (Wallner et al., 1987). El gen estaba contenido en un fragmento de 759 pb que incluye toda la secuencia codificante para LFA-3, 2 nucleótidos de la región no traducida de 5', y 4 nucleótidos de la región no traducida de 3'. El gen que codifica ICAM-1 se aisló en el National Cancer Institute mediante amplificación por PCR de ADNc transcrito de forma inversa a partir de ARN procedente de una estirpe de célula B transformada con el virus de Epstein-Barr derivada de un hombre sano, usando la secuencia publicada (Staunton et al., 1988). El gen estaba contenido en un fragmento de 1721 pb que incluye toda la secuencia codificante para ICAM-1, 29 nucleótidos de la región no traducida de 5', y 93 nucleótidos de la región no traducida de 3'. El gen que codifica B7.1 se aisló en el National Cancer Institute mediante amplificación por PCR de ADNc derivado de ARN procedente de la estirpe celular Raji humana (ATCC # CCL 86), usando la secuencia publicada (Chen et al., 1992). El gen estaba contenido en un fragmento de 1180 pb, que incluye toda la secuencia codificante para B7.1, 22 nucleótidos de la región no traducida de 5', y 291 nucleótidos de la región no traducida de 3'.

La estructura del vector de transferencia plasmídico se verificó mediante digestión con endonucleasas de restricción. Además, los productos de la digestión se sometieron a análisis de transferencia Southern usando sondas marcadas que corresponden a los genes de CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1 y a las secuencias de BamH I J de la viruela aviar. Los fragmentos de ADN visualizados mediante estos métodos fueron de los tamaños predichos, y la presencia de los genes de CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1 se demostró inequívocamente, confirmando así la estructura predicha del plásmido.

Se usó un aislado purificado en placas a partir de la cepa de la vacuna POXVAC-TC del virus de la viruela aviar como el virus parental para esta vacuna recombinante. La recombinación *in vivo* entre el vector plasmídico y el ADN vírico dio como resultado la formación de un virus recombinante en el que el gen de CEA(6D), bajo el control transcripcional del promotor 40K del virus de la vacuna, el gen de LFA-3, bajo el control transcripcional del promotor 30K del virus de la vacuna, el gen de ICAM-1, bajo el control transcripcional del promotor I3 del virus de la vacuna, el gen de B7.1, bajo el control transcripcional del promotor sE/L, y el gen *lacZ*, bajo el control del promotor C1, se insertaron en la región de BamH I J del genoma del virus de la viruela aviar, como se ilustra en la Figura 6.

Para identificar y aislar virus recombinantes que contienen las secuencias de *lacZ*, CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1, se usó el método de β -galactosidasa cromogénico (Bluo-Gal™) descrito en el Ejemplo 1, anteriormente.

Como se describe con detalle anteriormente en el Ejemplo 1, la estirpe celular hospedante usada para la preparación del virus recombinante rF-CEA(6D)/TRICOM fue la estirpe celular de riñón de mono verde africano CV-1.

rF-CEA(6D)/TRICOM se fabricó, incluyendo el ensayo de seguridad de producto final y en proceso, mediante infección de células dérmicas de embrión de pollo (CED) primarias con el virus recombinante, como se describe con detalle en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 4: PANVAC™-F

PANVAC-F consiste en el virus de la viruela aviar recombinante vivo que coexpresa una forma modificada (flotante)

de MUC-1, MUC-1(6), una forma modificada (flotante) de antígeno carcinoembrionario, wCEA(6D), antígeno 3 asociado a la función leucocitaria (LFA-3), molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1), y B7.1. La secuencia nucleotídica de MUC-1 flotante usada en PANVAC-F, también conocida como wMUC-1(6), se muestra en la Figura 7 como SEC ID NO:1; la secuencia de aminoácidos correspondiente de wMUC-1(6) se muestra en la Figura 8 como SEC ID NO:2. La secuencia nucleotídica de CEA flotante usado en PANVAC-F, también conocido como wCEA(6D), se muestra en la Figura 9 como SEC ID NO:3; la secuencia de aminoácidos correspondiente de wCEA(6D) se muestra en la Figura 10 como SEC ID NO:4.

La generación de virus de viruela aviar recombinantes se logra vía recombinación homóloga *in vivo* entre ADN de viruela aviar y un vector plasmídico que posee las secuencias heterólogas a insertar. Como se describe anteriormente, el vector plasmídico contiene uno o más genes quiméricos, comprendiendo cada uno un promotor poxvírico enlazado a una secuencia codificante de proteína, flanqueada por secuencias víricas de una región no esencial del genoma del virus de la viruela aviar. El plásmido se transfecta en células infectadas con el virus de la viruela aviar parental, y la recombinación entre las secuencias de la viruela aviar en el plásmido y el ADN correspondiente en el genoma vírico da como resultado la inserción en el genoma vírico de los genes quiméricos en el plásmido.

Para la generación de la vacuna recombinante PANVAC-F, se usaron dos vectores plasmídicos. El primer plásmido, denominado pT1154, dirige la inserción de las secuencias codificantes de wCEA(6D) y wMUC-1(6) en la región FP 14 del genoma del virus de la viruela aviar. El segundo plásmido, denominado pT8150, dirige la inserción de las secuencias codificantes de LFA-3, ICAM-1, y B7.1 (colectivamente conocidas como TRICOM) en la región de BamH I J del genoma del virus de la viruela aviar. El gen de wCEA(6D) está bajo el control transcripcional del promotor 40K del virus de la vacuna. El gen de wMUC-1(6) está bajo el control transcripcional del promotor temprano/tardío sintético (sE/L). El gen de LFA-3 está bajo el control transcripcional del promotor 30K del virus de la vacuna, el gen de ICAM-1 está bajo el control transcripcional del promotor I3 del virus de la vacuna, y el gen de B7.1 está bajo el control transcripcional del promotor temprano/tardío sintético (sE/L). Además, pT1154 contiene el gen de *lacZ* de *E. coli*, bajo el control del promotor 40K del virus de la vacuna, que se incluye como una identificación para la progenie recombinante, y pT8150 contiene el gen *GUS*, bajo el control del promotor 7.5, para uso en la identificación de la progenie recombinante.

Como el virus parental para esta vacuna recombinante, se usó un aislado purificado en placa procedente de la cepa de la vacuna POXVAC-TC del virus de la viruela aviar. La recombinación *in vivo* entre los vectores plasmídicos y el ADN vírico dio como resultado la formación de un virus recombinante en el que las secuencias de pT1154 se insertaron en FP 14, y las secuencias de pT8150 se insertaron en la región de BamHI J, como se ilustra en la Figura 11.

PANVAC-F se ha usado conjuntamente con PANVAC-V en un ensayo clínico continuado para el tratamiento de pacientes con adenocarcinoma metastásico (Etapa IV) del páncreas. Los resultados y la descripción posterior de este ensayo se describen más abajo en el Ejemplo 11.

EJEMPLO 5: PANVAC™-V

PANVAC-V consiste en un virus de la vacuna recombinante que coexpresa una forma modificada (flotante) de MUC-1, wMUC-1(6), una forma modificada (flotante) de antígeno carcinoembriogénico, wCEA(6D), antígeno 3 asociado con la función leucocitaria (LFA-3), molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1), y B7.1. La secuencia nucleotídica de MUC-1 flotante usada en PANVAC-V, también conocida como wMUC-1(6), se muestra en la Figura 7 como SEC ID NO:1. La secuencia de CEA flotante usada en PANVAC-V, también conocida como wCEA(6D), se muestra en la Figura 9 como SEC ID NO:3.

Para la generación de la vacuna recombinante PANVAC-V, se usó un nuevo procedimiento desarrollado que dio como resultado el aislamiento de un virus recombinante que contiene los genes extraños deseados, pero que no contiene genes que codifican marcadores seleccionables. Este procedimiento aprovecha la ventaja de la inestabilidad genética de secuencias duplicadas dentro del genoma poxvírico, dando como resultado la supresión de secuencias nucleotídicas situadas entre las secuencias duplicadas. Usando este procedimiento, los virus recombinantes contienen inicialmente el gen *lacZ* de *E. coli* junto con los genes extraños de interés. Estos virus recombinantes se identifican y purifican usando una identificación colorimétrica para el producto génico de *lacZ*. Durante la propagación subsiguiente de los virus recombinantes, la recombinación intramolecular entre secuencias duplicadas que flanquean el gen *lacZ* da como resultado la supresión de este gen, dejando un virus recombinante que contiene sólo los genes de interés.

Un derivado de la cepa de Wyeth (New York City Board of Health) del virus de la vacuna se usó como el virus parental para esta vacuna recombinante, denominada TBC-vTRICOM. Este virus parental, denominado TBC-vTRICOM, contiene las secuencias codificantes de LFA-3, ICAM-1, y B7.1 insertadas en la región de Hind III F del genoma del virus de la vacuna. La Figura 14 muestra la derivación de TBC-vTRICOM. En primer lugar, la vacuna de Wyeth se purificó en placa por Flow Laboratories, y después se expandió en células CV-1, para crear TBC-Wy. A continuación, el plásmido pT1068 se insertó usando células CV-1, para suprimir F13L (37K), creando TBCWy-Delta37. Entonces se insertaron LFA-3, ICAM-1, B7.1 y F13L en este virus usando el plásmido pT5132 en células

CED, creando TBC-vTRICOM.

Un vector plasmídico denominado pT1153, que dirige la inserción de las secuencias codificantes de CEA y MUC-1 modificadas en la región de Hind III J del genoma del virus TBC-vTRICOM, se usó para generar la vacuna recombinante PANVAC-V. El gen de CEA modificado, denominado wCEA(6D), está bajo el control transcripcional del promotor 40K del virus de la vacuna, y el gen de MUC-1 modificado, denominado wMUC-1(6), está bajo el control transcripcional del promotor temprano/tardío sintético (sE/L). El plásmido también contiene una porción de la región de Hind III J del virus de la vacuna, que codifica el gen de timidina cinasa (TK). Además, el gen de *lacZ* de *E. coli*, bajo el control del promotor 40K del virus de la vacuna, está incluido como una identificación transitoria para la progenie recombinante. La recombinación entre el vector plasmídico y el ADN vírico dio como resultado la formación de un virus recombinante en el que el gen de wCEA(6D), bajo el control transcripcional del promotor 40K del virus de la vacuna, el gen de wMUC-1(6), bajo el control transcripcional del promotor de sE/L, y el gen *lacZ*, bajo el control del promotor 40K se insertó en la región de Hind III J del genoma del virus de la vacuna, como se ilustra en la Figura 12.

El gen *lacZ* está flanqueado por secuencias repetidas para la selección transitoria de *lacZ*. La secuencia repetida consiste en todo el promotor 40K del virus de la vacuna de 161 pb, descrito anteriormente.

Las secuencias de CEA se aislaron de un clon de ADNc procedente de una librería de ADNc de células de carcinoma de colon construida en el National Cancer Institute (Kaufman et al., Int. J. Cancer 48:900-7 (1991)). El gen de CEA se alteró entonces mediante mutagénesis *in vitro* para expresar proteína de longitud completa que contiene un epítipo modificado. Esta mutación cambió el aminoácido codificado en la posición 609 de asparagina a ácido aspártico (en el que los aminoácidos se numeran comenzando en la primera metionina, incluyendo la secuencia líder). El gen modificado, denominado CEA(6D), se diseñó para potenciar la inmunogenicidad de CEA.

