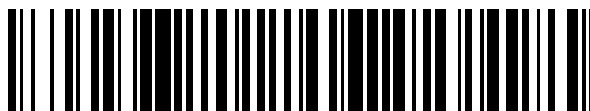


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 500 465**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 39/285** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61K 31/337** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2007 E 07839307 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2073837**

54 Título: **Virus vaccinia Ankara modificado recombinante que codifica antígeno HER-2 en combinación con un taxano para uso en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**06.10.2006 US 850031 P**

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

**30.09.2014**

73 Titular/es:

**BAVARIAN NORDIC INC. (100.0%)  
2425 Garcia Avenue  
Mountain View, CA 94043, US**

72 Inventor/es:

**DEL CAYRE, ALAIN;  
LAUS, REINER y  
MANDL, STEFANIE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 500 465 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

Virus vaccinia Ankara modificado recombinante que codifica antígeno HER-2 en combinación con un taxano para uso en el tratamiento del cáncer

## CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a virus MVA recombinantes que codifican el antígeno HER-2 asociado al tumor, en combinación con taxanos, para uso en el tratamiento de cánceres.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Virus vaccinia Ankara modificado (MVA) está relacionado con el virus vaccinia, un miembro de los géneros Orthopoxvirus, en la familia de Poxviridae. MVA fue generado por 516 pasajes en serie sobre fibroblastos de embrión de pollo de la cepa Ankara del virus vaccinia (CVA) (para revisión, véase Mayr, A., et al. *Infection* 3, 6-14 (1975)). Como consecuencia de estos pasajes a largo plazo, el genoma del virus MVA resultante tenía aproximadamente 31 kilobases de su secuencia genómica suprimidas y, por lo tanto, fue descrito como altamente restringido a células huésped para la replicación a células aviares (Meyer, H. et al., *J. Gen. Virol.* 72, 1031-1038 (1991)). Se ha demostrado en una diversidad de modelos animales que el MVA resultante era significativamente avirulento (Mayr, A. y Danner, K., *Dev. Biol. Stand.* 41: 225-34 (1978)). Adicionalmente, esta cepa de MVA ha sido sometida a ensayo en ensayos clínicos como una vacuna para inmunizar contra la enfermedad de la viruela humana (Mayr et al., *Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Org. B* 167, 375-390 (1987); Stickl et al., *Dtsch. med. Wschr.* 99, 2386- 2392 (1974)). Estos estudios implicaron a más de 120.000 seres humanos, incluidos los pacientes de alto riesgo, y ha demostrado que, en comparación con las vacunas basadas en vaccinia, MVA tenía una virulencia o infección disminuida, al tiempo que inducía una buena respuesta inmune específica.

En las décadas siguientes, MVA se ha diseñado para su uso como un vector viral para la expresión génica recombinante o como una vacuna recombinante (Sutter, G. et al, *Vaccine* 12: 1032- 40 (1994)).

A pesar de que Mayr et al. demostraron durante la década de 1970 que MVA está muy atenuado y es avirulento en seres humanos y mamíferos, determinados investigadores han informado que MVA no está plenamente atenuado en líneas celulares de mamíferos y seres humanos, ya que en estas células podría producirse una replicación residual. (Blanchard et al, *J Gen Virol* 79, 1159-1167 (1998); Carroll y Moss, *Virology* 238, 198-211 (1997); Altenberger, Patente de EE.UU. N ° 5.185.146; Ambrosini et al, *J Neurosci Res* 55(5), 569 (1999)). Se supone que los resultados reseñados en estas publicaciones se han obtenido con diversas cepas conocidas de MVA, ya que los virus utilizados difieren esencialmente en sus propiedades, en particular en su comportamiento de crecimiento en diversas líneas celulares. Tal replicación residual no es deseable por diversas razones, incluyendo problemas de seguridad en relación con el uso en seres humanos.

Se han descrito cepas de MVA que tiene perfiles de seguridad mejorados para el desarrollo de productos más seguros tales como vacunas o productos farmacéuticos. Véanse las Patentes de EE.UU. N°s 6.761.893 y 6.193.752. Tales cepas son capaces de replicación reproductiva en células y líneas celulares no humanas, especialmente en fibroblastos de embrión de pollo (CEF – siglas en inglés), pero no son capaces de replicación reproductiva significativa en determinadas líneas celulares humanas conocidas por permitir la replicación con cepas de vaccinia conocidas. Tales líneas celulares incluyen una línea celular de queratinocitos humanos, HaCat (Boukamp et al. *J Cell Biol* 106 (3): 761-71 (1988)), una línea celular de adenocarcinoma de cuello uterino humano, HeLa (ATCC N° CCL-2), una línea celular de riñón de embrión humano, 293 (ECACC N ° 85120602), y una línea celular de osteosarcoma de hueso humano, 143B (ECACC N ° 91112502). Tales cepas tampoco son capaces de replicación reproductiva significativa *in vivo*, por ejemplo en determinadas cepas de ratón tales como el modelo de ratón transgénico AGR 129, que está seriamente inmune-comprometido y es altamente susceptible a un virus replicante. Véase la Patente de EE.UU. N°s. 6.761.893. Se ha descrito una de tales cepas de MVA y sus derivados y productos recombinantes, conocidos como "MVA-BN". Véanse las Patentes de EE.UU. N°s 6.761.893 y 6.193.752.

MVA y MVA-BN han sido diseñados cada uno para su uso como un vector viral para la expresión génica recombinante o como una vacuna recombinante. Véase, p. ej., Sutter, G. et al, *Vaccine* 12: 1032-1040 (1994), Patentes de EE.UU. N°s 6.761.893 y 6.193.752.

Determinadas estrategias de la inmunoterapia del cáncer han incluido la vacunación con antígenos asociados a tumores. Kastenmueller (2006), *Virology* 350(2), 276-288 describe la infección de células dendríticas humanas con MVA recombinante que expresa HER-2. En determinados casos, estas estrategias han incluido el uso de un sistema de administración para fomentar respuestas inmunes del huésped a antígenos asociados a tumores. En determinados casos, tales sistemas de administración han incluido vectores virales recombinantes. Véase, p. ej., Harrop et al., *Front. Biosci.* 11: 804-817 (2006); Arlen et al., *Semin. Oncol* 32: 549-555 (2005); Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (supl. 2): 14567-14571 (2004). El documento EP 1188834 describe un MVA que codifica HER-2 para fines de inmunización. Lo mismo se describe en el documento WO 2004/058278, el cual, sin embargo, enseña que IL-15 ha de

ser co-expresada.

HER-2 es un antígeno asociado a tumores que se sobre-expresa en células tumorales de un cierto número de pacientes con cáncer. La inmunización con diversos polipéptidos HER-2 se ha utilizado para generar una respuesta inmunitaria contra las células tumorales que expresan este antígeno. Véase, p. ej., Renard et al, J. Immunology 171: 1588-1595 (2003); Mittendorf et al, Cancer 106: 2309-2317 (2006).

Taxanos, tales como paclitaxel y docetaxel, se han utilizado como quimioterapias para pacientes con cáncer. La quimioterapia con taxanos se ha combinado con diferentes tratamientos con vacunas contra el cáncer, lo que resulta en una diversidad de resultados. Véase, Chu et al, J. Immunotherapy 29: 367-380 (2006); Machiels et al., Cancer Res. 61: 3689 - 3697 (2001); Prell et al., Cancer Immunol. Immunother. 55: 1285-1293 (2006); Arlen et al, Clinical Breast Cancer 7: 176-179 (2006); y Arlen et al., Clinical Cancer Res. 12: 1260-1269 (2006). La combinación de vacunas contra el cáncer con quimioterapias ha sido revisada en Chong et al., Expert Opin. Pharmacother. 6: 1-8 (2005) y Emens et al, Endocrine-Related Cancer 12: 1-17 (2005). Burris (2000) Seminars Oncol. 27(2), Supl. 3, 19-23 describe un tratamiento combinado utilizando Docetaxel o Paclitaxel y el anticuerpo anti-HER-2 Herceptin®.

Basado en lo anterior, existe una necesidad en la técnica de reactivos y métodos para la terapia del cáncer.

#### BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La invención abarca una combinación de un MVA recombinante que codifica un polipéptido que comprende un antígeno HER-2 y/o un epítipo del mismo y una dosis tumoricida de un taxano, preferiblemente para uso en métodos para tratar pacientes con cáncer. En una realización, el método comprende administrar al paciente un MVA recombinante que codifica un polipéptido que comprende un antígeno HER-2 y administrar al paciente una dosis tumoricida de un taxano. El tratamiento de combinación es superior a cualquier tratamiento por sí solo.

En una realización preferida, el MVA es MVA-BN.

En una realización, el antígeno HER-2 comprende la SEQ ID NO: 2.

El MVA recombinante se puede administrar antes de la dosis tumoricida del taxano, al mismo tiempo que la dosis tumoricida del taxano, o después de la dosis tumoricida del taxano.

En una realización preferida, el taxano es docetaxel. En otra realización preferida, el taxano es paclitaxel. En una realización, el taxano es docetaxel a una dosis de 75-100 mg/m<sup>2</sup>. En una realización, el taxano es paclitaxel a una dosis de 135-175 mg/m<sup>2</sup>.

En una realización, el MVA recombinante se administra 1-26 semanas antes de la dosis tumoricida del taxano. En una realización, el MVA recombinante se administra 1-3 semanas antes de la dosis tumoricida del taxano.

En una realización, el MVA recombinante se administra 2-60 días después de la dosis tumoricida del taxano. En una realización, el MVA recombinante se administra 2- 7 días después de la dosis tumoricida del taxano.

La invención abarca, además, un kit para el tratamiento de un paciente con cáncer que contiene un MVA recombinante que codifica un polipéptido que comprende un antígeno HER-2 y las instrucciones para administrar el MVA recombinante antes de la dosis tumoricida del taxano, al mismo tiempo que la dosis de la tumoricida taxano, o después de la dosis tumoricida del taxano.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**Figura 1A-B. Análisis de la transferencia Western de la expresión de mHER2 en células CEF primarias (A) o células HeLa (B) después de la inoculación con MVA-BN-mHER2.** Los cultivos celulares fueron inoculados con MVA-BN o MVA-BN-mHER2 a las diluciones mostradas, o con tampón TBS, tal como se describe en el Ejemplo 1. Las células se recogieron de los cultivos 24 horas después y se prepararon lisados celulares. Las muestras se sometieron a electroforesis a través de geles de SDS-PAGE y electrotransferencia sobre membranas de nitrocelulosa. La proteína mHER2 se detectó por incubación con antisuero anti-HER-2 de conejo, seguido por la detección con anticuerpo anti-conejo marcado con fosfatasa alcalina y un sustrato cromogénico tal como se describe en el Ejemplo 1. La proteína HER-2 de longitud completa y el dominio extracelular de HER-2 se muestra como referencia. Las flechas marcan la posición de la proteína detectada con antisuero anti-HER-2 en lisados de cultivos celulares.

**Figura 2A-C. Respuestas de anticuerpos anti-HER-2 en diferentes cepas de ratones tratados con MVA-BN-mHER2.** Ratones C57BL/6 (A) o BALB/c (B) (5 animales en cada grupo) fueron tratados con 2E6 (◆), 1E7 (■) y 5E7 (▲) TCID<sub>50</sub> MVA-BN-mHER2 los días 1, 15 y 29 (indicado por flechas), como se describe en el Ejemplo 2. Se recogieron muestras de sangre y se analizaron diluciones seriadas de los sueros combinados en cuanto a la presencia de anticuerpos anti-HER-2 IgG mediante ELISA, como se describe en el Ejemplo 2. Se muestran para diferentes

instantes los títulos o factores de dilución en los cuales se detectaron señales dos veces por encima del fondo. (C) Ratones BALB/c (◆) y BALB/c NEUT HER-2 transgénico (■) fueron tratados con MVA-BN-mHER2 (1E7 TCID<sub>50</sub>). Títulos de IgG anti-HER-2 se determinaron como en los paneles A y B.

5 **Figura 3A-C. Especificidad para el antígeno de respuestas de anticuerpos anti-HER-2 inducidas por MVA-BN-mHER2.** (A) Pocillos de una placa de microtitulación se recubrieron con ecd-Fc HER-2 (columna negra), ecd-Fc HER-3 (columna gris) y ecd-Fc HER-4 (columna blanca), según se describe en el Ejemplo 2. Los antígenos fueron luego detectados mediante ELISA utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HER-2 de anticuerpos (HER-2 Ab; AB-5, Calbiochem), un anticuerpo anti-fragmento Fc de Ig monoclonal humano (Fc Ab; Southern Biotech) o un anticuerpo control de isotipo monoclonal (Contr Ab). (B) y (C). Ensayos ELISA se realizaron utilizando sueros de ratones C57BL/6 (B) o BALB/c (C) tratados con MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID<sub>50</sub>). Se recogieron sueros de pre-tratamiento antes del primer tratamiento; se recogieron sueros de post-tratamiento el día 42, dos semanas después de la última de las tres inyecciones administradas a intervalos de dos semanas. Los datos mostrados son la media ± desviación estándar, indicada por las barras de error estándar.

15 **Figura 4A-D. Respuestas de células T inducidas por HER-2 en diferentes cepas de ratones tratados con MVA-BN-mHER2.** Ratones C57BL/6 (A y B) o BALB/c (C y D) (5 animales en cada grupo) fueron tratados con TBS o MVA-BN-mHER2 1E7 TCID<sub>50</sub> según se describe en el Ejemplo 3. Cinco días después del último tratamiento, se recogieron los bazo y se prepararon suspensiones de células para la re-estimulación *in vitro*. IFN $\gamma$  secretado se detectó mediante un ensayo estándar de ELISpot según se describe en el Ejemplo 3. A y C, cantidades incrementales de ecd HER-2 (símbolos rellenos) o medio sólo (símbolos en blanco) se añadieron a células de bazo de ratones tratados con TBS (círculos) o MVA-BN-mHER2 (rombos). B y D, células de bazo de ratones tratados con TBS (barras en blanco) o MVA-BN-mHER2 (barras en negro) se volvieron a estimular con un péptido de HER-2 o uno de los péptidos de la toxina del tétanos (TTP2 o TTP30) según se describe en el Ejemplo 3. Los datos mostrados son la media ± desviación estándar, indicada por las barras de error estándar.

25 **Figura 5. Análisis del crecimiento del tumor en ratones pre-tratados con MVA-BN mHER2 (Ajuste profiláctico).** A ratones BALB/c (5 animales en cada grupo) se les inyectaron por vía subcutánea TBS (triángulos negros), MVA-BN-mHER2 (2E7 TCID<sub>50</sub>, círculos negros) o MVA-BN-mHER2 (2E6 TCID<sub>50</sub>, círculos en blanco) según se describe en el Ejemplo 5. Seis semanas después de la última inyección, los ratones fueron enfrentados a células TUBO (1E5) inyectadas por vía intradérmica. El crecimiento del tumor se determinó dos veces por semana a partir de entonces. Los datos mostrados son la media ± desviación estándar, indicada por las barras de error estándar.

30 **Figura 6. Análisis del crecimiento del tumor en ratones tratados con MVA-BN mHER2.** Ratones BALB/c (9 animales en cada grupo) fueron enfrentados a CT26-HER-2 (5E5 células inyectadas por vía intravenosa) el día 1 y fueron tratados por vía intraperitoneal el día 4 con TBS, MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID<sub>50</sub>), o MVA BN (5E7 TCID<sub>50</sub>) según se describe en el Ejemplo 5. Los ratones fueron sacrificados el día 14 y se pesaron sus pulmones. Masa tumoral se calculó restando el peso medio del pulmón de ratones naïfs del peso medio del pulmón de los ratones enfrentados a tumores. Los datos mostrados son la media ± desviación estándar, indicada por las barras de error estándar.

35 **Figura 7. Análisis del crecimiento del tumor en ratones tratados con MVA-BN mHER2 o MVA-BN.** Ratones BALB/c (9 animales en cada grupo) fueron enfrentados a CT26-HER-2 (5E5 células inyectaron por vía intravenosa) el día 1 y fueron tratados por vía intraperitoneal el mismo día con TBS, MVA-BN (5E6 o 5E7 TCID<sub>50</sub>) o MVA-BN-mHER2 (5E6 o 5E7 TCID<sub>50</sub>) según se describe en el Ejemplo 5. Los ratones fueron sacrificados el día 14 y se pesaron sus pulmones. La masa del tumor se calculó restando el peso medio del pulmón de los ratones naïfs a partir del peso medio de pulmón de los ratones enfrentados a tumores. Los datos mostrados son la media ± desviación estándar, indicada por las barras de error estándar.

40 **Figura 8 AB. Respuestas de anticuerpos anti-HER-2 en ratones co-tratados con MVA-BN mHER2 y docetaxel.** Ratones C57BL/6 fueron tratados por vía subcutánea con el control (solución salina tamponada con Tris (TBS); grupo I de 5 animales) o con 5E7 TCID<sub>50</sub> de MVA-BN-mHER2 (9 grupos de 5 animales) los días 1, 22 y 43 (q3 semanas x 3). El efecto del agente quimioterapéutico docetaxel en la inducción de anticuerpos anti-HER-2 se evaluó mediante el tratamiento de los animales con el fármaco en dosis tumorocidas (33 mg/kg) dos días (día -2) (A) o una semana (día -7) (B) antes del tratamiento con MVA-BN-mHER2. El fármaco se inyectó iv una, dos (q3 semanas X2), tres (q3 semanas X3) o cuatro veces (q3 semanas X4) según se describe en la Tabla 2.

