

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 604**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2008 PCT/US2008/080229**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2009 WO09052328**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2008 E 08839145 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2207564**

54 Título: **Uso de MVA para tratar el cáncer de próstata**

30 Prioridad:

18.10.2007 US 960893 P

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

12.04.2017

73 Titular/es:

**BAVARIAN NORDIC A/S (100.0%)
Hejreskovvej 10A
3490 Kvistgaard, DK**

72 Inventor/es:

**DELCAYRE, ALAIN;
LAUS, REINER;
MANDL, STEFANIE;
ROUNTREE, RYAN, BLAIR y
LEGRAND, FATEMA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 608 604 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

Uso de MVA para tratar el cáncer de próstata

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a la profilaxis y el tratamiento de cánceres, particularmente cáncer de próstata, al uso de virus MVA que codifican antígenos asociados a tumores, en particular antígeno prostático específico (PSA) y fosfatasa ácida prostática (PAP).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El virus vaccinia Ankara modificado (MVA) se relaciona con virus vaccinia, un miembro de los géneros Orthopoxvirus, en la familia de Poxviridae. MVA se generó mediante 516 pasajes seriados en 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 eliminadas y, por lo tanto, fue descrito como altamente restringido célula huésped para la replicación en 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)). Además, esta cepa de MVA ha sido testada 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 incluyeron a más de 120.000 seres humanos, incluyendo pacientes de alto riesgo, y demostraron que, en comparación con las vacunas basadas en vaccinia, MVA tenía la virulencia o capacidad de infección disminuida, mientras que inducía una buena respuesta inmune específica. En las décadas siguientes, MVA se ha modificado para su uso como un vector viral para la expresión génica recombinante o como una vacuna recombinante (Sutter, G. et al., Vaccine 12: 1032-1040 (1994)).

25 A pesar de que Mayr et al. demostraron durante la década de 1970 que MVA es altamente atenuado y avirulento en los seres humanos y mamíferos, determinados investigadores han informado que MVA no se atenúa por completo en líneas celulares de mamíferos y seres humanos, dado que la replicación residual podría producirse en estas células. (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 presentados en estas publicaciones se han obtenido con diversas cepas conocidas de MVA, ya que los virus utilizados esencialmente difieren 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 su uso en seres humanos.

35 Se han descrito cepas de MVA que tienen 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), pero no son capaces de replicación reproductiva en determinadas líneas celulares humanas conocidas para permitir la replicación con cepas de vaccinia conocidas. Esas 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 No. 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 virales tampoco son capaces de replicación reproductiva *in vivo*, por ejemplo, en determinadas cepas de ratón tales como el modelo de ratón transgénico AGR 129, que está gravemente inmune-comprometido y es altamente susceptible a un virus replicante. Véase la Patente de EE.UU. N° 6.761.893. Se ha descrito una de estas cepas de MVA y sus derivados y recombinantes, a la que se alude como "MVA-BN®", Véanse las Patente de EE.UU. N°s 6.761.893 y 6.193.752.

45 MVA y MVA-BN® han sido cada uno modificados 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.

Enfermedades relacionadas con el cáncer son una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. Por ejemplo, sólo en los EE.UU., se estima que uno de cada seis hombres padecerá cáncer de próstata.

Además de ello, los estudios de autopsias demuestran que una proporción significativa de la población masculina es conocida por portar la enfermedad, aunque en sus primeras etapas no malignas, tan pronto como a la edad de 30. Véase, *p. ej.*, Taichman et al., JCI 117(9): 2351-2361 (2007); Webster et al., J. Clin. Oncol. 23:8262-8269 (2005). Enfoques recientes a la inmunoterapia del cáncer han incluido la vacunación con antígenos asociados a tumores. En determinados casos, tales enfoques han incluido el uso de un sistema de suministro para fomentar respuestas inmunes del huésped a antígenos asociados a tumores. Tales sistemas de suministro han incluido vectores virales recombinantes, así como terapias basadas en células. 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 MVA ha sido utilizado como un vehículo de vacuna para el antígeno oncofetal 5T4 en ensayos clínicos en pacientes con cáncer colorrectal metastásico, renal metastásico y de próstata hormono-refractario. Amato, RJ., Expert Opin. Biol. Ther. 7(9):1463-1469 (2007).

Entre los antígenos asociados a tumores conocidos se encuentran el antígeno prostático específico (PSA) y la fosfatasa ácida prostática (PAP). Véase, *p. ej.*, Taichman et al., JCI 117(9): 2351-2361 (2007); Webster et al., J. Clin. Oncol. 23:8262-8269 (2005). PSA es producido por la próstata y se encuentra en cantidad incrementada en la sangre de los hombres que tienen cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna o una infección o inflamación de la próstata. PSA ha sido identificado como una diana para enfoques de inmunoterapia mediada por células al tratamiento de cáncer. Véase, *p. ej.*, McNeel, D.G., Curr. Opin. Urol. 17:175-181 (2007); Nelson W.G., Curr. Opin. Urol. 17:157-167 (2007). PAP es una enzima medida en la sangre, cuyos niveles pueden estar elevados en pacientes con cáncer de próstata que ha invadido o se ha metastatizado en otros lugares. La PAP no está elevada, a menos que el tumor se haya diseminado fuera de la cápsula prostática anatómica, ya sea a través de invasión localizada o metástasis distante. Por lo tanto, este antígeno del tumor de próstata está siendo investigado como un antígeno diana en varios ensayos de vacunas humanas, algunas de ellas con evidencia de beneficio clínico. Véase, *p. ej.*, McNeel, D.G., Curr. Opin. Urol. 17:175-181 (2007); Waeckerle-Men et al., Cancer Immunol. Immunother. 66:811-821 (2006); Machlenkin et al. Cancer Immunol Immunother. 56(2):217-226 (2007).

Vacunas que contiene PAP se han generado utilizando virus vaccinia recombinantes, PAP purificada, vacunas de ADN y células dendríticas cargadas con antígeno. Valone et al., The Cancer Journal 7: Supl 2:S53-61 (2001); Fong et al., J Immunol. 15 dic. 2001; 167(12):7150-6; Fong et al., J. Immunol. 159(7):3113-7 (1997); Johnson et al., Vaccine 24(3):293-303 (2006); Johnson et al., Cancer Immunol Immunother. 56(6):885-95 (2007). En un estudio, no se detectaron anticuerpos contra la PAP cuando se inyectaron células dendríticas pulsadas con PAP-GM-CSF en ratas. (Valone et al. en S55.). En otro estudio, la administración de virus vaccinia recombinante que contiene genes que codifican PAP de rata o PAP humana no generó una respuesta de anticuerpos medible a PAP de rata o humana. (Fong et al. (1997) en 3116-7.) En otro estudio, IgG específica para PAP puede ser detectada en los sueros de animales inmunizados con la proteína hPAP, así como en los animales que recibieron el virus vaccinia que codifica la vacunación con PAP humana, seguido de proteína hPAP como una inmunización de refuerzo, pero no en animales inmunizados dos veces con virus vaccinia que codifica PAP humana. (Johnson et al. (2007) en 890.)

La inmunoterapia del cáncer activa se basa en la inducción de una respuesta inmune contra células tumorales en pacientes con cáncer. La inducción de ambos componentes, tanto humorales como celulares, de la inmunidad adaptativa contra una amplia gama de antígenos asociados a tumores (TAA) y la activación concomitante de los componentes de la inmunidad innata son esenciales para la máxima eficacia de un producto de inmunoterapia activa. Específicamente, la inmunidad adaptativa de Tipo 1 o Th1, caracterizada por la inducción de células T citotóxicas productoras de IFN γ , específicas para antígenos (células T CD8) se cree que es importante para la inmunoterapia contra el cáncer.

A pesar de los recientes avances en el tratamiento del cáncer, el cáncer de próstata sigue siendo la segunda causa principal de muerte entre los pacientes con cáncer de América. Por lo tanto, se necesitan enfoques terapéuticos que podrían aliviar mejor la enfermedad fijando como objetivo múltiples aspectos del crecimiento tumoral y la metástasis.

Taxanos tales como paclitaxel y docetaxel se han utilizado como quimioterapias para pacientes con cáncer. Véase, *p. ej.*, Tannock et al., N. Engl. J. Med. 351:1502-1512 (2004). La quimioterapia con taxanos se ha combinado con diferentes tratamientos con vacunas contra tumores, 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 por Chong et al., Expert Opin. Pharmacother. 6:1-8 (2005); Emens et al, Endocrine-Related Cancer 12:1-17 (2005); y McNeel, D.G., Curr. Opin. Urol. 17:175-181 (2007).

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 métodos, reactivos y kits para la profilaxis del cáncer y el tratamiento de pacientes con cáncer, tanto de tumores primarios como de metástasis del cáncer.

5 La invención es la siguiente:

1. Un virus MVA recombinante que codifica un polipéptido que comprende un antígeno prostático específico (PSA) humano y un polipéptido que comprende un antígeno de la fosfatasa ácida prostática (PAP) humana.

2. El virus MVA recombinante del punto 1, en donde el virus MVA comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 y/o de SEQ ID NO: 2.

10 3. El virus MVA recombinante del punto 1 o 2, en donde el MVA es MVA-BN depositado en la ECACC bajo el número V00083008.