El vector plasmídico (pT1153) usado para la inserción de las secuencias codificantes de CEA y MUC-1 modificadas en el genoma del virus de la vacuna parental TBC-vTRICOM se ilustra en la Figura 13. Este vector contiene los siguientes elementos: (1) un origen procariota de replicación para permitir la amplificación del vector en un hospedante bacteriano; (2) el gen que codifica resistencia al antibiótico ampicilina, para permitir la selección de células hospedantes procariotas que contienen el plásmido; (3) secuencias de ADN homólogas a la región de Hind III J del genoma del virus de la vacuna, que dirige la inserción de secuencias extrañas en esta región vía recombinación homóloga; (4) un gen quimérico que comprende el promotor transcripcional 40K del virus de la vacuna enlazado al gen *lacZ*; (5) un segundo gen quimérico que comprende el promotor transcripcional 40K enlazado al gen de wCEA(6D); (6) un tercer gen quimérico que comprende el promotor transcripcional sE/L enlazado al gen de wMUC-1(6).

El esqueleto plasmídico, que incluye el origen bacteriano de replicación y el gen de resistencia a ampicilina, denominado pAG3, derivó del vector plasmídico pUC8 (Vieira, Gene 19:259-268(1982)) mediante supresión de un fragmento de Hae II de 442 pares de bases (pb) que contiene los poliligadores de pUC8 y el gen *lacZ*. Un ligador que contiene un único sitio de Hind III se insertó en el sitio único Nde I en este vector para facilitar la clonación adicional. Las secuencias de Hind III J del virus de la vacuna y las secuencias del promotor del virus de la vacuna se aislaron de ADN genómico preparado a partir de la cepa WR (Panicali, J. Virol. 37:1000-1010(1981)) o a partir de TBC-Wy. Las secuencias procedentes de la región de Hind III J que flanquean los genes de *lacZ*, CEA y MUC-1 comprenden un fragmento de Dra I-EcoR I de 508 pb en dirección 5' de la secuencia de 40K-*lacZ*, y un fragmento de EcoR I-Dra I de 633 pb en dirección 3' de la secuencia de sE/L-MUC-1. El elemento del promotor 40K se aisló como un fragmento de Dra I-FnuD II de 161 pb a partir de la región de Hind III H del virus de la vacuna (Rosel, 60:436-449 (1986)). El promotor sE/L se aisló como un fragmento de Hind III-Sal I de 60 pb a partir de pJS-8, un derivado de pSC65 (Chakrabarti, BioTechniques 23:1094-1097(1997)). El gen *lacZ* de *E. coli* se aisló como un fragmento de BamH I de 3100 pb a partir de pDP500 (Panicali, 47:193-199 (1986)).

El ensayo cromogénico para β -galactosidasa se usó para identificar y aislar virus recombinantes que contienen las secuencias de *lacZ*, CEA y MUC-1, como se describe anteriormente en el Ejemplo 1.

El gen *lacZ* de *E. coli* insertado estaba flanqueado por secuencias poxvíricas duplicadas. La recombinación intramolecular entre estas secuencias dio como resultado la supresión del gen *lacZ*. Los virus recombinantes de los que se suprimió el gen *lacZ* dieron lugar a placas incoloras, que se seleccionaron y se purificaron en placa. El poxvirus recombinante purificado final contenía sólo los genes deseados que codifican las proteínas CEA, MUC-1, LFA-3, ICAM-1 y B7.1 y ningún gen marcador (*lacZ*). Los recombinantes positivos se amplificaron en células CED para producir un lote de siembra. El lote de siembra se sometió entonces a titulación, ensayo de esterilidad, y análisis de expresión genómica y proteica.

EJEMPLO 6: Pan 1-1

En el estudio de Fase I, a los pacientes con cáncer pancreático no extirpable se les administró una mezcla de rVCEA(6D)/TRICOM™ (véase el Ejemplo 2 anterior) con rV-MUC-1 (véase el Ejemplo 1, anterior), seguido de rF-CEA(6D)/TRICOM (véase el Ejemplo 3, anterior), a dosis que se espera que genere respuestas inmunitarias y clínicas relevantes con toxicidad mínima, basado en estudios previos. En consecuencia, el estudio de Fase 1

suministró una dosis de “sensibilización” de 1×10^8 pfu rV-CEA(6D)/TRICOM™ mezclado con 1×10^8 pfu rV-MUC-1 subcutáneamente (SC), seguido 2 semanas más tarde por una dosis de “refuerzo” de 1×10^9 pfu rFCEA(6D)/TRICOM™ administrada SC. Los “refuerzos” de 1×10^9 pfu rF-CEA(6D)/TRICOM™ administrados SC se repitieron a intervalos de dos semanas, durante un total de tres “refuerzos”. Se administró SC sagramostim humana

5 recombinante (100 µg) en el sitio de la inyección de la vacuna como adyuvante, en el momento de cada inmunización y durante tres días consecutivos después. Los pacientes se observaron en cada visita de vacunación y cuatro semanas tras el “refuerzo” final para determinar el examen físico y la recogida de datos de laboratorio e información de sucesos adversos.

Los resultados del estudio de Fase I de Pan1-1 se describen más abajo en el Ejemplo 11.

10 **EJEMPLO 7: Vacunas adicionales**

Usando los procedimientos expuestos en los Ejemplos 1-6, se puede generar un abanico de vectores de vacuna. Los sitios de inserción preferidos para los vectores de la viruela aviar y del virus de la vacuna, incluyendo vectores MVA, se describen anteriormente. Los sitios de inserción de la viruela aviar preferidos son 43K, FP14 y la secuencia única larga (LUS). Los sitios de inserción del virus de la vacuna preferidos son MVA 44/45; MVA 49/50 y MVA

15 124/125.

Por ejemplo, el vector de vacuna del Ejemplo 2 (rV-CEA(6D)/TRICOM) se puede modificar para excluir el antígeno CEA, generando así rV-TRICOM. Éste puede incluir secuencias murinas (por ejemplo, rV-TRICOM murina) o secuencias humanas (es decir, rV-TRICOM-humana). De forma similar, en otro ejemplo, el vector de vacuna del Ejemplo 3 (rF-CEA(6D)/TRICOM) se puede modificar para excluir el antígeno CEA, generando así rF-TRICOM, que

20 puede tener secuencias humanas o murinas.

En otro ejemplo, el vector del Ejemplo 4 (PANVAC-F) se puede preparar con secuencias murinas así como con secuencias humanas. Los antígenos de PANVAC, wMUC-1(6), wCEA(6D), LFA-3, ICAM-1, y B7.1, también se pueden incluir en un vector de MVA en los sitios MVA 44/45, MVA 49/50, y MVA 124/125.

Por ejemplo, un virus de la viruela aviar recombinante denominado rF-MUC-1 contiene el ácido nucleico que codifica el gen de MUC-1 humano, o como alternativa, una o más regiones repetidas del MUC-1 humano como se describe anteriormente (SEC ID NO: 1), bajo el control del promotor 40K, y se ha descrito (Grosenbach, D. W., Barrientos, J. C., Schlom, J. y Hodge, J. W., Cancer Res 61, 4497-505, 2001). El virus de la viruela aviar recombinante que contiene el ácido nucleico que codifica MUC-1 humano y los genes de B7-1, ICAM-1, y LFA-3 murinos se denomina rF-MUC-1-TRICOM, y es el mismo vector que aquel descrito por Grosenbach et al., solo con antígeno MUC-1 en

25 lugar de antígeno CEA (Grosenbach, D. W., Barrientos, J. C., Schlom, J. y Hodge, J. W., Cancer Res 61, 4497-505, 2001). El vector de la viruela aviar recombinante denominado rF-OX40L se generó mediante inserción del gen OX40L murino bajo el control del promotor 40K en el genoma de rF-CEA en el sitio de FP 14 en el genoma. El ADNc de OX40L se amplificó a partir de células B murinas activadas anti-CD40/anti-IgM mediante RT-PCR usando cebadores específicos para los extremos 5'-(dGGTACCGGTACCATGGAAGGGGAAGGGGTTTC) (SEC ID NO:5) y 3'-(dCTCGAGCTCGAGTCACAGTGGTACTTGGTTTC) (SEC ID NO:6) del marco de lectura abierto. El ADNc se clonó en un vector de transferencia de poxvirus. El análisis de secuencia confirmó que no se introdujeron mutaciones en el proceso de clonación. El virus de la viruela aviar recombinante denominado rF-MUC-1-TRICOM/OX40L se generó mediante inserción del gen OX40L murino bajo el control del promotor 40K en el genoma de rF-TRICOM en el sitio de FP14 en el genoma. Ambos virus de la viruela aviar recombinantes que expresan OX40L se generaron mediante métodos descritos previamente (Gritz, L., Destree, A., Cormier, N., Day, E., Stallard, V., Caiazzo, T., Mazzara, G. y Panicali, D., J Virol 64, 5948-57, 1990). Estos virus también expresan el gen de MUC-1 humano y el gen de beta-galactosidasa bacteriana.

30

35

40

El virus de la viruela aviar recombinante denominado rF-CEA contiene los ácidos nucleicos que codifican el gen de CEA humano, o cualquier repetición antigénica del mismo como se muestra en SEC ID NO: 2, bajo el control del promotor 40K, y se ha descrito (Grosenbach, D. W., Barrientos, J. C., Schlom, J. y Hodge, J. W., Cancer Res 61, 4497-505, 2001). El virus de la viruela aviar recombinante que contiene el gen de CEA humano y los genes de B7-1, ICAM-1, y LFA-3 murinos se denomina rF-TRICOM a lo largo de este estudio, y se ha descrito (*Id.*). El virus de la viruela aviar recombinante denominado rF-OX40L se generó como se describe anteriormente. El virus de la viruela aviar recombinante denominado rF-CEA-TRICOM/OX40L se generó mediante inserción del gen de OX40L murino bajo el control del promotor 40K en el genoma de rF-TRICOM en el sitio de FP14 en el genoma. Ambos virus de la viruela aviar recombinante que expresan OX40L se generaron mediante métodos previamente descritos (Gritz, L., Destree, A., Cormier, N., Day, E., Stallard, V., Caiazzo, T., Mazzara, G. y Panicali, D., J Virol 64, 5948-57, 1990). Estos virus también expresan el gen de CEA humano y el gen de β-galactosidasa bacteriana.

45

50

55 **EJEMPLO 8: Respuesta inmunitaria a TAAs expresados mediante poxvirus recombinantes en un modelo murino**

Para evaluar respuestas inmunitarias frente a poxvirus recombinantes que expresan CEA o MUC-1, se inmunizaron ratones con virus recombinantes que expresan estos antígenos solos o en combinación con homólogos murinos de B7.1 o de las tres moléculas coestimulantes que comprenden TRICOM murino (muB7.1, muTRICOM™,

respectivamente). El uso de moléculas coestimulantes murinas en estos estudios permitió la evaluación del efecto de la coestimulación en el desarrollo de respuestas de células T.