45 **Figura 9 AB. Análisis del crecimiento del tumor en ratones pre-tratados con docetaxel y MVA-BN-mHER2 (Ajuste profiláctico).** La integridad de la respuesta inmune inducida por MVA-BN-mHER2 en ratones tratados con dosis tumorocidas de docetaxel se evaluó adicionalmente midiendo la actividad anti-tumor de MVA-BN-mHER2. Ratones tratados según se describe en la leyenda de la Figura 8 fueron enfrentados a células tumorales MC38-HER-2 el día 71 y el crecimiento tumoral se evaluó como se describe en la leyenda de la Figura 5.

50 **Figura 10A-C. Análisis del crecimiento del tumor en ratones co-tratados con docetaxel y MVA-BN-mHER2.** Para cada uno de los subconjuntos experimentales A, B y C, ratones C57BL/6 (40 animales) fueron enfrentados a

5 células MC38-HER-2 el día 1 y después fueron tratados por vía subcutánea con el control (solución salina tamponada con Tris (TBS); 10 animales tratados 3 veces), docetaxel solo (33 mg/kg; 10 animales tratados una vez), MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID<sub>50</sub>; 10 animales tratados dos veces) o docetaxel (1 tratamiento) y MVA-BN-mHER2 (dos tratamientos) en diversas veces para cada uno de los subconjuntos experimentales según se indica en la Figura. El crecimiento del tumor se evaluó dos veces a la semana hasta el sacrificio el día 23.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE DETERMINADAS REALIZACIONES

10 En una realización, la invención abarca el uso de virus MVA recombinantes que codifican un polipéptido que comprende un antígeno HER-2 y/o un epítipo del mismo, y una dosis tumorocida de un taxano para la terapia del cáncer. Los MVA recombinantes se generan mediante la inserción de secuencias heterólogas en un virus MVA. Ejemplos de cepas del virus MVA, que son útiles en la práctica de la presente invención y que se han depositado en cumplimiento de los requisitos del Tratado de Budapest, son las cepas MVA 572, depositada en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (ECACC), Salisbury (Reino Unido) con el número de depósito ECACC 94012707, el 15 27 de enero de 1994, y MVA 575, depositada bajo ECACC 00120707 el 7 de diciembre de 2000. MVA-BN, depositada el 30 de agosto de 2000 en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) bajo el número V00083008, y sus derivados, son cepas ilustrativas adicionales.

20 Aunque se prefiere MVA-BN por su mayor seguridad (menos competente para la replicación), todos los MVA son adecuados para esta invención. De acuerdo con una realización de la presente invención, la cepa MVA es MVA-BN y sus derivados. Una definición de MVA-BN y sus derivados se da en el documento PCT/EP01/13628.

25 Tal como se menciona en esta memoria, un MVA comprende al menos un antígeno asociado a tumor que es el antígeno HER-2. En una realización el antígeno HER-2 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2.

30 En realizaciones adicionales, el antígeno asociado a tumor se modifica para incluir uno o más epítopos T<sub>H</sub> extraños. Un agente inmunoterapéutico contra el cáncer de este tipo se describe en esta memoria en un ejemplo no limitativo y se le alude como "MVA-BN-mHER2". Tal como se describe en esta memoria, tales agentes inmunoterapéuticos contra el cáncer, que incluyen, pero no se limitan a MVA-BN-mHER2, son útiles para el tratamiento del cáncer. La invención permite el uso de tales agentes en regímenes de vacunación de estímulo primario de seres humanos y otros mamíferos, incluidos los pacientes inmuno-comprometidos; y la inducción de respuestas inmunes tanto humorales como celulares tales como la inducción de una respuesta inmune Th1 en un entorno de Th2 pre-existente.

35 El término "polipéptido" se refiere a un polímero de dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados. Los aminoácidos pueden ser de origen natural así como de origen no natural, o un análogo químico de un aminoácido de origen natural. El término también se refiere a proteínas, es decir, biomoléculas funcionales que comprenden al menos un polipéptido; cuando comprenden al menos dos polipéptidos, éstas pueden formar complejos, pueden estar unidas covalentemente o pueden estar unidas no covalentemente. El o los polipéptidos en una proteína pueden estar glicosilados y/o lipidados y/o pueden comprender grupos prostéticos.

40 En determinadas realizaciones, el MVA es MVA-BN, depositado el 30 de agosto de 2000 en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) bajo el número V00083008, y se describe en las patentes de EE.UU. N°s 6.761.893 y 6.193.752. Según se describe en esas publicaciones de patente, MVA-BN no se replica reproductivamente en líneas de células 293, 143B, HeLa y HaCat. En particular, MVA-BN exhibe una relación de amplificación de 0,05 a 0,2 en la línea de células 293 de riñón de embrión humano. En la línea de células 143B de osteosarcoma óseo humano, MVA-BN exhibe una relación de amplificación de 0,0 a 0,6. MVA-BN exhibe una relación de amplificación de 0,04 hasta 0,8 en la línea de células HeLa de adenocarcinoma de cuello uterino humano, y de 0,02 a 0,8 en la línea de células HaCat de queratinocitos humanos. MVA-BN tiene una relación de amplificación de 0,01 a 0,06 en células de riñón de mono verde africano (CV1: ATCC N°. CCL-70).

50 La relación de amplificación de MVA-BN está por encima de 1 en fibroblastos de embrión de pollo (CEF: cultivos primarios) según se describe en las patentes de EE.UU. N°s 6.761.893 y 6.193.752. El virus puede ser propagado y amplificado fácilmente en cultivos primarios de CEF con una relación por encima de 500.

55 En determinadas realizaciones, un MVA recombinante es un derivado de MVA-BN. Tales "derivados" incluyen virus que exhiben esencialmente las mismas características de replicación que la cepa depositada (ECACC N° V00083008), pero que exhiben diferencias en una o más partes de su genoma. Los virus que tienen las mismas "características de replicación" que el virus depositado son virus que se replican con relaciones de amplificación similares a la cepa depositada en células CEF y las líneas de células HeLa, HaCat y 143B; y que muestran características de replicación *in vivo* similares, según se determina, por ejemplo, en el modelo de ratón transgénico AGR129.

60 En determinadas realizaciones, el MVA es un virus vaccinia recombinante que contiene secuencias de nucleótidos adicionales que son heterólogas al virus vaccinia. En determinadas de dichas realizaciones, las secuencias heterólogas codifican los epítopos que inducen una respuesta por el sistema inmune. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, el MVA recombinante se utiliza para vacunar contra las proteínas o agentes que comprenden el epítipo que es HER-2.

En una realización, el antígeno HER-2 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2.

En determinadas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico heterólogo se inserta en una región no esencial del genoma del virus. En determinadas de esas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico heterólogo se inserta en un sitio de delección existente naturalmente del genoma de MVA según se describe en el documento WO 97/02355. Métodos para insertar secuencias heterólogas en el genoma poxviral son conocidos para una persona experta en la técnica.

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden uno o más soportes, aditivos, antibióticos, conservantes, adyuvantes, diluyentes y/o estabilizadores farmacéuticamente aceptables y/o aprobados. Tales aditivos incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a agua, solución salina, glicerol, etanol, agentes humectantes o emulsionantes y sustancias tamponadoras del pH. Soportes ilustrativos son típicamente moléculas grandes, que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados lipídicos o similares.

Para la preparación de vacunas, el MVA se puede convertir en una forma fisiológicamente aceptable. En determinadas realizaciones, una preparación de este tipo se basa en la experiencia en la preparación de vacunas de poxvirus utilizadas para la vacunación contra la viruela tal como se describe, por ejemplo, en Stickl, H. et al., Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392 (1974).

Sigue una preparación ilustrativa. Virus purificado se almacena a  $-80^{\circ}\text{C}$  con un título de  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml formulado en Tris 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. Para la preparación de dosis de vacuna, p. ej.,  $10^2$  -  $10^8$  partículas del virus se pueden liofilizar en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en presencia de peptona al 2% y albúmina humana al 1% en una ampolla, preferiblemente una ampolla de vidrio. Alternativamente, las dosis de vacunas se pueden preparar por etapas, la liofilización del virus en una formulación. En determinadas realizaciones, la formulación contiene aditivos adicionales tales como manitol, dextrano, azúcar, glicina, lactosa, polivinilpirrolidona, u otros aditivos tales como, incluyendo, pero no limitados a antioxidantes o gas inerte, estabilizadores o proteínas recombinantes (p. ej., albúmina de suero humano) adecuada para la administración *in vivo*. La ampolla se sella después y se puede almacenar a una temperatura adecuada, por ejemplo, entre  $4^{\circ}\text{C}$  y la temperatura ambiente durante varios meses. Sin embargo, siempre y cuando no haya necesidad, la ampolla se almacena preferiblemente a temperaturas inferiores a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

En diversas realizaciones que implican la vacunación o terapia, el liofilizado se disuelve en 0,1 a 0,5 ml de una disolución acuosa, preferiblemente solución salina fisiológica o tampón Tris, y se administra sistémica o localmente, es decir, por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intranasal, intradérmica, o cualquier otra vía de administración conocida para un experto en la materia. La optimización del modo de administración, la dosis y el número de administraciones está dentro de la habilidad y el conocimiento de un experto en la técnica.

En determinadas realizaciones, cepas de virus vaccinia atenuadas son útiles para inducir respuestas inmunes en animales inmuno-comprometidos, p. ej., monos (CD4  $<400/\mu\text{l}$  de sangre) infectados con el VIS, o seres humanos inmuno-comprometidos. El término "inmuno-comprometido" describe el estado del sistema inmune de un individuo que exhibe sólo respuestas inmunitarias incompletas o tiene una eficacia reducida en la defensa contra agentes infecciosos.

#### Determinados Antígenos Asociados a Tumores Ilustrativos

En determinadas realizaciones, se produce una respuesta inmune en un sujeto contra un antígeno polipeptídico asociado a células. En determinadas de dichas realizaciones, un antígeno polipeptídico asociado a células es un antígeno asociado a tumores.

En determinadas realizaciones, un antígeno polipeptídico asociado a células es un antígeno auto-proteína distinto de un antígeno asociado a tumores, que se relaciona con diversos procesos patológicos, o un antígeno viral, o antígenos derivados de un parásito intracelular o una bacteria. En determinados casos, tales antígenos asociados a patógenos son a menudo inmunógenos relativamente deficientes (p. ej. antígenos de micobacterias tales como *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*, pero también de protozoos tales como *Plasmodium* spp.).

Se conocen en la técnica numerosos antígenos asociados a tumores.

El antígeno asociado a tumores utilizado en la presente invención es HER-2. HER-2 es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidermal (c-erbB) que consiste hasta la fecha en cuatro receptores diferentes: c-erbB-1 (EGFr), c-erbB-2 (HER-2, c-Neu), c-erbB-3 y c-erbB-4 (Salomon et al, 1995). C-erbB-3 y c-erbB-4 están peor caracterizados que EGFr y HER-2. HER-2 es una glicoproteína de membrana integral. La proteína madura tiene un peso molecular de 185 kD con características estructurales que se asemejan estrechamente al receptor de EGFr (Prigent et al, 1992). EGFr es también un receptor de la membrana integral que consiste en una subunidad. Tiene un peso molecular aparente de 170 kD y consiste en un dominio de unión al ligando de la superficie de 621 aminoácidos, un dominio de transmembrana hidrófobo único de 23 aminoácidos y un dominio de tirosina quinasa citoplasmática altamente conservado de 542 aminoácidos. La proteína está N-glicosilada (Prigent et al, 1994).

Todas las proteínas de esta familia son tirosina quinasas. La interacción con el ligando conduce a la dimerización del receptor, lo que aumenta la acción catalítica de la tirosina quinasa (Bernard. 1995, Chantry 1995). Las proteínas dentro de la familia son capaces de homodimerizarse y heterodimerizarse, lo cual es importante para su actividad. El EGFr transmite efectos que fomentan el crecimiento y estimula la captación de glucosa y aminoácidos por parte de las células (Prigent et al 1992). HER-2 también transmite señales fomentadoras del crecimiento.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico se expresa en tejidos normales en cantidades bajas, pero está sobre-expresado en muchos tipos de cánceres. EGFr está sobre-expresado en cánceres de mama (Earp et al, 1993, Eppenberger 1994), gliomas (Schlegel et al, 1994), cáncer gástrico (Tkunaga et al, 1995), carcinoma escamoso cutáneo (Fujii 1995), cáncer de ovario (van Dam et al, 1994) y otros. HER-2 también se expresa en unos pocos tejidos humanos normales en baja cantidad, de la forma más característica en los epitelios secretores. La sobre-expresión de HER-2 se produce en aproximadamente el 30% de los cánceres de mama, gástrico, pancreático, de vejiga y de ovario.

La expresión de estos receptores varía dependiendo del grado de diferenciación de los tumores y del tipo de cáncer, p. ej., en cáncer de mama, los tumores primarios sobre-expresan ambos receptores; mientras que en el cáncer gástrico, la sobre-expresión se produce en una etapa posterior en los tumores metastáticos (Salomon et al, 1995). El número de receptores sobre-expresados en células de carcinoma es superior a  $10^6$ /célula para varios cánceres de cabeza y cuello, líneas de cáncer de vulva, mama y de ovario aislados de pacientes (Dean et al, 1994).

Hay varias razones por las que la familia EGFr de receptores constituye dianas adecuadas para la inmunoterapia tumoral. En primer lugar, se sobre-expresan en muchos tipos de cánceres, lo cual debería dirigir la respuesta inmune hacia el tumor. En segundo lugar, los tumores a menudo expresan o sobre-expresan los ligandos para esta familia de receptores y algunos son hipersensibles a los efectos proliferativos mediados por los ligandos. En tercer lugar, pacientes con tumores que sobre-expresan los receptores del factor de crecimiento tienen a menudo un pronóstico deficiente. La sobre-expresión ha estado estrechamente vinculada a un pronóstico deficiente, especialmente en el cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer de vejiga y puede estar asociado con fenotipos invasivos/metastáticos, que son más bien insensibles a las terapias convencionales (Eccles et al, 1994).

### 30 **Antígenos Asociados a Tumores Modificados**

En determinadas realizaciones, un antígeno polipeptídico asociado a células se modifica de tal manera que se induce una respuesta de CTL contra una célula que presenta epítomos derivados de un antígeno polipeptídico en su superficie, cuando se presenta en asociación con una molécula MHC clase I en la superficie de una APC (siglas inglesas de célula presentadora de antígenos). En determinadas de dichas realizaciones, al menos un primer epítomo  $T_H$  extraño, cuando está presente, está asociado con una molécula de MHC de clase II en la superficie de la APC. En determinadas de dichas realizaciones, un antígeno asociado a células es un antígeno asociado a tumores.

APCs ilustrativas, capaces de presentar epítomos incluyen células dendríticas y macrófagos. APCs ilustrativas adicionales incluyen cualquier APC pinocitante o fagocitante, que es capaz de presentar simultáneamente 1) epítomos de CTL unidos a moléculas MHC de clase I y 2) epítomos de  $T_H$  unidos a las moléculas de MHC de clase II.

En determinadas realizaciones, las modificaciones de HER-2 están hechas de manera que, después de la administración a un sujeto, se induce a los anticuerpos policlonales para que reaccionen predominantemente con HER-2. Estos anticuerpos podrían atacar y eliminar las células tumorales, así como evitar que las células metastásicas se convierta en metástasis. El mecanismo efector de este efecto antitumoral podría ser mediado a través de complemento y de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Además, los anticuerpos inducidos también podrían inhibir el crecimiento de células cancerígenas a través de la inhibición de la oligo-dimerización dependiente del factor de crecimiento y de la internalización de los receptores. En determinadas realizaciones, tales antígenos polipeptídicos HER-2 modificados podrían inducir respuestas de CTL dirigidas contra epítomos HER-2 conocidos y/o previstos exhibidos por las células tumorales.

En determinadas realizaciones, un antígeno de polipéptido HER-2 modificado comprende un epítomo de CTL del antígeno polipeptídico asociado a células y una variación, en donde la variación comprende al menos un epítomo de CTL de un epítomo  $T_H$  extraño. Determinados de estos antígenos de polipéptidos HER-2 modificados que comprenden al menos un epítomo de CTL y una variación comprenden al menos un epítomo de CTL de un epítomo  $T_H$  extraño, y métodos de producir el mismo, se describen en la Patente de EE.UU. N° 7.005.498 y las patentes de EE.UU. N°s de publicación 2004/0141958 y 2006/0008465.

En determinadas realizaciones, un epítomo  $T_H$  extraño es un epítomo de células T "promiscuo" de origen natural. Epítomos de células T promiscuos de este tipo son activos en una gran proporción de individuos de una especie animal o una población animal. En determinadas realizaciones, una vacuna comprende epítomos de células T promiscuos de este tipo. En determinadas de estas realizaciones, el uso de epítomos de células T promiscuos reduce la necesidad de un gran número de diferentes epítomos de CTL en la misma vacuna. Epítomos de células T promiscuos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a los epítomos de la toxina del tétanos, que incluyen, pero no se limitan a los epítomos P2 y

P30 (Panina-Bordignon et al., 1989), toxina de la difteria, hemaglutinina del virus de la influenza (HA) y antígeno CS de *P. falciparum*.

