

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 858**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2010** **E 10709742 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015** **EP 2411815**

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

30 Prioridad:

24.03.2009 EP 09305256

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.01.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ACRES, BRUCE y
MARIE-BASTIEN, BÉRANGÈRE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 555 858 T3

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

DESCRIPCIÓN

Biomarcador para el control de pacientes

5 La presente invención se incluye en el campo de la inmunoterapia y se refiere a métodos para determinar la eficacia de ciertos tratamientos inmunoterápicos. Los métodos de la invención incluyen la medición de un biomarcador especial en determinado momento, después de iniciar el tratamiento inmunoterápico, para evaluar el resultado clínico de dicho tratamiento. Por tanto, la invención tiene aplicaciones en el campo de la medicina.

10 Desde hace muchos años se conocen técnicas de vacunación tradicionales que implican la introducción de un antígeno (p. ej., péptidos, proteínas) en un sistema animal que puede inducir una respuesta inmunitaria y proteger así a dicho animal, por ejemplo, contra la infección. Estas técnicas se han incluido posteriormente en el desarrollo de vacunas, tanto vivas como inactivadas. Las vacunas vivas son, típicamente, versiones atenuadas no patógenas de un agente infeccioso, que son capaces de iniciar una respuesta inmunitaria dirigida contra una versión patógena del agente infeccioso.

15 En los últimos años ha habido avances en el desarrollo de vacunas recombinantes, especialmente, vacunas recombinantes vivas, en las cuales, los agentes extraños de interés se codifican y se expresan a partir de un vector. Entre ellos, los vectores a base de virus recombinantes han demostrado ser muy prometedores y juegan un importante papel en el desarrollo de nuevas vacunas. La capacidad de expresar proteínas a partir de patógenos extraños o tejido tumoral, y de inducir respuestas específicas *in vivo* contra estos agentes se ha investigado en muchos virus. Generalmente, estas vacunas génicas pueden estimular potentes respuestas inmunitarias humorales y celulares y los vectores virales podrían ser una estrategia eficaz, tanto para la liberación de genes que codifican antígenos, como para la facilitación y mejora de la presentación antigénica. Para utilizarse como un vehículo de vacuna, el vector viral ideal debe ser seguro y permitir una presentación eficaz de los antígenos específicos de patógenos requeridos al sistema inmunitario. Además, el sistema del vector ha de cumplir con criterios que permitan su producción a gran escala. Hasta la fecha han surgido, por tanto, varios vectores virales de vacunas, todos ellos con ventajas y límites relativos, dependiendo de la aplicación propuesta (para una revisión sobre vacunas virales recombinantes, véase, por ejemplo, Harrop y Carroll, 2006, *Front Biosci.*, 11, 804-817; Yokoyama y cols., 1997, *J Vet Med Sci.*, 59, 311-322). El uso de dichas vacunas recombinantes se denomina comúnmente inmunoterapia dirigida o inmunoterapia activa específica de antígeno.

20 Tras la observación, a principios de la década de 1990, de que los vectores de ADN plasmídico podían transfectar directamente células animales *in vivo*, también se han hecho esfuerzos significativos en la investigación para desarrollar técnicas inmunoterápicas basadas en el uso de plásmidos de ADN para inducir una respuesta inmunitaria, mediante la introducción directa en animales de ADN que codifique antígenos. Dichas técnicas, que se mencionan ampliamente como vacunación con ADN o inmunoterapia con ADN, se han utilizado ahora para suscitar respuestas inmunoprotectoras en un gran número de modelos de enfermedad. Para una revisión sobre vacunas de ADN, véase Reyes-Sandoval y Ertl, 2001 (*Current Molecular Medicine*, 1, 217-243).

40 Sin embargo, en el campo de la inmunoterapia se ha identificado un problema general sobre un medio para inducir en los individuos tratados una respuesta inmunitaria suficientemente fuerte para protegerlos contra infecciones y enfermedades.

45 Por lo tanto, en los últimos años ha habido un esfuerzo importante para descubrir nuevos compuestos farmacológicos que actúen estimulando ciertos aspectos clave del sistema inmunitario que servirán para aumentar la respuesta inmunitaria inducida por las inmunoterapias. La mayoría de estos compuestos, a los que se denomina adyuvantes o modificadores de la respuesta inmunitaria (MRI), parecen actuar a través de mecanismos básicos del sistema inmunitario, mediante receptores de tipo *Toll* (TLR, *Toll-like receptors*) para inducir la biosíntesis de diversas citocinas importantes (p. ej., interferones, interleucinas, factor de necrosis tumoral, etc. Véase, por ejemplo, Schiller y cols., 2006, *Exp Dermatol.*, 15, 331-341). Se ha demostrado que dichos compuestos estimulan una rápida liberación de ciertas citocinas derivadas de células dendríticas, monocitos y macrófagos y que también son capaces de estimular a las células B para segregar anticuerpos que juegan un importante papel en las actividades antiviral y antitumoral de los compuestos MRI.

50 Como alternativa, se han propuesto estrategias inmunoterápicas, la mayoría de ellas basadas en un régimen de vacunación de estímulo primario. De acuerdo con estos protocolos de inmunoterapia de "estímulo primario", se induce primero al sistema inmune administrando al paciente una composición sensibilizadora y después se refuerza administrando una segunda composición de refuerzo (véanse, por ejemplo, los documentos EP1411974 o US20030191076)

Además, en el contexto sanitario, se ha demostrado que un tratamiento puede ser eficaz sólo en un grupo específico de pacientes.

65 Por ejemplo, el documento WO 2007/015171 describe el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico con una formulación liposómica que comprende MUC1 e IL-2 y comunica que, si después del tratamiento con dicha

composición, un paciente presentaba una respuesta proliferativa positiva de células T específicas de MUC1, el tiempo medio de supervivencia de dichos pacientes que respondían aumentaba significativamente en comparación con los que no respondían.

Es por tanto deseable proporcionar a los médicos herramientas y métodos que les permitan adaptar terapias óptimas personalizadas para el paciente, es decir, prescribir la terapia adecuada al paciente adecuado en el momento adecuado, para proporcionar un mayor índice de éxito del tratamiento, controlar la respuesta al tratamiento, incrementar la eficacia y la seguridad farmacológica, eliminar el tratamiento innecesario de pacientes para los que la terapia no es apropiada, evitar al paciente efectos secundarios y de toxicidad innecesarios, reducir para los pacientes y para las aseguradoras el coste de una medicación ineficaz, innecesaria o peligrosa, y mejorar la calidad de vida del paciente, haciendo que el cáncer termine siendo una enfermedad controlada, con ensayos de seguimiento apropiados.

A este respecto, la bibliografía propone diversas herramientas y métodos, tales como, por ejemplo:

- La farmacogenética, que consiste en el estudio de la respuesta individual a los fármacos en función de las diferencias genéticas. Estas respuestas se refieren a cómo funciona un fármaco en cualquier individuo dado, cómo se metaboliza, su toxicidad y requerimientos de dosificación. Con el proyecto del genoma humano, la farmacogenética se ha ampliado a la farmacogenómica. La farmacogenómica va más allá de la farmacogenética, con la posibilidad de encontrar usos a partir del descubrimiento y el desarrollo de fármacos, del descubrimiento y la validación de dianas, y de los ensayos clínicos;

- La metabolómica también puede aplicarse al campo de la medicina predictiva. Al contrario que la farmacogenética, que se limita a factores genéticos, la farmacometabolómica puede predecir la respuesta de un individuo a un fármaco, basándose, no sólo en factores genéticos, sino también en factores no genéticos, tales como otros fármacos en el organismo del paciente, el estado de salud actual del paciente, etc.