En un experimento, se evaluó el efecto de muB7.1 sobre respuestas inmunitarias provocadas por MUC-1 expresado por el virus de la vacuna. Un grupo de ratones C57BL/6 se vacunó con una mezcla de rV-MUC-1 y virus de la vacuna no recombinante (10^7 pfu de cada virus) en los días 0, 14, y 28. El segundo grupo de ratones se vacunó con una mezcla de rVMUC-1 y rV-muB7.1 (10^7 pfu de cada virus) en el día 0, y después con una mezcla de rV-MUC-1 y virus de la vacuna no recombinante (10^7 pfu de cada virus) en los días 14 y 28. Los ratones se eutanasiaron en el día 35, y la actividad de células T citotóxicas se evaluó en un ensayo de liberación de indio estándar. CTL específico de MUC-1 se detectó en ambos grupos; sin embargo, el porcentaje de lisis específica fue aproximadamente 1,5 veces mayor en ratones que recibieron la mezcla de rV-MUC-1/rV-muB7.1. (Akagi et al., *J Immunother.* 20:38-47 (1997)).

Otro experimento comparó los efectos de muB7.1 y muTRICOM™ sobre respuestas inmunitarias provocadas por CEA expresado por el virus de la vacuna. En este estudio, ratones transgénicos para CEA C57BL/6, que expresan CEA humano con una distribución tisular similar a la de seres humanos, se vacunaron con uno de tres inmunógenos: (1) rV-CEA; (2) rV-CEA mezclado con rV-muB7.1; o (3) rV-CEA/muTRICOM. Todos los animales se sacrificaron en el día 22, y se midieron las respuestas linfoproliferativas específicas de CEA. Los ratones inmunizados con rV-CEA/muTRICOM™ tuvieron respuestas dos veces mayores que aquellos vacunados con rV-CEA + rV-muB7.1, y respuestas cuatro veces mayores que aquellos vacunados con rV-CEA sola. Un número de estudios adicionales evaluó las respuestas inmunitarias a CEA expresado por poxvirus en ratones. (Hodge et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 1228-39 (2000); Hodge et al., *Cancer Research* 59: 5800-07 (1999)).

EJEMPLO 9: Actividad antitumoral de vacunas que expresan moléculas coestimulantes en modelos murinos

Los modelos murinos permiten no sólo la medida de las respuestas inmunitarias provocadas por vacunas del cáncer, sino también la evaluación de efectos antitumorales profilácticos o terapéuticos estimulados por estas vacunas. Por ejemplo, para evaluar la capacidad de vacunas a base de poxvirus para proteger frente a exposiciones tumorales, se inmunizaron ratones mediante escarificación de la cola con una mezcla de rV-CEA y rV-muB7.1. Cuando los ratones inmunizados se expusieron a células MC-38 que expresan CEA, los tumores no se establecieron, indicando que la inmunización había dado lugar a una protección frente a la exposición tumoral. Esta protección vino acompañada de respuestas de células T específicas de CEA correspondientes (Hodge et al., *Cancer Res* 55:3598-3603 (1995)). Se dieron a conocer resultados similares después de que los ratones se inmunizaron con un único virus de la vacuna recombinante que expresó tanto CEA como muB7.1 (Kalus, 1999). Subsiguientemente, la mezcla (rV-CEA + rV-muB7.1) se comparó con el constructo de gen dual (rV-CEA/muB7.1) en un modelo de protección frente a tumor. Tanto la mezcla como el recombinante individual provocaron respuestas antitumorales; sin embargo, se necesitaron mayores dosis de los virus mezclados para obtener respuestas inmunitarias comparables a las obtenidas usando el recombinante individual.

La protección exitosa usando muB7.1 conduce a estudios que evalúan combinaciones de moléculas coestimulantes. En otro experimento de exposición a tumor, se vacunaron SC ratones C57BL/6 con rV-CEA o rV-CEA/muTRICOM™, y después se expusieron 100 días más tarde a células de carcinoma de colon MC-38 que expresan CEA. Todos los ratones vacunados con rV-CEA sucumbieron a los tumores, mientras que todos los ratones vacunados con rV-CEA/muTRICOM™ sobrevivieron a la exposición al tumor. Las respuestas de células T también fueron significativamente mayores en animales vacunados con rV-CEA/muTRICOM (Hodge et al., *Cancer Research* 59: 5800-07 (1999)).

En los estudios de protección frente a tumor descritos previamente, CEA, aunque expresado en una estirpe de célula tumoral murina, representó un antígeno extraño en los ratones vacunados. A fin de determinar si se podrían provocar respuestas antitumorales similares en un marco en el que CEA representa un antígeno "propio", se realizaron estudios de inmunoterapia tumoral usando ratones transgénicos para CEA. En un experimento, los animales se inocularon primero con células MC-38 que expresan CEA, después se inmunizaron cuatro días más tarde con rV-CEA, rV-CEA/muB7.1, o rV-CEA/muTRICOM™. Sólo los ratones que recibieron rV-CEA/muTRICOM™ permanecieron libres del tumor. Estos ratones también tuvieron las respuestas de células T específicas de CEA más elevadas (Hodge et al., *Cancer Research* 59: 5800-07 (1999)).

En un modelo de inmunoterapia más riguroso, ratones transgénicos para CEA con metástasis de carcinoma hepático positivo a CEA establecido se trataron mediante vacunación semanal durante cuatro semanas con rV-muCEA/TRICOM™ más GM-CSF e IL-2 murinos. De los dieciséis ratones tratados, nueve (56%) permanecieron vivos a lo largo de 25 semanas. Por el contrario, en el grupo de control (que recibió virus de la vacuna no recombinante más citocinas), sólo sobrevivió uno de diecinueve (5%) pasadas 16 semanas (Grosenbach, 2001).

EJEMPLO 10: Expresión de TRICOM™ en células que presentan antígeno en un modelo murino

Las células dendríticas (DCs) son participantes claves en la activación de linfocitos T tanto CD4+ como CD8+. El grado de activación de las células T parece estar relacionado, al menos en parte, con el nivel de expresión de ciertas moléculas coestimulantes en DCs. Se demostró que DCs murinas infectadas con rV-muTRICOM o rF-muTRICOM™

potencia significativamente la proliferación de células T sin tratamiento, la proliferación de células T alogénicas, y la proliferación de células T específicas de péptidos *in vitro*. Además, las DCs pulsadas con péptidos infectadas con rV- o rF-muTRICOM™ indujeron mayor actividad de CTL *in vivo* que lo que lo hicieron las DCs pulsadas con péptido no infectadas correspondientes (Hodge et al., J Natl Cancer Inst. 92:1228-1239 (2000)).

5 Se han obtenido resultados similares usando DCs humanas. El origen y la etapa de madurez de DCs humanas afecta a los niveles de moléculas coestimulantes mostrados por estas células. Zhu y colaboradores han demostrado que varias horas después de la infección con rF-TRICOM™, las DCs humanas hiperexpresan eficientemente las tres moléculas coestimulantes (Zhu, 2001). Además DCs autólogas pulsadas con péptidos, infectadas con rF-
10 muTRICOM™, fueron más potentes a la hora de activar células T *in vitro* que las DCs pulsadas con péptidos sin infectar, según se mide mediante la producción de interferón-gamma tras 24 horas de incubación. Estos resultados se obtuvieron usando péptidos procedentes de antígenos víricos tanto fuertes como débiles, así como péptidos de antígenos propios, asociados a tumores (CEA y PSA). La activación de células T potenciada no estuvo acompañada por una mayor apoptosis de células T.

15 La potencia de otras células que presentan antígeno (APCs), tales como células progenitoras de médula ósea (BMPCs), también se puede incrementar usando vectores poxvíricos que expresan TRICOM™ (Rad, 2001). BMPCs murinas infectadas con rV- o rF-muTRICOM™ potencian significativamente la activación de poblaciones de células T CD4+ y CD8+ T tanto nativas como efectoras. Una población de APC genérica, esplenocitos murinos, también se podría hacer más eficiente en la presentación de antígenos mediante infección con cualquiera de los vectores TRICOM™ (Hodge et al., Vaccine 19:3552-3567 (2001)). Los esplenocitos infectados requieren menos
20 concanavalina A (que actúa como señal 1) para activar células T sin tratamiento. Además, cuando se usó para este ensayo una cantidad constante de concanavalina A, se necesitó un menor número de esplenocitos infectados para la activación de células T. Los esplenocitos infectados con TRICOM™ también indujeron una mayor activación de células T específicas de antígeno que lo que lo hicieron los esplenocitos sin infectar, aproximándose a niveles logrados con DCs no infectadas según se mide mediante producción de interferón-gamma.

25 **EJEMPLO 11: Datos de ensayos clínicos**

PANVAC-VF se diseñó para estimular el sistema inmunitario para seleccionar como dianas y destruir células cancerosas que expresan dos proteínas (o antígenos), antígeno carcinoembrionario (CEA) y mucina-1 (MUC-1), encontradas en alrededor del 90 por ciento de células de tumor pancreático. Se administraron vacunas de Therion
30 vía inyección subcutánea de una manera de "sensibilización-refuerzo" empleando el virus de la vacuna como el vector de sensibilización, seguido de dosis secuenciales con un vector de la viruela aviar, como se describe más abajo. Las vacunas también incorporan TRICOM, diseñado para potenciar y sostener una respuesta inmunitaria dirigida contra células tumorales.

35 Se han llevado a cabo dos estudios clínicos de fase I de etiqueta abierta: PAN 1-1 y TBC-PAN-002, cada uno con el objetivo primario de la seguridad. En resumen, los estudios enrolaron un total de 22 pacientes con cáncer pancreático avanzado (Etapa III o IV), 20 de los cuales tuvieron enfermedad metastásica (Etapa IV); todos ellos recibieron quimioterapia previa. Basándose en un repaso de los estudios de Fase III múltiples que implican otras sustancias quimioterapéuticas, la supervivencia global mediana esperada de esta población de pacientes es aproximadamente 3 meses.

PAN 1-1

40 PAN 1-1 fue un estudio de etiqueta abierta para evaluar la seguridad y tolerabilidad de rV-CEA(6D)/TRICOM mezclado con rV-MUC-1 seguido de rF-CEA(6D)/TRICOM en combinación con sagramostim en el tratamiento de pacientes con adenocarcinoma del páncreas. La población de estudio incluyó pacientes ≥ 18 años de edad que habían confirmado histológicamente adenocarcinoma del páncreas, cuya enfermedad no era extirpable quirúrgicamente en opinión del investigador, y que habían tenido un estado de comportamiento ECOG de ≤ 2 .

45 Los pacientes recibieron una dosis de sensibilización de 1×10^8 pfu rV-CEA(6D)/TRICOM mezclado con 1×10^8 pfu rV-MUC-1 SC en el Día 0, seguido de una dosis de refuerzo de 1×10^9 pfu rF-CEA(6D)/TRICOM SC en los Días 14, 28, y 42. Se administró sagramostim (100 μ g) SC en el sitio de inyección en el día de cada administración de la vacuna y durante tres días consecutivos después. A discreción del investigador, a los pacientes se les dejó continuar en una fase de tratamiento de extensión tras el Día 70. Tres pacientes entraron en la fase de extensión; el estudio se
50 terminó el 11 de diciembre de 2003, tras la retirada del paciente final.

Los parámetros de seguridad evaluados durante el transcurso de este estudio incluyeron historial médico, signos vitales, examen físico, ensayos de laboratorio (hematología, química, y urinálisis), ECGs, estado de comportamiento ECOG, y documentación de medicaciones concomitantes.