4. El MVA recombinante de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3 para uso en la profilaxis y/o el tratamiento de un cáncer mediado por células que sobre-expresan PSA y/o PAP.

15 5. El MVA recombinante para su uso de acuerdo con el punto 4, en donde el cáncer es cáncer de próstata y/o metástasis del cáncer de próstata.

6. El MVA recombinante para su uso de acuerdo con el punto 4 o 5, en donde el MVA recombinante se administra antes de, al mismo tiempo que o después de una dosis tumoricida de un taxano.

7. El MVA recombinante para uso de acuerdo con el punto 6, en donde el taxano es docetaxel o paclitaxel.

20 8. El MVA recombinante de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1-3 para uso de acuerdo con los puntos 4-7 en un método para inducir respuestas inmunes de células B y de células T contra PSA y/o PAP, que comprende administrar a un paciente una dosis de cebado de dicho MVA recombinante y una o más dosis de refuerzo de dicho MVA recombinante.

25 9. El MVA recombinante para uso de acuerdo con el punto 8, en donde una dosis de cebado de 1×10^8 TCID₅₀ y dos dosis de refuerzo de 2×10^8 y 4×10^8 TCID₅₀ se administran al paciente, dándolas preferentemente a las cuatro y ocho semanas después de la dosis de cebado.

10. Una composición inmunogénica que comprende un virus MVA recombinante de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1-3.

11. Un kit que comprende el MVA recombinante de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1-3.

12. El kit de acuerdo con el punto 11, que comprende, además:

30 (i) instrucciones para administrar el MVA recombinante antes de la detección del cáncer de próstata;

(ii) instrucciones para administrar el MVA recombinante a un paciente de cáncer de próstata;

(iii) instrucciones para administrar el MVA recombinante a un paciente de cáncer de próstata antes

35 de, al mismo tiempo que o después del tratamiento con una dosis tumoricida de un taxano, o

(iv) instrucciones para administrar el MVA recombinante para la profilaxis de la metástasis del cáncer de próstata después de detectar un aumento de un marcador asociado a células de tumor de próstata.

13. El virus MVA recombinante de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3 para uso como un medicamento contra el cáncer.

40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 AB. Mapas esquemáticos del genoma de MVA-BN®. Se muestran en **1A** las ubicaciones de los seis sitios de delección en el genoma de MVA-BN®: secciones sombreadas y las letras (A a O) identifican fragmentos *Hind*III de digestión de restricción de enzimas, y en las flechas se muestran las posiciones y los tamaños de las secuencias de CVA que faltan en el MVA-BN®. Se muestran en **1B** los fragmentos de restricción *Hind*III (letras A a O) y el sitio IGR 014L/015L utilizado para la generación de MVA-BN-PRO.

45 **Figura 2. Visión de conjunto esquemática del virus MVA-BN-PRO.** Mapa del genoma MVA-BN® (mapa de restricción *Hind*III, indicado por las letras A a O) que delinea el inserto recombinante clonado en la región intergénica 014L/015L: genes PSA y PAP, cada uno bajo el control del promotor ATI del virus de la viruela (ATI).

50 **Figura 3 A-B. Detección de PAP (A) y PSA (B) en el sobrenadante de cultivos de células CT26 incubadas con MVA-BN-PRO.** Células CT26 a una densidad de 6×10^5 células por pocillo (cuadrados oscuros y triángulos) o 6×10^4 células por pocillo (cuadrados grises) se infectaron con MVA-BN-PRO (cuadrados) o MVA-BN® (triángulos) a la multiplicidad de infección (MOI) indicada. 24 horas más tarde, los sobrenadantes de células se recogieron y los niveles de proteína PAP y PSA se midieron mediante el ensayo enzimático de PAP y ELISA de PSA, respectivamente.

Figura 4 A-B. Respuestas de anticuerpos Anti-PSA (A) y anti-PAP (B) en ratones tratados con MVA-BN-PRO.

Los animales se inmunizaron tres veces (días 1, 15 y 29), ya sea con MVA-BN-PRO (cuadrados blancos) o MVA-BN® (cuadrados negros). Las muestras de sangre se recogieron antes del tratamiento, los días 14, 28 y 42. Los títulos son el valor recíproco de la última dilución con una densidad óptica al menos 2 veces mayor que el fondo (suero a misma dilución de animales tratados con TBS). Los títulos que se indican como cero fueron negativos a la dilución de suero más baja ensayada (1:50).

Figura 5 AB. Respuestas Anti-PSA y Anti-PAP de células T en ratones tratados con MVA-BN-PRO. Los esplenocitos de animales inmunizados con MVA-BN-PRO (A) y animales control TBS (B) se incubaron con OPL de secuencias de PAP (cuadrados grises), PSA (cuadrados blancos) o HER2 (cuadrados negros) a las concentraciones indicadas. Las manchas indicativas de células T productoras de IFN- γ fueron numeradas utilizando un analizador ImmunoSpot. Medios de pocillos por triplicado y desviación estándar se representan para cada una de las concentraciones de OPL probadas.

Figura 6 A-B. Contribuciones de células T CD4 y CD8 a Respuestas de células T mediadas por MVA-BN-PRO.

Los animales fueron inmunizados con MVA-BN-PRO cuatro veces (d 1, 15, 29 y 49) y los esplenocitos se recogieron seis días después del último tratamiento, los esplenocitos agotados en CD8 (A) y los esplenocitos agotados en CD4 (B) se incubaron con OPL de secuencias de PAP (cuadrados grises), PSA (cuadrados blancos) o HER2 (cuadrados negros) a las concentraciones indicadas. El análisis se llevó a cabo tal como se describe para la Figura 5.

Figura 7 A-F. Prevención profiláctica del crecimiento del tumor en ratones tratados con MVA-BN-PRO. Los animales fueron tratados 3 veces a intervalos de 3 semanas a la TCID₅₀ indicada de virus diluido en TBS. Seis semanas después del tercer tratamiento los animales fueron enfrentados por vía intradérmica a 1×10^5 células tumorales E5 que expresan PSA. El crecimiento del tumor se midió dos veces por semana usando calibradores. El volumen del tumor se calculó como: $(L \times W^2)/2$. **7A a 7E:** se reseña el crecimiento del tumor en ratones individuales para cada uno de los grupos de tratamiento. **7F:** los tamaños medios de tumores y la desviación estándar se reseñan para todos los grupos de tratamiento.

Figura 8. Prevención del crecimiento del tumor en Ratones Tratados con MVA-BN-PRO. Comparación de las Mediciones del Día 29 en dos Experimentos Separados.

Los animales fueron tratados tres veces a intervalos de 2 semanas (símbolos grises) con 2×10^6 TCID₅₀ de virus indicado diluido en TBS. Dos semanas después del último tratamiento, los animales fueron enfrentados por vía intradérmica a 1×10^5 células tumorales E5 que expresan PSA. El crecimiento del tumor se midió dos veces por semana usando calibradores. El volumen del tumor se calculó como: $(L \times W^2)/2$. Los puntos muestran los volúmenes de los tumores para cada uno de los animales el Día 29 post-implantación del tumor. Los datos de los grupos coincidentes de un experimento separado que se describen en la Figura 7 están representados en símbolos negros para la comparación. Ambos experimentos aquí reseñados se llevaron a cabo bajo condiciones similares, excepto por la longitud de los intervalos de tratamiento (intervalos de 3 semanas frente a 2 semanas) y el momento de la implantación de células tumorales (seis frente a dos semanas después del tercer tratamiento).

Figura 9 A-F. Supresión Terapéutica del Crecimiento del Tumor en Ratones Tratados con MVA-BN-PRO.

Ratones BALB/c (10 animales en cada uno de los grupos) fueron enfrentados a células E6 (1×10^5 células inyectadas id) el día 1 y fueron tratados por vía subcutánea los días 1, 8 y 15, ya sea con TBS (E), MVA-BN® (5×10^6 ó 5×10^7 TCID₅₀; A y B), o MVA-BN-PRO (5×10^6 o 5×10^7 TCID₅₀; C y D). Los ratones fueron sacrificados el día 22. Los paneles A-E muestran los tamaños de los tumores de ratones individuales. Los promedios de los tamaños de los tumores y las desviaciones estándar para cada uno de los grupos se representan en el panel F. El crecimiento del tumor se midió dos veces por semana usando calibradores. El volumen del tumor se calculó como: $(L \times W^2)/2$. Las barras de error representan desviaciones estándar (SD).

Figura 10. Supresión del Crecimiento del Tumor PAP-positivo en Ratones Tratados con MVA-BN-PRO.

Ratones BALB/c (10 animales en cada uno de los grupos) fueron enfrentados a CT26-PAP (5×10^5 células inyectadas por vía intravenosa) el Día 1 y fueron tratados por vía intraperitoneal el Día 4, ya sea con TBS, MVA-BN (5×10^7 TCID₅₀) o MVA-BN-PRO (2×10^6 y 5×10^7 TCID₅₀). Los ratones fueron sacrificados el Día 14 y sus pulmones se pesaron. Los puntos de datos representan el peso de los pulmones de ratones individuales. Las barras horizontales indican la media de peso del pulmón para cada uno de los grupos.