- El papel de los biomarcadores está adquiriendo cada vez más importancia en el desarrollo clínico de los tratamientos. Un biomarcador puede ser un indicador de procesos biológicos normales, de procesos de enfermedad, o de respuestas farmacológicas a la intervención terapéutica. Su papel abarca desde la estratificación de la población de pacientes para ayudar a identificar a los pacientes que responden frente a los que no responden hasta la determinación de la eficacia de la terapia. Los biomarcadores pueden ser una valiosa herramienta para tomar mejores decisiones que reducirán el coste del desarrollo de fármacos y permitirán que las terapias lleguen más rápido a la población adecuada de pacientes. La invención proporciona materiales y métodos como se describen más adelante en el presente documento para evaluar la eficacia de un tratamiento que implica la administración de una composición inmunógena a un paciente (es decir, un tratamiento de inmunoterapia) utilizando marcadores biológicos (biomarcadores) que se ha determinado que son un distintivo sustancialmente fiable que se correlaciona con la respuesta inmunitaria deseada.

Por tanto, la presente invención se refiere a un método *ex-vivo* para evaluar la eficacia de un tratamiento en un paciente que padece un cáncer con una composición inmunógena, que comprende las etapas de:

medir los niveles de interferón γ en una muestra de sangre, plasma o suero, obtenida de dicho paciente después de la administración de dicha composición inmunógena a dicho paciente, donde el tiempo entre el inicio de dicho tratamiento que comprende la administración de dicha composición inmunógena y las mediciones de interferón γ es de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 semanas; y donde los niveles de interferón γ por encima de 4 pg/ml indican que el paciente es representativo de un resultado clínico satisfactorio para el tratamiento, y donde dicha composición inmunógena contiene al menos un vector viral recombinante que expresa *in vivo* todo o parte del antígeno de MUC1, y donde dicho vector viral recombinante expresa, además, IL-2.

La capacidad de predecir el resultado clínico de un tratamiento, como se describe anteriormente, poco después de su inicio, permitirá a los profesionales clínicos y a los pacientes identificar una terapia ineficaz, tomar decisiones con consentimiento con respecto al transcurso del tratamiento, tales como si se abandona o se permite aplicar una terapia alternativa.

Como se usa en el presente documento a lo largo de toda la solicitud, las expresiones “un”, “uno” y “una” se usan en el sentido de querer decir “al menos uno(a)”, “al menos un(a) primer(a)”, “uno(a) o más” o “una pluralidad” de los compuestos o etapas referidos, a menos que el contexto dictamine otra cosa. Por ejemplo, la expresión “una célula” incluye una pluralidad de células que incluye una mezcla de las mismas. Más específicamente “al menos uno(a)” y “uno(a) o más”, significa un número que es uno o mayor que uno, con una preferencia especial por uno, dos o tres.

La expresión “y/o”, dondequiera que se use en el presente documento, incluye el significado de “y”, “o” y “cualquier otra combinación de los elementos relacionados con dicha expresión”.

Las expresiones “alrededor de” o “aproximadamente”, de la manera en la que se usan en el presente documento, significan dentro de un 20 %, preferentemente dentro de un 10%, y más preferentemente dentro de un 5%.

5 Los términos “paciente” y “sujeto” se refieren a un vertebrado, particularmente a un miembro de las especies de mamíferos e incluye, pero sin limitación, animales domésticos, animales para el deporte, primates, incluido el ser humano.

De la manera en la que se usan en el presente documento, los términos “tratamiento” o “tratar” se refieren a terapia.

10 Una “cantidad eficaz” o una “cantidad suficiente” de un compuesto activo es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados, incluidos los resultados clínicos. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” es una cantidad para efectuar resultados clínicos beneficiosos.

15 De acuerdo con la invención, el término “evaluar” debería entenderse como “controlar, modificar o ajustar” un tratamiento que implica la administración de una composición inmunógena a un paciente como se define anteriormente en el presente documento.

20 En ciertos aspectos, el método puede incluir, además, la medición de los niveles de interferón γ de un paciente antes del tratamiento inmunoterápico.

25 El tiempo entre el inicio del tratamiento inmunoterápico y las mediciones de interferón γ es de aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 8 semanas. En una realización preferida de la invención, el intervalo de tiempo es de aproximadamente 5 semanas. Igualmente, pueden efectuarse mediciones adicionales (es decir, una tercera, una cuarta, una quinta, etc. medición) a intervalos de tiempo similares después de la segunda medición.

30 De acuerdo con una realización especial de la invención, el “tratamiento inmunoterápico” consiste en al menos una administración de dicha composición inmunógena a dicho paciente. De acuerdo con una realización especial, el “tratamiento inmunoterápico” consiste en administraciones sucesivas de dicha composición inmunógena a dicho paciente, más específicamente, consiste en la administración semanal durante al menos 2 semanas, preferentemente durante al menos 6 semanas.

35 El método incluye la determinación de los niveles de interferón γ en un paciente después de la administración de dicha composición inmunógena al mismo, comparando dichos niveles con un valor umbral y evaluando la eficacia del tratamiento inmunoterápico en base a los niveles de interferón γ comparados con el valor umbral.

40 El valor umbral y/o el límite de detección es de aproximadamente 4 pg/ml (p. ej., 4,6 pg/ml en plasma), preferentemente medidos mediante perfilado multianalito de proteínas plasmáticas, utilizando el sistema Luminex® (véase el ejemplo 1). El experto que utilice otra prueba/método (p. ej., ELISA), no tendrá dificultad para determinar el equivalente para una prueba específica de dicho valor umbral y/o límite de detección de aproximadamente 4 pg/ml medido mediante perfilado multianalito de proteínas plasmáticas, utilizando el sistema Luminex®. De acuerdo con realizaciones especiales, dicho valor umbral de acuerdo con la invención puede definirse como un valor umbral equivalente al valor umbral medido mediante perfilado multianalito de proteínas plasmáticas, utilizando el sistema Luminex®. Mediante un “valor umbral” equivalente al valor umbral medido mediante perfilado multianalito de proteínas plasmáticas, utilizando el sistema Luminex® se quiere indicar un valor umbral que identifique a los mismos pacientes que los identificados mediante el valor umbral medido mediante perfilado multianalito de proteínas plasmáticas, utilizando el sistema Luminex®.

50 De acuerdo con una realización especial, la invención tiene que ver con un método descrito anteriormente en el presente documento, donde dicho tratamiento con dicha composición inmunógena comprende la administración de una o más dosis de dicha composición inmunógena a dicho sujeto.

55 De acuerdo con una realización alternativa de la invención, el método de la invención comprende, además, una etapa inicial que consiste en determinar los niveles de interferón γ en el organismo del paciente antes de la administración de dicha composición inmunógena.

De acuerdo con la presente invención, el nivel de interferón γ se mide en una muestra de sangre, plasma o suero obtenida del paciente.