55 Doce pacientes se enrolaron en el estudio y recibieron la vacunación de sensibilización. Dos de estos doce pacientes fueron sustitutos de pacientes que se retiraron prematuramente del estudio por razones distintas de toxicidad. Nueve pacientes completaron el curso completo del tratamiento por protocolo (una inyección de sensibilización y tres inyecciones de refuerzo). Cinco pacientes completaron la visita de seguimiento final (Día 70: 28

días después de la última dosis). De este modo, de las 40 vacunaciones planificadas originales (diez pacientes; cuatro vacunaciones cada uno), se administraron 42 vacunaciones a los 12 pacientes enrolados en este estudio. Tres de estos pacientes entraron en la fase de extensión y recibieron mensualmente vacunaciones durante un período adicional de cinco meses. De este modo, para los tres pacientes enrolados en la fase de extensión, cada uno recibió un total de nueve vacunaciones durante un período de aproximadamente siete meses (Fase Central más Fase de Extensión).

Basándose en los datos disponibles, rV-CEA(6D)/TRICOM, rV-MUC-1, y rF-CEA(6D)/TRICOM en combinación con sagramostim se toleraron bien. No hubo toxicidades limitantes de la dosis (DLTs) o sucesos adversos serios relacionados de forma causal con el régimen de tratamiento, y los pacientes no se retiraron debido a DLT, suceso relacionado con la inoculación, u otro suceso adverso relacionado con el tratamiento. Las reacciones adversas relacionadas causalmente con el régimen de tratamiento se limitaron a sucesos de grado 1 y 2, asociados con reacciones de sitio de inyección cutáneas locales y sucesos sistémicos de fatiga, escalofríos y fiebre.

Como se señala anteriormente, al final de la Fase de Tratamiento Central de 70 Días, tres pacientes entraron en la Fase de Extensión del Estudio. Estos tres pacientes recibieron cinco refuerzos adicionales de rF-CEA(6D)/TRICOM, y se retiraron subsiguientemente del estudio debido a la progresión de la enfermedad. Ninguno de los pacientes permaneció en el estudio. Se dieron a conocer veintiún AEs, posible o definitivamente relacionado con la vacuna, en los tres pacientes durante el período de cinco meses de la Fase de Extensión. Todos los AEs relacionados con la vacuna [rF-CEA(6D)/TRICOM] tuvieron gravedad de grado 1. El AE más habitual fue eritema de grado 1 en el sitio de inyección tras los refuerzos mensuales. Estos datos, aunque en un número pequeño de pacientes, sugiere que los refuerzos mensuales continuados con vacunas a base de viruela aviar son bien tolerados durante más de 6 meses.

Todos los pacientes enrolados en el Estudio PAN 1-1 continúan estando seguidos para determinar datos de supervivencia. Ocho de los 12 pacientes enrolados en el Estudio PAN 1-1 murieron. La supervivencia global (OS) mediana es de 7,9 meses. Es de señalar que todos estos pacientes tuvieron enfermedad metastásica en la línea base, y todos fracasaron en la quimioterapia de primera línea. Basándose en los datos de control históricos, la OS mediana esperada en esta población de pacientes es aproximadamente 3-4 meses (Heinemann, Semin Oncol. diciembre de 2002; 29(6 Supl. 20):9-16). Aunque el tamaño de la muestra es pequeño y el análisis está limitado por comparación con datos de control históricos, estos datos son alentadores.

TBC-PAN-002

El Protocolo de Ensayo Clínico TBC-PAN-002 fue un estudio de etiqueta abierta de Fase I para evaluar la seguridad y tolerabilidad de PANVAC-VF en combinación con sagramostim en el tratamiento de pacientes con adenocarcinoma del páncreas. La población del estudio incluye pacientes ≥ 18 años de edad que han confirmado histológicamente adenocarcinoma del páncreas, cuya enfermedad no es extirpable quirúrgicamente en la opinión del investigador, y que tienen un Estado de Comportamiento Karnofsky de ≥ 80 . Los pacientes del estudio deben haber también recibido virus de la vacuna previa (inmunización contra la viruela) y se espera que vivan al menos 4 meses.

Para TBC-PAN-002, los pacientes recibieron una dosis de "sensibilización" de 2×10^8 pfu PANVAC-V SC en el Día 0, seguido de una dosis de "refuerzo" de 1×10^9 pfu PANVAC-F SC en los Días 14, 28, y 42. Sagramostim (100 μ g) se da SC en el sitio de inyección en el día de la administración de cada vacuna y durante tres días consecutivos después.

Tras el Día 70, a discreción del investigador, se dejó que los pacientes que estaban clínicamente estables entrasen en una Fase de Extensión de vacunaciones continuadas. Los pacientes en la Fase de extensión recibieron refuerzos mensuales de PANVAC-F a 1×10^9 pfu con sagramostim mensualmente hasta la progresión de la enfermedad, según se determine por el investigador. Durante la Fase de Extensión, se continuarán recogiendo datos de seguridad.

Los parámetros de seguridad evaluados durante el transcurso de este estudio incluyen historia médica, signos vitales, examen físico, ensayos de laboratorio (hematología, química, urianálisis), y medicaciones concomitantes. La seguridad se evalúa examinando estos parámetros y tabulando efectos adversos que surgen del tratamiento que se producen entre la línea base y los Días 14, 28, 42 y 70. Además, se recogieron lecturas de ECG en la línea base, Día 28, y Día 70, y se determinó una evaluación del Estado de Comportamiento Karnofsky en la línea base, Día 28 y Día 70. Los resultados de los ensayos de laboratorio fuera del intervalo, u otros sucesos no evaluados como cambios clínicamente significativos a partir de la línea base, no se dan a conocer como sucesos adversos.

El AE más habitual (43%) relacionado con las vacunas fue reacción del sitio de inyección en el sitio de administración de la vacuna. Estos AEs fueron todos grado 1 e incluyeron eritema, hinchazón, prurito, ampollas, induración, y dolor. Principalmente, de las diez administraciones del virus de la vacuna (PANVAC-V), hubo tres AEs de grado 1 (ampolla, eritema, y prurito). Es de señalar que todas las vacunaciones en este estudio se administraron subcutáneamente (y lo serán en todos los estudios futuros de PANVAC-VF). Estos datos demuestran que el perfil de AE relacionado con la administración subcutánea de la vacuna es significativamente más benigno que el perfil de AE tras la administración intradérmica mediante escarificación. La administración intradérmica del virus de la vacuna está asociada clásicamente con la formación de vesículas, pústulas, y cicatrices, todas las cuales pueden contener

virus infeccioso. De este modo, aunque los sitios de inyección no se cultivaron en estudio reciente, el perfil de AE tras la vacunación con PANVAC-V sugiere que PANVAC-V no se puede desprender del paciente tras la vacunación. La administración de PANVAC-F estuvo asociada más habitualmente con reacciones del sitio de la inyección. De las 28 vacunaciones de PANVAC-F administradas a los 10 pacientes, 20 estaban asociadas con AEs, y 15 de estas 20 (75%) estaban limitadas a eritema de grado 1.

La mayoría de los AEs relacionados con la vacuna (63 de 74; 85%) tuvieron una gravedad de grado 1. Hubo diez AEs de grado 2 relacionados con la vacuna (cinco fatigas, tres cefaleas, un vómito, una náusea). Hubo 1 fiebre de grado 3 que fue una toxicidad limitante de la dosis (véase más abajo). Siguiendo las reacciones del sitio de inyección, los AEs más habituales fueron fatiga, anorexia, náusea, vómito, fiebre, cefalea, y mialgia. Es posible que varios de estos AEs puedan reflejar un síndrome relacionado con la vacuna.

Se han dado a conocer veintitrés sucesos adversos graves (SAEs) en cinco pacientes. Todos los SAEs se clasificaron como no relacionados con la vacuna por los investigadores. Tres de los sucesos (disfunción/insuficiencia hepática, progresión de la enfermedad de cáncer pancreático, y recurrencia de neumonía) dieron como resultado la muerte. Un paciente experimentó una DLT de Fiebre de Grado 3, que se resolvió sin secuelas: este paciente recibió la inyección de vacuna de sensibilización en el Día 0, y vacunaciones de refuerzo en los Días 14 y 28. Sagramostim se administró por protocolo tras las vacunaciones del Día 0 y Día 14. En la tarde del Día 28, tras la segunda administración de PANVAC-F y una administración de sagramostim, el paciente observó una temperatura de 104,5°F, que fue una reacción de grado 3 y una DLT, ya que el investigador clasificó este suceso como definitivamente relacionado con la vacuna. El paciente se trató con 500 mg de acetaminofeno oralmente, y el suceso se resolvió sin secuelas. Este paciente continuó en el Estudio.

Basándose en los datos preliminares, PANVAC-VF en combinación con sagramostim parece ser bien tolerado y de este modo hasta ahora no se han observado sucesos adversos graves, clínicamente significativos, causalmente relacionados con el régimen de tratamiento. La OD mediana es 6,3 meses.

TBC-PAN-003

El Protocolo de Ensayo Clínico TBC-PAN-003 es un estudio controlado, aleatorizado, de Fase III, para evaluar la seguridad y eficacia de PANVAC-VF en combinación con sargarmostim frente a la mejor quimioterapia de cuidados complementarios o paliativa en pacientes con adenocarcinoma metastásico (Etapa IV) del páncreas que han fracasado en un régimen de quimioterapia que contiene gemcitabina. El protocolo para el tratamiento de pacientes en este ensayo clínico sigue el protocolo para TBC-PAN-002, descrito anteriormente.

LISTADO DE SECUENCIAS ORIGINAL

<110> THERION BIOLOGICS CORPORATION THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

<120> SISTEMA PARA TRATAR Y PREVENIR CÁNCER DE MAMA

<130> P105991EPPC/DLB

<140> 04810831.0

<141> 2004-11-12

<150> US 60/519,427

<151> 2003-11-12

<160>6

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 1548

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: constructo nucleotídico sintético

<400> 1

```

atgacaccgg gcacccagtc tcctttcttc ctgctgctgc tcctcacagt gcttacagtt 60
gttacgggtt ctggtcatgc aagctctacc ccagggtggag aaaaggagac ttcggctacc 120
cagagaagtt cagtgccag ctctactgag aagaatgctg tgagtatgac aagctccgta 180
ctctccagcc acagccccgg ttcaggctcc tccaccactc agggacagga tgtcactctg 240
gccccggcca cggaacccagc ttcaggttca gctgccttgt ggggacagga tgtcacctcg 300
gtaccagtta ctagaccagc tttaggtagc acagcacctc ctgctcatgg agtaactagt 360
gctcctgata ctgctccagc tcctggcagt actgcaccac cggcacatgg cgtaacatca 420
gcacctgata caagacctgc acctggatct acagcgccgc ctgcgcacgg agtgacatcg 480
gcgcccagata cgcgccccgc tcccggtagc accgcaccgc ccgcccacgg tgttacaagt 540
gcacccgata cccggccggc acccggaggt accgctccac ctgcacacgg ggtcacaagc 600
gcgcccagata ctgacctgc gccagggtcg actgcccctc cggcgcattg tgtgacctca 660
gctcctgata caaggccagc cccagctagc actctgggtg acaacggcac ctctgccagg 720
gctaccacaa ccccagccag caagagcact ccattctcaa tccccagcca ccactctgat 780
actcctacca cccttgccag ccatagcacc aagactgatg ccagtagcac tcaccatagc 840
acgggtacct ctctcacctc ctccaatcac agcacttctc cccagttgtc tactggggtc 900
tccttctttt tctgtctttt tcacatttca aacctccagt ttaattctc tctggaagat 960
cccagcaccg actactacca agagctgcag agagacattt ctgaaatggt tttgcagatt 1020
tataaacaag ggggttttct gggcctctcc aatattaagt tcaggccagg atctgtggtg 1080
gtacaattga ctctggcctt ccgagaaggt accatcaatg tccacgacgt ggagacacag 1140
ttcaatcagt ataaaacgga agcagcctct cgatataacc tgacgatctc agacgtcagc 1200
gtgagtgatg tgccatttcc tttctctgcc cagtctgggg ctgggggtgcc aggctggggc 1260
atcgcgctgc tgggtgctggt ctgtgttctg gttgcgctgg ccattgtcta tctcattgcc 1320
ttggctgtct gtcagtgccg ccgaaagaac tacgggcagc tggacatctt tccagcccgg 1380
gatacctacc atcctatgag cgagtacccc acctaccaca cccatggggc ctatgtgccc 1440
cctagcagta ccgatcgtag cccctatgag aaggtttctg caggtaatgg tggcagcagc 1500
ctctcttaca caaacccagc agtggcagcc acttctgcca acttgtag 1548