Figura 11. Respuestas de anticuerpos anti-PSA y anti-PAP inducidos en ratones BALB/c o C57BL/6.

Ratones BALB/c y C57BL/6 machos (5 animales en cada uno de los grupos) fueron inmunizados los días 1, 15 y 29 con 5×10^7 TCID₅₀ de MVA-BN-PRO. Muestras de sangre se recogieron el día 42, y diluciones en serie de mezclas de sueros se analizaron en cuanto a la presencia de IgG anti-PSA o anti-PAP por ELISA. Los títulos se calcularon como el valor recíproco de la última dilución con una D.O. al menos 2 veces mayor que el fondo (que se define como suero en la misma dilución de animales tratados con TBS). Los puntos de datos para los sueros con títulos por debajo de la dilución más baja ensayada (<125) se colocaron de forma arbitraria en el eje x situado una dilución por debajo de la primera dilución del ensayo (62.5) para los fines de gráficos.

Figura 12. Respuestas de células T en Pacientes tratados con MVA-BN-PRO.

PBMC de sangre del Paciente J-D-1001 se recogieron antes del tratamiento (Base) o post-tratamiento n MVA-BN-PRO (TC3). Las células se incubaron durante 40 horas con proteína PSA, banco de péptidos solapantes (OPL) de PSA, proteína PAP, OPL de PAP, mezclas de péptidos MHC de Clase I y de Clase II derivados de antígenos asociados a tumores (TAA) o MVA-

BN a la concentración indicada en el gráfico. La activación de células T se determinó mediante ELISpot midiendo la IFN- γ secretada. Para cada una de las condiciones estimulantes, los resultados se expresan como la media de células formadoras de puntos IFN- γ (SFC) por cada 2×10^5 PBMC. Los valores de SFC se derivaron de la media de los pocillos por cuadruplicado con el fondo sustraído.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN Y DIVULGACIÓN HECHA

Un MVA recombinante que expresa antígenos de PSA y PAP humanos (MVA-BN-PRO) se testó en un panel de ensayos *in vitro* e *in vivo*. La expresión de ambos antígenos prostáticos específicos codificadas por MVA-BN-PRO (PSA y PAP) en células eucariotas incubadas con MVA-BN-PRO se evaluó utilizando un kit de detección de PSA y un ensayo funcional para la actividad de la fosfatasa, respectivamente. Se utilizaron ensayos ELISA y ELISpot para controlar la inducción de anti-PSA y de anticuerpos anti-PAP y respuestas inmunes de células T en ratones tratados con MVA-BN-PRO. La actividad anti-tumor de MVA-BN-PRO se evaluó en modelos de tumores PSA, tanto en un entorno profiláctico como en un entorno terapéutico.

Estos estudios demostraron que (i) la captación de MVA-BN-PRO por las células *in vitro* da como resultado la expresión tanto de PAP como de PSA en cantidades similares; (ii) el tratamiento de ratones con MVA-BN-PRO da como resultado respuestas inmunes anti-PSA y anti-PAP humorales y Th1 celulares, (iii) el tratamiento de ratones con MVA-BN-PRO inhibe el crecimiento de tumores PSA (+) en entornos tanto profilácticos como terapéuticos, (iv) el tratamiento de ratones con MVA-BN-PRO inhibe el crecimiento de tumores PAP (+) en un entorno terapéutico, (v) en un ser humano, el tratamiento con MVA-BN-PRO aumentó los niveles tanto de células T anti-PSA como de células T anti-PAP, y (vi) el tratamiento con MVA-BN-PRO en un ser humano dio como resultado la propagación de las respuestas de células T a otros antígenos tumorales. Por lo tanto, MVA-BN-PRO activa el sistema inmune humoral mediante la activación de respuestas humorales específicas de antígenos y de tipo Th1 celulares, lo que resulta en una actividad terapéutica significativa contra los tumores que expresan PSA y PAP *in vivo*. Por consiguiente, MVA-BN-PRO es una vacuna candidata atractiva para la inmunoterapia del cáncer de próstata en los seres humanos.

MVA-BN-PRO es un potente inmunógeno capaz de inducir inmunidad antitumoral protectora que evita el crecimiento del tumor en un entorno profiláctico y que también suprime el crecimiento de tumores establecidos. Las actividades antitumorales profilácticas y terapéuticas de MVA-BN-PRO fueron mediadas por respuestas inmunes adaptativa anti-PSA-específica. Sin embargo, las respuestas inmunitarias adaptativas se indujeron contra los dos antígenos prostáticos específicos, PSA y PAP, codificados por MVA-BN-PRO. La activación concomitante de respuestas adaptativas contra antígenos tumorales múltiples permite que MVA-BN-PRO combata los tumores de manera más eficiente y aumente el potencial de tratar con éxito pacientes con cáncer.

La divulgación abarca el uso de virus MVA recombinantes para la terapia del cáncer de próstata. Los MVAs recombinantes se generan mediante la inserción de secuencias heterólogas en un virus MVA. Ejemplos de cepas del virus de 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 27 de enero de 1994, y MVA 575, depositada bajo ECACC 00120707 el 7 de diciembre de 2000. MVA-BN®, depositado el 30 de agosto de 2000 en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) bajo el número V00083008, y sus derivados, son cepas a modo de ejemplo adicionales.

Aunque MVA-BN® se prefiere 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. Véase el documento PCT/EP01/13628.

El MVA expresa dos antígenos asociados a tumores, un antígeno PSA y un antígeno PAP. Los dos antígenos asociados a tumores pueden comprender las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Los dos antígenos asociados a tumores pueden ser expresados a partir de una casete que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3.

El antígeno asociado a tumores se puede modificar para incluir uno o más epítomos T_H extraños. Tal como se describe en esta memoria, tales agentes inmunoterapéuticos contra el cáncer son útiles para la profilaxis y/o el tratamiento del cáncer, incluyendo la metástasis del cáncer. La divulgación permite el uso de tales agentes en regímenes de vacunación de de sensibilización/refuerzo de seres humanos y otros mamíferos, incluyendo 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.

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. La expresión también se refiere a proteínas, es decir biomoléculas funcionales que comprenden al menos un polipéptido; cuando comprenden al menos dos polipéptidos, éstos pueden formar complejos, pueden estar ligados covalentemente o pueden estar ligados de forma no covalente. El o los polipéptidos en una proteína puede estar glicosilados y/o lipidados y/o pueden comprender grupos prostéticos.

La expresión "no capaz de replicación reproductora" en líneas celulares humanas tales como las líneas celulares HaCAT (Boukamp et al. 1988, J Cell Biol 106(3):761-71) o HeLa se utiliza en la presente solicitud como se define en el documento WO 02/42480. Por lo tanto, un virus que "no es capaz de replicación reproductora" en una línea celular es un virus que muestra una relación de amplificación de menos de 1 en la línea celular. La "relación de amplificación" de un virus es la relación de virus producido a partir de una célula infectada (de salida) a la cantidad utilizada originalmente para infectar las células en primer lugar (de entrada). Una relación de "1" entre la Salida y la Entrada define un estado de amplificación en el que la cantidad de virus producida a partir de las células infectadas es la misma que la cantidad utilizada inicialmente para infectar las células. De acuerdo con la divulgación, los virus que "no son capaces de replicación reproductora" en líneas celulares humanas pueden tener una relación de amplificación de 1,0 (valor medio) o menos, o incluso 0,8 (valor medio) o menos, en cualquiera de las líneas celulares HeLa, HaCat y 143B humanas.

El MVA puede ser MVA-BN®, depositada el 30 de agosto de 2000 en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) con el número V00083008 y descrito en las Patentes de EE.UU. N°s 6.761.893 y 6.193.752. Tal como se describe en esas publicaciones de patente, MVA-BN® no se replica reproductivamente en líneas celulares 293, 143B, HeLa y HaCat. En particular, MVA-BN® exhibe una relación de amplificación de 0,05 a 0,2 en la línea celular de riñón de embrión humano 293. En la línea celular de osteosarcoma de hueso humano 143B, MVA-BN® exhibe una relación de amplificación de 0,0 a 0,6. MVA-BN® exhibe una relación de amplificación de 0,04 y 0,8 en la línea celular de adenocarcinoma de cuello uterino humano HeLa y de 0,02 a 0,8 en la línea celular de queratinocitos humanos HaCat. 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).

La relación de amplificación de MVA-BN® está por encima de 1 en fibroblastos de embrión de pollo (CEF: cultivos primarios) tal como se describe en las Patentes de EE.UU. N°s 6.761.893 y 6.193.752. El virus se puede propagar fácilmente y amplificar en cultivos primarios de CEF con una relación superior a 500.

A MVA recombinante puede ser un derivado de MVA-BN®. Tales "derivados" incluyen virus que exhiben esencialmente las mismas características de replicación que la cepa depositada (ECACC No. V00083008), pero que exhiben diferencias en una o más partes de su genoma. Los "derivados" no tienen por qué ser derivados de MVA-BN®. Los virus que tienen las mismas "características de replicación" que el virus depositado son virus que se replican con relaciones de amplificación similares a los de la cepa depositada en células CEF y las líneas celulares, HeLa, HaCat y 143B; y que muestran características de replicación similares *in vivo*, tal como se determina, por ejemplo, en el modelo de ratón transgénico AGR129.