60 Los métodos para obtener sangre o suero son bien conocidos en la técnica y no forman parte de la invención.

65 Además, se conocen numerosos métodos para detectar y cuantificar polipéptidos, en particular interferón γ . Dichos métodos son, pero no se limitan a, métodos basados en anticuerpos, más específicamente, métodos basados en anticuerpos monoclonales. Los métodos particulares para detectar y cuantificar interferón γ no son importantes para la invención. Por ejemplo, los materiales y métodos de la presente invención pueden usarse con la tecnología

Luminex (Luminex Corporation, Austin, Tex.), o ensayo de inmunoadsorción (ELISA, en el mercado se dispone de numerosos kits de ELISA, p. ej., de CliniScience, Diaclone, Biosource).

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones “composición inmunógena”, “composición vacunal”, “vacuna”, o expresiones similares pueden utilizarse indistintamente.

Dicha composición inmunógena contiene al menos un vector viral recombinante que expresa *in vivo* todo o parte del antígeno MUC1 y donde dicho vector viral recombinante expresa, además IL-2.

De acuerdo con otra realización, la composición inmunógena también comprende al menos un modificador de la respuesta inmunitaria. Son ejemplos de dichos modificadores de la respuesta inmunitaria (MRI) los oligonucleótidos CpG (véanse, por ejemplo, los documentos US 6.194.388; US2006094683; WO 2004039829), lipopolisacáridos, complejos de ácido poliínosico:policitidílico (Kadowaki, y cols., 2001, J. Immunol. 166, 2291-2295), y polipéptidos y proteínas que se sabe que inducen la producción de citocinas a partir de células dendríticas y/o monocitos/macrófagos. Otros ejemplos de dichos modificadores de la respuesta inmunitaria (MRI) son moléculas orgánicas pequeñas, tales como imidazoquinolinaminas, aminas de imidazopiridina, aminas de cicloalquilimidazopiridina condensadas en 6, 7, aminas de imidazonaftiridina, aminas de oxazoloquinolina, aminas de tiazoloquinolina y aminas de imidazoquinolina con puente 1,2 (véanse, por ejemplo, los documentos US 4.689.338; US 5.389.640; US 6.110.929; y US 6.331.539).

Si es necesario, la molécula de ácido nucleico de uso en la invención puede optimizarse para proporcionar altos niveles de expresión del antígeno MUC1 en una célula u organismo huésped en particular, p. ej., una célula huésped u organismo humanos. Típicamente, la optimización de codones se realiza reemplazando uno o más codones “nativos” correspondientes por un codón de uso infrecuente en la célula huésped de mamífero por uno o más codones que codifican el mismo aminoácido, cuyo uso es más frecuente. Esto puede lograrse mediante mutagénesis convencional o mediante técnicas de síntesis química (p. ej. que producen un ácido nucleico sintético). No es necesario reemplazar todos los codones nativos correspondientes por los codones de uso infrecuente, ya que puede lograrse una expresión aumentada incluso con un reemplazo parcial. Además, pueden efectuarse algunas desviaciones de la adherencia estricta al uso de codones optimizado para dar cabida a la introducción de uno o más sitios de restricción.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “vector recombinante” se refiere a vectores virales.

Particularmente importantes en el contexto de la invención son los vectores para su uso en terapia génica (es decir, que son capaces de liberar el ácido nucleico en un organismo huésped), así como los vectores de expresión para uso en diversos sistemas de expresión.

Los vectores virales apropiados pueden proceder de una variedad de virus diferentes (p. ej., retrovirus, adenovirus, VAA, poxvirus, herpesvirus, virus del sarampión, virus espongiformes y similares). Tal como se usa en el presente documento, la expresión “vector viral” engloba vectores de ADN/ARN, así como partículas virales generadas por los mismos. Los vectores virales pueden ser competentes para la replicación o estar genéticamente deshabilitados de manera que su replicación esté alterada o no tengan capacidad de replicación. La expresión “competente para la replicación”, tal como se usa en el presente documento, engloba vectores de replicación selectiva y condicionalmente replicativos, que se han diseñado para replicarse mejor o selectivamente en células huésped específicas (p. ej., células tumorales).

En un aspecto, el vector recombinante de uso en la invención es un vector adenoviral recombinante (para una revisión, véase “Adenoviral vectors for gene therapy”, 2002, Ed D. Curiel y J. Douglas, Academic Press). Puede proceder de una variedad de fuentes humanas o animales y puede emplearse cualquier serotipo de los serotipos de adenovirus 1 a 51. Particularmente, se prefieren los adenovirus humanos 2 (Ad2), 5 (Ad5), 6 (Ad6), 11 (Ad11), 24 (Ad24) y 35 (Ad35). Dichos adenovirus pueden obtenerse en la American Type Culture Collection (Colección americana de cultivos tipo, ATCC, Rockville, Md.), y han sido objeto de numerosas publicaciones que describen su secuencia, organización y métodos de producción, permitiendo que el experto pueda aplicarlos (véanse, por ejemplo, los documentos US 6.133.028; US 6.110.735; WO 02/40665; WO 00/50573; EP 1016711; Vogels y cols., 2003, J. Virol. 77, 8263-8271).

El vector adenoviral de uso en la presente invención puede ser competente para la replicación. Los expertos en la técnica pueden disponer fácilmente de numerosos ejemplos de vectores adenovirales competentes para la replicación (véase, por ejemplo, Hernandez-Alcoceba y cols., 2000, Human Gene Ther. 11, 2009-2024; Nemunaitis y cols., 2001, Gene Ther. 8, 746-759; Alemany y cols., 2000, Nature Biotechnology 18, 723-727). Pueden diseñarse, por ejemplo, a partir de un genoma natural de adenovirus, mediante delección en el dominio E1A CR2 (véase, por ejemplo, el documento WO00/24408) y/o reemplazando los promotores nativos E1 y/o E4 por promotores tisulares, tumorales o específicos del estado celular (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.998.205, WO99/25860, US 5.698.443, WO00/46355, WO00/15820 y WO01/36650).

Como alternativa, el vector adenoviral de uso en la invención tiene capacidad de replicación defectuosa (véase, por ejemplo, el documento WO94/28152; Lusky y cols., 1998, J. Virol 72, 2022-2032). Los vectores adenovirales con capacidad de replicación defectuosa preferidos son defectivos para E1 (véanse, por ejemplo, los documentos US 6.136.594 y US 6.013.638), con una delección en E1 que se extiende de aproximadamente las posiciones 459 a 3328, o aproximadamente desde las posiciones 459 a 3510 (por referencia a la secuencia del adenovirus humano de tipo 5 divulgada en el GeneBank con el número de registro M 73260 y en Chroboczek y cols., 1992, Virol. 186, 280-285). La capacidad de clonación puede mejorarse más mediante la delección de una o más porciones adicionales del genoma adenoviral (todo o parte la región no esencial E3 y de otras regiones esenciales E2, E4). Puede efectuarse una inserción de un ácido nucleico en cualquier localización del vector adenoviral mediante recombinación homóloga, como se describe en Chartier y cols. (1996, J. Virol. 70, 4805-4810). Por ejemplo, puede insertarse el ácido nucleico que codifica el polipéptido E6 de HPV-16 en sustitución de la región E1, y el ácido nucleico que codifica el polipéptido E7 de HPV-16 en sustitución de la región E3, o viceversa.