```

<210>2

<211> 515

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: constructo proteico sintético

<400> 2

Met₁ Thr Pro Gly Thr₅ Gln Ser Pro Phe Phe₁₀ Leu Leu Leu Leu Leu₁₅ Thr
 Val Leu Thr Val₂₀ Val Thr Gly Ser Gly₂₅ His Ala Ser Ser Thr₃₀ Pro Gly
 Gly Glu Lys₃₅ Glu Thr Ser Ala Thr₄₀ Gln Arg Ser Ser Val₄₅ Pro Ser Ser
 Thr Glu₅₀ Lys Asn Ala Val Ser₅₅ Met Thr Ser Ser Val₆₀ Leu Ser Ser His
 Ser₆₅ Pro Gly Ser Gly Ser₇₀ Ser Thr Thr Gln Gly₇₅ Gln Asp Val Thr Leu₈₀
 Ala Pro Ala Thr Glu₈₅ Pro Ala Ser Gly Ser₉₀ Ala Ala Leu Trp Gly₉₅ Gln
 Asp Val Thr Ser₁₀₀ Val Pro Val Thr Arg₁₀₅ Pro Ala Leu Gly Ser₁₁₀ Thr Ala
 Pro Pro Ala₁₁₅ His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg₁₂₅ Pro Ala Pro
 Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala₁₃₅ His Gly Val Thr Ser₁₄₀ Ala Pro Asp Thr
 Arg₁₄₅ Pro Ala Pro Gly Ser₁₅₀ Thr Ala Pro Pro Ala₁₅₅ His Gly Val Thr Ser₁₆₀
 Ala Pro Asp Thr Arg₁₆₅ Pro Ala Pro Gly Ser₁₇₀ Thr Ala Pro Pro Ala₁₇₅ His
 Gly Val Thr Ser₁₈₀ Ala Pro Asp Thr Arg₁₈₅ Pro Ala Pro Gly Ser₁₉₀ Thr Ala
 Pro Pro Ala₁₉₅ His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg₂₀₅ Pro Ala Pro
 Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala₂₁₅ His Gly Val Thr Ser₂₂₀ Ala Pro Asp Thr
 Arg₂₂₅ Pro Ala Pro Ala Ser₂₃₀ Thr Leu Val His Asn Gly₂₃₅ Thr Ser Ala Arg₂₄₀
 Ala Thr Thr Thr₂₄₅ Pro Ala Ser Lys Ser Thr₂₅₀ Pro Phe Ser Ile Pro Ser₂₅₅
 His His Ser Asp₂₆₀ Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His Ser Thr₂₇₀ Lys Thr
 Asp Ala Ser₂₇₅ Ser Thr His His Ser₂₈₀ Thr Val Pro Pro Leu₂₈₅ Thr Ser Ser
 Asn His₂₉₀ Ser Thr Ser Pro Gln₂₉₅ Leu Ser Thr Gly Val₃₀₀ Ser Phe Phe Phe
 Leu Ser Phe His Ile Ser₃₁₀ Asn Leu Gln Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp₃₂₀
 Pro Ser Thr Asp Tyr₃₂₅ Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met₃₃₅
 Phe Leu Gln Ile₃₄₀ Tyr Lys Gln Gly Gly₃₄₅ Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile₃₅₀

Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg
 355 360 365
 Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr
 370 375 380
 Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser
 385 390 395 400
 Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val
 405 410 415
 Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala
 420 425 430
 Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg
 435 440 445
 Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His
 450 455 460
 Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro
 465 470 475 480
 Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn
 485 490 495
 Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser
 500 505 510
 Ala Asn Leu
 515

<210>3

<211> 2106

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: constructo nucleotídico sintético

<400> 3


```

atggagtcctc cctcggcccc tccccacaga tgggtgcattc cctggcagag gtcctctgctc 60
acagcctcac ttctaaccctt ctggaacccg cccaccactg ccaagctcac tattgaatcc 120
acgccgttca atgtcgcaga ggggaaggag gtgcttctac ttgtccacaa tctgccccag 180
catctttttg gctacagctg gtacaaaggt gaaagagtgg atggcaaccg tcaaattata 240
ggatatgtaa taggaactca acaagctacc ccagggcccg catacagtgg tcgagagata 300
atatacccca atgcatccct gctgatccag aacatcatcc agaatgacac aggattctac 360
accctacacg tcataaagtc agatcttgtg aatgaagaag caactggcca gttccgggta 420
tacccggaac tccctaagcc ttctattagc tccaataata gtaagcctgt cgaagacaaa 480
gatgccgtcg cttttacatg cgagcccga aactcaagacg caacatatct ctgggtgggtg 540
aacaaccagt ccctgcctgt gtcccctaga ctccaactca gcaacggaaa tagaactctg 600
accctgttta acgtgaccag gaacgcaca gcaagctaca aatgcgaaac ccaaaatcca 660
gtcagcgcca ggaggctctg ttcagtgtat ctcaacgtgc tttacggacc cgatgctcct 720
acaatcagcc ctctaaacac aagctataga tcaggggaaa atctgaatct gagctgtcat 780
gccgctagca atcctcccgc ccaatacagc tggtttgtca atggcacttt ccaacagtcc 840
accaggaac tgttcattcc caatattacc gtgaacaata gtggatccta cacgtgcaa 900
gctcacaata gcgacaccgg actcaaccgc acaaccgtga cgacgattac cgtgtatgag 960
ccacaaaac cattcataac tagtaacaat tctaaccag ttgaggatga ggacgcagt 1020
gattaactt gtgagccaga gattcaaat accacttatt tatgggtggg caataaccaa 1080
agtttgccgg ttagcccagc ctgacagttg tctaatagata accgcacatt cgaactctg 1140
tccgttactc gcaatgatgt aggaccttat gagtgtggca ttcagaatga attatccgtt 1200
gatcactccg accctgttat ccttaatgtt ttgtatggcc cagacgacc aactatatct 1260
ccatcataca cctactaccg tcccggcgtg aacttgagcc tttcttgcca tgcagcatcc 1320
aaccccctg cacagtactc ctggctgatt gatggaaaca ttcagcagca tactcaagag 1380
ttatttataa gcaacataac tgagaagaac agcggactct atacttgcca ggccaataac 1440

```

```

tcagccagtg gtcacagcag gactacagtt aaaa~aataa ctgtttccgc ggagctgccc 1500
aagccctcca tctccagcaa caactccaaa cccgtggagg acaaggatgc tgtggccttc 1560
acctgtgaac ctgaggctca gaacacaacc tacctgtggt gggtaaattg tcaagcctc 1620
ccagtcagtc ccaggctgca gctgtccaat ggcaacagga ccctcactct attcaatgtc 1680
acaagaaatg acgcaagagc ctatgtatgt ggaatccaga actcagttag tgcaaaccgc 1740
agtgaccag tcacctgga tgtcctctat gggccggaca ccccatcat tccccccca 1800
gactcgtctt acctttcggg agcggacctc aacctctct gccactcggc ctctaaccga 1860
tccccgcagt attcttggcg tatcaatggg ataccgcagc aacacacaca agttctcttt 1920
atcgccaaaa tcacgccaaa taataacggg acctatgcct gttttgtctc taacttggct 1980
actggccgca ataattccat agtcaagagc atcacagtct ctgcatctgg aacttctcct 2040
ggtctctcag ctggggccac tgtcggcatc atgattggag tgctggttgg ggttgcctctg 2100
atatag 2106

```

<210>4

5 <211> 372

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: constructo proteico sintético

10 <400> 4

Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Glu Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu
 1 5 10 15
 Pro Glu Ile Gln Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser
 20 25 30
 Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu
 35 40 45
 Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly
 50 55 60
 Ile Gln Asn Glu Leu Ser Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn
 65 70 75 80
 Val Leu Tyr Gly Pro Asp Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr
 85 90 95
 Tyr Arg Pro Gly Val Asn Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn
 100 105 110
 Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His
 115 120 125
 Thr Gln Glu Leu Phe Ile Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu
 130 135 140
 Tyr Thr Cys Gln Ala Asn Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr
 145 150 155 160
 Val Lys Thr Ile Thr Val Ser Ala Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser
 165 170 175
 Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr
 180 185 190
 Cys Glu Pro Glu Ala Gln Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly
 195 200 205
 Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg
 210 215 220
 Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val
 225 230 235 240

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

<210>5

<211>31

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 5

ggtaccggtaccatggaagg ggaaggggtt c 31

10 <210>6

<211>31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 6

ctcgagctcg agtcacagtg gtacttggtt c 31

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para inducir una respuesta inmunológica frente a una célula que expresa un antígeno asociado con cáncer de mama en un ser humano que tiene cáncer de mama o con riesgo de desarrollar cáncer de mama, que comprende:

5 (a) un primer vector que contiene uno o más segmentos de ADN que codifican (i) mucina (MUC) o una porción antigénica de la misma o una versión modificada de la misma, en el que la versión modificada de la misma comprende SEC ID NO: 2, y (ii) antígeno carcinoembrionario (CEA) o una porción antigénica del mismo o una versión modificada del mismo, en el que la versión modificada del mismo comprende SEC ID NO: 4, y

10 (b) al menos un segundo vector que contiene uno o más segmentos de ADN que codifican (i) MUC o una porción antigénica de la misma o una versión modificada de la misma, en el que la versión modificada de la misma comprende SEC ID NO: 2, y (ii) CEA o una porción antigénica del mismo o una versión modificada del mismo, en el que la versión modificada del mismo comprende SEC ID NO: 4,

en el que el segundo vector es para la administración al ser humano a intervalos regulares tras la administración del primer vector.

15 2. Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para inducir una respuesta inmunológica frente a una célula que expresa un antígeno asociado con cáncer de mama en un ser humano que tiene cáncer de mama o con riesgo de desarrollar cáncer de mama.

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, o el uso de la reivindicación 2, en el que la composición farmacéutica comprende además factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

20 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 ó 3, o el uso de la reivindicación 2 ó 3, en el que la composición farmacéutica comprende además al menos una molécula coestimulante.