La divulgación abarca virus MVA que tienen una o ambas de las siguientes propiedades de MVA-BN:

- capacidad de replicación reproductora en fibroblastos de embrión de pollo (CEF), pero sin capacidad de replicación reproductora en la línea celular de queratinocitos humanos (HaCaT), la línea celular de riñón de embrión humano (293), la línea celular de osteosarcoma de hueso humano (143B) y la línea celular de adenocarcinoma de cuello uterino (HeLa) humana; y

- si no se replica en un modelo de ratón que es capaz de producir células B y T maduras y como tal están seriamente inmuno-comprometidos y son altamente susceptibles a un virus replicante.

El MVA puede ser un virus vaccinia recombinante que contiene secuencias de nucleótidos adicionales que son heterólogas al virus vaccinia. Las secuencias heterólogas pueden codificar epítopos que inducen una respuesta por el sistema inmune. Por lo tanto, el MVA recombinante se puede utilizar para vacunar contra las proteínas o agentes que comprenden el epítipo. El epítipo puede ser un antígeno asociado a un tumor, preferiblemente PSA o PAP. El antígeno PSA puede comprender la secuencia de SEQ ID NO: 1. El antígeno PAP puede comprender la secuencia de SEQ ID NO: 2.

Una secuencia de ácido nucleico heteróloga se inserta en una región no esencial del genoma del virus. La secuencia de ácido nucleico heteróloga se puede insertar en un sitio de delección que se produce de forma natural del genoma de MVA tal como se describe en el documento PCT/EP96/02926. Métodos para la inserción de secuencias heterólogas en el genoma poxviral son conocidos por un experto en la técnica. La secuencia de ácido nucleico heteróloga se puede insertar en una región intergénica del genoma de MVA tal como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. 20050244428 publicada. La región intergénica puede ser IGR 014L/015L.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender 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. Ejemplos de soportes son moléculas típicamente grandes, lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados lipídicos, o similares.

Para la preparación de las vacunas, el MVA se puede convertir en una forma fisiológicamente aceptable. Una preparación de este tipo puede basarse 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 a modo de ejemplo. Virus purificado se almacena a -80°C con un título de 5×10^8 TCID₅₀/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 2% de peptona y 1% de albúmina humana en una ampolla, preferiblemente una ampolla de vidrio. Alternativamente, las dosis de vacunas se pueden preparar escalonadamente, liofilizando el virus en una formulación. La formulación puede contener aditivos adicionales tales como manitol, dextrano, azúcar, glicina, lactosa, polivinilpirrolidona, u otros aditivos tales como que incluyen, pero no se limitan a antioxidantes o gas inerte, estabilizadores o proteínas recombinantes (p. ej., albúmina de suero humano) adecuados para la administración *in vivo*. La ampolla se sella entonces y se puede almacenar a una temperatura adecuada, por ejemplo, entre 4°C y la temperatura ambiente durante varios meses. Sin embargo, siempre que no exista necesidad alguna, la ampolla se almacena preferiblemente a temperaturas inferiores a -20°C .

El liofilizado puede disolverse en 0,1 a 0,5 ml de una disolución acuosa, preferiblemente solución salina fisiológica o tampón Tris, y administrarse ya sea sistémica o localmente, es decir, por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intranasal, intradérmica, o cualquier otra vía de administración conocida por un experto en la materia. La optimización del modo de administración, de la dosis y del número de administraciones está dentro de la experiencia y el conocimiento de un experto en la técnica.

Cepas de virus vaccinia atenuadas pueden ser útiles para inducir respuestas inmunes en animales inmunocomprometidos, p. ej., monos (CD4 <400/μl de sangre) infectados con el SIV, o los seres humanos inmunocomprometidos. El término "inmuno-comprometidos" describe el estado del sistema inmune de un individuo que exhibe solamente respuestas inmunes incompletas o que tiene una eficacia reducida en la defensa contra agentes infecciosos.

Determinados Antígenos Asociados a Tumores a modo de Ejemplo

Una respuesta inmune se puede producir en un sujeto contra un antígeno polipeptídico asociado a células. Un antígeno polipeptídico asociado a células puede ser un antígeno asociado a un tumor.

Un antígeno polipeptídico asociado a células puede ser 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.).

Numerosos antígenos asociados a tumores son conocidos en la técnica. Antígenos asociados a tumores a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, 5 alfa reductasa, alfa-fetoproteína, AM-1, APC, April, BAGE, beta-catenina, Bcl12, bcr-abl, CA-125, CASP-8/FLICE, catepsinas, CD19, CD20, CD21, CD23, CD22, CD33 CD35, CD44, CD45, CD46, CD5, CD52, CD55, CD59, CDC27, CDK4, CEA, c-myc, Cox-2, DCC, DcR3, E6/E7, CGFR, EMBP, Dna78, farnesil transferasa, FGF8b, FGF8a, FLK-1/KDR, receptor del ácido fólico, G250, familia GAGE, gastrina 17, hormona liberadora de gastrina, GD2/GD3/GM2, GnRH, GnTV, GP1, gp100/Pmel17, gp-100-in4, GP15, gp75/TRP-

1, hCG, heparansa, Her2/neu, HMTV, Hsp70, hTERT, IGFR1, IL-13R, iNOS, Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA, LKLR-FUT, familia MAGE, mammaglobina, MAP17, melan-A/MART-1, mesotelina, MIC A/B, MT-MMPs, mucina, NY-ESO-1, osteonectina, p15, P170/MDR1, p53, p97/melanotransferrina, PAI-1, PDGF, uPA, PRAME, probasina, progenipoyentina, PSA, PAP, PSM, RAGE-1, Rb, RCAS1, SART-1, familia SSX, STAT3, STn, TAG-72, TGF-alfa, TGF-beta, Timosina-beta-15, TNF-alfa, TP1, TRP-2, tirosinasa, VEGF, ZAG, p16INK4 y glutación-S-transferasa. Ejemplos particulares de antígenos asociados a tumores en el cáncer de próstata incluyen, pero no se limitan a PSA, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), PAP y el antígeno de células madre de próstata (PSCA).

Antígenos PSA y PAP

10 La divulgación abarca antígenos PSA y PAP que son de longitud completa o fragmentos de PSA y PAP. Preferiblemente, los antígenos PSA y PAP son humanos. El PSA y/o PAP puede ser rata o ratón. Los antígenos PSA y PAP pueden ser codificados por las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente.

15 El antígeno PAP puede ser un fragmento de PAP. Fragmentos comprenden los aminoácidos 181-95, 112-120, 133-152, 155-163, 173-192, 199-213, 228-242, 248-257, 299-307 ó 308-322, de PAP humana. Véase Waeckerle-Men et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 55:1524-1533 (2006); Klyushnenkova et al., *Prostate* 67(10):1019-28 (2007); Matsueda et al., *Clin Cancer Res.* 11(19 Pt 1):6933-43 (2005); Harada et al., *Oncol Rep.* 12(3):601-7 (2004); Machlenkin et al., *Field Cod Cancer Res.* 65(14):6435-6442 (2005); y McNeel et al., *Cancer Res.* 61(13):5161-7 (2001). El polipéptido puede comprender uno de estos epítomos. El polipéptido puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 20 9 ó 10 de estos epítomos. Cada una de las posibles combinaciones de estos epítomos se contempla específicamente.

El fragmento de PAP puede comprender 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325 ó 375 aminoácidos consecutivos de PAP humana. Fragmentos de PAP se pueden ensayar en cuanto a la retención de epítomos utilizando ensayos bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Klyushnenkova et al., *Prostate* 67(10):1019-28 (2007); Matsueda et al., *Clin Cancer Res.* 11(19 Pt 1):6933-43 (2005).

25 Los ADN que codifican estos fragmentos pueden ser generados por PCR u otras técnicas de biología molecular de rutina.

30 El antígeno PSA puede ser un fragmento de PSA. Fragmentos preferidos comprenden los aminoácidos 16-24 ó 154-163 de PSA humano. Véase Waeckerle-Men et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 55:1524-1533 (2006); Matsueda et al., *Clin Cancer Res.* 11(19 Pt 1):6933-43 (2005). El polipéptido puede comprender uno de estos epítomos. El polipéptido puede comprender ambos de estos epítomos.

Fragmentos de PSA se pueden ensayar en cuanto a la retención de epítomos utilizando ensayos bien conocidos en la técnica, tales como el rastreo de epítomos. El fragmento de PSA puede comprender 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 ó 250 aminoácidos consecutivos de PSA humano.

35 Los ADN que codifican estos fragmentos pueden ser generados por PCR u otras técnicas de biología molecular de rutina.

Diversos antígenos y métodos de polipéptidos PAP y PSA modificados pueden ser producidos por métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden utilizar los métodos descritos en la Patente de EE.UU. N° 7.005.498 y las publicaciones de patente de EE.UU. N°s 2004/0141958 y 2006/0008465.

Los siguientes parámetros deben ser considerados:

- 40
1. epítomos de CTL conocidos y previstos;
 2. Homología con proteínas relacionadas;
 3. Conservación de residuos cisteína;
 4. Estructuras de bucle, hélice α y lámina β predichas;
 5. Sitios de N-glicosilación potenciales;
 - 45 6. Predicción de residuos aminoácidos expuestos y enterrados;
 7. Organización de dominios.