En otro aspecto preferido, el vector de uso en la invención es un vector poxviral (véase, por ejemplo, Cox y cols. en "Viruses in Human Gene Therapy" Ed J. M. Hos, Carolina Academic Press). De acuerdo con otra realización preferida, este se selecciona del grupo que consiste en el virus vacuna; los virus vacuna adecuados incluyen, sin limitación, la cepa Copenhagen (Goebel y cols., 1990, Virol. 179, 247-266 y 517-563; Johnson y cols., 1993, Virol. 196, 381-401), la cepa Wyeth y el virus atenuado altamente atenuado derivado de las mismas, incluyendo el virus MVA (*Modified Vaccinia Ankara*) (para una revisión, véase Mayr, A., y cols., 1975, Infection 3, 6-14) y derivados de la mismas (tales como la cepas MVA de vacuna 575 (ECACC V00120707 - US 6.913.752), NYVAC (véase el documento WO 92/15672 - Tartaglia y cols., 1992, Virology, 188, 5 217-232). La determinación de la secuencia completa del genoma del MVA y la comparación con el genoma de la cepa Copenhagen W ha permitido la identificación exacta de las siete delecciones (I a VII) que se produjeron en el genoma del MVA (Antoine y cols., 1998, Virology 244, 365-396), cualquiera de las cuales puede usarse para insertar el ácido nucleico que codifica el antígeno. El vector también puede obtenerse de cualquier otro miembro de la familia *Poxviridae*, en particular, de la viruela aviar (p. ej., TROVAC, véase Paoletti y cols, 1995, Dev Biol Stand., 84, 159-163); viruela del canario (p. ej., ALVAC, documento WO 95/27780, Paoletti y cols, 1995, Dev Biol Stand., 84, 159-163); viruela de la paloma; viruela porcina y similar. A modo de ejemplo, los expertos en la técnica pueden remitirse al documento WO 92 15672 (incorporado como referencia) que describe la producción de vectores de expresión basados en poxvirus capaces de expresar dichas secuencias heterólogas de nucleótidos, especialmente las secuencias de nucleótidos que codifican el antígeno.

La técnica básica para insertar el ácido nucleico y los elementos reguladores asociados necesarios para la expresión en un genoma poxviral se describe en numerosos documentos accesibles para el experto en la técnica (Paul y cols., 2002, Cancer gene Ther. 9, 470-477; Piccini y cols., 1987, Methods of Enzymology 153, 545-563; documentos US 4,769,330; US 4,772,848 ; US 4,603,112 ; US 5,100,587 y US 5,179,993). Habitualmente, se lleva a cabo a través de recombinación homóloga entre secuencias solapantes (es decir, el sitio de inserción deseado) presentes tanto en el genoma viral como en un plásmido que porta el ácido nucleico a insertar.

El ácido nucleico que codifica el antígeno MUC1 se inserta preferentemente en un locus no esencial del genoma poxviral, para que el poxvirus recombinante siga siendo viable e infeccioso. Las regiones no esenciales son regiones intergénicas no codificantes, o cualquier gen en el que la inactivación o la delección no perjudican significativamente el crecimiento, la replicación o la infección virales. También puede contemplarse la inserción en un locus viral esencial, dado que la función defectuosa se facilita *in trans* durante la producción de partículas virales, por ejemplo, usando una línea celular colaboradora que lleve las secuencias complementarias correspondientes a las delecionadas en el genoma poxviral.

Cuando se usa la cepa Copenhagen del virus vacuna, el ácido nucleico que codifica el antígeno se inserta preferentemente en el gen de la timidina cinasa (tc) (Hruby y cols., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci USA 80, 3411-3415; Weir y cols., 1983, J. Virol. 46, 530-537). Sin embargo, también son apropiados otros sitios de inserción, p. ej., en el gen de la hemaglutinina (Guo y cols., 1989, J. Virol. 63, 4189-4198), en el locus K1L, en el gen u (Zhou y cols., 1990, J. Gen. Virol. 71, 2185-2190) o en el extremo izquierdo del genoma del virus vacuna, donde se han publicado en la bibliografía diversas delecciones espontáneas o diseñadas (Altenburger y cols., 1989, Archives Virol. 105, 15-27 ; Moss y cols. 1981, J. Virol. 40, 387-395 ; Panicali y cols., 1981, J. Virol. 37, 1000-1010; Perkus y cols., 1989, J. Virol. 63, 3829-3836 ; Perkus y cols., 1990, Virol. 179, 276-286 ; Perkus y cols., 1991, Virol. 180, 406-410).

Cuando se usa el MVA, el ácido nucleico que codifica el antígeno puede insertarse en una cualquiera de las delecciones I a VII identificadas, así como en el locus D4R, pero se prefiere la inserción en la delección II o III (Meyer y cols., 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038; Sutter y cols., 1994, Vaccine 12, 1032-1040)

Cuando se usa virus de la viruela aviar, aunque puede considerarse la inserción dentro del gen de la timidina cinasa, el ácido nucleico que codifica el antígeno se introduce preferentemente en la región intergénica situada entre las ORF (*Open Reading Frame*, fase de lectura abierta) 7 y 9 (véanse, por ejemplo, los documentos EP 314 569 y US 5.180.675).

De acuerdo con una realización especial, dicho vector viral recombinante es un vector adenoviral recombinante.

De acuerdo con otra realización especial, dicho vector viral recombinante es un vector vacuna recombinante

De acuerdo con una realización preferida, dicho vector viral recombinante es un vector MVA recombinante

5 Preferentemente, el ácido nucleico que codifica el antígeno MUC1 de uso en la invención está en una forma adecuada para su expresión en una célula u organismo huésped, lo que significa que la secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno MUC1 está situada bajo el control de una o más secuencias reguladoras necesarias para su expresión en la célula u organismo huésped. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia reguladora" se refiere a cualquier secuencia que permita, contribuya o module la expresión de un ácido nucleico en una célula huésped determinada, incluyendo la replicación, duplicación, transcripción, corte y empalme, traducción, estabilidad y/o transporte del ácido nucleico o de uno de sus derivados (es decir, ARNm) dentro de la célula huésped. Los expertos en la técnica apreciarán que la elección de las secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la célula huésped, el vector y el nivel de expresión que se desee. El ácido nucleico que codifica el antígeno MUC1 está unido operativamente a una secuencia de expresión génica que dirige la expresión del ácido nucleico del antígeno MUC1 dentro de una célula eucariota. La secuencia de expresión génica es cualquier secuencia de nucleótidos reguladora, tal como una secuencia de un promotor, o una combinación potenciadora de un promotor que facilite la transcripción y traducción eficaces del ácido nucleico del antígeno MUC1 al que está unida operativamente. La secuencia de expresión génica puede ser, por ejemplo, un promotor de mamífero o viral, tal como un promotor constitutivo o inducible. Los promotores constitutivos de mamífero incluyen, pero sin limitación, los promotores de los siguientes genes: hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT, por sus siglas en inglés), adenosina desaminasa, piruvato cinasa, promotor de b-actina y otros promotores constitutivos. Un ejemplo de promotores virales que funcionan de forma constitutiva en las células eucariotas son, por ejemplo, promotores de citomegalovirus (CMV), virus de simio (p. ej., SV40), papilomavirus, adenovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del sarcoma de Rous, citomegalovirus, repeticiones terminales largas (LTR, por sus siglas en inglés) del virus de la leucemia de Moloney y otros retrovirus, y el promotor de la timidina cinasa del virus del herpes simple. Los expertos en la técnica conocen otros promotores constitutivos.