5. La composición farmacéutica o uso de la reivindicación 4, en el que la molécula coestimulante es codificada por al menos uno de los vectores.

25 6. La composición farmacéutica o uso de la reivindicación 5, en la que el al menos uno de los vectores que codifican la molécula coestimulante contiene al menos B7.1, LFA-3 e ICAM-1 como genes coestimulantes.

7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-6, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en la que los vectores primero y segundo son vectores poxvíricos.

30 8. La composición farmacéutica o uso de la reivindicación 7, en la que los vectores primero y segundo se seleccionan del grupo que consiste en: un vector de virus orthopox; un vector de virus avipox; un vector de virus suiipox; un vector de virus capropox; un vector de virus leporipox; y un vector de iridovirus, en la que los vectores primero y segundo pueden ser vectores poxvíricos iguales o diferentes.

9. La composición farmacéutica o uso de la reivindicación 7, en la que al menos uno de los vectores poxvíricos es un vector poxvírico con replicación alterada o que no se replica.

35 10. La composición farmacéutica o uso de cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en la que el primer vector es un vector de virus orthopox, y el segundo vector es un vector de virus avipox.

11. La composición farmacéutica o uso de la reivindicación 10, en la que el vector orthopox es virus de la vacuna.

12. La composición farmacéutica o uso de la reivindicación 11, en la que el virus de la vacuna es virus de la vacuna Wyeth o un virus de la vacuna atenuado.

40 13. La composición farmacéutica o uso de la reivindicación 12, en la que el virus de la vacuna atenuado es MVA o NYVAC.

14. La composición farmacéutica o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en la que el vector orthopox se administra antes de que se administre el vector avipox.

45 15. La composición farmacéutica o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en la que el vector orthopox se administra en una a tres administraciones a intervalos establecidos, y el vector avipox se administra en múltiples administraciones a intervalos establecidos.

16. La composición farmacéutica o uso de la reivindicación 15, en la que el intervalo establecido es 20 días a 90 días.

17. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-16, o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-16, en la que la mucina es MUC-1.

18. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-16, o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-16, en la que la versión modificada de mucina es una MUC flotante y contiene cinco a quince repeticiones en tándem.

5 19. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-16, o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-16, en la que la mucina es una MUC-1 flotante o una mini-MUC-1 flotante que tiene seis repeticiones en tándem.

20. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-19, o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-19, en la que el uno o más segmentos de ADN comprende SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 3, o codifica SEC ID NO: 2 y SEC ID NO: 4.