Epítomos de células T promiscuos adicionales incluyen péptidos capaces de unirse a una gran proporción de moléculas de HLA-DR codificadas por los diferentes HLA-DR. Véase, p. ej., el documento WO 98/23635 (Frazer IH et al., cedido a la Universidad de Queensland.); Southwood S et al., 1998, *J. Immunol.* 160: 3363-3373; Sinigaglia F et al., 1988, *Nature* 336: 778-780; Rammensee HG et al., 1995, *Immunogenetics* 41: 4 178-228; Chiczy RM et al., 1993, *J. Exp. Med* 178: 27 47; Hammer J et al, 1993, *Cell* 74: 197 203; y Falk y K et al, 1994, *Immunogenetics* 39: 230-242. Esta última referencia también se ocupa de ligandos HLA-DQ y -DP.

Todos los epítomos listados en estas referencias son relevantes como epítomos naturales candidatos según se describe en esta memoria, así como los epítomos que comparten motivos comunes con éstos.

En otras determinadas realizaciones, el epítomo de células T promiscuo es un epítomo de células T artificial que es capaz de unirse a una gran proporción de haplotipos. En determinadas de estas realizaciones, el epítomo de células T artificial es un péptido epítomo pan DR ("PADRE") según se describe en el documento WO 95/07707 y en el documento correspondiente de Alexander J et al., 1994, *Immunity* 1: 751 761.

### mHER2

Diversos antígenos polipeptídicos HER-2 modificados y métodos para producir los mismos se describen en la Patente de EE.UU. N° 7.005.498 y en las patentes de EE.UU. N°s de publicación 2004/0141958 y 2006/0008465. Estos documentos describen diversos antígenos polipeptídicos HER-2 modificados que comprenden epítomos de células T promiscuos en diferentes posiciones en el polipéptido de HER-2.

La secuencia de HER-2 humana se puede dividir en un cierto número de dominios basados únicamente en la estructura primaria de la proteína. Estos dominios son como sigue. El dominio (receptor) extracelular se extiende desde los aminoácidos 1 - 654 y contiene varios subdominios como sigue: Dominio I (dominio N-terminal de polipéptido maduro) se extiende desde los aminoácidos 1-173; Dominio II (dominio rico en cisteína, 24 residuos cisteína) se extiende desde los aminoácidos 174 - 323; Dominio III (dominio de unión a ligando en el receptor de EGF homólogo) se extiende desde los aminoácidos 324 - 483; y Dominio IV (dominio rico en cisteína, 20 residuos cisteína) se extiende desde los aminoácidos 484 - 623. Los residuos de transmembrana se extienden desde los aminoácidos 654 - 675. El dominio intracelular (quinasa) se extiende desde los aminoácidos 655 - 1235 y contiene el dominio de tirosina quinasa, que se extiende desde los aminoácidos 655-1010 (dominio de TK del núcleo se extiende desde 725 - 992); y el dominio C-terminal, que se extiende desde los aminoácidos 1011 - 1235.

La selección de sitios en la secuencia de aminoácidos de HER-2 a ser desplazados por cualquiera de los epítomos T auxiliares humanos P2 o P30 se describe en la Patente de EE.UU. N° 7.005.498 y en las patentes de EE.UU. N°s de publicación 2004/0141958 y 2006/0008465. En resumen, se consideraron los siguientes parámetros:

1. Epítomos CTL conocidos y previstos;
2. Homología con receptores relacionados (EGFR, en particular);
3. Conservación de los residuos cisteína;
4. Bucle previsto, estructuras de hélice  $\alpha$  y lámina  $\beta$ ;
5. Sitios de N-glicosilación potenciales;
6. Predicción de residuos de aminoácidos expuestos y enterrados;
7. Organización de dominio.

Los epítomos de CTL parecen estar formando racimos en el dominio I, el dominio III, el dominio TM y en dos o tres "puntos calientes" en el dominio TK. Según se describe en la Patente de EE.UU. N° 7.005.498 y en las patentes de EE.UU. N°s de publicación 2004/0141958 y 2006/0008465, éstos deben estar muy conservados.

Es probable que las regiones con un alto grado de homología con otros receptores sean estructuralmente importantes para la estructura terciaria "global" de HER-2 y, por lo tanto, para el reconocimiento de anticuerpos, mientras que las regiones con baja homología posiblemente pueden intercambiarse con sólo alteraciones locales de la estructura como la consecuencia.

Los residuos cisteína están a menudo implicados en la formación intramolecular de puentes disulfuro y, por lo tanto, están implicados en la estructura terciaria y no se deberían cambiar. Regiones previstas para formar estructuras de hélice alfa o de láminas beta deberían evitarse como puntos de inserción de epítomos extraños, ya que se piensa que estas regiones están implicadas en el plegamiento de la proteína.

Deberían conservarse sitios potenciales de N-glicosilación si se desea una manosiación de la proteína.

De preferencia, deberían conservarse regiones previstas (por sus propiedades hidrofóbicas) para encontrarse en el interior de la molécula, ya que podrían estar implicadas en el plegamiento. Por el contrario, las regiones expuestas a disolventes podrían servir como posiciones candidatas para la inserción del modelo T<sub>H</sub> de los epítomos P2 y P30.



Finalmente, debería tenerse en consideración la organización de los dominios de la proteína debido a su relevancia para la estructura y función de proteínas.

5 Tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 7.005.498 y en las patentes de EE.UU. N°s de publicación 2004/0141958 y 2006/0008465, el foco de la estrategia ha sido conservar lo más posible la estructura de la parte extracelular de HER-2, ya que ésta es la parte de la proteína que es relevante como una diana para neutralizar anticuerpos. Por el contrario, la parte intracelular de HER-2 ligado a la membrana nativa en la superficie de las células cancerígenas es inaccesible para el sistema inmunitario humoral.

10 En la Patente de EE.UU. N° 7.005.498 y en las patentes de EE.UU. N°s de publicación 2004/0141958 y 2006/0008465 se proporcionan diversas construcciones ilustrativas utilizando los epítotos P2 y P30 de la toxina del tétanos insertados en diversos dominios de HER-2. Un antígeno polipeptídico HER-2 modificado ilustrativo, al que se alude como "mHER2," comprende los dominios extracelulares y nueve aminoácidos del dominio transmembrana; el epítoto P2  
15 insertado en el Dominio II entre los residuos de aminoácidos 273 a 287 del polipéptido de HER-2 modificado y el epítoto P30 insertado en el Dominio IV entre los residuos de aminoácidos 655 a 675 del polipéptido HER-2 modificado.

### **MVA-BN-mHER2 Recombinante**

20 En una realización no limitante, MVA recombinante que comprende un antígeno asociado a tumores, p. ej. MVA-BN-mHER2, se construye como sigue. El stock de virus inicial se genera por recombinación en cultivo celular utilizando un tipo de célula permisiva para la replicación, p. ej., células CEF. Las células se inoculan tanto con un virus vaccinia atenuado, p. ej. MVA-BN, y se transfectan con un plásmido de recombinación (p. ej., pBN146) que codifica el antígeno asociado a tumores, p. ej. mHER2, secuencia y regiones flanqueantes del genoma del virus. En una realización no  
25 limitante, el plásmido pBN146 contiene secuencias que también están presentes en MVA-BN (los marcos de lectura abierta 14L y 15L). La secuencia de mHER2 se inserta entre las secuencias de MVA-BN para permitir la recombinación en el genoma viral de MVA-BN. En determinadas realizaciones, el plásmido también contiene una casete de selección que comprende uno o más genes de selección para permitir la selección de las construcciones recombinantes en células CEF. En una realización preferida, el MVA recombinante codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO:  
30 2.

La infección y transfección simultáneas de los cultivos permite que ocurra una recombinación homóloga entre el genoma viral y el plásmido de recombinación. A continuación se aísla el virus portador de insertos, se caracteriza y se preparan los stocks de virus. En determinadas realizaciones, el virus se hace pasar en cultivos de células CEF en  
35 ausencia de selección para permitir la pérdida de la región que codifica los genes de selección, gpt y EGFP.

### **Terapia de combinación con agentes citotóxicos**

40 Los agentes citotóxicos exhiben actividades inmunomoduladoras a dosis sub-tumorizadas que podrían ser beneficiosas para la eficacia de la vacuna. Sin embargo, a dosis tumorizadas (dosis altas), estos agentes podrían ser perjudiciales para las actividades de vacunas. Se ha demostrado ahora que las dosis tumorizadas equivalentes a seres humanos de docetaxel administradas a ratones durante el curso del tratamiento con MVA-BN-mHER2 no afectaron a los títulos de anti-HER-2 de anticuerpos inducidos por la vacuna. Además de ello, el tratamiento de ratones con MVA-BN-mHER2 aumentó la sensibilidad del tumor a docetaxel in vivo. Por lo tanto, simultáneamente, antes o después de la  
45 quimioterapia contra MVA-BN-mHER2 el tratamiento puede ser superior a cualquier tratamiento solo.

Pacientes con un cáncer mediado por células que sobre-expresan el antígeno HER-2 asociado a tumores pueden ser tratados mediante la combinación de MVA que codifica un antígeno HER-2 con un taxano. En una realización  
50 preferida, el MVA es MVA-BN. En una realización particularmente preferida, el MVA codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 2.

El MVA recombinante que codifica un antígeno HER-2 puede administrarse ya sea sistémica o localmente, es decir, por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intranasal, intradérmica, o por cualquier otra vía de  
55 administración conocida para un experto en la materia. En una realización, se administran al paciente  $10^5$  -  $10^{10}$  TCID<sub>50</sub> del MVA recombinante. Preferiblemente, se administran al paciente  $10^7$  -  $10^{10}$  TCID<sub>50</sub> del MVA recombinante. Más preferiblemente, se administran al paciente  $10^8$  -  $10^{10}$  TCID<sub>50</sub> del MVA recombinante. Lo más preferiblemente, se administran al paciente  $10^8$  -  $10^9$  TCID<sub>50</sub> del MVA recombinante.

60 El cáncer es preferiblemente un cáncer de mama, un cáncer de pulmón, un cáncer gástrico, un cáncer pancreático, un cáncer de vejiga o un cáncer de ovario. En una realización preferida, el cáncer es un cáncer de mama metastásico.

El paciente con cáncer puede ser cualquier mamífero, incluido un ratón o rata. Preferiblemente, el paciente con cáncer es un primate, lo más preferiblemente un ser humano.

65 En una realización, el taxano es docetaxel. En otra realización, el taxano es paclitaxel. El taxano se administra

preferiblemente a una dosis tumoricida. Una "dosis tumoricida" de docetaxel es de al menos 50 mg/m<sup>2</sup>. Preferiblemente, la dosis tumoricida de docetaxel es de 75-100 mg/m<sup>2</sup>, que corresponde a una dosis de aproximadamente 25-33 mg/kg. Una "dosis tumoricida" de paclitaxel es de al menos 90 mg/m<sup>2</sup>. Preferiblemente, la dosis tumoricida de paclitaxel es 135-175 mg/m<sup>2</sup>. Una "dosis sub-tumoricida" de un taxano es una dosis por debajo de la dosis tumoricida. El taxano puede administrarse por medios conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, por vía intravenosa.

En una realización, el taxano y el MVA que codifica un polipéptido que comprende un antígeno HER-2 se administran al mismo tiempo. El tratamiento de combinación es superior a cualquiera de los tratamientos solos.

En una realización, el taxano se administra antes del MVA que codifica un polipéptido que comprende un antígeno HER-2. En una realización, el MVA que codifica un antígeno HER-2 se administra en el espacio de 6 meses. En determinadas realizaciones, el MVA que codifica un antígeno HER-2 se administra en el espacio de 3 meses, en el espacio de 2 meses o en el espacio de 1 mes después del taxano. En una realización, el MVA que codifica un antígeno HER-2 se administra en el espacio de los 21 días después del taxano. En una realización, el MVA que codifica un antígeno HER-2 se administra en el espacio de los 14 días después del taxano. En una realización, el MVA que codifica un antígeno HER-2 se administra en el espacio de los 7 días después del taxano. Habitualmente, el MVA que codifica un antígeno HER-2 se administra al menos 2 días después del tratamiento con el taxano. El tratamiento de combinación es superior a cualquiera de los tratamientos solos.

En una realización, el taxano se administra después del MVA que codifica un polipéptido que comprende un antígeno HER-2. Habitualmente, el MVA que codifica un antígeno HER-2 se administra al menos 1 semana antes del tratamiento con el taxano. En una realización, el MVA que codifica un antígeno HER-2 se administra menos de 2 años antes del taxano. En determinadas realizaciones, el MVA que codifica un antígeno HER-2 se administra menos de 1 año, menos de 6 meses o menos de 3 meses antes del taxano. En una realización, el MVA que codifica un antígeno HER-2 se administra 1-26 semanas antes que el taxano. En una realización, el MVA que codifica un antígeno HER-2 se administra 1-9 semanas antes que el taxano. En una realización, el MVA que codifica un antígeno HER-2 se administra 1-3 semanas antes que el taxano. El tratamiento de combinación es superior a cualquiera de los tratamientos solos.

En determinadas realizaciones, el taxano se administra tanto antes como después del MVA que codifica un antígeno HER-2. En otras realizaciones, el MVA que codifica un antígeno HER-2 se administra tanto antes como después del taxano. La administración del MVA y el taxano puede ser una sola administración o administraciones múltiples. Por ejemplo, las administraciones pueden estar separadas en 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 semanas.

La invención abarca kits que comprenden MVA recombinante. El MVA recombinante puede estar contenido en un vial o recipiente. Preferiblemente, el MVA recombinante codifica un polipéptido que comprende un antígeno HER-2. En diversas realizaciones, los kits para la vacunación que comprenden un MVA recombinante para la primera vacunación ("cebado") en un primer vial o recipiente y para una segunda vacunación ("impulso") en un segundo vial o recipiente.

En una realización, el kit puede contener un MVA recombinante e instrucciones para la administración del MVA recombinante antes de la administración de una dosis tumoricida de un taxano. Las instrucciones pueden instruir que el MVA es para ser administrado en cualquier instante entre 6 meses y 1 semana antes de la administración del taxano. En realizaciones preferidas, las instrucciones enseñan a que el MVA es para ser administrado en cualquier instante entre 3 meses y 1 semana, seis semanas y 1 semana, 1 mes y 1 semana, 3 semanas y 1 semana y 2 semanas y 1 semana antes de la administración del taxano. En una realización, las instrucciones pueden instruir que el MVA es para ser administrado en cualquier instante entre 1 semana y 0 días antes de la administración del taxano.

El kit también puede contener un MVA recombinante e instrucciones para la administración del MVA recombinante al mismo tiempo que la administración de una dosis tumoricida de un taxano.

El kit también puede contener un MVA recombinante e instrucciones para la administración del MVA recombinante después de la administración de una dosis tumoricida de un taxano. Las instrucciones pueden enseñar que el MVA es para ser administrado en cualquier instante entre 1 día y 6 meses después de la administración del taxano. En realizaciones preferidas, las instrucciones que enseñan que el MVA es para ser administrado en cualquier instante entre 2 días y 1 semana, 2 días y 2 semanas, 2 días y 3 semanas, 2 días y 1 mes, 2 días y 2 meses, y 2 días y 3 meses y 2 días y 6 meses después de la administración del taxano. En una realización, las instrucciones pueden enseñar que el MVA es para ser administrado en cualquier instante entre 0 y 2 días después de la administración del taxano.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

#### Construcción de MVA-BN-mHER2 y Análisis de la Expresión de Proteínas en Células Infectadas

Una infección y transfección simultáneas de los cultivos permitieron que se produjera una recombinación homóloga entre el genoma viral y el plásmido de recombinación. Se aisló el virus portador de insertos, se caracterizó y se

prepararon reservas de virus.

5 El plásmido pBN146 contiene secuencias que también están presentes en MVA-BN (los marcos de lectura abierta 14L y 15L). Se insertó la secuencia mHER2 entre las secuencias de MVA-BN para permitir la recombinación en el genoma viral de MVA-BN. Por lo tanto, se construyó un plásmido que contenía la secuencia mHER2 aguas abajo de un promotor de poxvirus, específicamente el promotor del gen de cuerpo de inclusión del virus de la viruela vacuna de tipo A. El plásmido también contenía una casete de selección que comprendía un promotor del virus vaccinia sintético (Ps), un gen de resistencia a los fármacos (guanina-xantina fosforribosiltransferasa; Ecogpt), un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES), y la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP). Los dos genes de selección (gpt y EGFP) fueron  
10 codificadas por un único transcrito bicistrónico.

15 La secuencia de HER-2 se modificó mediante la adición de secuencias de nucleótidos que codifican los epítopos de la toxina del tétanos p2 y p30 para aumentar la respuesta inmune contra la misma. Después de haber insertado mHER2 en el genoma de MVA-BN, el virus de la "región del inserto" tenía la siguiente estructura: promotor AT1 - secuencia de mHER2 - promotor Ps- - gpt - IRES - EGFP. La región del inserto estaba flanqueada por las secuencias (F1 y F2) de la región intergénica de MVA-BN 14L en el plásmido bacteriano de recombinación pBN146. La secuencia de nucleótidos de la construcción se muestra a continuación.