Los promotores útiles como secuencias de expresión génica de la invención también incluyen promotores inducibles. Los promotores inducibles se expresan en presencia de un agente inductor. Por ejemplo, el promotor de la metalotioneína se induce para promover la transcripción y traducción en presencia de ciertos iones metálicos. Los expertos habituales en la técnica conocen otros promotores inducibles. En general, la secuencia de expresión génica incluirá, necesariamente, secuencias 5' no traducibles y 5' no traducibles implicadas en el inicio de la transcripción y la traducción respectivamente, tales como una caja TATA, una secuencia protectora terminal, una secuencia CAAT, y similares. Especialmente, dichas secuencias 5' no traducibles incluirán una región promotora que incluya una secuencia promotora para el control transcripcional del ácido nucleico del antígeno unido operativamente. Las secuencias de expresión génica incluirán opcionalmente secuencias potenciadoras o secuencias activadoras cadena arriba según convenga. Los promotores preferidos para usar en un vector poxviral (véase más adelante) incluyen, sin limitación, los promotores del virus vacuna 7,5 K, H5R, TK, p28, p11 Y K1L, promotores quiméricos entre promotores poxvirales tempranos y tardíos, así como promotores sintéticos tales como los descritos en Chakrabarti y cols. (1997, Biotechniques 23, 1094-1097), Hammond y cols. (1997, J. Virological Methods 66, 135-138) y en Kumar y Boyle (1990, Virology 179, 151-158).

El promotor es de especial importancia y la presente invención engloba el uso de promotores constitutivos que dirigen la expresión del ácido nucleico en muchos tipos de células huésped y los que dirigen la expresión sólo en determinadas células huésped o en respuesta a acontecimientos o factores exógenos específicos (p. ej., temperatura, adición de nutrientes, hormonas u otro ligando). En la bibliografía se describen ampliamente promotores adecuados y pueden citarse más específicamente promotores virales tales como los promotores de RSV, SV40, CMV y MLP. Los promotores preferidos para su uso en un vector poxviral incluyen, sin limitación, los promotores del virus vacuna 7,5 K, H5R, TK, p28, p11 Y K1L, promotores quiméricos entre promotores poxvirales tempranos y tardíos, así como promotores sintéticos tales como los descritos en Chakrabarti y cols. (1997, Biotechniques 23, 1094-1097), Hammond y cols. (1997, J. Virological Methods 66, 135-138) y Kumar y Boyle (1990, Virology 179, 151-158).

Los expertos en la materia apreciarán que los elementos reguladores que controlan la expresión de la molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno MUC1 pueden comprender, además, elementos adicionales para un inicio, una regulación y/o una terminación de la transcripción (p. ej., secuencias poli-A de terminación de la transcripción) transporte del ARNm (p. ej., secuencias de señal de localización nuclear) procesamiento (p. ej., señales de corte y empalme) y estabilidad (p. ej., intrones, secuencias no codificantes 5' y 3') traducción (p. ej., péptido señal, propéptido, secuencias líder tripartitas, sitios de unión a ribosomas, secuencias Shine-Dalgarno, etc.) adecuados, en la célula u organismo huésped.

El vector recombinante viral de uso en la presente invención comprende, además, un ácido nucleico que codifica IL-2. Dicho vector puede comprender otros ácidos nucleicos que codifiquen otras citocinas. Las citocinas adecuadas incluyen, sin limitación, interleucinas (p. ej., IL-7, IL-15, IL-18, IL-21) e interferones (p. ej., IFN γ , IFN α). Dichos ácidos nucleicos que expresan otras citocinas pueden transportarse a través del vector viral recombinante que codifica MUC1 e IL-2 o a través de un vector recombinante independiente que puede ser del mismo o de diferente origen.

Las partículas virales infecciosas que comprenden el vector viral recombinante descrito anteriormente pueden producirse mediante un proceso habitual. Un ejemplo de un proceso comprende las siguientes etapas:

- a. introducción del vector viral en una línea celular adecuada,
- b. cultivo de dicha línea celular en condiciones adecuadas para permitir la producción de dicha partícula viral infecciosa,
- c. recuperación del cultivo de dicha línea celular de la partícula viral infecciosa producida, y
- d. opcionalmente, purificación de dicha partícula viral infecciosa recuperada.

Son células apropiadas para propagar vectores adenovirales, por ejemplo, células 293, células PERC6, células HER96, o células como las divulgadas en los documentos WO 94/28152, WO 97/00326, US 6,127,175.

Son células apropiadas para propagar vectores poxvirales células de ave y, más preferentemente, fibroblastos primarios de embrión de pollo (FEP) preparados a partir de embriones de pollo obtenidos de huevos fertilizados.

Las partículas virales infecciosas pueden recuperarse del sobrenadante del cultivo o de las células después de la lisis (p. ej., mediante medios químicos, congelación/ descongelación, choque osmótico, choque mecánico, ultrasonido y similar). Las partículas virales pueden aislarse mediante rondas consecutivas de purificación en placas y después, pueden purificarse usando los métodos de la técnica (métodos cromatográficos, ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio o sacarosa).

De acuerdo con otra realización, los métodos de la invención pueden combinarse con otros métodos para predecir la eficacia de los tratamientos, más específicamente, para predecir la eficacia de los tratamientos inmunoterápicos. Por ejemplo, los niveles de biomarcadores, tales como los niveles de células NK activadas (véase la solicitud de patente que reivindica prioridad del documento EP 08305876.8) o los niveles de sICAM-1 (véase la solicitud de patente que reivindica prioridad del documento EP 09305032.6).

Si se desea, la administración de la composición inmunógena puede llevarse a cabo junto con una o más modalidades terapéuticas convencionales (p. ej., radiación, quimioterapia y/o cirugía). El uso de múltiples enfoques terapéuticos proporciona al paciente seleccionado una intervención con una base más amplia. En una realización, la administración de la composición inmunógena puede ir precedida o seguida de una intervención quirúrgica. En otra realización, puede ir precedida o seguida de radioterapia (p. ej., radiación gamma). Los expertos en la técnica pueden formular rápidamente protocolos de radioterapia y parámetros adecuados que pueden usarse (véase, por ejemplo, Perez y Brady, 1992, Principles and Practice of Radiation Oncology, 2ª Ed. JB Lippincott Co; que usan adaptaciones y modificaciones apropiadas que serán rápidamente evidentes para los expertos en la técnica). En otra realización más, la administración de la composición inmunógena está asociada a quimioterapia con uno o más fármacos (p. ej., fármacos que se usan convencionalmente para tratar o prevenir infecciones virales, afecciones patológicas relacionadas con virus, cáncer y similares).

Por tanto, también se divulga un método para mejorar el tratamiento de un paciente con cáncer que está sometido a un tratamiento de quimioterapia con un agente quimioterápico, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

- administración al paciente con cáncer de una o más dosis de una composición inmunógena, como se describe anteriormente en el presente documento, y de una o más dosis de un agente quimioterápico.
- medición de un nivel de interferón γ en una muestra de sangre, plasma o suero de dicho paciente después de al menos una de dichas administraciones de dicha composición inmunógena como se describe anteriormente en el presente documento;
- donde los niveles de interferón γ anteriores de aproximadamente 4 pg/ml (p. ej., 4,6 pg/ml) indican que el sujeto es indicativo de un resultado clínico satisfactorio para el tratamiento, es decir, de un aumento del índice de supervivencia.