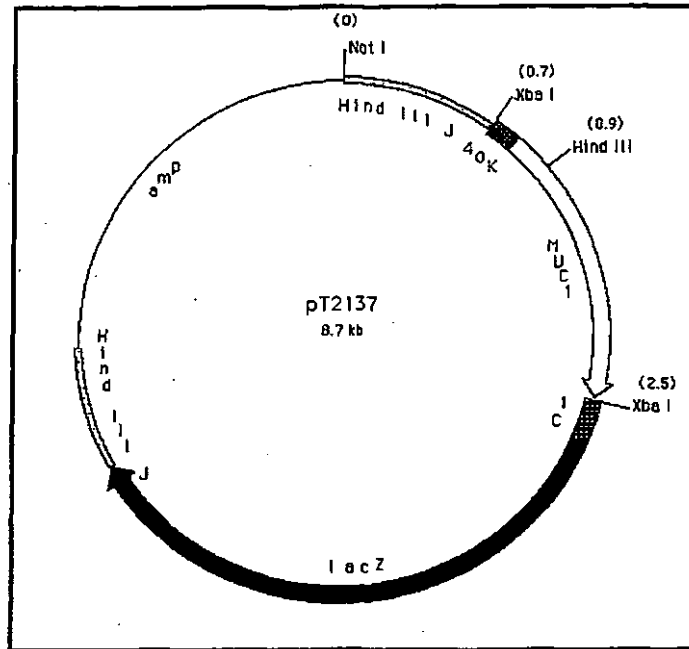


Figura 1

Mapa de endonucleasas de restricción del plásmido pT2137

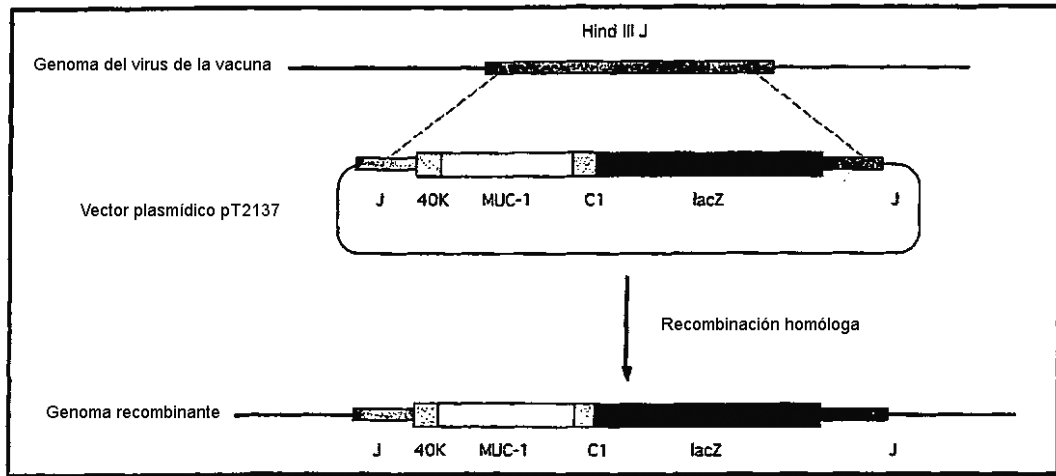


Figura 2

Esquema del vector rV-MUC-1

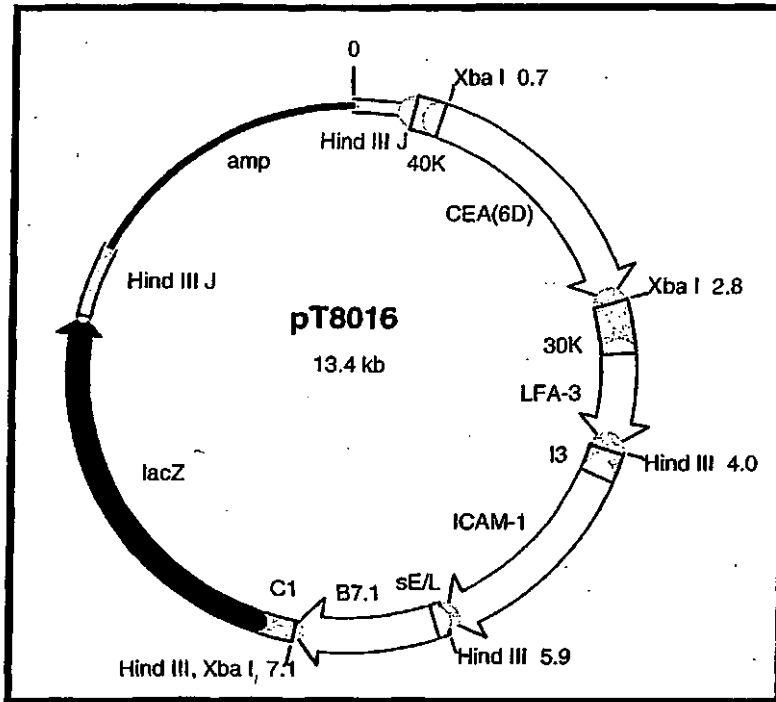


Figura 3

Mapa de endonucleasas de restricción del plásmido pT8016

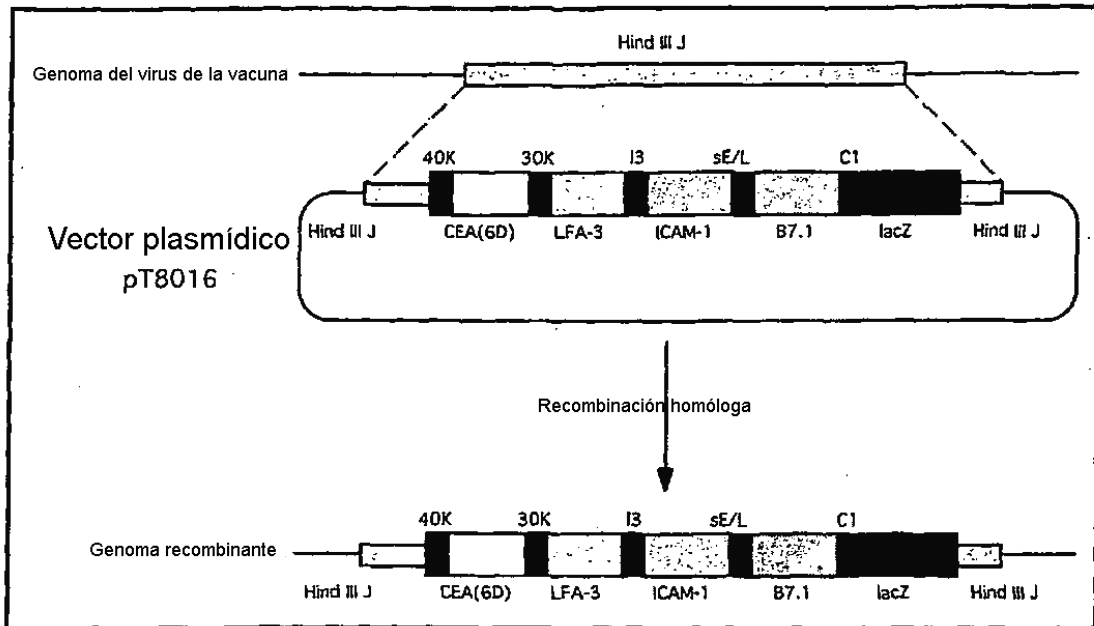


Figura 4

Generación del virus de la vacuna recombinante rV-CEA(6D)/TRICOM

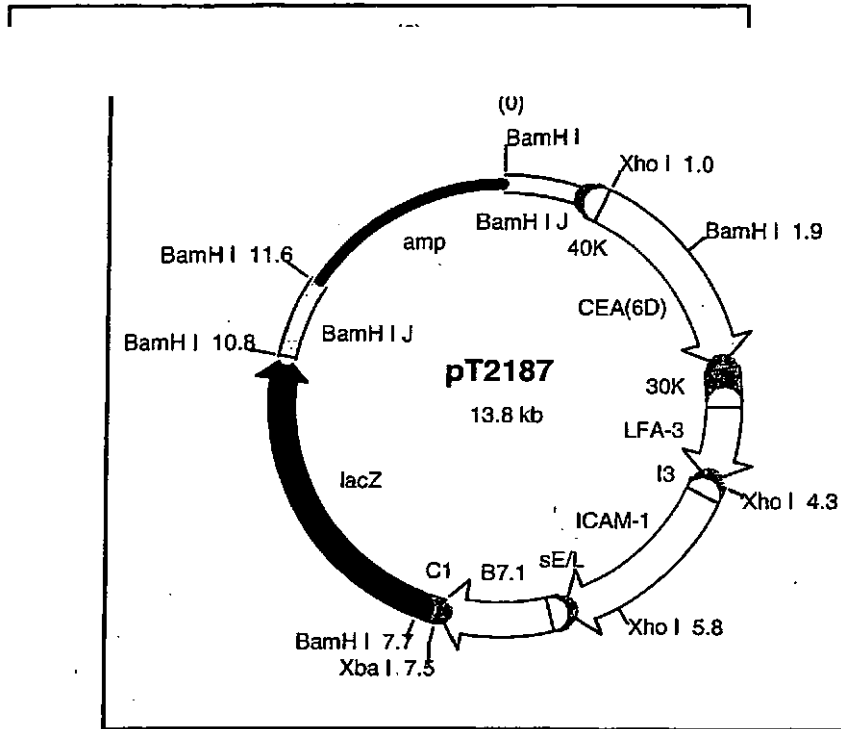


Figura 5

Mapa de endonucleasas de restricción del plásmido pT2187

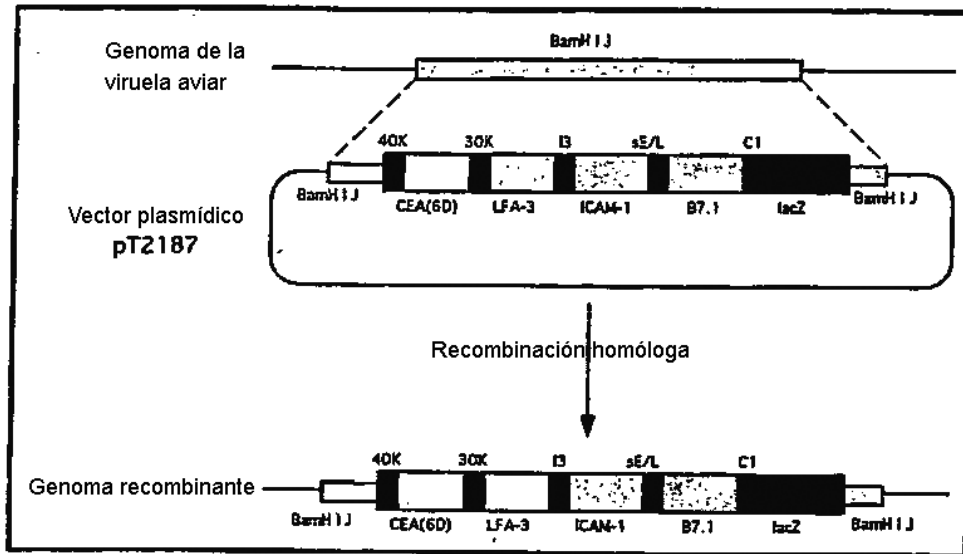


Figura 6

Generación del virus de la viruela aviar recombinante rF-CEA(6D)/TRICOM

```

1 ATGACACCGG GCACCCAGTC TCCTTCTTTC CTGCTGCTGC TCCTCACAGT GCTTACAGTT
61 GTTACGGGTT CTGGTCATGC AAGCTCTACC CCAGGTGGAG AAAAGGAGAC TTCGGCTACC
121 CAGAGAAGTT CAGTGCCCAG CTCTACTGAG AAGAATGCTG TGAGTATGAC AAGCTCCGTA
181 CTCTCCAGCC ACAGCCCCGG TTCAGGCTCC TCCACCACTC AGGGACAGGA TGTCACTCTG
241 GCCCCGGCCA CGGAACCAGC TTCAGGTTC A GCTGCCTTGT GGGGACAGGA TGTCACTCTG
301 GTACCAGTTA CTAGACCAGC TTTAGGTAGC ACAGCACCTC CTGCTCATGG AGTAACACTAGT
361 GCTCCTGATA CTCGTCCAGC TCCTGGCAGT ACTGCACCAC CGGCACATGG CGTAACATCA
421 GCACCTGATA CAAGACCTGC ACCTGGATCT ACAGCGCCGC CTGCGCACGG AGTGACATCG
481 GCGCCCGATA CCGCCCCCGC TCCCGGTAGC ACCGCACCGC CCGCCACGG TGTACAAGT
541 GCACCCGATA CCGGCCCGGC ACCCGGAAGT ACCGCTCCAC CTGCACACGG GGTACAAGC
601 GCGCCAGACA CTCGACCTGC GCCAGGGTCG ACTGCCCTC CGGCGCATGG TGTGACCTCA
661 GCTCCTGACA CAAGGCCAGC CCCAGCTAGC ACTCTGGTGC ACAACGGCAC CTCTGCCAGG
721 GCTACCACAA CCCCAGCCAG CAAGAGCACT CCAATTCTCA TTCCCAGCCA CCACTCTGAT
781 ACTCCTACCA CCCTTGCCAG CCATAGCACC AAGACTGATG CCAGTAGCAC TCACCATAGC
841 ACGGTACCTC CTCTCACCTC CTCCAATCAC AGCACTTCTC CCCAGTTGTC TACTGGGGTC
901 TCTTCTTTTT TCCTGTCTTT TCACATTTCA AACCTCCAGT TTAATTCCTC TCTGGAAGAT
961 CCCAGCACCG ACTACTACCA AGAGCTGCAG AGAGACATT CTGAAATGTT TTTGCAGATT
1021 TATAACAAG GGGGTTTTCT GGGCTCTCC AATATTAAGT TCAGGCCAGG ATCTGTGGTG
1081 GTACAATTGA CTCTGGCCTT CCGAGAAGGT ACCATCAATG TCCACGACGT GGAGACACAG
1141 TTCAATCAGT ATAAAACCGA AGCAGCCTCT CGATATAACC TGACGATCTC AGACGTCAGC
1201 GTGAGTGATG TGCCATTTCC TTTCTCTGCC CAGTCTGGGG CTGGGGTGCC AGGCTGGGGC
1261 ATCGCGCTGC TGGTGCTGGT CTGTGTTCTG GTTGGCGCTGG CCATTGTCTA TCTCATGACC
1321 TTGGCTGTCT GTCAGTGCCG CCGAAAGAAC TACGGGCAGC TGGACATCTT FCCAGCCCCG
1381 GATACCTACC ATCCTATGAG CGAGTACCCC ACCTACCACA CCCATGGGGC CTATGTGCCC
1441 CCTAGCAGTA CCGATCGTAG CCCCTATGAG AAGGTTTCTG CAGGTAATGG TGGCAGCAGC
1501 CTCTCTTACA CAAACCCAGC AGTGGCAGCC ACTTCTGCCA ACTTGTAG

```

FIGURA 7

SECUENCIA DE wMUC-I(6), SEC. ID. NO: 1

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATORSSVPSSTEKNAV
SMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAALWGQDVTSVPVTRPAL
GSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAP
DTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAH
GVT SAPDTRPAPASTLVHNGTSARATTPASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHST
KTDASSTHRSTVPPLTSSNHSTSPQLSTGVSFFFLSFHISNLQFNSSLEDPSTD
YYQELQDI SEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVHDE
TQFNQYKTEAASRYNLTI SDVSVSDVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLVLCVLA
LAIVYLIALAVCQCRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDR
SPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL

FIGURA 8

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE wMUC-I(6), SEC. ID. NO: 2

```

1 ATGGAGTCTC CCTCGGCCCC TCCCCACAGA TGGTGCATCC CCTGGCAGAG GCTCCTGCTC
61 ACAGCCTCAC TTCTAACCTT CTGGAACCCG CCCACCCTG CCAAGCTCAC TATTGAATCC
121 ACGCCGTTCA ATGTGCGAGA GGGGAAGGAG GTGCTTCTAC TTGTCCACAA TCTGCCCCAG
181 CATCTTTTTG GCTACAGCTG GTACAAAGGT GAAAGAGTGG ATGGCAACCG TCAAATTATA
241 GGATATGTAA TAGGAACTCA ACAAGCTACC CCAGGGCCCC CATAAGTGG TCGAGAGATA
301 ATATAACCCA ATGCATCCCT GCTGATCCAG AACATCATCC AGAATGACAC AGGATTCTAC
361 ACCCTACACG TCATAAAGTC AGATCTTGTG AATGAAGAAG CAACTGGCCA GTCCGGGTA
421 TACCCGGAAC TCCCTAAGCC TTCTATTAGC TCCAATAATA GTAAGCCTGT CGAAGACAAA
481 GATGCCGTCG CTTTTACATG CGAGCCCGAA ACTCAAGACG CAACATATCT CTGGTGGGTG
541 AACAAACAGT CCCTGCCTGT GTCCCCTAGA CTCCAACCTCA GCAACGGAAA TAGAACTCTG
601 ACCCTGTTTA ACGTGACCAG GAACGACACA GCAAGCTACA AATGCGAAAC CCAAAATCCA
661 GTCAGCGCCA GGAGGTCTGA TTCAGTGATT CTC AACGTGC TTTACGGACC CGATGCTCCT
721 ACAATCAGCC CTCTAAACAC AAGCTATAGA TCAGGGGAAA ATCTGAATCT GAGTGTCTAT
781 GCCGCTAGCA ATCCTCCCGC CCAATACAGC TGGTTGTCA ATGGCACTTT CCAACAGTCC
841 ACCCAGGAAC TGTTCAATCC CAATATTACC GTGAACAATA GTGGATCCTA CACGTGCCAA
901 GCTCACAATA GCGACACCGG ACTCAACCCG ACAACCGTGA CGACGATTAC CGTGTATGAG
961 CCACCAAAC CATTCATAAC TAGTAACAAT TCTAACCCAG TTGAGGATGA GGACGCAGTT
1021 GCATTAACCT GTGAGCCAGA GATTCAAAAT ACCACTTATT TATGGTGGGT CAATAACCAA
1081 AGTTTGCCGG TTAGCCACG CTTGCAGTTG TCTAATGATA ACCGCACATT GACTCTCTG
1141 TCCGTTACTC GCAATGATGT AGGACCTTAT GAGTGTGGCA TTCAGAATGA ATTATCCGTT
1201 GATCACTCCG ACCCTGTTAT CCTTAATGTT TTGTATGGCC CAGACGACCC AACTATATCT
1261 CCATCATACA CCTACTACCG TCCCGGCGTG AACTTGAGCC TTTCTTGCCA TGCAGCATCC
1321 AACCCCTG CACAGTACTC CTGGCTGATT GATGGAAACA TTCAGCAGCA TACTCAAGAG
1381 TTATTTATAA GCAACATAAC TGAGAAGAAC AGCGGACTCT ATACTTGCCA GGCCAATAAC
1441 TCAGCCAGTG GTCACAGCAG GACTACAGTT AAAACAATAA CTGTTTCCGC GGAGCTGCCC
1501 AAGCCCTCCA TCTCCAGCAA CAACTCCAAA CCCGTGGAGG ACAAGGATGC TGTGGCCTTC
1561 ACCTGTGAAC CTGAGGCTCA GAACACAACC TACCTGTGGT GGGTAAATGG TCAGAGCCTC
1621 CCAGTCAGTC CCAGGCTGCA GCTGTCCAAT GGCAACAGGA CCCTCACTCT ATTCAATGTC
1681 ACAAGAAATG ACGCAAGAGC CTATGTATGT GGAATCCAGA ACTCAGTGAG TGCAAACCGC
1741 AGTGACCCAG TCACCCTGGA TGTCTCTAT GGGCCGGACA CCCCATCAT TTCCCCCCA
1801 GACTCGTCTT ACCTTTGCGG AGCGGACCTC AACCTCTCCT GCCACTCGGC CTCTAACCCA
1861 TCCCGCAGT ATTCTTGGCG TATCAATGGG ATACCGCAGC AACACACACA AGTTCTCTTT
1921 ATCGCCAAA TCACGCCAAA TAATAACGGG ACCTATGCCT GTTTTGTCTC TAACCTGGCT
1981 ACTGGCCGCA ATAATTCCAT AGTCAAGAGC ATCACAGTCT CTGCATCTGG AACTTCTCCT
2041 GGTCTCTCAG CTGGGCCAC TGTCGGCATC ATGATTGGAG TGCTGGTTGG GGTGCTCTG
2101 ATATAG