AGTATGCATTTTTACGGATGGAGTCTCGGTCTAAAAACGGGAATGTACTATCTACGTACG  
 AAACCCGCATCCGCTCCCATTTCAATTCACATTGGACAAGGATAAAAATAAAACCACTGGTG  
 GTTTGCGATTCCGAAATCTGTACATCATGCAGTGGTTAAACAAATCTAGAACTAGTTTAA  
 TTAAGGAGCTGTTTTGAATAAAAATTTTTTTATAATAAATCTAGAACTAGTGGATCCCCCG  
 GGCTGCAGGAATTCGATCTAGCCGCCACCATGGAGCTGGCGGCCTTGTGCCGCTGGGGGC  
 TCCTCCTCGCCCTCTTGCCCCCGGAGCCGCGAGCACCCAAGTGTGCACCCGGCACAGACA  
 TGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCTCTACC  
 AGGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAACCTGGAACCTCACCTACCTGCCACCAATGCCAGCT  
 TAAGTTTCCTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAACCAAG  
 TGAGGCAGGTCCCCTGCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACA  
 ACTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGAGACCCGCTGAACAATACCACCCCTGTACAG  
 GGGCCTCCCCAGGAGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCACAGAGATCTTGAAAG  
 GAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCCAGCTCTGCTACCAGGACACGATTTTGTGGAAGG  
 ACATCTTCCACAAGAACAACCAGCTGGCTCTCACACTGATAGACACCAACCGCTCTCGGG  
 CCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGCTGSSGGAGAGAGTTCTGAGG  
 ATTGTCAGAGCCTGACGCGCACTGTCTGTGCCGGTGGCTGTGCCCGCTGCAAGGGGCCAC  
 TGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTGCACGGGCCCCAAGCACTCTG  
 ACTGCCTGGCCTGCCTCCACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCCAGCCC  
 TGGTCCAGTACATCAAAGCTAACTCCAAATTCATCGGTATCACCGAGCTGCGGTATACAT  
 TCGGCGCCAGCTGTGTGACTGCCTGTCCCTACAACCTACCTTTCTACGGACGTGGGATCCT  
 GCACCCTCGTCTGCCCCCTGCACAACCAAGAGGTGACAGCAGAGGATGGAACACAGCGGT  
 GTGAGAAGTGCAGCAAGCCCTGTGCCCGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACTTGC  
 GAGAGGTGAGGGCAGTTACCAGTGCCAATATCCAGGAGTTTGCTGGCTGCAAGAAGATCT  
 TTGGGAGCCTGGCATTCTGCGCGAGAGCTTTGATGGGGACCCAGCCTCCAACACTGCCC  
 CGCTCCAGCCAGAGCAGCTCCAAGTGTGAGACTCTGGAAGAGATCACAGGTTACCTAT  
 ACATCTCAGCATGGCCGGACAGCCTGCCTGACCTCAGCGTCTTCCAGAACCTGCAAGTAA  
 TCCGGGGACGAATTCGCACAATGGCGCTACTCGCTGACCCTGCAAGGGCTGGGCATCA  
 GCTGGCTGGGGCTGCGCTCACTGAGGGAACCTGGGCAGTGGACTGGCCCTCATCCACCATA  
 ACACCCACCTCTGCTTCGTGCACACGGTGCCCTGGGACCAGCTCTTTCGGAACCCGCACC  
 AAGCTCTGCTCCACACTGCCAACCCGGCCAGAGGACGAGTGTGTGGGCGAGGGCCTGGCCT

GCCACCAGCTGTGCGCCCGAGGGCACTGCTGGGGTCCAGGGCCCACCCAGTGTGTCAACT  
 GCAGCCAGTTCCTTCGGGGCCAGGAGTGCGTGGAGGAATGCCGAGTACTGCAGGGGCTCC  
 CCAGGGAGTATGTGAATGCCAGGCACTGTTTGCCGTGCCACCCTGAGTGTGAGCCCCAGA  
 ATGGCTCAGTGACCTGTTTTGGACCGGAGGCTGACCAGTGTGTGGCCTGTGCCCACTATA  
 AGGACCCTCCCTTCTGCGTGGCCCGCTGCCCCAGCGGTGTGAAACCTGACCTCTCCTACA  
 TGCCCATCTGGAAGTTTCCAGATGAGGAGGGCGCATGCCAGCCTTGCCCCATCAACTGCA  
 CCCACTCCTGTGTGGACCTGGATGACAAGGGCTGCCCCGCCGAGCAGAGAGCCAGCCCTC  
 TGACGTCCTTCAACAACCTCACCGTGAGCTTCTGGCTGCGCGTGCCCAAGGTGAGCGCCA  
 GCCACCTGGAGATCGTCTCTGCGGTGGTTGGCATTCTGTAGAAGCTTGGTACCGAGCTCG  
 GATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCATCAAG  
 CTTATCGATAACGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAGTTAATTAAGGATCCCCCG  
 GGCTGCAGGAATTCCATTTTATTCTCAAATGAGATAAAGTGAAAATATATATCATATAT  
 ACAAAGTA

(SEQ ID NO: 1).

Los codones de inicio y detención de HER2 se indican en negrita. Las secuencias flanqueantes se indican en cursiva.

5

La traducción del polipéptido mHER2 codificado se muestra a continuación:

MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMLRRLPASPETHLDMLRHLIYQGCQVVQGNL  
 ELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNG  
 DPLNNTTPVTGASPGGLRELQRLSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLA  
 LTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQSLTRTV CAGGCARCKGPLPTDCCHEQC  
 AAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVQYIKANSKFIGITELRYTFGASCVTACP  
 YNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVAVTSAN  
 IQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVPETLEEITGYLYISAWPDSL  
 DLSVFNQLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSSLALIHNNTHLCFVHTV  
 FWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLAHQLCARGHCWGGPTQCVNCSQFLRGQEC  
 VEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDP PFCVARC  
 PSGVKPDL SYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGC PAEQRASPLTSFNNFTVS  
**FWLRVPKVSASHLEIVSAVVGIL.**

(SEQ ID NO: 2).

10

Los epítomos de la toxina del tétanos de las secuencias p2 y p30 se indican en negrita.

15

Cultivos de CEF fueron inoculados con MVA-BN y también se transfectaron con el ADN del plásmido pBN146. A su vez, muestras de estos cultivos celulares se inoculan en cultivos de CEF en medio que contenía fármacos de selección y los clones virales que expresan EGFP se aislaron mediante purificación en placa. Las reservas de virus que crecieron en presencia de los fármacos de selección y la EGFP expresada se designaron MVA-BN-mHER2. La generación de MVA-BN-mHER2 y la preparación de la reserva de virus implicaba doce (12) pasajes secuenciales, incluyendo cinco (5) purificaciones en placa.

A continuación, MVA-BN-mHER2 se hizo pasar en cultivos de células CEF en ausencia de fármacos de selección. La ausencia de los fármacos de selección permitía la pérdida de la región que codifica los genes de selección *gpt*, y EGFP y el promotor asociado (la casete de selección) de la secuencia insertada. La recombinación que resulta en la pérdida de la casete de selección es mediada por la región F1 I4L y una subsección de esa región, la repetición F1 (F1 rpt), que flanquean la casete de selección en el plásmido pBN146. Estas secuencias duplicadas se incluyeron para mediar en la recombinación que resulta en la pérdida de la casete de selección, dejando sólo la secuencia mHER2 insertada en la región intergénica I4L.

Se preparó un virus purificado en placa que carece de la casete de selección. Tal preparación implicaba quince (15) pasajes, incluidas cinco (5) purificaciones en placa.

La presencia de la secuencia mHER2 y la ausencia de virus MVA-BN parental en las reservas de MVA-BN-mHER2 se confirmó por análisis de PCR, y se utilizó una PCR anidada para verificar la ausencia de la casete de selección (los genes *gpt* y EGFP).

La expresión de la proteína mHER2 se demostró en células inoculadas con MVA-BN-mHER2 *in vitro*. Cultivos de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) o células HeLa fueron inoculados con MVA-BN-mHER2 o MVA-BN, en las diluciones señaladas, o con tampón TBS. Las células se recogieron de los cultivos 24 horas después y se prepararon lisados celulares. Las muestras se aplicaron a geles de SDS-PAGE (NuPAGE® Novex geles Bis-Tris al 4% a 12%, Invitrogen), y se sometieron a electroforesis en tampón MOPS bajo condiciones reductoras (ditiotreitól). Se incluyeron dos patrones de referencia obtenidos de Pharmexa A/S, a saber, el patrón HER-2 y el patrón del dominio extracelular de HER-2 (0,3 ug de HER-2 ecd). Los geles se sometieron a electrotransferencia sobre membranas de nitrocelulosa, que se incubaron con antisuero anti-HER-2 de conejo (obtenido de Pharmexa A/S). El anticuerpo HER-2 ligado fue revelado con un anticuerpo anti-conejo marcado con fosfatasa alcalina y sustrato cromogénico (Western Breeze™, Invitrogen).

Los resultados se muestran en la Figura 1. Las flechas marcan la posición de la proteína detectada con antisuero anti-HER-2 en lisados de cultivos celulares inoculados con MVA-BN mHER2. El antígeno se detectó en lisados de ambos tipos de células inoculadas con MVA-BN-mHER2 (representado por flechas en la Figura 1) que era de un tamaño similar a los patrones de referencia de la proteína HER-2. No se detectaron proteínas en lisados de cultivos inoculados con MVA-BN o con solución salina tamponada con Tris (TBS) que eran similares en tamaño a los patrones de referencia de la proteína HER-2.

Estos datos demuestran la expresión, en células aviares y humanas, de mHER2 después de la inoculación de las células con MVA-BN-mHER2. Por lo tanto MVA-BN representa un vehículo de suministro eficaz para la expresión de antígenos transgénicos tales como mHER2 en células humanas.

## Ejemplo 2

### Inducción de una respuesta inmune contra HER-2 en ratones tratados con MVA-BN-mHER2

La inducción de una respuesta inmune anti-HER-2 después del tratamiento con MVA-BN-mHER2 se evaluó tanto en ratones BALB/c como C57BL/6, dos cepas de ratón con diferentes orígenes o haplotipos inmunológicos. La inducción de una respuesta inmune anti-HER-2 tras el tratamiento con MVA-BN-mHER2 también fue evaluada en ratones BALB/c NeuT, una cepa de ratón HER-2 transgénica. En estos estudios se evaluaron diversas dosis de MVA-BN-mHER2 que oscilaban entre 2E6 y 5E7 TCID<sub>50</sub> según se describe más adelante. Se recogieron muestras de sangre un día antes de cada uno de los tratamientos y en diversos momentos durante y después del tratamiento según se describe a continuación. Las respuestas humorales (producción de IgG anti-HER-2) se analizaron mediante el ensayo ELISA. Se recogieron esplenocitos después del tratamiento final y las respuestas celulares se analizaron mediante ELISpot. Estos estudios se describen en el Ejemplo 3.

*Cepas de ratón:* ratones hembras Balb/c y C57BL/6 de 8-10 semanas de edad se obtuvieron de HSD. Ratones BALB/c NeuT fueron un generoso regalo de Guido Forni. Estos ratones expresan un oncogén HER-2/Neu activado bajo el control de un virus de tumor mamario de ratón quimérico (MMTV). BALB/c Neut hembras no muestran anomalías morfológicas de la glándula mamaria hasta las 3 semanas de edad. Luego progresan a través de la hiperplasia atípica en un carcinoma lobular *in situ*. Hacia las 25 semanas de edad, las 10 glándulas mamarias muestran carcinomas invasivos (Boggio et al, 1998, J. Exp. Med.). Todos los experimentos utilizaron de cinco a diez ratones por grupo.

### Inducción de respuestas de anticuerpos anti-HER-2 en ratones tratados con MVA-BN-mHER2

A ratones BALB/c, C57BL/6 y BALB/c Neut se les inyectó por vía subcutánea una disolución control (solución salina tamponada con Tris (TBS)), o con 2E6, 1E7 o 5E7 TCID<sub>50</sub> de MVA-BN-mHER2 los días 1, 15 y 29. Cinco animales se encontraban en cada uno de esos grupos de tratamiento de ensayo. Las muestras de sangre se recogieron los días 0, 14, 28, 42 y 56. Los sueros de cada uno de los cinco animales en cada uno de los grupo de ensayo se agruparon y

analizaron en cuanto a la presencia de anticuerpos de IgG anti-HER-2 utilizando un ensayo ELISA.

El ensayo ELISA se llevó a cabo como sigue. Las placas de ELISA se revistieron primero con quimera ErbB2/Fc humana recombinante (R + D System, diluido en tampón de revestimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200 mM, pH 9,6)) a 2 µg/ml (50 µl/pocillo) durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron seis veces con PBS + Tween al 0,05% utilizando un lavador de placas (Wellwash AC, Thermo Electronics) y subsiguientemente se bloquearon durante 1 hora con PBS + Tween al 0,05%. Las placas se lavaron seis veces de nuevo. Suero de ratón se diluyó en PBS + Tween al 0,05% y se añade a razón de 50 µl/pocillo. Las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Después las placas se lavaron 6 veces y se añadió anticuerpo secundario de IgG-HRP anti-ratón de oveja (Southern Biotech J3003-VI4513) (50 µl/pocillo diluido a razón de 1:1000 en PBS + Tween al 0,05%). Las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron seis veces y luego se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato TMB a todos los pocillos. Las placas se incubaron durante veinte minutos en la oscuridad y, a continuación, se añadieron a todos los pocillos 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M. La absorbancia a 450 nm en cada uno de los pocillos se determinó utilizando un lector de placas (Thermo Electronics).

Los resultados se muestran en las Figuras 2A-C. Las Figuras 2A y 2B muestran que se detectó una respuesta del anticuerpo anti-HER-2 en todos los grupos tratados con MVA-BN-mHER2 tanto en ratones C57BL/6 como BALB/c. En ambas cepas, los títulos anti-HER-2 de anticuerpos aumentaron con múltiples administraciones de MVA-BN-mHER2 y se estabilizaron después de cesar el tratamiento. La Figura 2C muestra que también se detectó una respuesta del anticuerpo anti-HER-2 en ratones BALB/c Neut transgénicos que expresan constitutivamente HER-2. Por lo tanto, estos datos demuestran que MVA-BN-mHER2 es un inmunógeno potente que puede superar la tolerancia inmune a HER-2, un atributo que puede ser útil para el tratamiento de pacientes con cáncer.

#### *Especificidad para antígenos de respuesta del anticuerpo anti-HER-2 inducida por MVA-BN-mHER2*

Los sueros de ratones tratados con MVA-BN-mHER2 también se evaluaron mediante ELISA utilizando el proceso arriba descrito. Se utilizaron proteínas quiméricas HER-2, HER-3 y HER-4 ecd-Fc como antígenos revestidos sobre los pocillos de una placa de microtitulación. Los antígenos fueron detectados utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HER-2 (HER-2 Ab; AB-5, Calbiochem), un anticuerpo del fragmento Fc de Ig anti-humana monoclonal (Fc Ab; Southern Biotech), o un anticuerpo control de isotipo monoclonal (Contr Ab). Los resultados se muestran en la Figura 3. La Figura 3A muestra los controles ELISA: el anticuerpo anti-HER-2 monoclonal reacciona específicamente sólo con pocillos revestidos con ecd-Fc de HER-2, mientras que el anticuerpo del fragmento Fc de Ig anti-humana monoclonal reacciona con las tres proteínas quiméricas. Las Figuras 3B y 3C muestran que en los ratones tanto C57BL/6 como BALB/c tratados con MVA-BN-mHER2, los sueros sólo detectaron la quimera ecd-Fc de HER-2. Estos datos muestran que, en ambas cepas de ratón, la respuesta de anticuerpos inducida después del tratamiento con MVA-BN-mHER2 es muy específica para HER-2 y no reacciona de forma cruzada con otros determinados miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico tales como HER-3 y HER-4.

La inducción de anticuerpos anti-HER-2 en ratones tratados con MVA-BN-mHER2 también se evaluó mediante análisis de barrido de células activadas por fluorescencia (FACS) utilizando una línea celular murina que expresa HER-2 humano (CT26-HER-2; descrita más adelante). Sueros de ratones tratados con MVA-BN-mHER2 contenían anticuerpos que se unían a células que expresan HER-2 humano, pero no a sus homólogos parentales que no expresan este receptor (datos no mostrados).

En resumen, estos datos demuestran que el tratamiento de ratones con MVA-BN-mHER2 estimula la formación de anticuerpos que son capaces de unirse a polipéptidos HER-2 humanos, así como a HER-2 humano expresado en la superficie de las células.

### **Ejemplo 3**

#### **Inducción de respuestas de células T anti-HER-2**

A ratones BALB/c y C57BL/6 (5 animales en cada uno de los grupos) se les inyectó por vía subcutánea control (TBS) o 1E7 TCID<sub>50</sub> de MVA-BN-mHER2 los días 1, 15, 29 y 43. Los bazo se recogieron de los animales el día 48 y suspensiones celulares de cada uno de los grupos de ensayo se combinaron para el análisis. La inducción de respuestas de células T se evaluó mediante un ensayo ELISpot que mide la producción de IFN<sub>γ</sub> después de la re-estimulación específica para el antígeno *in vitro*. HER-2 ecd, un péptido HER-2 de MHC clase I, y los dos péptidos T auxiliares de MHC de clase II de la toxina del tétanos, que están incluidos en la secuencia de mHER2, se utilizaron individualmente para la re-estimulación. El péptido HER-2 de Clase I tenía la secuencia de aminoácidos, TYLPTNASL (SEQ ID NO: 3). El péptido P2 de la toxina del tétanos T auxiliar de MHC de Clase II tenía la secuencia de aminoácidos QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 4) (TTP2 marcado en la Figura 4) y el péptido P30 de la toxina del tétanos T auxiliar de MHC de Clase II tenía la secuencia de aminoácidos FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 5) (TTP30 marcada en la Figura 4).