La administración de dicho agente quimioterápico puede hacerse antes de la administración de dicha composición inmunógena, después de la administración de dicha composición inmunógena, o simultáneamente con la administración de dicha composición inmunógena.

En otra realización, en el método de la invención, el tratamiento con la composición inmunógena que recibe el paciente con cáncer se lleva a cabo de acuerdo con una modalidad terapéutica de refuerzo de sensibilización que comprende la administración secuencial de una o más composiciones sensibilizadoras y de una o más composiciones de refuerzo. Típicamente, las composiciones sensibilizadoras y de refuerzo usan diferentes vehículos que comprenden o codifican al menos un dominio antigénico en común. La composición sensibilizadora se administra inicialmente al organismo huésped y la composición de refuerzo se administra posteriormente al mismo organismo huésped después de un periodo que varía desde un día a doce meses. Dicha modalidad de refuerzo de sensibilización puede comprender de una a diez administraciones secuenciales de la composición sensibilizadora

seguidas de una a diez administraciones secuenciales de la composición de refuerzo. A ser posible, los intervalos de inyección son cuestión de una semana a seis meses. Además, las composiciones sensibilizadoras y de refuerzo pueden administrarse en el mismo sitio o en sitios alternativos a través de la misma vía de administración o a través de vías diferentes.

De acuerdo con una realización especial, dicho cáncer es, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer rectal, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer renal, melanoma maligno, cáncer de laringe, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cánceres hematológicos, cánceres gástricos, mieloma.

De acuerdo con una realización preferida, dicho cáncer es cáncer de pulmón no microcítico (CPNM).

De acuerdo con una realización especial, en el paciente con cáncer tratado puede observarse una respuesta inmunitaria dirigida hacia al antígeno MUC1. De acuerdo con una realización, dicha "respuesta inmunitaria" en dicha población de pacientes está dirigida hacia distintos antígenos.

De acuerdo con otra realización especial, dicha "respuesta inmunitaria" en dicho paciente con cáncer es una respuesta inmunitaria de células T y, preferentemente, una respuesta inmunitaria de linfocitos CD8+ (linfocitos T citotóxicos). De acuerdo con otra realización especial, dicha "respuesta inmunitaria" en dicho paciente es una respuesta inmunitaria inespecífica. De acuerdo con otra realización especial, dicha "respuesta inmunitaria" en dicho paciente es una estimulación de la respuesta inmunitaria innata.

La capacidad para inducir o estimular una respuesta inmunitaria tras la administración en un organismo animal o humano puede evaluarse bien *in vitro* o bien *in vivo* usando una diversidad de ensayos que son habituales en la técnica. Para una descripción general de técnicas disponibles para evaluar la aparición y la activación de una respuesta inmunitaria, véase, por ejemplo, Coligan y cols. (1992 y 1994, Current Protocols in Immunology; ed J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health). La medición de la inmunidad celular puede realizarse midiendo los perfiles de citocinas segregadas por células efectoras activadas, incluyendo las derivadas de células T CD4+ y CD8+ (p. ej., cuantificación de células productoras de IL-10 o IFN gamma mediante ELISpot), determinando el estado de activación de células inmunitarias efectoras (p. ej., ensayos de proliferación de células T mediante una captación clásica de timidina [³H]), sometiendo a ensayo linfocitos T específicos de antígeno en un sujeto sensibilizado (p. ej., lisis específica de péptido en un ensayo de citotoxicidad) o mediante detección de células T específicas de antígeno por MHC fluorescente y/o multímeros de péptido (p. ej., tetrámeros). La capacidad para estimular una respuesta humoral puede determinarse por unión a los anticuerpos y/o competición por la unión a los mismos (véase, por ejemplo, Harlow, 1989, Antibodies, Cold Spring Harbor Press). El método de la invención también puede validarse después en modelos animales expuestos a un agente inductor de tumores apropiado (p. ej., células RMA que expresan MUC1) para determinar la actividad antitumoral, que refleja una inducción o potenciación de una respuesta inmunitaria anti-antigénica.

Por tanto, también se describe un método para prolongar la supervivencia de un paciente con cáncer tratado mediante la administración de una composición inmunógena como se define anteriormente en el presente documento, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

- administración a un paciente de una o más dosis de una composición inmunógena, como se define anteriormente en el presente documento
- medición de un nivel de interferón γ de dicho paciente después de al menos una de dichas administraciones de dicha composición inmunógena, como se describe anteriormente en el presente documento

También se divulga el uso de interferón γ como biomarcador para predecir si un paciente con cáncer tratado mediante la administración de una composición inmunógena, como se describe anteriormente en el presente documento, es o no susceptible a desarrollar una respuesta terapéutica, preferentemente una respuesta terapéutica inmunitaria como una consecuencia de dicha administración de una composición inmunógena.

Se divulga, además, el uso de interferón γ como biomarcador para controlar, modificar o ajustar un tratamiento que implica la administración de una composición inmunógena, como se define anteriormente en el presente documento, a un paciente con cáncer.

También se divulga el uso del nivel de interferón γ como biomarcador para controlar, modificar o ajustar un tratamiento que implica la administración de una composición inmunógena como se define anteriormente en el presente documento, a un paciente con cáncer, donde los niveles de un interferón γ , medidos después de dicha administración como se define en el presente documento, por encima de 4 pg/ml (p. ej., 4,6 pg/ml), indican que el paciente es indicativo de un resultado clínico satisfactorio para el tratamiento, es decir, el aumento del índice de supervivencia.

La presente invención también se refiere al uso de un *kit* para analizar, en un método *ex-vivo* de acuerdo con la presente invención, si un paciente que padece un cáncer está respondiendo terapéuticamente a un método de tratamiento con una composición inmunógena, comprendiendo el *kit*:

- 5 (a) anticuerpos para determinar el nivel de interferón γ en dicha muestra de sangre, plasma o suero del paciente; y
(b) instrucciones para interpretar los datos obtenidos diciendo que los niveles de interferón γ por encima de 4 pg/ml indican que el sujeto es indicativo de un resultado clínico satisfactorio para el tratamiento de acuerdo con el método de la presente invención;
- 10 donde dicha composición inmunógena contiene al menos un vector viral recombinante que expresa *in vivo* todo o parte del antígeno MUC1 y donde dicho vector viral recombinante expresa, además, IL-2; y
donde el tiempo entre el inicio de dicho tratamiento que comprende la administración de dicha composición inmunógena y las mediciones de interferón γ es desde aproximadamente 4 a aproximadamente 8 semanas.
- 15 Por tanto, la invención también divulga *kits* que incluyen partes para llevar a la práctica los métodos descritos en el presente documento y que serán obvios a partir de los ejemplos proporcionados en el presente documento. El *kit* (o *kits*) de partes, puede incluir reactivos para recoger y o medir los niveles séricos de interferón gamma. Dichos reactivos son anticuerpos. Los *kits* también pueden incluir instrumental para recoger y/o procesar muestras biológicas. Los *kits* también contienen instrucciones de uso, valores umbrales y/o instrucciones para su determinación, e instrucciones para interpretar los datos obtenidos a partir del uso de los *kits*.
- 20

Ejemplos

Figuras:

- 25 Figura 1: Curvas de supervivencia que describen la inmunoterapia mediante vacuna en cáncer de pulmón: pacientes con o sin interferón γ detectable en el día 43

- 30 - Grupo 1: Vacuna terapéutica (es decir, composición inmunógena) + quimioterapia en pacientes con interferón γ detectable en el día 43. Detectable, definido como $\geq$ Límite de Detección, que es de 4,6 pg/ml. 22 pacientes. Mediana de supervivencia 25,4 meses.