Las regiones con un alto grado de homología con otras proteínas relacionadas son propensas a ser estructuralmente importantes para la estructura terciaria "global" y, por lo tanto, para el reconocimiento de anticuerpos, mientras que las regiones de baja homología posiblemente pueden intercambiarse con sólo alteraciones locales de la estructura como la consecuencia.

- 5 Los residuos cisteína están a menudo implicados en la formación del puente disulfuro intramolecular y, por lo tanto, están implicados en la estructura terciaria y no deberían modificarse. Regiones predichas para formar estructuras hélice alfa o de lámina beta deberían evitarse como puntos de inserción de epítomos extraños, ya que se cree que estas regiones están implicadas en el plegamiento de la proteína.

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

- 10 Regiones predichas (por sus propiedades hidrofóbicas) para ser interiores en la molécula deberían conservarse preferiblemente, ya que podrían estar implicadas en el plegamiento. Por el contrario, las regiones expuestas de disolventes podrían servir como posiciones candidato para la inserción del modelo TH de epítomos P2 y P30.

Por último, la organización del dominio de la proteína debería ser tomada en consideración debido a su relevancia para la estructura y función de las proteínas.

- 15 El efecto de las modificaciones de PSA y PAP se puede ensayar por inmunizaciones de animales tales como ratones, para determinar el efecto de las modificaciones sobre las respuestas inmunes humorales y celulares.

Antígenos Modificados Asociados a Tumores

- 20 Un antígeno de polipeptídico asociado a células se puede modificar de tal manera que se induce una respuesta de CTL contra una célula que presenta epítomos derivados de un antígeno de polipéptido en su superficie, cuando se presenta en asociación con una molécula MHC de Clase I en la superficie de una APC. Al menos un primer epítomo T_H extraño, cuando se presenta, puede estar asociado con una molécula MHC de Clase II en la superficie de la APC. Un antígeno asociado a células puede ser un antígeno asociado a tumores.

- 25 APCs a modo de ejemplo capaces de presentar epítomos incluyen células dendríticas y macrófagos. APCs a modo de ejemplo adicionales incluyen cualquier APC pinocitante o fagocitante, que es capaz de presentar simultáneamente 1) epítomos de CTL unidos a moléculas de MHC de Clase I y 2) epítomos T_H unidos a moléculas de MHC de Clase II.

- 30 Las modificaciones de PSA y/o PAP se pueden hacer de tal manera que, después de la administración a un sujeto, se provoca que los anticuerpos policlonales reaccionen predominantemente con PSA y/o PAP. Tales anticuerpos podrían atacar y eliminar las células tumorales, así como evitar que las células metastásicas se conviertan en metástasis. El mecanismo efector de este efecto antitumoral sería mediado a través del complemento y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo. Además, los anticuerpos inducidos también podrían inhibir el crecimiento de células cancerosas a través de la inhibición de la oligo-dimerización dependiente del factor de crecimiento y la internalización de los receptores. Antígenos de polipéptidos PSA y/o PAP modificado de este tipo podrían inducir respuestas de CTL dirigidas contra epítomos PSA y/o PAP conocidos y/o predichos mostrados por las células tumorales. Los antígenos de PSA y PAP pueden inducir una respuesta de célula B y una respuesta de célula T contra estos antígenos.

- 40 Un antígeno polipeptídico PSA y/o PAP modificado puede comprender 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 antígenos polipeptídicos PSA y/o PAP modificados que comprenden al menos un epítomo de CTL y una variación que comprende al menos un epítomo de CTL de un epítomo T_H extraño, y métodos de producir los mismos se describen en la Patente de EE.UU. N°. 7.005.498 y las publicaciones de patente de EE.UU. N°s 2004/0141958 y 2006/0008465.

- 45 Un epítomo T_H extraño puede ser un epítomo de células T "promiscuo" de origen natural. Tales epítomos de células T promiscuos son activos en una gran proporción de individuos de una especie animal o una población animal. Una vacuna puede comprender tales epítomos de células T promiscuos. El uso de epítomos de células T promiscuos puede reducir la necesidad de un número muy grande de diferentes epítomos de CTL en la misma vacuna. Epítomos de células T promiscuos a modo de ejemplo 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 gripe (HA) y antígeno CS de *P. falciparum*.

5 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., asignado a la Universidad de Queensland); Southwood S et. al., J. Immunol. 160:3363-3373 (1998); Sinigaglia F et al., Nature 336: 778 780 (1988); Rammensee HG et al., Immunogenetics 41(4):178-228 (1995); Chicz RM et al., J. Exp. Med 178:27-47 (1993); Hammer J et al., Cell 74:197-203 (1993); y Falk K et al., Immunogenetics 39:230-242 (1994). La última referencia también se ocupa de ligandos de HLA-DQ y -DP. Todos los epítomos enumerados en estas referencias son relevantes como epítomos naturales candidatos tal como se describe en esta memoria, al igual que los epítomos que comparten motivos comunes con estos.

10 El epítomo de células T promiscuo puede ser un epítomo de células T artificial que es capaz de unirse a una gran proporción de haplotipos. El epítomo de células T artificial puede ser un péptido epítomo pan DR ("PADRE") tal como se describe en el documento WO 95/07707 y en el documento correspondiente de Alexander J et al., Immunity 1:751-761 (1994).

MVA recombinante

15 La divulgación abarca un virus MVA recombinante que expresa un polipéptido que comprende un antígeno PAP. Preferiblemente, el virus MVA expresa un PAP humano. El virus MVA puede expresar un antígeno PAP de rata o el ratón. El virus MVA puede codificar un antígeno PAP de longitud completa. El MVA puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2.

20 El MVA puede codificar un fragmento de un PAP. Fragmentos de PAP se pueden ensayar en cuanto a la retención de epítomos utilizando ensayos bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Klyushnenkova et al., Prostate 67(10):1019-28 (2007); Matsueda et al., Clin Cancer Res. 11(19 Pt 1):6933-43 (2005); Machlenkin et al., Cancer Res. 65(14):6435-6442 (2005). El fragmento de PAP puede comprender 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325 ó 375 aminoácidos consecutivos de PAP humano.

25 El MVA puede codificar un polipéptido que comprende los aminoácidos 81-95, 112-120, 133-152, 155-163, 173-192, 199-213, 228-242, 248-257, 299-307 ó 308-322 de PAP humano. Véase Waeckerle-Men et al., Cancer Immunol. Immunother. 55:1524-1533 (2006); Klyushnenkova et al., Prostate 67(10):1019-28 (2007); Matsueda et al., Clin Cancer Res. 11(19 Pt 1):6933-43 (2005); Harada et al., Oncol Rep. 12(3):601-7 (2004); Machlenkin et al., Cancer Res. 65(14):6435-6442 (2005); y McNeel et al., Cancer Res. 61(13):5161-7 (2001). El polipéptido puede comprender uno de estos epítomos. El polipéptido puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 de estos epítomos. Cada una de las posibles combinaciones de estos epítomos se contempla específicamente.

30 La divulgación abarca un virus MVA recombinante que expresa un polipéptido que comprende un antígeno PSA y un virus MVA recombinante que expresa un polipéptido que comprende un antígeno PSA y un polipéptido que comprende un antígeno PAP. Preferiblemente, el virus MVA expresa un antígeno PSA humano. El virus MVA puede expresar un antígeno PSA de rata o ratón. El virus MVA puede codificar un antígeno PSA de longitud completa. El MVA puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

35 El MVA puede codificar un fragmento de un PSA. Fragmentos de PSA se pueden ensayar en cuanto a la retención de epítomos utilizando ensayos bien conocidos en la técnica. En una determinada realización, el fragmento de PSA comprende 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 ó 250 aminoácidos consecutivos de PSA humano.

40 El MVA puede codificar un polipéptido que comprende los aminoácidos 16-24 ó 154-163 de PSA humano. Véase Waeckerle-Men et al., Cancer Immunol. Immunother. 55:1524-1533 (2006); Matsueda et al., Clin Cancer Res. 11(19 Pt 1):6933-43 (2005). El polipéptido puede comprender uno de estos epítomos. El polipéptido puede comprender ambos de estos epítomos.

45 El virus MVA recombinante se puede utilizar en una composición inmunogénica para inducir respuestas inmunes de células B y de células T contra PAP y/o PSA cuando se administra a un huésped. La composición inmunogénica puede inducir anticuerpos contra PAP y/o PSA cuando se administra a un huésped. La composición inmunogénica puede contener adyuvantes, diluyentes y/o estabilizadores. Tales aditivos incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a agua, solución salina, glicerol, etanol, agentes humectantes o emulsionantes y sustancias tamponadoras del pH.

El MVA puede ser MVA-BN®.

MVA recombinante puede comprender un antígeno asociado a tumores, p. ej., MVA-BN-PRO, que codifica antígenos tanto PSA como PAP construidos 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., pBN217) que codifica el antígeno asociado a tumores, p. ej., PSA o PAP, la secuencia y las regiones flanqueantes del genoma del virus. El plásmido pBN217 puede contener secuencias que también están presentes en MVA-BN® (los marcos de lectura abierta 014L y 015L). Las secuencias de ADNc de PSA y PAP se insertan entre las secuencias de MVA-BN® para permitir la recombinación en el genoma viral de MVA-BN®. El plásmido también puede contener una casete de selección que comprende uno o más genes de selección para permitir la selección de las construcciones recombinantes en células CEF.