```

FIGURA 9

SECUENCIA DE ADN DE wCEA(6D), SEC. ID. NO: 3

nsnpvededavaltcepei qnttylwwvnnqslpvsprlqlsndnrtltllsvtrndv gpy
 ecgiqnel svdhsdpvlnvlygpddptispsytyrpgvnlslschaasnppaqysw lid
 gniqqhtqelfisniteknsglytcqannsasghsr ttvktitvsaelpkpsissnnskpv
 edkdavaf tcepeaqnttylwwvngqslpvsprlqlsngnrtltlfnvtrndarayv
 cgiqnsvsanr sdpvtldvlygpdtpiispdssylsgadlnlschsanpsppqyswrin
 gipqqhtqvlfiakitpnngtyacfvsnlatgrnnsivksitvsasgtspgl sagatvg
 imigvlvgvali

Secuencia de aminoácidos de wCEA (6D) humano

SEC. ID. NO: 4

FIG. 10

Plásmidos de PANVAC-F pT1154 y pT8150

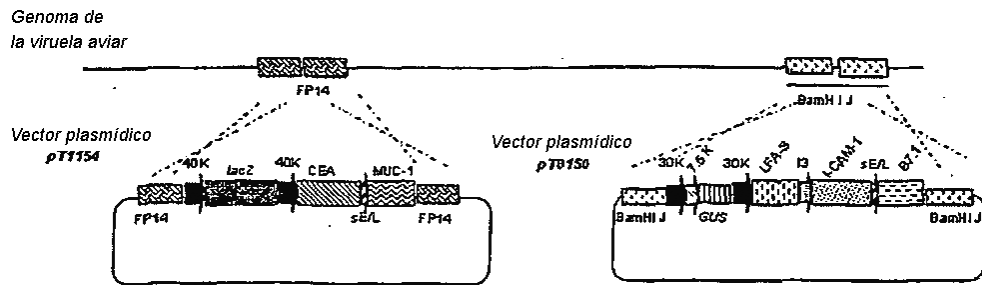


FIGURA 11

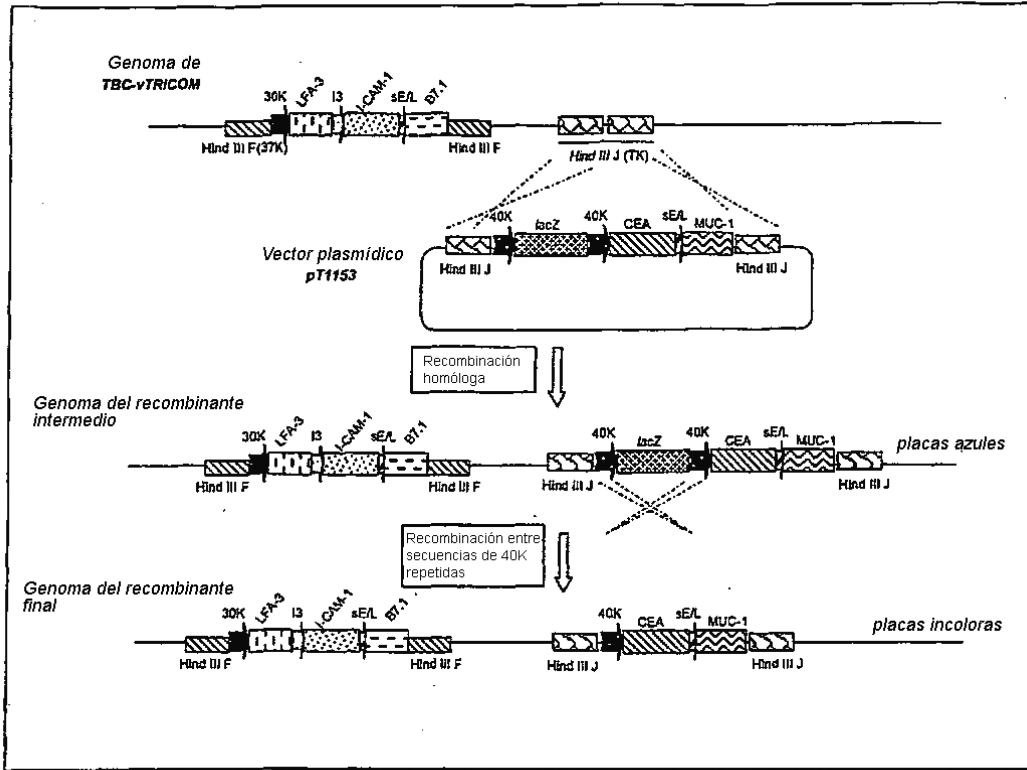


FIGURA 12

GENERACIÓN DEL VIRUS DE LA VACUNA RECOMBINANTE PANVAC-V

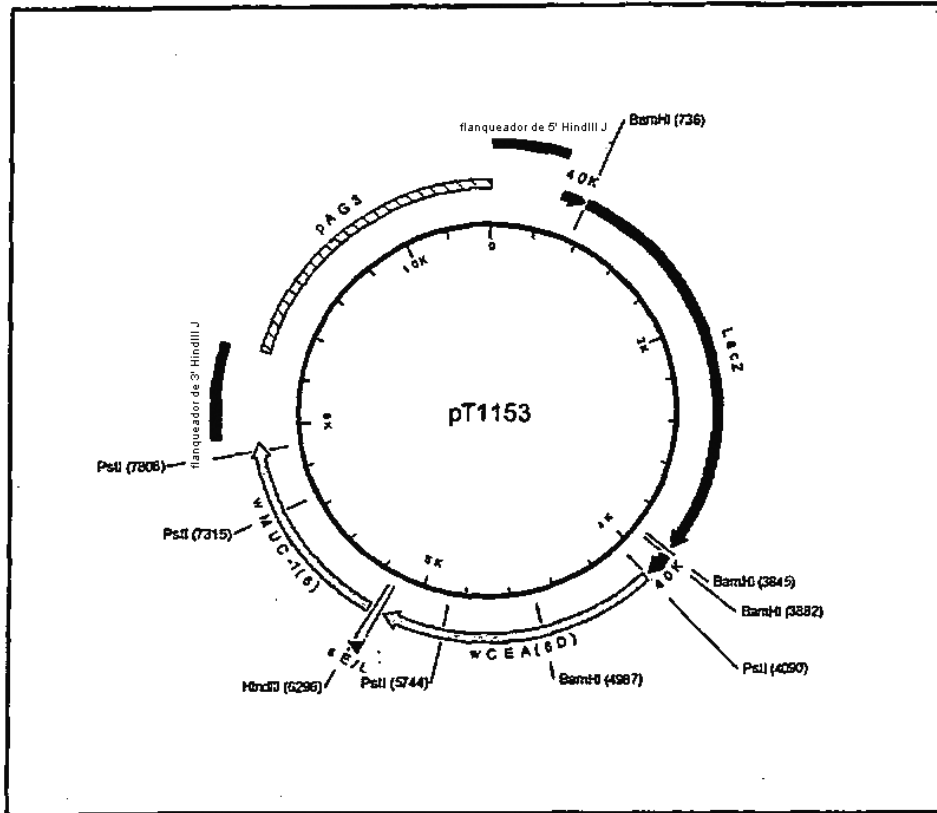


FIGURA 13

MAPA DE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN DEL PLÁSMIDO PT1153

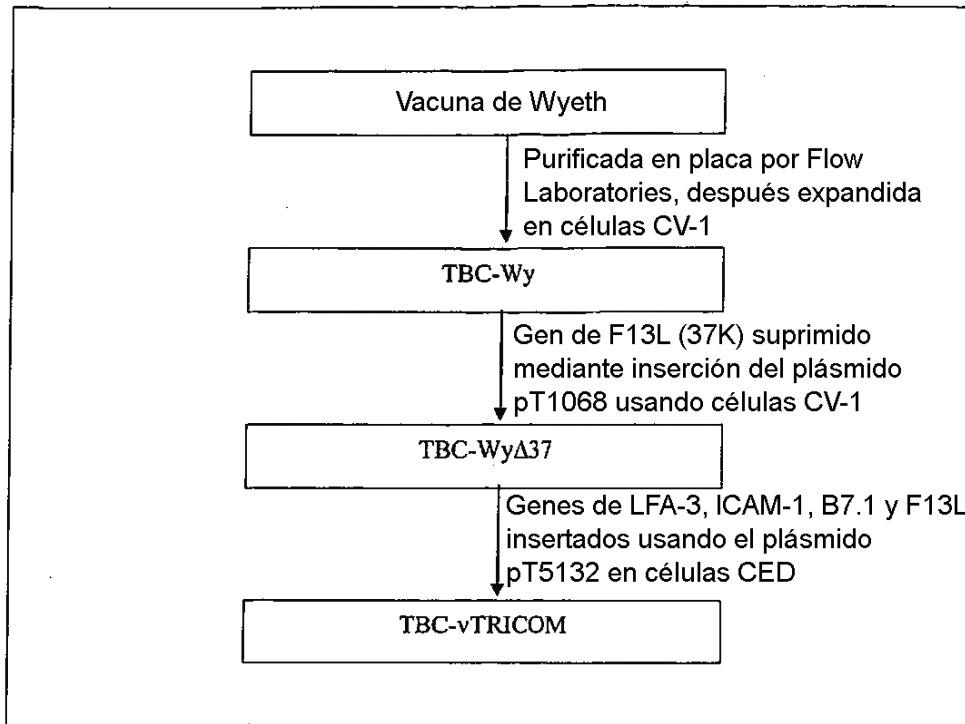


Figura 14

Derivación del virus parental TBC-vTRICOM

FIGURA 15: NUEVOS CASOS DE CÁNCER DE MAMA PREVISTOS PARA 2004

Etapa	%	Nuevos casos	Supervivencia a 5 años	Opciones de tratamiento
0	17%	36,965	100%	<ul style="list-style-type: none"> - Lumpectomía y radiación - Mastectomía simple
I	40%	86,976	98%	<ul style="list-style-type: none"> - Lumpectomía y radiación - Mastectomía simple - Si >1 cm, quimioterapia o terapia hormonal adyuvante
II	31%	67,406	76-88%	<ul style="list-style-type: none"> - Cirugía y terapia sistémica adyuvante (radiación, quimio tamoxifeno)
III	6%	13,046	49-56%	<ul style="list-style-type: none"> - Cirugía y terapia sistémica adyuvante (radiación, quimio tamoxifeno) - Quimioterapia neoadyuvante antes de cirugía
IV	3%	6,523	16% Mediana	<ul style="list-style-type: none"> - Terapia hormonal sistémica y quimioterapia citotóxica - Inmunoterapia con herceptina - Radiación o cirugía paliativa
Etapa desconocida	3%	6,523	Supervivencia 2,2 años	

Desplazamiento hacia diagnóstico más temprano, menor mortalidad