- 35 - Grupo 2: Vacuna terapéutica (es decir, composición inmunógena) + quimioterapia en pacientes con interferón γ no detectable en el día 43. No detectable, definido como $< 4,6$ pg/ml sCD54 en sangre periférica. 29 pacientes. Mediana de supervivencia 10,14 meses.

Diferencia significativa, mediante rango logarítmico: $p = 0,019$

○ Completo + Censurado

- 40 Figura 2: Curvas de supervivencia que describen la quimioterapia en cáncer de pulmón: pacientes con o sin interferón γ detectable ($\geq 4,6$ pg/ml)

- 45 - Grupo 1: Quimioterapia sola (sin vacuna terapéutica) en pacientes con interferón γ detectable en el día 43. Detectable, definido como $> 4,6$ pg/ml en sangre periférica. 25 pacientes. Mediana de supervivencia 8,5 meses.

- Grupo 2: Quimioterapia sola (sin vacuna terapéutica) en pacientes con interferón γ no detectable en el día 43. No detectable, definido como $< 4,6$ pg/ml de IFN γ en sangre periférica. 34 pacientes. Mediana de supervivencia 12,8 meses

- 50 Diferencia significativa, mediante rango logarítmico: $p = 0,047$

○ Completo + Censurado

- 55 Figura 3: Curvas de supervivencia que describen la quimioterapia en cáncer de pulmón: pacientes con $\geq 4,6$ pg/ml de interferón γ

- Grupo 1: Vacuna terapéutica (es decir, composición inmunógena) + quimioterapia en pacientes con niveles detectables de interferón γ . Niveles detectables, definido como $\geq 4,6$ pg/ml en sangre periférica. 22 pacientes. Mediana de supervivencia 25,4 meses.

- 60 - Grupo 2: Quimioterapia sola (sin vacuna TG4010 terapéutica) en pacientes con niveles detectables de interferón γ . Niveles detectables, definido como $\geq 4,6$ pg/ml de interferón γ en sangre periférica. 25 pacientes. Mediana de supervivencia 8,5 meses.

Diferencia significativa, mediante rango logarítmico: $p = 0,002$

○ Completo + Censurado

65

Ejemplo 1

La composición inmunógena, denominada vacuna TG4010, se usó para tratar pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) en combinación con quimioterapia habitual.

5 La vacuna TG4010 es un virus Ankara modificado (MVA) recombinante que expresa tanto IL-2 como el antígeno MUC1 asociado a tumores

Ciento cuarenta y ocho pacientes se distribuyeron al azar para recibir:

10 - quimioterapia (75 mg/m² de cisplatino el d1 y 1250 mg/m² de gemcitabina el día1 y el día 8 cada 3 semanas durante hasta 6 ciclos), bien sola (Grupo 2 del estudio), o
- quimioterapia junto con TG4010 (Grupo 1 del estudio)

15 Los tumores se evaluaron (criterios de la OMS) cada 6 semanas. Los criterios de valoración fueron la supervivencia sin de progresión (SSP) a los 6 meses y la supervivencia global con análisis por intención de tratar.

20 Las muestras de sangre se extrajeron el día 43 (una semana después de la 6ª inyección semanal) y se enviaron inmediatamente a un laboratorio central de inmunología donde las muestras de plasma se dividieron en alícuotas y se congelaron. Las alícuotas de plasma congeladas se enviaron, por lotes, en hielo seco a un segundo laboratorio central donde se evaluaron los niveles de interferón gamma.

25 El contenido de interferón gamma (interferón γ) de las muestras de plasma se evaluó mediante perfilado multianálisis de proteínas plasmáticas utilizando el sistema Luminex®. El límite de detección se ha establecido como 4,6 pg/ml.

La figura 1 muestra que los pacientes [Grupo 1 (TG4010 + quimioterapia) con interferón γ detectable el día 43 sobreviven más tiempo (mediana de supervivencia = 25,4 meses) que los pacientes con interferón γ no detectable (mediana de supervivencia 10,14 meses) cuando se tratan tanto con la vacuna TG4010 como con quimioterapia.

30 Los datos de la figura 2 demuestran que la asociación positiva entre el interferón γ plasmático detectable y la supervivencia global se circunscribe a pacientes que reciben la vacuna terapéutica. Los pacientes del grupo 2, que solo reciben quimioterapia, que tenían interferón γ plasmático detectable el día 43, tuvieron peor supervivencia (8,5 meses) que los pacientes con interferón γ no detectable el día 43 (12,8 meses).

35 Los datos de la figura 3 demuestran que el efecto de seleccionar pacientes en función de la detección de interferón γ en su plasma el día 43 se circunscribe a pacientes que reciben la vacuna terapéutica. La figura 3 muestra que los pacientes con interferón γ detectable el día 43 tienen una expectativa de supervivencia superior sólo si reciben la vacuna terapéutica.

REIVINDICACIONES

1. Un método *ex-vivo* para evaluar la eficacia de un tratamiento en un paciente que padece cáncer con una composición inmunógena, donde el método de ensayo comprende la etapa de:
 - medir los niveles de interferón γ en una muestra de sangre, plasma o suero obtenida de dicho paciente después de la administración de dicha composición inmunógena a dicho paciente, donde el tiempo entre el inicio de dicho tratamiento que comprende la administración de dicha composición inmunógena y las mediciones de interferón γ es de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 semanas; y
 - donde los niveles de interferón γ por encima de aproximadamente 4 pg/ml indican que el paciente es indicativo de un resultado clínico satisfactorio para el tratamiento, y donde dicha composición inmunógena contiene al menos un vector viral recombinante que expresa *in vivo* todo o parte del antígeno MUC1 y donde dicho vector viral recombinante expresa, además, IL-2.
2. El método de la reivindicación 1, donde el nivel de interferón γ está por encima de aproximadamente 4,6 pg/ml.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, donde el tiempo entre el inicio de dicho tratamiento que comprende la administración de dicha composición inmunógena y las mediciones de interferón γ es de aproximadamente 5 semanas.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho cáncer es cáncer de pulmón no microcítico (CPNM).
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dichos niveles de interferón γ se miden mediante perfilado multianálisis de proteínas plasmáticas utilizando el sistema Luminex®.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho vector viral es competente para replicación.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho vector viral tiene replicación defectuosa.
8. El método de la reivindicación 6 o 7, donde dicho vector recombinante es un vector de virus vacuna recombinante.
9. el método de la reivindicación 8, donde dicho vector de virus vacuna recombinante es un vector MVA recombinante.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho paciente es un paciente tratado con un agente quimioterápico.
11. El método de la reivindicación 10, donde la administración de dicho agente quimioterápico se hace simultáneamente con la administración de dicha composición inmunógena.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde dicho método comprende, además, una etapa inicial que consiste en la medición de los niveles de interferón γ en una muestra de sangre, plasma o suero, obtenida de dicho paciente antes de dicha administración de dicha composición inmunógena.
13. El uso de un *kit* para analizar, en un método *ex-vivo* de acuerdo con la reivindicación 1, si un paciente que padece cáncer está respondiendo terapéuticamente a un método de tratamiento con una composición inmunógena, donde el *kit* comprende:
 - (a) anticuerpos para determinar el nivel de interferón γ en dicha muestra de sangre, plasma o suero del paciente; y
 - (b) instrucciones para interpretar los datos obtenidos diciendo que los niveles de interferón γ por encima de 4 pg/ml indican que el sujeto es indicativo de un resultado clínico satisfactorio para el tratamiento de acuerdo con el método de la reivindicación 1;
 donde dicha composición inmunógena contiene al menos un vector viral recombinante que expresa *in vivo* todo o parte del antígeno MUC1, y donde dicho vector viral recombinante expresa, además, IL-2; y donde el tiempo entre el inicio de dicho tratamiento, que comprende la administración de dicha composición inmunógena, y las mediciones de interferón γ , es desde aproximadamente 4 a aproximadamente 8 semanas.
14. El uso de la reivindicación 13, donde el nivel de interferón γ está por encima de aproximadamente 4,6 pg/ml.