El ensayo ELISpot se realizó como sigue. Se prepararon placas de ensayo al pre-humedecer membranas de placas de filtración Millipore Multiscreen de 96 pocillos mediante la adición de 15  $\mu$ l de etanol al 35% a cada uno de los pocillos. El etanol desapareció rápidamente y las placas se lavaron dos veces con 200  $\mu$ l/pocillo de PBS. Las placas se revistieron con anticuerpo de captura de IFN $\gamma$  anti-ratón de rata (BD Pharmingen, 551216, lote n° 34503) a 2  $\mu$ g/ml (50  $\mu$ l/pocillo diluido en PBS) y se incubaron durante una noche a 4°C. El anticuerpo de revestimiento desapareció rápidamente y las placas se lavaron tres veces con PBS bajo condiciones estériles. Las placas fueron bloqueadas con 100  $\mu$ l/pocillo de RPMI-10 (RPMI + FCS al 10% +  $\beta$ -mercaptoetanol) durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente y subsiguientemente se lavaron dos veces con PBS.

Se añadieron células efectoras en 50  $\mu$ l de RPMI-10 (FCS al 10% + 2-ME 5x10<sup>-5</sup> M + 1 x Pen./Estrep.) a las concentraciones indicadas. Proteínas HER-2, péptidos HER-2 o proteínas y péptidos de la toxina del tétanos se diluyeron en RPMI-10 y se añadieron en las diluciones apropiadas (habitualmente, partiendo de 10  $\mu$ g/ml para proteínas y 25  $\mu$ M para péptidos, pero variaron a lo largo de los experimentos) a pocillos efectores (50  $\mu$ l/pocillo). Las placas se incubaron a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub> durante aproximadamente 18 horas.

Las células desaparecieron rápidamente de los pocillos y se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo de dH<sub>2</sub>O a todos los pocillos durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con 100  $\mu$ l/pocillo de dH<sub>2</sub>O. Las placas se lavaron entonces seis veces con un lavador de placas (Wellwash AC, Thermo Electron) con PBS + Tween al 0,05% como tampón de lavado.

Se añadieron a todos los pocillos 50  $\mu$ l/pocillo de anti-IFN $\gamma$ -biotina (Serotec, MCA1548B, lote n° 0803) a una dilución de 1: 5000 en PBS + FCS al 5% y se incubaron durante una a dos horas a la temperatura ambiente. Las placas se lavaron a continuación utilizando un lavador de placas (Wellwash AC, Thermo Electron) durante 6 ciclos, con PBS + Tween al 0,05% como tampón de lavado. Después se añadieron a todos los pocillos 50  $\mu$ l/pocillo de estreptavidina-fosfatasa alcalina (BD Pharmingen, 554065, lote n° 46484) a una dilución de 1:5000 en PBS + BSA al 5% y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente.

Después las placas se lavaron de nuevo utilizando un lavador de placas (Wellwash AC, Thermo Electron) durante 6 ciclos y subsiguientemente se desarrollaron en la oscuridad mediante la adición de 50  $\mu$ l/pocillo de sustrato BCIP/NBT durante 15 minutos. El sustrato se desplazó rápidamente hacia un sumidero y se lavó a fondo con agua del grifo. Los soportes de las placas se retiraron y las placas se secaron en una campana de humos. Las placas fueron rastreadas y leídas en un escáner de placas ImmunoSpot utilizando el software CellCount Pro.

Los resultados se muestran en las Figuras 4A-D. Las Figuras 4 A y C muestran que se detectó una respuesta de células T dependiente de la dosis en células de bazo de cepas de ratones tanto C57BL/6 (Fig. 4A) como BALB/c (Fig. 4C) tras la re-estimulación con HER-2 ecd.

La Figura 4B (ratones C57BL/6) y la Figura 4D (ratones BALB/c) muestran que también se detectó la producción de IFN $\gamma$  en este ensayo después de la incubación con un péptido HER-2 MHC de clase I, así como con los péptidos de la toxina del tétanos de MHC de Clase II. Este resultado indica que tanto las células T CD8 específicas de MHC clase I como las células T CD4 específicas de MHC Clase II fueron inducidas en ratones tratados con MVA-BN-mHER2. Estos datos confirman que los péptidos de la toxina del tétanos en mHER2 actúan como epítopos T auxiliares e indican que el tratamiento con MVA-BN-mHER2 induce a las células T, incluidas las células T CD8, que reaccionan con epítopos presentes en la proteína nativa HER-2.

En resumen, estos estudios demuestran que el tratamiento repetido de ratones con MVA-BN-mHER2 induce una amplia respuesta inmune adaptativa específica para antígenos que incluye anticuerpos, así como tanto subtipos de células CD4 como CD8 T. Se obtuvieron resultados similares en ratones tanto C57BL/6 como BALB/c, indicando que los animales con diferentes haplotipos MHC responden de manera similar. Como se ha comentado antes en el Ejemplo 2, se obtuvo una respuesta de anticuerpos específica en ratones HER-2 tolerantes. Por lo tanto, el tratamiento con MVA-BN-mHER2 tiene el potencial de mediar en la eliminación de células tumorales que auto-expresan el antígeno por múltiples vías y en diversos entornos de MHC, lo cual es deseable para el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, los regímenes de tratamiento que emplean múltiples inyecciones de MVA-BN-mHER2 se pueden utilizar en el tratamiento de pacientes humanos con cáncer.

#### Ejemplo 4

##### Inmunomodulación Th1 en ratones tratados con MVA-BN-mHER2

Los datos en los Ejemplos anteriores indican que MVA-BN es un vehículo de suministro de transgén eficiente, que también exhibe fuertes propiedades inmunogénicas. Previamente se ha reseñado que MVA desencadena una respuesta inmune adaptativa Th1 que confiere protección contra la viruela (Earl et al, 2004; Wyatt et al, 2004) y también que induce respuestas inmunes innatas (Brutkiewicz et al, 1992; Dokun et al., 2001). En consecuencia, las propiedades inmunes intrínsecas de MVA-BN son potencialmente útiles para modular las respuestas inmunes a los transgenes.



Se sabe que el examen de determinados subtipos de anticuerpos producidos después de la administración de inmunógenos revela determinadas características de la respuesta inmune. Por ejemplo, los anticuerpos IgG2a han demostrado prevalecer en entornos Th1 inmunes, mientras que los anticuerpos IgG1 prevalecen cuando se induce una respuesta inmune Th2. Entornos Th1 inmunes comprenden tanto componentes humorales como celulares de la respuesta inmune y, por lo tanto, conducen a respuestas protectoras de larga duración que puedan ser deseables en un contexto de inmunoterapia del cáncer. Los entornos Th2 inmunes, en cambio, comprenden componentes humorales de corta duración de la respuesta inmune, que son menos deseables en un contexto de inmunoterapia del cáncer. Por lo tanto, la medición de la relación de subtipos IgG2a a IgG1 después de la administración de un inmunógeno en ratones es un medio de evaluar las características Th1/Th2 de la respuesta inmune. Un aumento de la relación IgG2a/IgG1 después de la administración de un inmunógeno es una indicación de un desplazamiento hacia un entorno Th1. Por el contrario, una relación menor indica un desplazamiento hacia una respuesta Th2.

La capacidad de MVA-BN-mHER2 de modular la respuesta inmune a HER-2 se evaluó midiendo la relación de subtipos de anticuerpos IgG2a a IgG1 anti-HER-2 producidos tras el tratamiento de ratones con diversas formulaciones que comprenden secuencias HER-2. La relación IgG2a/IgG1 de anticuerpos anti-HER-2 inducida después del tratamiento de los ratones BALB/c con MVA-BN-mHER2, proteína mHER2 en emulsión de adyuvante de Freund, o líneas de células tumorales HER-2(+) se determinó mediante ELISA utilizando anticuerpos de detección específicos para el subtipo de anticuerpos. Los ensayos ELISA se realizaron como se ha descrito anteriormente, excepto con la sustitución de los anticuerpos de detección. Los resultados se muestran en la Tabla 1 que figura más adelante.

Los resultados demuestran que la relación de IgG2a/IgG1 era significativamente mayor en ratones tratados con MVA-BN-mHER2 en comparación con ratones tratados con HER-2 en adyuvante de Freund o células tumorales HER-2(+). Además, los resultados demuestran que la relación IgG2a/IgG1 de anticuerpo en el suero de ratones tratados con líneas de células tumorales HER-2(+) aumenta cuando estos ratones fueron co-tratados con MVA-BN-mHER2. Ese resultado indica que, incluso en un entorno Th2, que resultó de la administración de líneas de células tumorales HER-2(+), la administración adicional de MVA-BN-mHER2 indujo eficazmente una respuesta Th1.

**Tabla 1. Relación IgG2a/IgG1 de respuestas de anticuerpos anti-HER-2 inducidas por diversas formulaciones que comprenden secuencias HER-2.**

Formulación	Tratamiento del ratón	Relación IgG2a/IgG1*
MVA-BN-mHER2	3 inyecciones subcutáneas a intervalos de 2 semanas con dosis que oscilan entre 2E6 y 5E7 TCID <sub>50</sub>	0,38 ± 0,09
HER-2 ECD en Adyuvante de Freund	3 inyecciones subcutáneas a intervalos de 2 semanas con 10 µg de proteína emulsionada en CFA, luego en IFA	0,08 ± 0,02
Células TUBO	1E5 células inyectadas por vía intradermal	0,03 ± 0,02
MC38-HER-2	1E5 células inyectadas por vía intradermal	0,03 ± 0,02
Células TUBO + MVA-BN-mHER2	1E5 células inyectadas por vía intradermal y 3 inyecciones subcutáneas a intervalos de 1 semana con 5E7 TCID <sub>50</sub> de MVA-BN-mHER2 (1ª dosis el mismo día que las células)	0,69 ± 0,07
MC38-HER-2 + MVA-BN-mHER2	1E5 células inyectadas por vía intradermal y 3 inyecciones subcutáneas a intervalos de 1 semana con 5E7 TCID <sub>50</sub> de MVA-BN-mHER2 (1ª dosis el mismo día que las células)	0,5 ± 0,07

\* Los valores representan la media ± desviación estándar de al menos dos conjuntos de pocillos duplicados.

En resumen, estos datos demuestran que la inmunogenicidad intrínseca de MVA-BN, que se caracteriza por una fuerte desviación hacia respuestas inmunes Th1, influye en la respuesta inmune contra HER-2 hacia el entorno Th1. Este era también cierto cuando había una respuesta de anticuerpos anti-HER-2 desviada hacia Th2, inducida por las células tumorales que expresan HER-2. La potente propiedad de inmunomodulación de MVA-BN descrita en esta memoria es deseable en un contexto terapéutico, ya que se han reseñado en pacientes con cáncer de mama respuestas de anticuerpos anti-HER-2 preexistentes contra las inducidas por tumores. Por lo tanto, incluso si ya existe una respuesta Th2 no deseada hacia HER-2, el tratamiento de pacientes con MVA-BN-mHER2 debe volver a centrar la respuesta inmune hacia un perfil Th1.

### Ejemplo 5

#### Actividad anti-tumoral en ratones tratados con MVA-BN-mHER2

##### Tratamiento profiláctico

La capacidad de MVA-BN-mHER2 de prevenir el crecimiento del tumor en un contexto profiláctico se evaluó utilizando células TUBO trasplantadas como un modelo de cáncer de mama en ratones. Células TUBO se derivan de un carcinoma de glándula mamaria que se desarrolló en un ratón BALB/c transgénico para el oncogén de HER-2 (HER-

2/neu) de rata transformante (Rovero et al, *J. Immunol.* 165, 5133-5142 (2000)). Puesto que la secuencia de HER-2 está altamente conservada entre ratas y seres humanos, las células TUBO se utilizan de forma rutinaria para evaluar la eficacia de las vacunas que comprenden homólogos de HER-2 de rata o humanos (Dela Cruz et al., *Vaccine*, 23, 4793-4803 (2005)).

En este estudio de eficacia, los ratones fueron inmunizados con MVA-BN-mHER2 como se ha descrito anteriormente, es decir, tres veces a intervalos de 2 semanas, con TBS o MVA-BN-mHER2 (2E6 o 5E7 TCID<sub>50</sub>). Los ratones tratados se sometieron entonces a un enfrentamiento al tumor mediante la inyección intradérmica de células 3E5 TUBO seis semanas después de la última inyección de la vacuna. El crecimiento del tumor en el sitio de inyección se observó después de ello dos veces por semana y se midió el tamaño de los tumores sólidos debajo de la piel usando calibradores. El volumen del tumor (mm<sup>3</sup>) se calculó utilizando la fórmula:  $V = (L \times W^2) / 2$ , en donde L = longitud, W = anchura, (1 mm<sup>3</sup> = 1 mg). Los resultados presentados en la Figura 5 demuestran que los tumores en animales pretratados con MVA-BN-mHER2 eran significativamente más pequeños que los tumores en ratones tratados con control.

Las diferencias en el tamaño del tumor fueron estadísticamente significativas en los ratones que recibieron MVA-BN-mHER2 en cualquiera de las dosis, en comparación con el tamaño de los tumores en ratones tratados con TBS ( $p < 0,005$ ). El día 25, varios ratones tratados con MVA-BN-mHER2 mostraron una estabilización, regresión o incluso erradicación del tumor. Dado que los ratones fueron enfrentados a células tumorales de seis semanas después del último tratamiento con MVA-BN-mHER2, estos datos demuestran que la inhibición observada del crecimiento del tumor era más probablemente mediada por el recuerdo de una respuesta inmune de memoria inducida por la administración de MVA-BN-mHER2.

En resumen, estos datos demuestran que el tratamiento de ratones con MVA-BN-mHER2 induce una respuesta inmune adaptativa específica para el antígeno y el establecimiento de memoria inmunológica. Cuando los ratones fueron enfrentados subsiguientemente a células tumorales que expresan HER-2, la memoria inmune es recordada e inhibe el crecimiento de las células tumorales.

#### *Tratamiento Terapéutico: Supresión de Tumores Establecidos mediante tratamiento con MVA-BN-mHER2*

La capacidad de MVA-BN-mHER2 de suprimir tumores establecidos se evaluó en un modelo experimental de metástasis de pulmón utilizando células CT26 que expresan establemente HER-2 humano. CT26 es un carcinoma colorrectal inducido químicamente de ratones BALB/c (Brattain et al., 1980). En este modelo, células CT26-HER-2 se inyectan por vía intravenosa en ratones Balb/c y la carga tumoral se evalúa en los pulmones, en donde crecen nódulos tumorales.

Los ratones fueron enfrentados a células CT26-HER-2 (5E5) inyectadas por vía intravenosa el día 1 y fueron tratados por vía intraperitoneal el día 4 con una sola inyección de TBS, MVA-BN (5E7 TCID<sub>50</sub>) o MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID<sub>50</sub>). Los ratones fueron entonces sacrificados el día 14 y sus pulmones se pesaron. La masa tumoral se calcula restando el peso medio del pulmón de ratones naifs (no enfrentados a células tumorales) del peso medio del pulmón de ratones enfrentados a tumores.

Los resultados se presentan en la Figura 6. Los resultados demuestran que la carga tumoral en ratones tratados con MVA-BN-mHER2 era significativamente menor que en los ratones control ( $p < 0,000001$ ). De hecho, se observó una nítida disminución del peso del pulmón en todos los animales del grupo de MVA-BN-mHER2 en comparación con el grupo control. En contraposición, la carga tumoral era similar en los grupos control y tratados con MVA-BN. En resumen, el tratamiento de ratones con MVA-BN-mHER2 inhibe el crecimiento de tumores HER-2(+) establecidos en ratones.

#### *Tratamiento terapéutico: Inducción de la inmunidad innata protectora después de tratamiento con MVA-BN-mHER2 o MVA-BN*

La capacidad de MVA-BN de contribuir en la actividad anti-tumor de MVA-BN mHER2 desencadenando una inmunidad innata se evaluó en el modelo de tumor CT26 descrito anteriormente. En este experimento, los ratones fueron tratados con MVA-BN (5E6 o 5E7 TCID<sub>50</sub>) o MVA-BN-mHER2 (5E6 o 5E7 TCID<sub>50</sub>) el día del enfrentamiento al tumor, un momento en el que la carga tumoral es baja. La carga tumoral se evaluó como se describió anteriormente en los pulmones de ratones enfrentados. Los resultados se presentan en la Figura 7. Los resultados demuestran que la inhibición del crecimiento del tumor (TGI – siglas en inglés) mediante tratamiento con MVA-BN (5E7 TCID<sub>50</sub>) era  $> 70\%$  ( $p < 0,0001$ ). La actividad antitumoral de MVA-BN era dependiente de la dosis, ya que el tratamiento con MVA-BN (5E6 TCID<sub>50</sub>) era menos eficiente (32% de TGI;  $p = 0,002$ ) que el tratamiento con 5E7 TCID<sub>50</sub>. En contraposición, los ratones tratados con MVA-BN mHER2 (ya sea 5E6 o 5E7 TCID<sub>50</sub>) exhibían una protección similar ( $> 70\%$  de TGI;  $p < 0,000001$ ).

Tomados en conjunto, los datos mostrados en las Figuras 6 y 7 demuestran que tanto MVA-BN como MVA-BN-mHER2 tienen actividad anti-tumor, sin embargo, la actividad de MVA-BN mHER2 es superior. De hecho, el tratamiento

de ratones en el modelo de metástasis pulmonar el día 1 (Figura 7) con MVA-BN-mHER2 (5E6 TCID<sub>50</sub>) era más eficaz que el tratamiento con la misma dosis de MVA-BN. En este modelo, el tratamiento de ratones el día 4 (Figura 6) con MVA-BN-mHER2 también suprimió el crecimiento del tumor, mientras que MVA-BN no tuvo efecto alguno. Por lo tanto, la actividad antitumoral de MVA-BN observado en determinadas configuraciones es la más probable debido a la estimulación de la inmunidad innata. La actividad superior de MVA-BN-mHER2 observada en todos los experimentos es probablemente debida a la estimulación combinada del sistema inmune innato y a la inducción de una respuesta específica inmune anti-HER-2 adaptativa.