La infección y transfección simultáneas de los cultivos permite que se produzca una recombinación homóloga entre el genoma viral y el plásmido de recombinación. Se aísla a continuación virus portador del inserto, se caracteriza y se preparan stocks de virus. El virus se puede hacer pasar en cultivos de células CEF en ausencia de selección para permitir la pérdida de la región que codifica los genes de selección, p. ej., gpt y proteína roja fluorescente (RFP).

Métodos de Tratamiento

Pacientes con un cáncer mediado por células que sobre-expresan antígenos asociados a tumores tales como PSA y/o PAP, pueden ser tratados con MVA recombinante que codifica uno o más de dichos antígenos. El MVA puede ser MVA-BN®. El MVA puede codificar un polipéptido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 y un segundo polipéptido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2.

El cáncer es preferiblemente un cáncer de próstata. El cáncer puede ser cáncer de próstata metastásico. El paciente con cáncer puede ser cualquier mamífero, incluyendo un ratón o rata. Preferiblemente, el paciente de cáncer es un primate, más preferiblemente, un ser humano.

El uno o más antígenos asociados a tumores, que codifican MVA recombinante (p. ej., PSA o PAP) se pueden administrar sistémica o localmente, es decir, por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intranasal, intradérmica, o cualquier otra ruta de administración conocida por un médico experto.

10^5 - 10^{10} TCID₅₀ del MVA recombinante se pueden administrar al paciente. Preferiblemente, se administran al paciente 10^7 - 10^{10} TCID₅₀ del MVA recombinante. Más preferiblemente, se administran al paciente 10^8 - 10^{10} TCID₅₀ del MVA recombinante. Lo más preferiblemente, se administran al paciente 10^8 - 10^9 o 10^9 - 10^{10} TCID₅₀ del MVA recombinante. Preferiblemente, el MVA recombinante se administra al paciente en una dosis de 1×10^8 , 2×10^8 ó 4×10^8 TCID₅₀.

El MVA recombinante se puede administrar de una vez o en varias veces. El MVA recombinante se puede administrar dos, tres, cuatro o cinco veces. Preferiblemente, el MVA recombinante se administra tres veces. Lo más preferiblemente, se da tres veces a intervalos de cuatro semanas. El espaciamiento entre administraciones es preferiblemente de 1-4 semanas, 1-8 semanas, 1-16 semanas y 1-52 semanas. El MVA recombinante se puede administrar el día 0 y de nuevo los días 8 y 15. La dosificación puede ser aumentada para administraciones posteriores.

1×10^8 , 2×10^8 y 4×10^8 TCID₅₀ se pueden administrar tres veces a intervalos de cuatro semanas. La razón fundamental para dar dosis múltiples del MVA recombinante se basa en datos de inmunogenicidad preclínicos en ratones que muestran que los tratamientos de refuerzo aumentaban significativamente las respuestas inmune anti-PSA y anti-PAP. Teniendo en cuenta el amplio polimorfismo inmunológico en seres humanos, el dar tres o más dosis puede asegurar que cada uno de los individuos pueda alcanzar la respuesta inmune máxima.

Respuestas de anticuerpos anti-PSA y/o anti-PAP. El tratamiento con el MVA recombinante puede inducir respuestas de células T inmunes anti-PSA y/o anti-PAP. El tratamiento con el MVA recombinante puede inducir respuestas inmunes de anticuerpos anti-PSA y/o anti-PAP y de células T.

El tratamiento con el MVA recombinante puede inducir la propagación de respuestas de células T a otros antígenos tumorales.

El tratamiento con el MVA recombinante puede inhibir el crecimiento de tumores de PSA (+) en un entorno de tratamiento profiláctico y/o terapéutico. El tratamiento con el MVA puede inhibir el crecimiento de tumores PAP (+) en un entorno profiláctico y/o terapéutico. El tratamiento con el MVA recombinante puede inhibir el crecimiento de PSA (+) y de tumores PAP (+) en un entorno de tratamiento profiláctico y/o terapéutico.

Terapia de combinación con agentes citotóxicos

5 Pacientes con un cáncer mediado por células que sobre-expresan antígenos asociados a tumores tales como PSA y/o PAP pueden ser tratados por la combinación de un MVA recombinante que codifica uno o más de tales antígenos con un taxano. Los agentes citotóxicos muestran actividades inmunomoduladoras a dosis sub-tumorizadas que podrían ser beneficiosas para la eficacia de la vacuna. A dosis tumorizadas (dosis altas), el uso de estos agentes al mismo tiempo, antes o después del tratamiento con el MVA recombinante puede ser superior a cualquier tratamiento solo.

10 El taxano puede ser docetaxel. El taxano puede ser paclitaxel. El taxano se puede administrar en una dosis tumorizada. Una "dosis tumorizada" de docetaxel es de al menos 50 mg/m². Preferiblemente, la dosis tumorizada de docetaxel es 75-100 mg/m², que corresponde a una dosificación de aproximadamente 25-33 mg/kg. Una "dosis tumorizada" de paclitaxel es de al menos 90 mg/m². Preferiblemente, la dosis tumorizada de paclitaxel es 135 a 175 mg/m². Una "dosis sub-tumorizada" de un taxano es una dosis por debajo de la dosis tumorizada. El taxano se puede administrar por cualquier medio conocido por el experto en la materia, por ejemplo por vía intravenosa.

15 El taxano y el MVA que codifica un polipéptido que comprende un antígeno específico de tumor de próstata pueden ser administrados al mismo tiempo.

20 El taxano puede administrarse antes del MVA recombinante. El MVA recombinante se puede administrar dentro de los 6 meses de la administración del taxano. El MVA recombinante se puede administrar dentro de los 3 meses, dentro de 2 meses o dentro de 1 mes después del taxano. El MVA recombinante se puede administrar dentro de 21 días después del taxano. El MVA recombinante se puede administrar dentro de 14 días después del taxano. El MVA recombinante se puede administrar dentro de 7 días después del taxano. Habitualmente, el MVA recombinante se administra al menos 2 días después del tratamiento con el taxano.

25 El taxano se puede administrar después del MVA recombinante. Habitualmente, el MVA recombinante se administra al menos 1 semana antes del tratamiento con el taxano. El MVA recombinante se puede administrar menos de 2 años antes del taxano. El MVA recombinante se puede administrar menos de 1 año, menos de 6 meses o menos de 3 meses antes del taxano. El MVA recombinante se puede administrar 1-26 semanas antes del taxano. El MVA recombinante se puede administrar 1-9 semanas antes del taxano. El MVA recombinante se puede administrar 1-3 semanas antes del taxano.

30 El taxano puede administrarse tanto antes como después del MVA recombinante. El MVA recombinante se puede administrar tanto antes como después del taxano. La administración del MVA recombinante y el taxano puede ser una sola administración o administraciones múltiples. Por ejemplo, las administraciones pueden distanciarse 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 semanas.

Kits

35 La divulgación abarca kits que comprenden un MVA recombinante. El MVA recombinante puede estar contenido en un vial o recipiente. El MVA recombinante codifica un polipéptido que comprende un antígeno PSA y un polipéptido que comprende un antígeno PAP. Kits para la vacunación pueden comprender un MVA recombinante para la primera vacunación ("cebado") en una primera vial o recipiente y para una segunda o tercera vacunación ("refuerzo") en un segundo o tercer vial o recipiente.

40 El kit puede contener un MVA recombinante y las instrucciones para la administración del MVA recombinante para la profilaxis del cáncer de próstata. El kit puede contener un MVA recombinante y las instrucciones para la administración del MVA recombinante para la profilaxis del cáncer de próstata después de haber detectado un aumento en uno o más marcadores asociados con un tumor de próstata. Las instrucciones pueden instruir a que el MVA se ha de administrar para la profilaxis del cáncer de próstata después de que se determine que los niveles de PSA circulante han aumentado. Las instrucciones pueden instruir a que el MVA se ha de administrar para la profilaxis del cáncer de próstata a un paciente de sexo masculino después de la edad de 30 años. Las instrucciones pueden instruir a que el MVA se ha de administrar para la profilaxis del cáncer de próstata a un paciente de sexo masculino después de la edad de 30 años y antes de cumplir los 40 años de edad. El kit puede contener un MVA recombinante y las instrucciones para la administración del MVA recombinante para la profilaxis del cáncer de próstata después de la edad de 40 años.

50 El kit puede contener un MVA recombinante y las instrucciones para la administración del MVA recombinante para la profilaxis de la metástasis del cáncer de próstata. El kit puede contener un MVA recombinante y las instrucciones

5 para la administración del MVA recombinante para la profilaxis de la metástasis del cáncer de próstata después de haber detectado un aumento en un marcador asociado a células de tumor de próstata. Las instrucciones pueden instruir a que el MVA se ha de administrar para la profilaxis de la metástasis del cáncer de próstata después de que se determine que han aumentado los niveles de PSA circulante, y a pesar de la ausencia de un tumor primario detectable. Las instrucciones pueden instruir a que el MVA se ha de administrar para la profilaxis de la metástasis del cáncer de próstata a un paciente de sexo masculino después de la edad de 30 años. Las instrucciones pueden instruir a que el MVA se ha de administrar para la profilaxis de la metástasis del cáncer de próstata a un paciente de sexo masculino después de la edad de 30 años y antes de cumplir los 40 años de edad. El kit puede contener un MVA recombinante y las instrucciones para la administración del MVA recombinante para la profilaxis de la metástasis del cáncer de próstata después de la edad de 40 años.