Figura 1

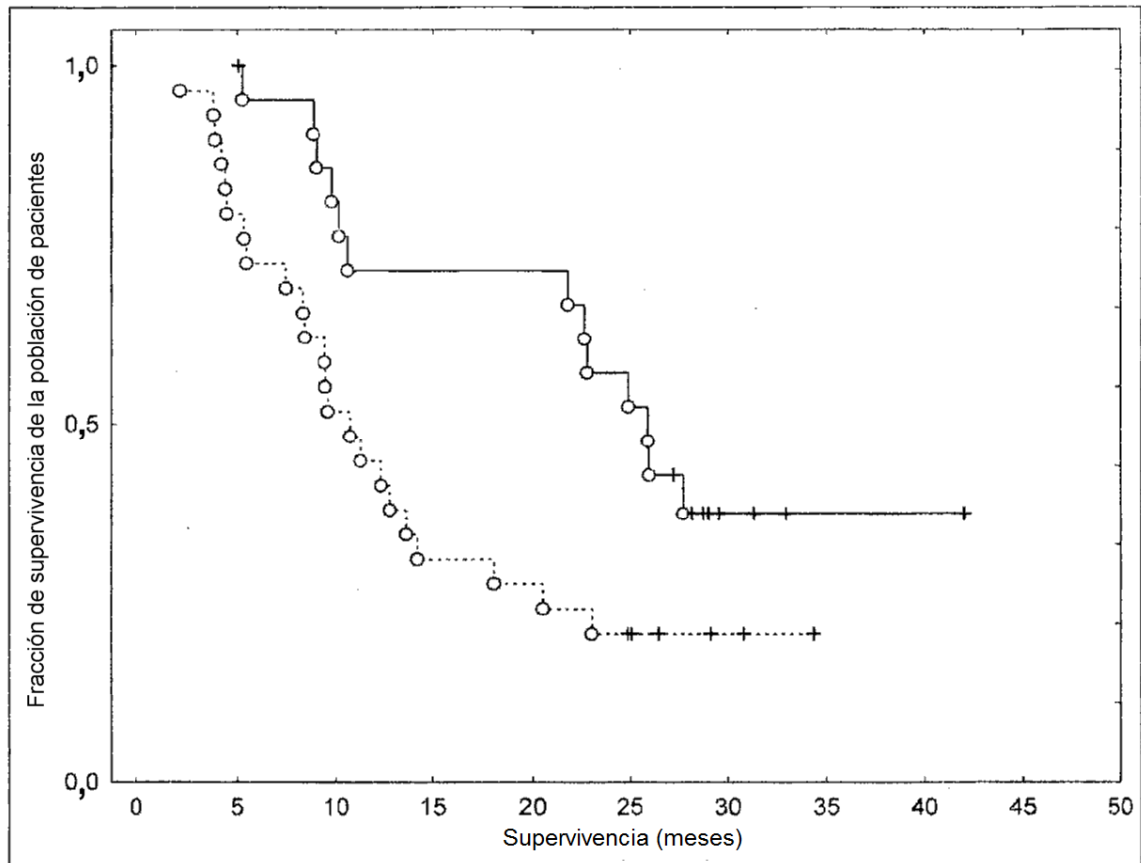


Figura 2

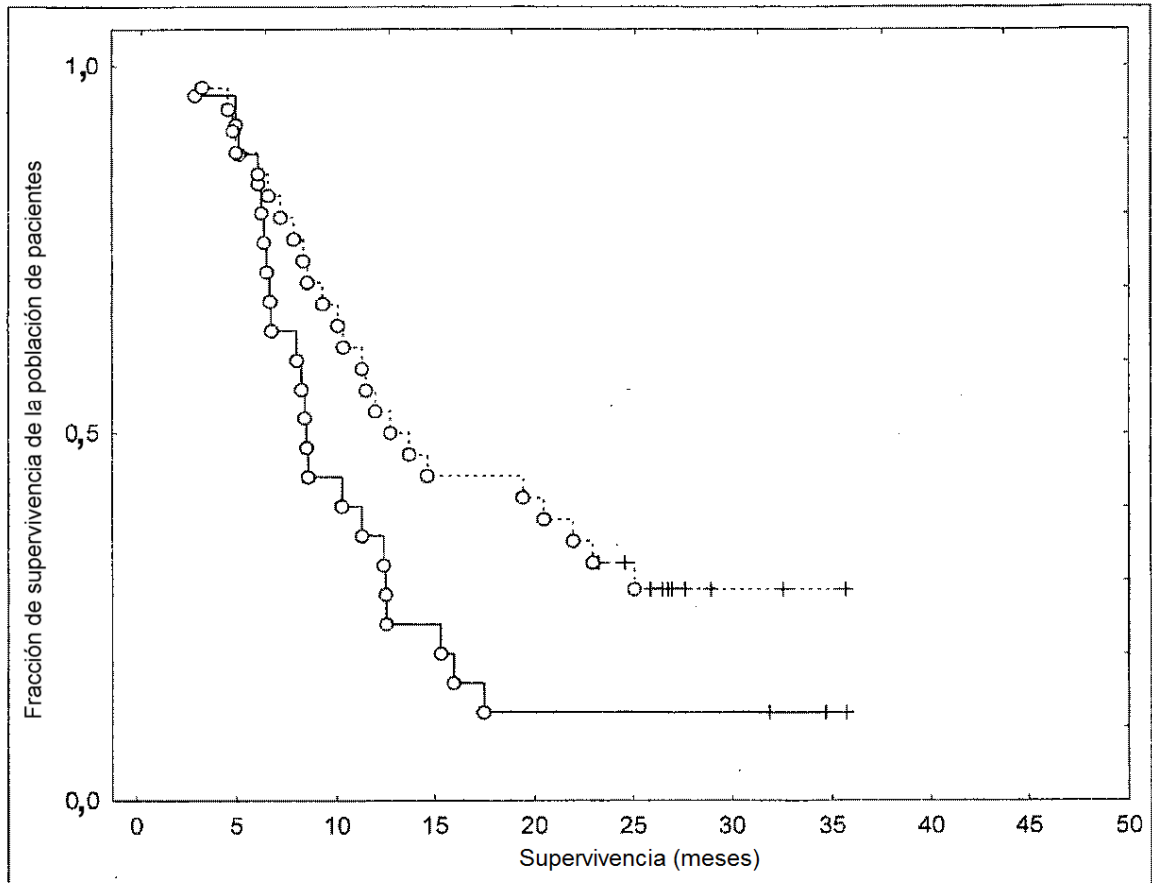


Figura 3