### Ejemplo 6

#### Terapia de combinación con agentes citotóxicos

Ratones C57BL/6 fueron tratados por vía subcutánea con el control (solución salina tamponada con Tris (TBS); grupo I de 5 animales) o con 5E7 TCID<sub>50</sub> de MVA-BN-mHER2 (9 grupos de 5 animales) los días 1, 22 y 43 (q3 semanas x 3). El efecto del agente quimioterapéutico docetaxel sobre la inducción de anticuerpos anti-HER-2 se evaluó tratando los animales con el fármaco a dosis tumoricidas (33 mg/kg) una semana (día -7) o dos días (día -2) antes del tratamiento con MVA-BN-mHER2. El fármaco se inyectó iv una vez, dos veces (q3 semanas X2), tres veces (q3 semanas X3) o cuatro veces (q3 semanas X4). La disposición del grupo de animales, el régimen de administración y el programa se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2: Grupos de estudio**

Grupos de Tratamiento (n=5)	Regimen de docetaxel (33 mg/kg)			Regimen de vacuna
	Tipo	Programa	Vía	
1	Ninguno	N/A	N/A	Ninguno
2	Ninguno	N/A	N/A	MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID <sub>50</sub> , SC los d1, 22 y 43)
3	Doc d-2 X1	d-2	IV	MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID <sub>50</sub> , SC los d1, 22 y 43)
4	Doc d-2 X2	d-2 y d20	IV	MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID <sub>50</sub> , SC los d1, 22 y 43)
5	Doc d-2 X3	d-2, d20 y d41	IV	MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID <sub>50</sub> , SC los d1, 22 y 43)
6	Doc d-2 X4	d-2, d20, d41 y d62	IV	MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID <sub>50</sub> , SC los d1, 22 y 43)
7	Doc d-8 X1	d-7	IV	MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID <sub>50</sub> , SC los d1, 22 y 43)
8	Doc d-8 X2	d-7 y d15	IV	MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID <sub>50</sub> , SC los d1, 22 y 43)
9	Doc d-7 X3	d-7, d15 y d36	IV	MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID <sub>50</sub> , SC los d1, 22 y 43)
10	Doc d-7 X4	d-7, d15, d36 y d57	IV	MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID <sub>50</sub> , SC los d1, 22 y 43)

Las muestras de sangre se recogieron el día -9 (pre-sangrado), 13 días después de cada tratamiento con vacuna (D14, 35, 56) y una semana después del último tratamiento con el fármaco (d70). Los sueros de cada uno de los grupos de ensayo se agruparon y analizaron mediante ELISA utilizando una proteína quimérica HER-2 ecd-Fc comercialmente disponible como antígeno revestida sobre los pocillos de una placa de microtitulación. Esta proteína quimérica comprende el dominio extracelular de HER-2 humano nativo fusionado al dominio Fc de una inmunoglobulina G humana. Como se muestra en las Figuras 8A y B, se detectó una respuesta de anticuerpos anti-HER-2 en todos los grupos tratados con MVA-BN-mHER2 y para cada instante, los títulos no fueron significativamente diferentes cuando los ratones fueron pretratados dos o siete días antes de la vacunación con dosis tumoricidas de docetaxel (33 mg/kg). Además de ello, las respuestas de anticuerpos no se vieron afectadas, incluso cuando el tratamiento con docetaxel continuó durante todo el programa de tres vacunaciones.

La integridad de la respuesta inmune inducida por MVA-BN-mHER2 en ratones tratados con dosis tumoricidas de docetaxel se evaluó mediante la medición de la actividad antitumoral de MVA-BN-mHER2. De hecho, MVA-BN-mHER2 demostró inducir más temprano (Ejemplo 5) respuestas de memoria capaces de retrasar el crecimiento de tumores implantados post- vacunación (modelo de tumor profiláctico). Los ratones de los grupos de estudio en la Tabla 2 anterior, fueron enfrentados, por lo tanto, a células MC38-HER-2 tumorales (Penichet et al., Animal Science Laboratory 49, 179-188 (1999)) el día 71 y el crecimiento del tumor se evaluó según se describe en el Ejemplo 5. Tal como se muestra la Figura 9A y B, el crecimiento del tumor se retrasó en todos los grupos de ratones tratados con MVA-BN-

mHER2. El pretratamiento, así como el tratamiento concomitante con docetaxel a dosis tumorocidas no tuvieron efecto significativo sobre el retraso del crecimiento del tumor. Debido a que este experimento se realizó en un ajuste profiláctico, el efecto anti-tumor medido fue más probable mediado por respuestas inmunes anti-HER-2 inducidas por MVA-BN-mHER2, mientras que docetaxel no tuvo efecto citotóxico directo alguno sobre el tumor. De hecho, el intervalo de tiempo más corto entre el tratamiento con docetaxel y el enfrentamiento al tumor fue de nueve días (el Grupo 6 recibió su dosis final de docetaxel el día 62). Teniendo en cuenta las propiedades farmacológicas de los agentes quimioterapéuticos, la concentración de fármaco era probablemente demasiado baja en el momento de la implantación del tumor como para que fuese eficaz. Por lo tanto, los datos confirmaron que MVA-BN-mHER2 y el tratamiento con docetaxel combinado no es perjudicial para la inducción de una respuesta inmune protectora por parte de la vacuna. Esto es cierto, incluso cuando se utilizó el agente quimioterapéutico en dosis tumorocidas a intervalos de tres semanas, que refleja el regimen de tratamiento estándar en seres humanos.

A continuación, se evaluó el beneficio potencial proporcionado por el tratamiento de combinación de quimioterapia e inmunoterapia en un ajuste terapéutico del modelo de tumor de ratón MC38-HER-2. En este experimento, los animales fueron divididos en tres subconjuntos (subconjuntos A, B y C) en que se administró un tratamiento de quimioterapia, ya sea antes, durante o después de dos tratamientos de inmunoterapia, respectivamente.

En el subconjunto A, ratones C57BL/6 (40 animales) fueron enfrentados a células MC38-HER-2 el día 1 y después fueron tratados por vía subcutánea con el control (solución salina tamponada con Tris (TBS); 10 animales tratados los días 1, 8 y 15), Docetaxel solo (33 mg/kg; 10 animales tratados el día 1), MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID<sub>50</sub>; 10 animales tratados los días 1 y 15) o Docetaxel el día 1, después MVA-BN-mHER2 los días 8 y 15. El crecimiento del tumor se evaluó dos veces a la semana hasta el sacrificio el día 23. Tal como se muestra en la Figura 10A, el tratamiento con Docetaxel el día 1 dio como resultado un retraso modesto y transitorio del crecimiento del tumor (se detectó diferencia estadísticamente significativa hasta el día 19 solamente), mientras que el tratamiento con MVA-BN-mHER2 los días 8 y 15 no tuvo efecto alguno sobre el crecimiento del tumor. En contraposición, el tratamiento combinado de Docetaxel (día 1) antes de la administración de MVA-BN mHER2 los días 8 y 15 era altamente eficiente en la inhibición de crecimiento del tumor durante todo el estudio ( $p = 0,001$  el día 23).

Para el subconjunto B el experimento se realizó con los mismos 4 grupos de animales; sin embargo Docetaxel fue dado el día 8, mientras que MVA-BN-mHER2 fue administrado los días 1 y 15. Se determinó previamente que Docetaxel no tenía efecto sobre el crecimiento de MC38-HER-2 una vez que el tamaño del tumor excede de 50 mg de peso, que se alcanza alrededor del día 8 para este modelo. Como era de esperar, el tratamiento con Docetaxel el día 8 no tenía efecto alguno sobre el crecimiento del tumor (Figura 10B), mientras que dos administraciones de MVA-BN-mHER2 en el intervalo de dos semanas (el día 1 y día 15) fue altamente eficaz en la inhibición del crecimiento del tumor ( $p = 0,002$  el día 23). De manera más importante, esta actividad antitumoral no se vio afectada negativamente por las altas dosis de Docetaxel administrados entre los tratamientos con vacunas (Figura 10B).

Para el subconjunto C, el experimento también se realizó con los mismos 4 grupos de animales; sin embargo, Docetaxel fue dado el día 15, mientras que MVA-BN-mHER2 fue administrado los días 1 y 8. Al igual que para el subconjunto B, los tumores en todos los grupos excedieron el límite de tamaño más allá del cual no es eficaz Docetaxel para reducir el crecimiento de MC38-HER-2 en el momento de tratamiento con quimioterapia (día 15). Y como era de esperar, la Figura 10C demuestra que docetaxel no tenía efecto alguno sobre el crecimiento del tumor cuando se administra solo. Al igual que en el subconjunto A, el tratamiento con vacuna que consiste en dos administraciones de MVA-BN-mHER2 en un intervalo de una semana también fue subóptimo y no tenía tampoco efecto alguno sobre el crecimiento del tumor. Sorprendentemente, el tamaño medio del tumor de los ratones del grupo tratado con MVA-BN-mHER2, que también recibieron Docetaxel después de la administración de la vacuna fue significativamente menor ( $p = 0,036$  el día 23) que la media del tamaño del tumor de los ratones tratados con MVA-BN-mHER2 solamente. Estos datos de muestran que el tratamiento con MVA-BN-mHER2 aumenta la sensibilidad de MC38-HER2 a Docetaxel in vivo.

En general, los datos demuestran que MVA-BN-mHER2 y dosis tumorocidas de agentes quimioterapéuticos se pueden combinar sin efectos perjudiciales sobre la potencia de la vacuna. De hecho, se encontró que la combinación de estas dos terapias puede ser mutuamente beneficiosa, ya que el pre-tratamiento con quimioterapia aumentó la eficacia de la vacuna, mientras que el pre-tratamiento con la vacuna aumentó la sensibilidad de las células tumorales a la quimioterapia. Por lo tanto, se anticipa que el tratamiento combinado de la administración continua alternada de vacuna y quimioterapia también proporcionan nuevos medios para generar un regimen más potente para el tratamiento del cáncer.

## Ejemplo 7

### Difusión epítipo/antígeno

La difusión epítipo/antígeno resulta de la inducción de respuestas inmunes desencadenadas por la exposición de epítipos/antígenos a células tumorales moribundas. La difusión epítipo/antígeno Inducida por la vacuna es altamente ventajosa para una actividad anti-tumoral máxima. Se encontró que el tratamiento con MVA-BN-mHER2 resulta en una

difusión epítipo/antígeno, ya que los ratones protegidos contra un tumor HER-2+ resisten un segundo enfrentamiento al tumor parental que no expresa HER-2. Por lo tanto, MVA-BN-mHER2 permite el desencadenamiento de una amplia respuesta inmune protectora que se puede diseminar a antígenos de tumores distintos de HER-2, que es un requisito previo para el tratamiento de tumores heterogéneos y evitar el escape del tumor.

5

### **Ejemplo 8**

#### **Tumores espontáneos en ratones NeuT**

10 Se requiere un alto título y un amplio espectro de anticuerpos para retrasar tumores espontáneos que surgen en ratones transgénicos que expresan HER-2/neu de rata (ratones NeuT) tratados con HER-2 heterólogo (p. ej., HER-2 humano). La formulación de la vacuna de HER-2 heterólogo como ADN desnudo fracasó en retrasar el crecimiento del tumor en estos modelos, mientras que la formulación basada en virus exhibía actividad antitumoral. Se encontró que  
15 MVA-BN-mHER2 retrasó el crecimiento espontáneo del tumor en NeuT, incluso cuando el tratamiento se inició durante las últimas etapas del desarrollo del tumor. Por lo tanto, MVA-BN proporciona una formulación de antígeno superior para la inducción de la actividad anti-tumoral.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	BN Immunotherapeutics Inc.	
5	<120>	MÉTODOS PARA TRATAR EL CÁNCER CON MVA	
	<130>	BNIT0001PCT-EP	
	<150>	PCT/US2007/021436	
10	<151>	05-10-2007	
	<150>	60/850.031	
	<151>	06-10-2006	
15	<160>	5	
	<170>	PatentIn version 3.5	
	<210>	1	
20	<211>	2528	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
25	<223>	Casete de expresión de HER-2	
	<400>	1	
		agtatgcatt tttacggatg gagtctcggg ctaaaaacgg gaatgtacta tctacgtacg	60
		aaaccgcgat ccgctcccat tcaattcaca ttggacaagg ataaaataaa accactgggtg	120
		gtttgcgatt ccgaaatctg tacatcatgc agtgggttaa caaatctaga actagttaa	180
		ttaaggagct gttttgaata aaattttttt ataataaatc tagaactagt ggatcccccg	240
		ggctgcagga attcgatcta gccgccacca tggagctggc ggccttgctc cgctgggggc	300
		tcctcctcgc cctcttgccc cccggagccg cgagcaccca agtgtgcacc ggacagaca	360
		tgaagctgcg gctccctgcc agtcccgaga cccacctgga catgctcgc cacctctacc	420
		agggctgcca ggtggtgcag ggaaacctgg aactcaccta cctgcccacc aatgccagct	480
		taagtttctt gcaggatata caggaggtgc agggctacgt gctcatcgt cacaaccaag	540
		tgaggcaggt cccactgcag aggctgcgga ttgtgagagg caccagctc tttgaggaca	600
		actatgccct ggccgtgcta gacaatggag acccgctgaa caataccacc cctgtcacag	660
		gggcctcccc aggaggcctg cgggagctgc agcttcgaag cctcacagag atcttgaaag	720
		gaggggtctt gatccagcgg aacccccagc tctgctacca ggacacgatt ttgtggaagg	780
		acatcttcca caagaacaac cagctggctc tcacactgat agacaccaac cgctctcggg	840
		cctgccacc ctgttctcgc atgtgtaagg gctcccgtc ctggggagag agttctgagg	900
		attgtcagag cctgacgcgc actgtctgtg ccggtggctg tgcccgtgc aaggggccac	960
		tgcccactga ctgctgcat gagcagtgtg ctgccggctg cagggcccc aagcactctg	1020
		actgctggc ctgctccac ttcaaccaca gtggcatctg tgagctgcac tgcccagccc	1080
		tggtccagta catcaaagct aactccaat tcacgggat caccgagctg cggatatacat	1140
		tcggcgccag ctgtgtgact gcctgtcctt acaactacct ttctacggac gtgggatcct	1200
		gcaccctcgt ctgccccctg cacaaccaag aggtgacagc agaggatgga acacagcggg	1260

ES 2 500 465 T3

gtgagaagtg cagcaagccc tgtgcccag tgtgctatgg tctgggcatg gagcacttgc 1320  
gagaggtgag ggcagttacc agtgccaata tccaggagtt tgctggctgc aagaagatct 1380  
ttgggagcct ggcatttctg ccggagagct ttgatgggga cccagcctcc aacactgccc 1440  
cgctccagcc agagcagctc caagtgtttg agactctgga agagatcaca ggttacctat 1500  
acatctcagc atggccggac agcctgcctg acctcagcgt cttccagaac ctgcaagtaa 1560  
tccggggagc aattctgcac aatggcgctt actcgtgac cctgcaaggg ctgggcatca 1620  
gctggctggg gctgcgtca ctgagggaac tgggcagtgg actggccctc atccaccata 1680  
acacccacct ctgcttcgtg cacacggtgc cctgggacca gctctttcgg aacccgcacc 1740  
aagctctgct ccacactgcc aaccggccag aggacgagtg tgtgggagag ggcttggcct 1800  
gccaccagct gtgcgccga gggcactgct ggggtccagg gccacccag tgtgtcaact 1860  
gcagccagtt ctttcggggc caggagtgcg tggaggaatg ccgagtactg caggggctcc 1920  
ccagggagta tgtgaatgcc aggcactggt tgccgtgcca ccctgagtgt cagccccaga 1980  
atggctcagt gacctgtttt ggaccggagg ctgaccagtg tgtggcctgt gccactata 2040  
aggaccctcc cttctgcgtg gcccgctgcc ccagcgggtg gaaacctgac ctctctaca 2100  
tgcccatctg gaagtttcca gatgaggagg gcgcatgcca gccttgcccc atcaactgca 2160  
cccactctg tgtggacctg gatgacaagg gctgccccgc cgagcagaga gccagccctc 2220  
tgacgtcctt caacaacttc accgtgagct tctggctgcy cgtgcccaag gtgagcgcca 2280  
gccacctgga gatcgtctct gcggtggttg gcattctgta gaagcttggg accgagctcg 2340  
gatccactag tccagtgtgg tggattctg cagatatcca gcacagtggc ggccatcaag 2400  
cttatcgata ccgtcgacct cgaggggggg cccggtacct agttaattaa ggatcccccg 2460  
ggctgcagga attccatttt tattctcaaa tgagataaag tgaaaatata tatcatatat 2520  
acaagta 2528

<210> 2  
<211> 683  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
10 <223> Proteína HER-2 codificada por la casete de expresión de HER-2

<400> 2  
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu  
1 5 10 15  
Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys  
20 25 30  
Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His  
35 40 45

15

ES 2 500 465 T3

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr  
 50 , 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val  
 65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu  
 85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr  
 100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro  
 115 120 125

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser  
 130 135 140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln  
 145 150 155 160

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn  
 165 170 175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys  
 180 185 190