15 El kit puede contener un MVA recombinante y las instrucciones para la administración del MVA recombinante para el tratamiento de cáncer de próstata. El kit puede contener un MVA recombinante y las instrucciones para la administración del MVA recombinante para el tratamiento de cáncer de próstata después de haber detectado un aumento en uno o más de los marcadores asociados a un tumor de próstata. Las instrucciones pueden instruir a que el MVA se ha de administrar para el tratamiento de cáncer de próstata después de que se determina que han aumentado los niveles de PSA circulante. Las instrucciones pueden instruir a que el MVA se ha de administrar para el tratamiento del cáncer de próstata a un paciente de sexo masculino después de la edad de 30 años. Las instrucciones pueden instruir a que el MVA se ha de administrar para el tratamiento del cáncer de próstata a un paciente de sexo masculino después de la edad de 30 años y antes de cumplir los 40 años de edad. El kit puede contener un MVA recombinante y las instrucciones para la administración del MVA recombinante para el tratamiento de cáncer de próstata después de la edad de 40 años.

25 El kit puede contener un MVA recombinante y las instrucciones para la administración del MVA recombinante antes de la administración de una dosis tumoricida de un taxano. Las instrucciones pueden instruir a que el MVA se ha de administrar en cualquier momento entre 6 meses y 1 semana antes de la administración del taxano. Las instrucciones instruyen a que el MVA se ha de administrar en cualquier momento 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. Las instrucciones pueden instruir a que el MVA se ha de administrar en cualquier momento entre 1 semana y 0 días anteriores a la administración del taxano.

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

35 El kit también puede contener un MVA recombinante y las instrucciones para la administración del MVA recombinante después de la administración de una dosis tumoricida de un taxano. Las instrucciones pueden instruir a que el MVA se ha de administrar en cualquier momento entre 1 día y 6 meses después de la administración del taxano. Las instrucciones instruyen a que el MVA se ha de administrar en cualquier momento 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. Las instrucciones pueden instruir a que el MVA se ha de administrar en cualquier momento entre 0 y 2 días después de la administración del taxano.

40 Se dan a continuación ejemplos y referencias para ilustrar la presente invención con más detalle, pero el alcance de la presente invención no está limitado por estos ejemplos. Cualquier variación en los artículos ejemplificados que se le ocurra al experto está destinada a caer dentro del alcance de la presente invención. Además de ello, la memoria descriptiva se entiende más a fondo a la vista de las referencias citadas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Construcción de MVA-BN-PRO y Análisis de la Expresión de Proteínas en Células Infechadas

45 Para desarrollar una vacuna contra el cáncer de próstata, se generó un vector de virus vaccinia recombinante, MVA-BN-PRO, que codifica el antígeno prostático específico (PSA) humano y fosfatasa ácida prostática (PAP). El vector del virus vaccinia recombinante MVA-BN-PRO se derivó de la cepa del virus vaccinia altamente atenuado MVA-BN® (Modified Vaccinia Virus Ankara - Bavarian Nordic). MVA-BN® está fuertemente adaptado a células primarias de fibroblastos de embrión de pollo (CEF), y no se replica reproductivamente en células humanas. En las células humanas, los genes virales se expresan, pero no se produce un virus infeccioso.

Origen de los Genes

El gen PSA y ADNcs de PAP se transcribieron (transcripción inversa) del ARN total de próstata humana adquirido de Clontech (Nº de Catálogo 6410801), utilizando técnicas de biología molecular rutinarias. El PSA es un antígeno prostático específico producido por la próstata y se encuentra en mayor cantidad en la sangre de los hombres que tienen cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna o una infección o inflamación de la próstata. PSA ha sido identificado como un objetivo para métodos de inmunoterapia mediadas por células. PAP (fosfatasa ácida prostática) es una enzima medida en la sangre, cuyos niveles pueden ser elevados en pacientes con cáncer de próstata que ha invadido o se ha metastatizado en otros lugares. El PAP no es elevado, a menos que el tumor se haya diseminado fuera de la cápsula prostática anatómica. Por lo tanto, este antígeno del tumor de próstata es actualmente investigado como un antígeno diana en varios ensayos de vacunas humanas, algunos de ellos con evidencia de un beneficio clínico.

Se confirmó que la secuencia de los ADNcs de PSA y PAP amplificados resultantes coincidía con las publicadas. Es decir, el ADNc de PSA (p. ej., entre otros GenBank M26663.1 GI: 618463; sinónimos: calicreína 3; KLK3; 786 pb) y la secuencia del gen de ADNc de PAP cDNA (GenBank M34840.1 GI: 189620; sinónimos: PAP, ACP3, ACP-3; ACP3; 1161 pb) se muestran a continuación.

La secuencia de ADNc de PSA humano (99% de identidad con la secuencia de GenBank M26663.1; negrita: tres intercambios de nucleótidos silenciosos en las posiciones 48, 54 y 237, que no cambian la secuencia de aminoácidos):

ATGTGGGTCCCGGTTGTCTTCCTCACCTGTCCGTGACGTGGATTGGCGCTGCGCCCTCAT
 CCTGTCTCGGATTGTGGGAGGCTGGGAGTGCGAGAAGCATTCCCAACCCTGGCAGGTGCTTG
 TGGCCTCTCGTGGCAGGGCAGTCTGCGGCGGTGTTCTGGTGCACCCCCAGTGGGTCCTCACA
 GCTGCCCACTGCATCAGGAACAAAAGCGTGATCTTGCTGGGTCCGCACAGTCTGTTTTATCC
 TGAAGACACAGGCCAGGTATTTAGGTCAGCCACAGCTTCCCACACCCGCTCTACGATATGA
 GCCTCCTGAAGAATCGATTCTCAGGCCAGGTGATGACTCCAGCCACGACCTCATGCTGCTC
 CGCCTGTCAGAGCCTGCCGAGCTCACGGATGCTGTGAAGGTCATGGACCTGCCACCCAGGA
 GCCAGCACTGGGGACCACCTGCTACGCCTCAGGCTGGGGCAGCATTGAACCAGAGGAGTTCT
 TGACCCCAAAGAACTTCAGTGTGTGGACCTCCATGTTATTTCCAATGACGTGTGTGCGCAA
 GTTCACCCTCAGAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTGTGCTGGACGCTGGACAGGGGGCAAAG
 CACCTGCTCGGGTGATTCTGGGGGCCACTTGTCTGTAATGGTGTGCTTCAAGGTATCACGT
 CATGGGGCAGTGAACCATGTGCCCTGCCGAAAGGCCTTCCCTGTACACCAAGGTGGTGCAT
 TACCGGAAGTGGATCAAGGACACCATCGTGGCCAACCCCTGA (SEQ ID NO:1)

La secuencia de aminoácidos de PSA humano es:

MWVPVVFLLSVTWIGAAPLILSRIVGGWECEKHSQPWQVLVAS
 RGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSVILLGRHSLFHPEDTGQVFQVSHSFPHPLYD
 MSLLNRFRLPGDDSSHDLMLLRLSEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTTCYASGWGSI
 EPEEFLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLCAGRWTGGKSTCSGDSGGPLV
 CNGVLQGITSWGSEPCALPERPSLYTKVVHYRKWIKDTIVANP (SEQ ID NO:3).

La secuencia de ADNc de PAP humano (100% de identidad con la secuencia de GenBank M34840.1):

ES 2 608 604 T3

ATGAGAGCTGCACCCCTCCTCCTGGCCAGGGCAGCAAGCCTTAGCCTTGGCTTCTTGTTTCT
GCTTTTTTCTGGCTAGACCGAAGTGTACTAGCCAAGGAGTTGAAGTTTGTGACTTTGGTGT
TTCGGCATGGAGACCGAAGTCCCATTGACACCTTTCCCACTGACCCCATAAAGGAATCCTCA
TGGCCACAAGGATTTGGCCAACTCACCCAGCTGGGCATGGAGCAGCATTATGAACTTGGAGA
GTATATAAGAAAGAGATATAGAAAATTCTTGAATGAGTCCTATAAACATGAACAGGTTTATA
TTCGAAGCACAGACGTTGACCGGACTTTGATGAGTGCTATGACAAACCTGGCAGCCCTGTTT
CCCCAGAAGGTGTCAGCATCTGGAATCCTATCCTACTCTGGCAGCCCATCCCGGTGCACAC
AGTTTCTCTTTCTGAAGATCAGTTGCTATACCTGCCTTTCAGGAACTGCCCTCGTTTTCAAG
AACTTGAGAGTGAGACTTTGAAATCAGAGGAATTCAGAAGAGGCTGCACCCTTATAAGGAT
TTTATAGCTACCTTGGGAAAACCTTTCAGGATTACATGGCCAGGACCTTTTTTGGAAATTTGGAG
TAAAGTCTACGACCCTTTATATTGTGAGAGTGTTTACAATTTCACTTTACCCTCCTGGGCCA
CTGAGGACACCATGACTAAGTTGAGAGAATTGTCAGAATTGTCCCTCCTGTCCCTCTATGGA
ATTCACAAGCAGAAAGAGAAAATCTAGGCTCCAAGGGGGTGTCCCTGGTCAATGAAATCCTCAA
TCACATGAAGAGAGCAACTCAGATACCAAGCTACAAAAAACTTATCATGTATTCTGCGCATG
ACACTACTGTGAGTGGCCTACAGATGGCGCTAGATGTTTACAACGGACTCCTTCCCTCCCTAT
GCTTCTTGCCACTTGACGGAATTGTACTTTGAGAAGGGGGAGTACTTTGTGGAGATGTACTA
TCGGAATGAGACGCAGCACGAGCCGTATCCCTCATGCTACCTGGCTGCAGCCCTAGCTGTC
CTCTGGAGAGGTTTGTGAGCTGGTTGGCCCTGTGATCCCTCAAGACTGGTCCACGGAGTGT
ATGACCACAAACAGCCATCAAGGTACTGAGGACAGTACAGATTAG