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser  
 195 200 205

Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys  
 210 215 220

Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys  
 225 230 235 240

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu  
 245 250 255

His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val  
 260 265 270

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Arg  
 275 280 285

Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu  
 290 295 300

Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln  
 305 310 315 320



ES 2 500 465 T3

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys  
 325 330 335  
 Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu  
 340 345 350  
 Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys  
 355 360 365  
 Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp  
 370 375 380  
 Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe  
 385 390 395 400  
 Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro  
 405 410 415  
 Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg  
 420 425 430 435  
 Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu  
 435 440 445  
 Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly  
 450 455 460  
 Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val  
 465 470 475 480  
 Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr  
 485 490 495  
 Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His  
 500 505 510  
 Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys  
 515 520 525  
 Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys  
 530 535 540  
 Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys  
 545 550 555 560  
 Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys  
 565 570 575  
 Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp  
 580 585 590

ES 2 500 465 T3

Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu  
 595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln  
 610 615 620

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys  
 625 630 635 640

Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Phe Asn Asn  
 645 650 655

Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His  
 660 665 670

Leu Glu Ile Val Ser Ala Val Val Gly Ile Leu  
 675 680

5 <210> 3  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido HER-2 de MHC Clase I

<400> 3  
 Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu  
 1 5

15 <210> 4  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido P2 T auxiliar de MHC de clase II de la toxina del tétanos

<400> 4  
 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
 1 5 10 15

20 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Péptido P30 T auxiliar de MHC de clase II de la toxina del tétanos

<400> 5  
 Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser  
 1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu  
 20

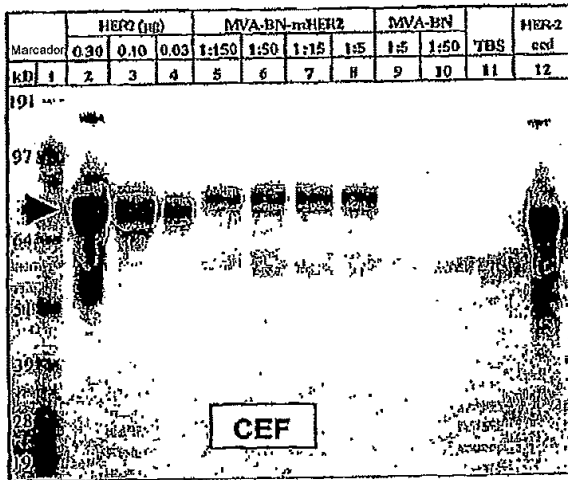
30

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una combinación de un virus vaccinia Ankara modificado (MVA) recombinante que codifica un polipéptido que comprende un antígeno HER-2 y/o un epítipo del mismo, y una dosis tumoricida de un taxano.
2. La combinación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el antígeno HER-2 está modificado de modo que incluya uno o más epítipos T<sub>H</sub> extraños.
- 10 3. La combinación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el antígeno HER-2 está modificado por la adición de los epítipos p2 y p30 de la toxina del tétanos.
4. La combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el antígeno HER-2 comprende la SEQ ID NO:2.
- 15 5. La combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el taxano es docetaxel o paclitaxel.
- 20 6. La combinación de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el taxano es docetaxel a una dosis de al menos 50 mg/m<sup>2</sup>, preferiblemente a una dosis de 75-100 mg/m<sup>2</sup>.
7. La combinación de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el taxano es paclitaxel a una dosis de al menos 90 mg/m<sup>2</sup>, preferiblemente a una dosis de 135-175 mg/m<sup>2</sup>.
- 25 8. La combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para administrar el MVA recombinante 1-26 semanas, preferiblemente 1-3 semanas antes del taxano.
9. La combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para administrar el MVA recombinante 2-60 días, preferiblemente 2-7 días después del taxano.
- 30 10. La combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para administraciones múltiples.
11. La combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el MVA es MVA-BN.
- 35 12. Una composición farmacéutica que comprende la combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 precedentes.
13. Uso de la combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 precedentes para la preparación de una composición farmacéutica o medicamento.
- 40 14. Un kit que contiene un MVA recombinante que codifica un polipéptido que comprende un antígeno HER-2 y/o un epítipo del mismo, y una dosis tumoricida de un taxano en forma de una preparación combinada.
- 45 15. El kit de acuerdo con la reivindicación 14, comprendiendo dicho kit el MVA recombinante en un primer vial o recipiente para una primera administración ("cebado") y en un segundo vial o recipiente y para una segunda administración ("impulso").
- 50 16. La combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 precedentes, la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, el uso de acuerdo con la reivindicación 13 y/o el kit de acuerdo con la reivindicación 14 ó 15 para uso en un método para tratar y/o prevenir el cáncer de mama.
17. La combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y 16, la composición farmacéutica de la reivindicación 12 o el kit de la reivindicación 14 ó 15, en donde el MVA recombinante se administra antes de, al mismo tiempo o después de la dosis tumoricida del taxano.

FIGURA 1

A



B

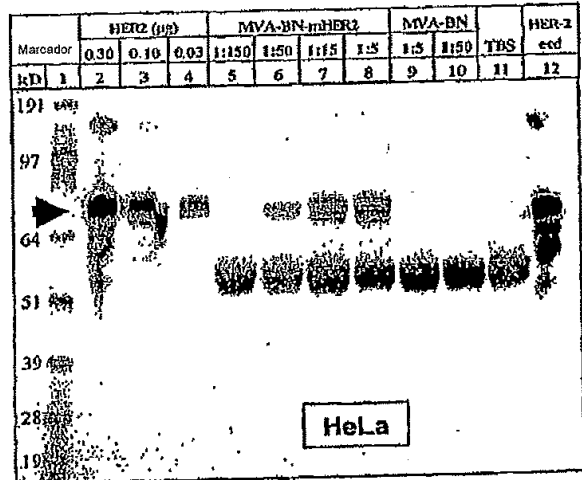


FIGURA 2

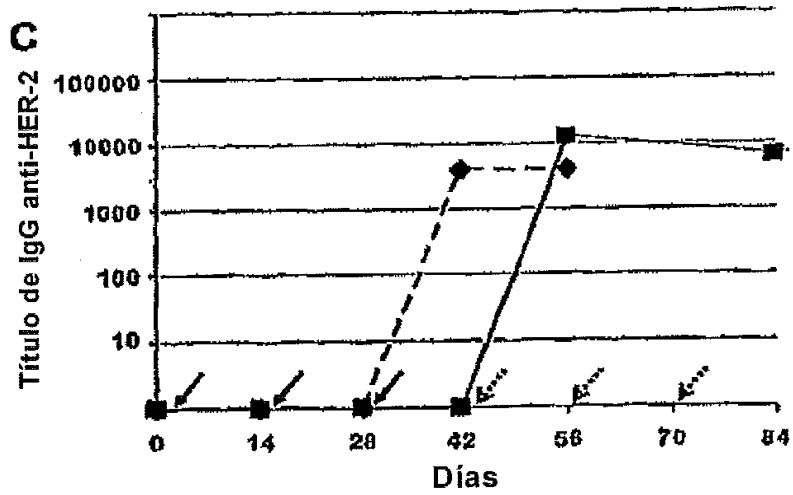
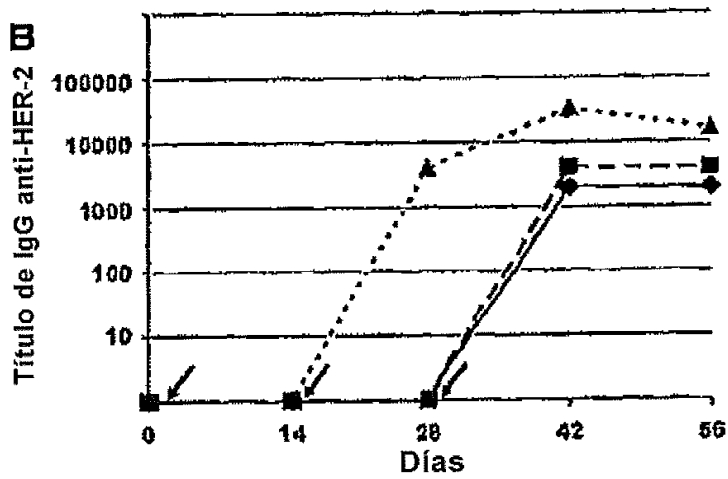
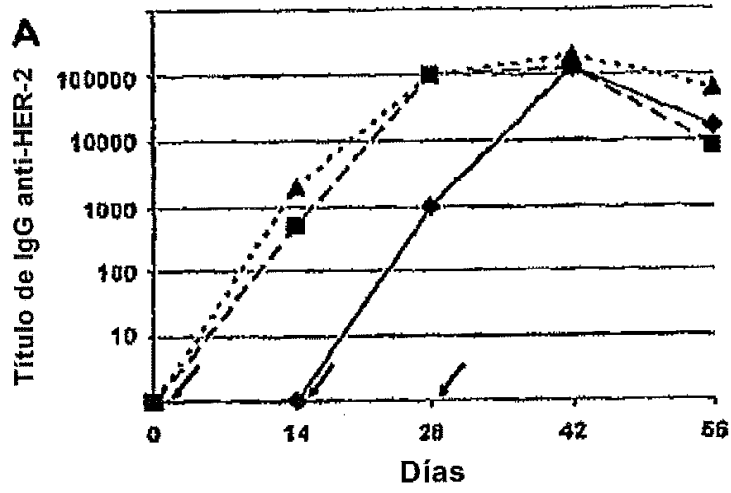


FIGURA 3

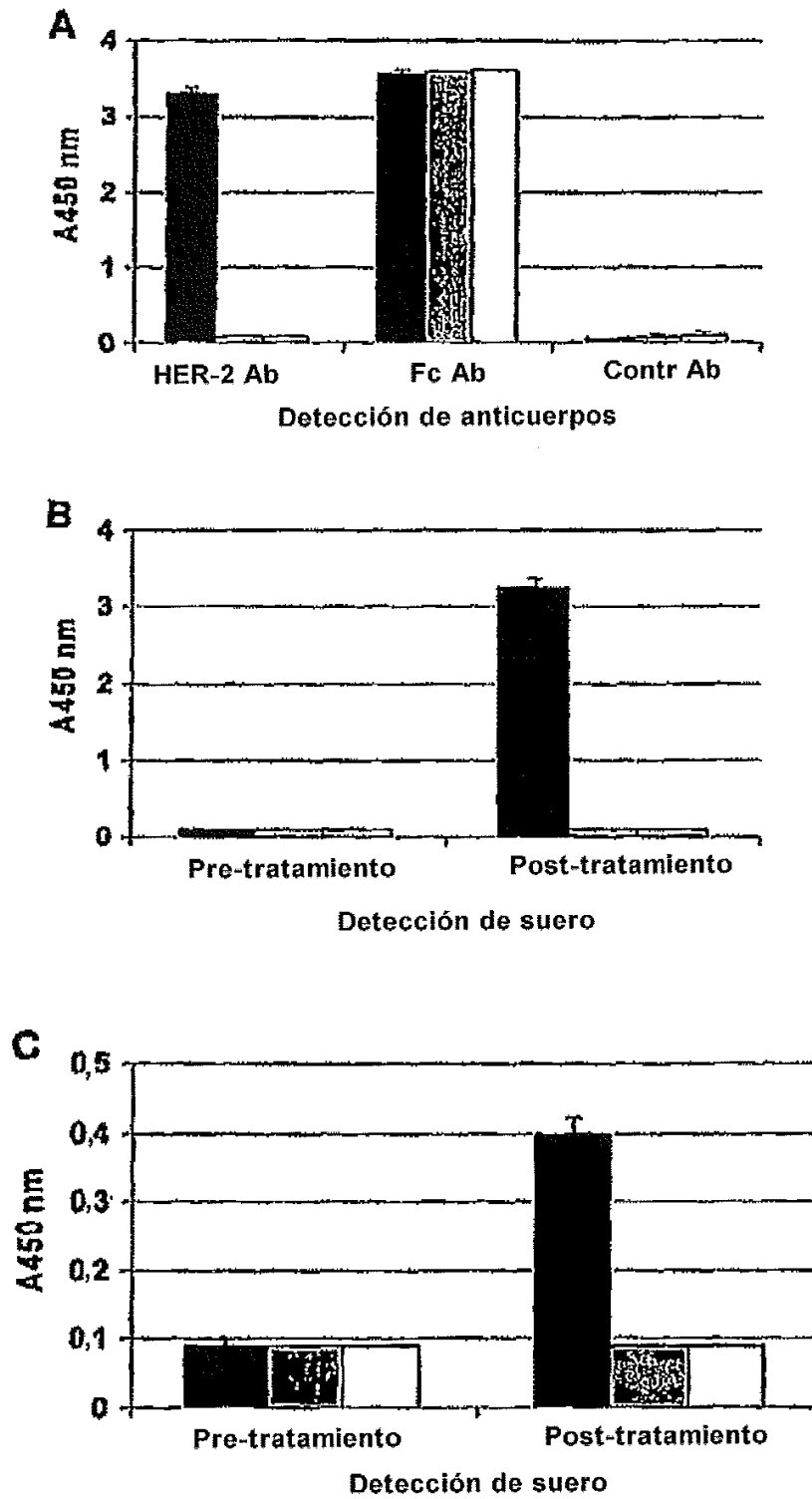


FIGURA 4

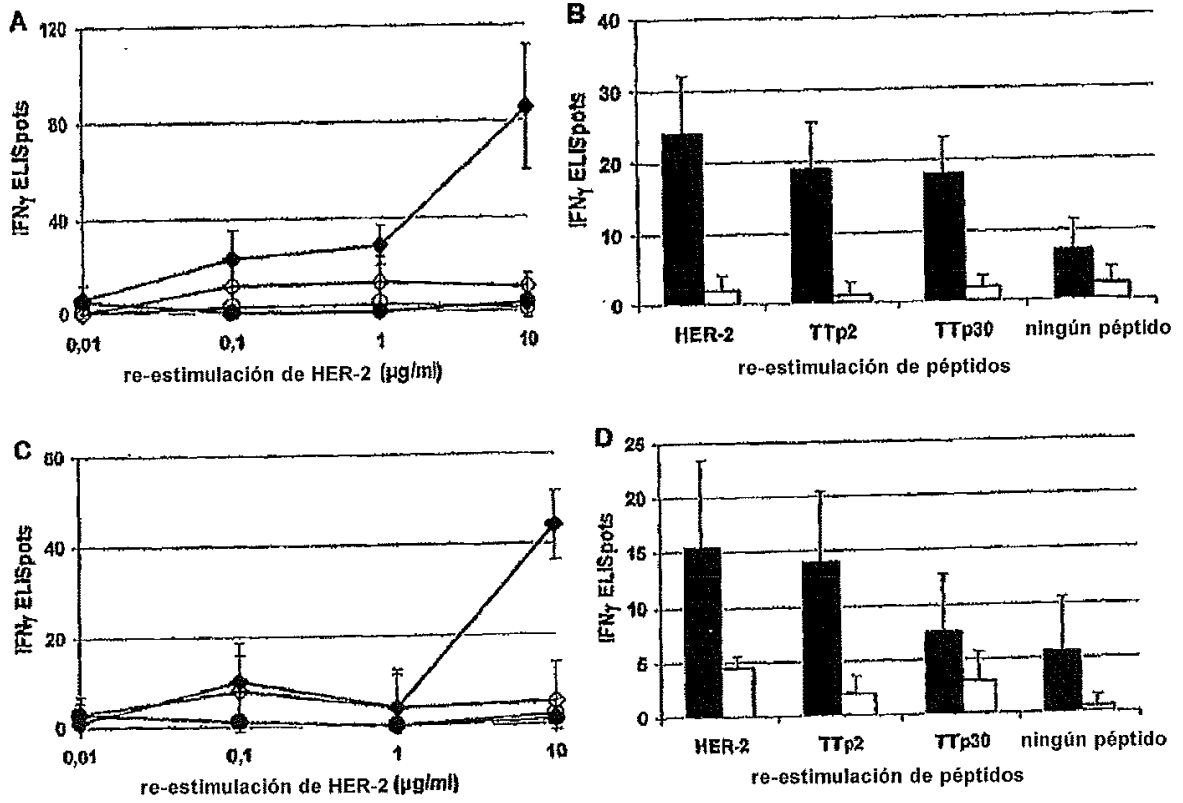


FIGURA 5

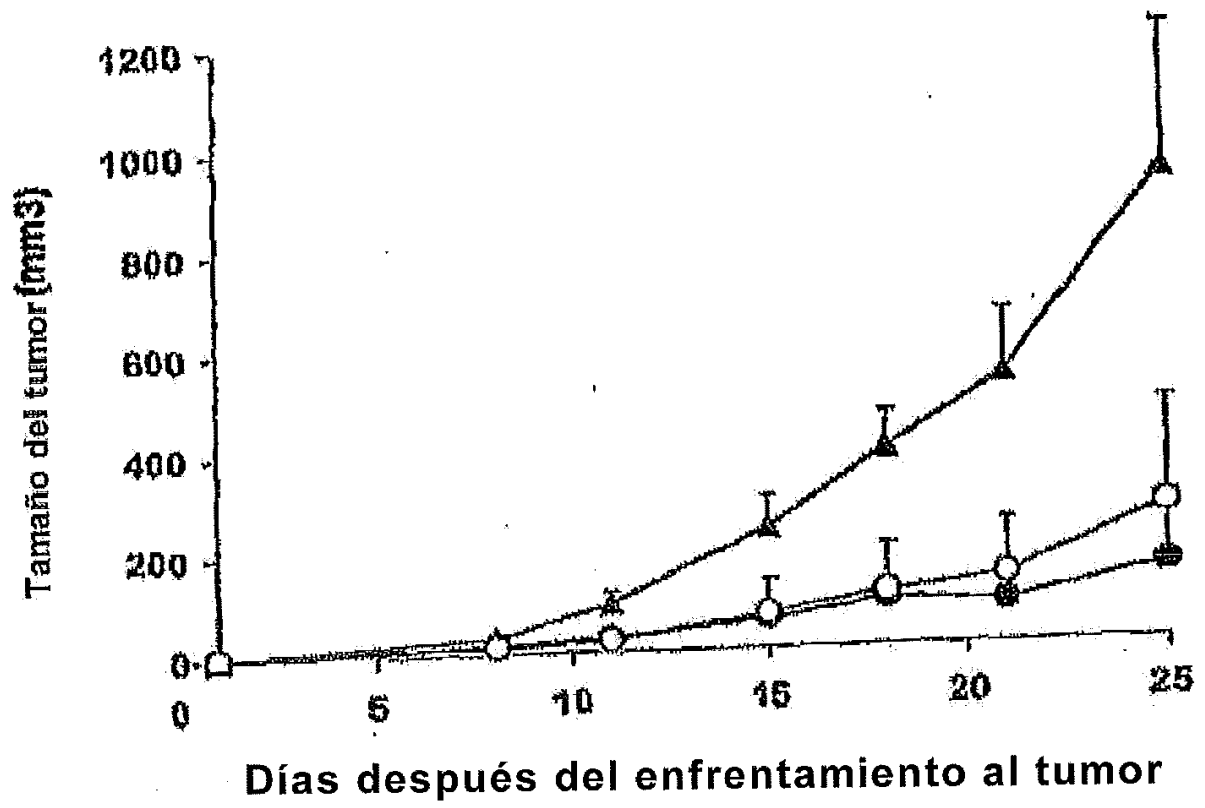




FIGURA 6

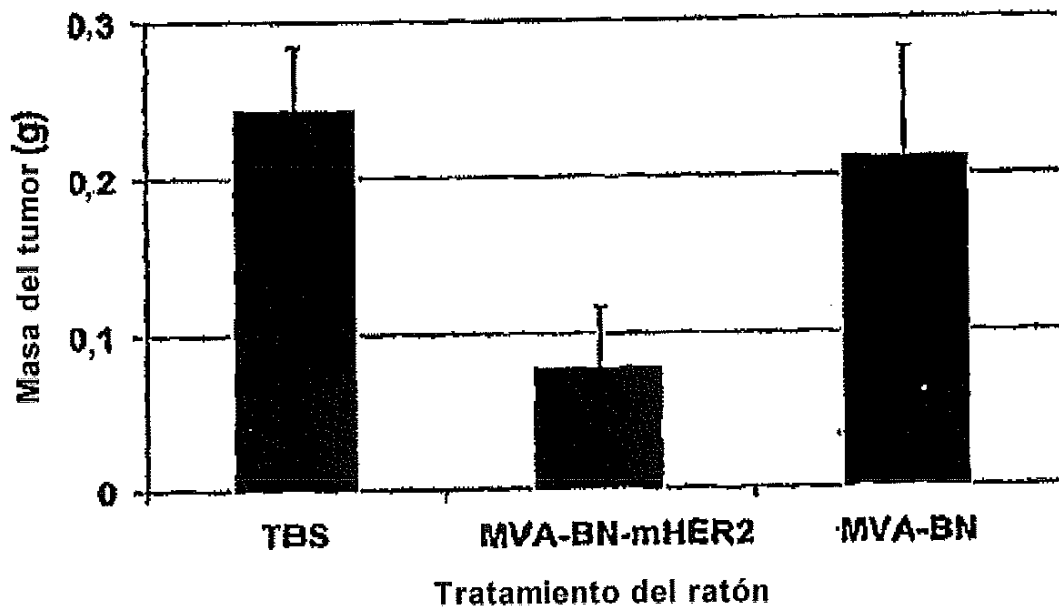


FIGURA 7

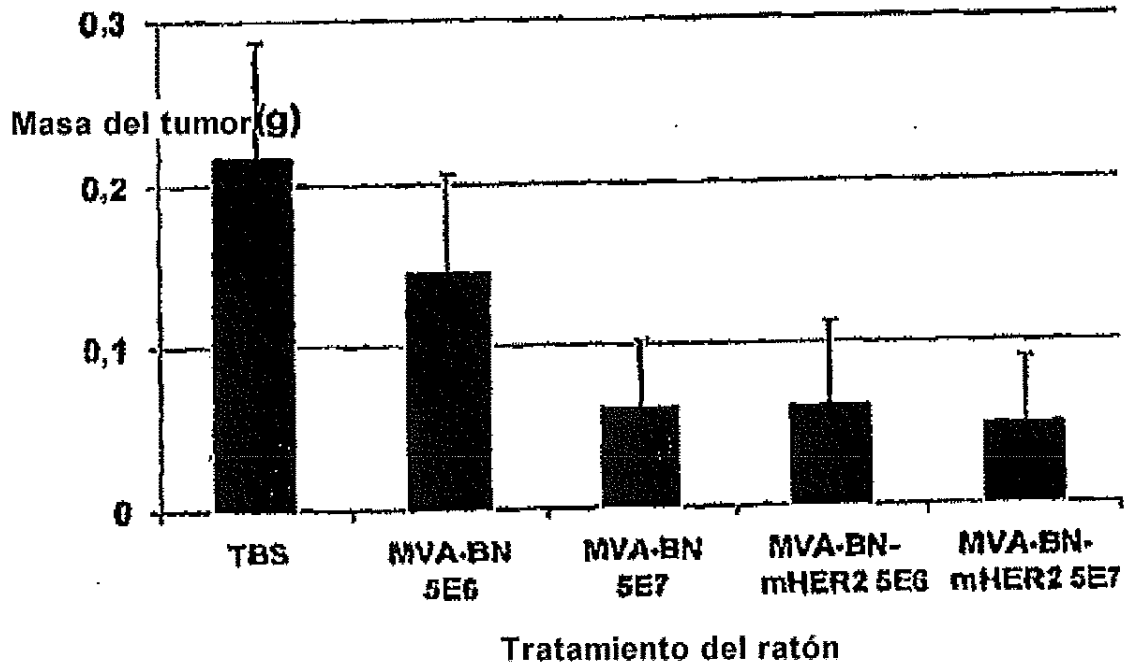
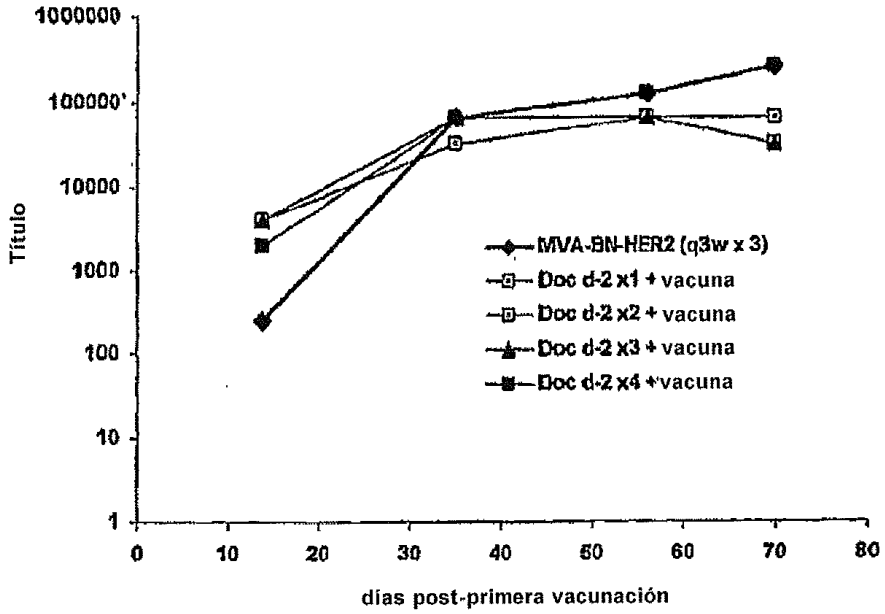


FIGURA 8

A

Títulos de HER-2 06-041 (grupos día 2)



B

Títulos de HER-2 06-041 (grupos día 7)

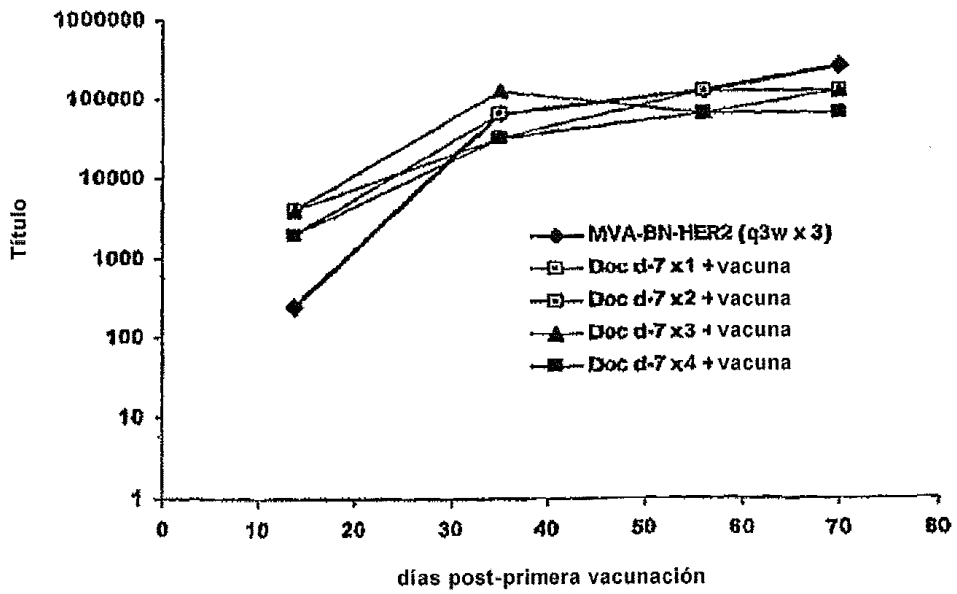
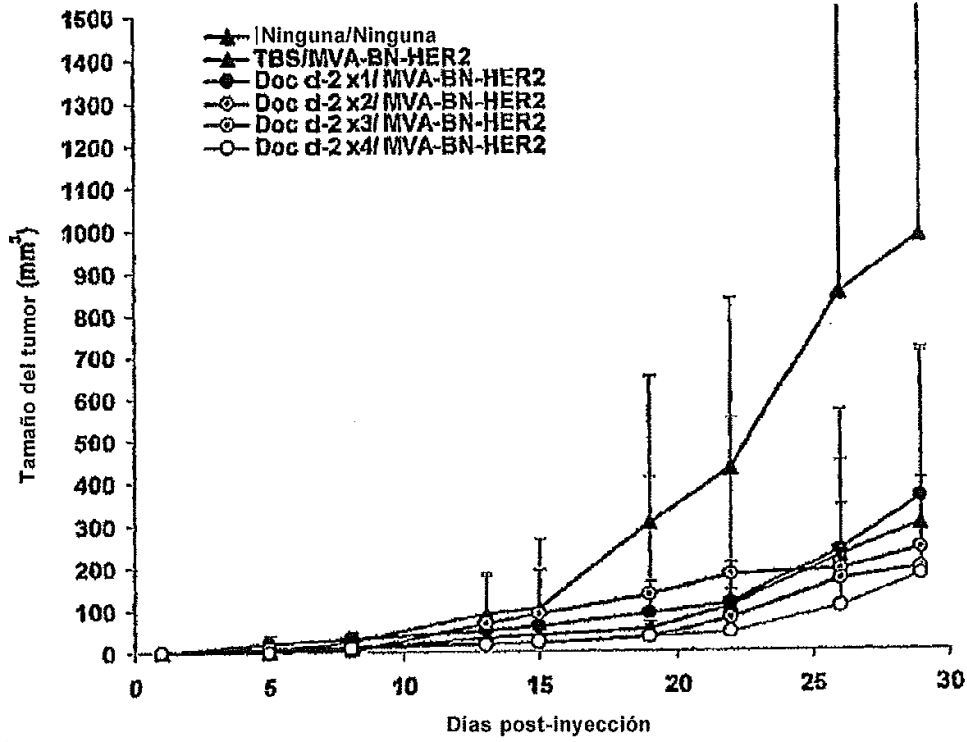


FIGURA 9

A



B

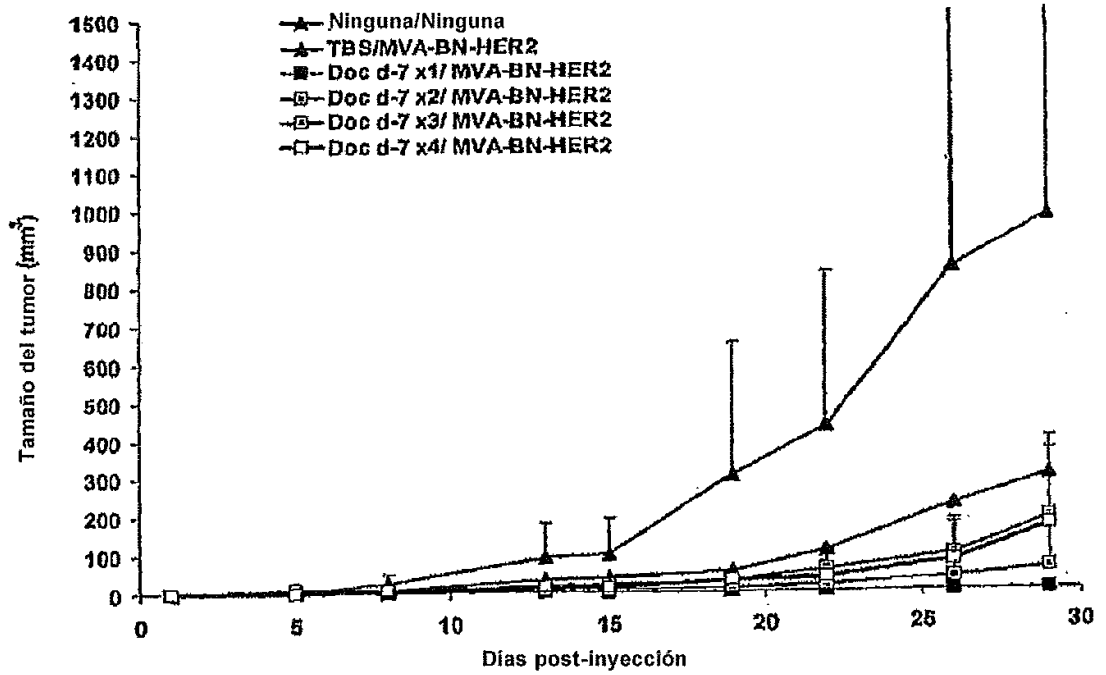
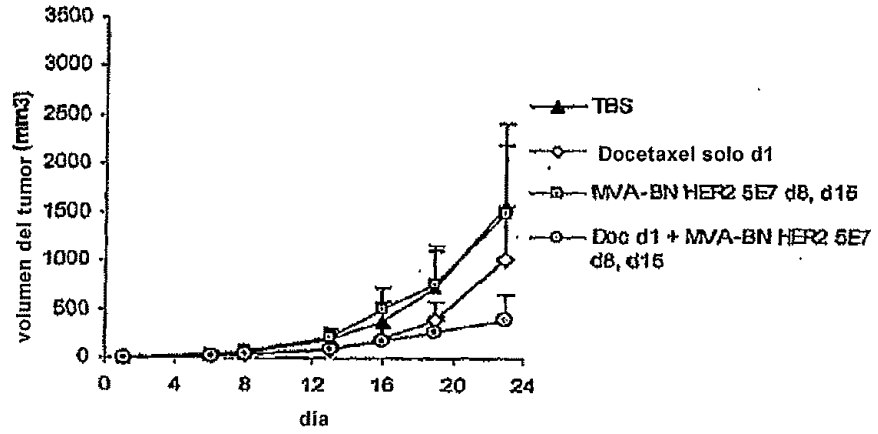


FIGURA 10

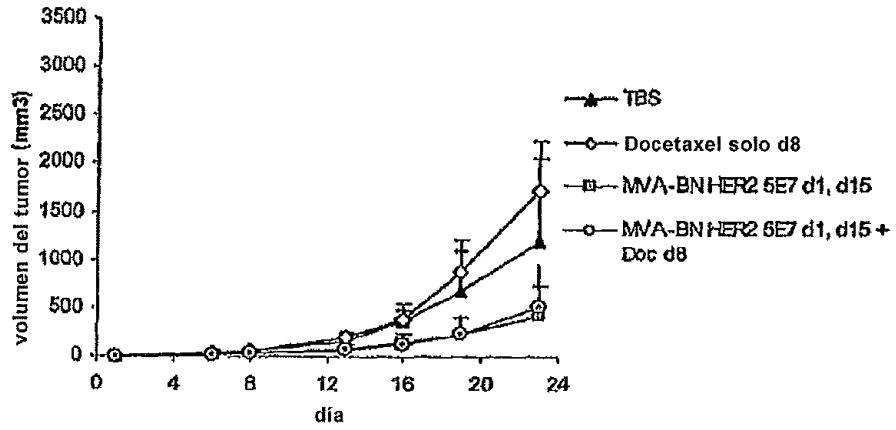
A

Subconjunto A: Curvas de Crecimiento del Tumor



B

Subconjunto B: Curvas de Crecimiento del Tumor



C

Subconjunto C: Curvas de Tratamiento del Tumor