(SEQ ID NO: 2)

La secuencia de aminoácidos del PAP humano es:

MRAAPLLLARAASLSLGLFLLFFWLDRSVLAKELKFVTLVFRH
GDRSPIDTFPTDPIKESWPQGFQGLTQLGMEQHYELGEYIRKRYRKFLNESYKHEQV
YIRSTDVDRTLMSAMTNLAALFPPEGVSIWNPILLWQPIPVHTVPLSEDQLLYLPFRN

CPRFQELESETLKSEEFQKRLHPYKDFIATLGKLSGLHGQDLFGIWSKVYDPLYCESV
HNFTLPSWATEDTMTKLRELSLSLLSLYGIHKQKEKSRLQGGVLVNEILNHMKRATQ
IPSYKKLIMYSAHDTTVSGLQMALDVYNGLLPPYASCHLTELYFEKGEYFVEMYRNE
TQHEPYPLMLPGCSPSCPLERFAELVGPVIPQDWSTECMTTNSHQGTEDSTD

(SEQ ID NO:4).

El promotor de cuerpos de inclusión de tipo A del virus de la viruela de las vacas (ATI), un promotor tardío (que se muestra a continuación), se generó de manera sintética en un plásmido pBluescript KS + (Stratagene), se cortó y se insertó en la parte delantera tanto de la secuencia de PAP como de la secuencia de PSA. Por consiguiente, la proteína de PSA y PAP debe expresarse con otros genes tardíos, después de la replicación del ADN.

5 Secuencia del Promotor ATI:

5'-GTTTTGAATAAAAATTTTTTTATAATAAATC (SEQ ID NO: 5)

Construcción del Plásmido de Recombinación PSA/PAP-MVA-BN

10 Para la inserción de genes extraños en el genoma de MVA-BN®, se puede utilizar un plásmido de recombinación intermedia que fija como objetivo una región específica del genoma de MVA-BN®, a saber, un sitio de delección o una región intergénica (no codificante).

15 El plásmido pBNX128 intermedio contiene secuencias de ADN de MVA de las regiones que flanquean la región intergénica (no codificante) (IGR) entre los marcos de lectura abiertos (ORFs) 014L y 015L. Las secuencias, p. ej., ADNc de PSA y PAP, se pueden insertar entre estas secuencias flanqueantes. Luego, cuando tanto el plásmido como MVA-BN® están presentes en la misma célula CEF, las secuencias flanqueantes 014L/015L median en la recombinación homóloga, mediando en la inserción de las secuencias de plásmido en la región intergénica 014L/015L del genoma de MVA-BN® (Figura 1A-B). La presencia de una casete de selección en las secuencias insertadas permite la selección positiva de los virus MVA-BN® recombinantes.

Generación del MVA-BN-PRO

20 La infección simultánea y la transfección de cultivos permiten que se produzca una recombinación homóloga entre el genoma viral y el plásmido de recombinación. El vector vaccinia recombinante resultante, designado MVA-mBN106A, que contiene la región codificante de PSA y PAP y la casete de selección se obtuvo después de múltiples purificaciones en placa en condiciones selectivas. Después de la amplificación y de la purificación adicional en placa bajo condiciones no selectivas, se aisló el virus vaccinia recombinante MVA-BN-PRO, desprovisto de la casete de selección.

25 Se preparó virus MVA-BN-PRO purificado en placa que carece de la casete de selección. Tal preparación implicaba doce (12) pasajes, incluyendo cuatro (4) purificaciones en placa.

30 La presencia de la secuencia del promotor-PSA-promotor-PAP y la ausencia de virus MVA-BN® parental en los stocks de MVA-BN-PRO se confirmó por secuenciación de ADN y análisis de PCR, y la PCR anidada se utilizó para verificar la ausencia de la casete de selección (gpt y los genes RFP). Un esquema simplificado del genoma de MVA-BN-PRO se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 2

Co-expresión de PSA y PAP en Células Tratadas con MVA-BN-PRO

35 La expresión simultánea de los dos antígenos prostáticos específicos codificada por MVA-BN-PRO, es decir, PSA humano y PAP humana, se demostró en células incubadas con MVA-BN-PRO in vitro. Cultivos de CT26, un carcinoma colorrectal inducido químicamente de ratones BALB/c (Brattain et al., Cancer Research 40, 2142-2146 (1980)), se incubaron con MVA-BN-PRO y los sobrenadantes se analizaron en cuanto a la presencia de PSA y PAP recombinantes. PSA se midió utilizando un kit de diagnóstico de PSA basado en ELISA que se utiliza rutinariamente para el rastreo de muestras de suero humano (Human PSA ELISA Kit, Anogen, Ontario, Canadá; intervalo de detección de PSA: 2 - 80 ng/mL). PAP se midió indirectamente a través de sus propiedades enzimáticas utilizando un ensayo colorimétrico para las actividades de fosfato (ensayo de fosfatasa ácida; intervalo de detección de PAP: 4 - 40 ng/mL). PSA y PAP se evaluaron en partes alícuotas de los mismos sobrenadantes de cultivo recogidos 24 h después de la adición de MVA-BN-PRO a una multiplicidad de infección (MOI) que varía de 1 a 100.

45 Tal como se muestra en la Figura 3, ambos antígenos podían ser detectados en los sobrenadantes de células incubadas con MVA-BN-PRO. La cantidad de PSA y PAP recombinante producida en cultivo dependía de la cantidad de MVA-BN-PRO (MOI) y el número de células utilizadas en el experimento. Por el contrario, ni la actividad

de PSA ni de fosfatasa indicativa de PAP podía ser detectada en los sobrenadantes de cultivos de control incubados en medio solo o con una MOI coincidente de MVA-BN®.

La titulación de PSA y PAP, calculada utilizando gráficas de referencia estándar para cada ensayo reveló que cantidades similares de ambos antígenos eran producidas por células incubadas con MVA-BN-PRO. De hecho, 1043 ng/mL de PSA y 209 ng/mL de PAP se midieron en sobrenadantes de cultivo cuando CT26 se sembró a razón de 1×10^5 células por pocillo y se incubó con MVA-BN-PRO a una MOI de 10 durante 48 h. Secuencias de PSA y PAP se insertan en la misma región del genoma de MVA-BN® y su expresión es impulsada independientemente por un promotor ATI situado aguas arriba de cada una de las secuencias. Esta configuración del inserto parece conferir el entorno adecuado para la expresión óptima de los dos antígenos recombinantes. En general, estos datos demuestran que MVA-BN® representa un vehículo de suministro adecuado para una expresión bien equilibrada y concomitante de múltiples antígenos transgénicos tales como PSA y PAP.

Ejemplo 3

Inducción de Respuesta Inmune Anti-PAP y Anti-PSA en ratones tratados con MVA-BN-PRO

La inducción de respuestas inmunes anti-PSA y anti-PAP tras el tratamiento con MVA-BN-PRO se evaluó en ratones BALB/c. En estos estudios, se evaluaron diversas dosis de MVA-BN-PRO que oscilan entre 2×10^6 y 5×10^7 TCID50. Las muestras de sangre se recogieron un día antes de cada uno de los tratamientos y dos semanas después del tratamiento final y las respuestas humorales se analizaron mediante ELISA. Los esplenocitos se recogieron después del tratamiento final y las respuestas celulares se analizaron mediante ELISpot.

Inducción de Respuestas de Anticuerpos anti-PSA y anti-PAP

Ratones BALB/c (5 animales en cada uno de los grupos) se trataron por vía subcutánea con 5×10^7 TCID50 de MVA-BN-PRO los días 1, 15 y 29 (cada 2 semanas x 3). Los animales de control fueron tratados con MVA-BN® o tampón de formulación (TBS). Las muestras de sangre se recogieron antes del tratamiento, los días 14, 28 y 42. El suero de los ratones de cada uno de los grupos de ensayo se agrupó a continuación y se analizó por ELISA. La inducción de respuestas de anticuerpos anti-PSA y anti-PAP se evaluó utilizando proteínas purificadas disponibles comercialmente (Meridian Life Sciences, Inc., Saco, ME) como antígenos diana que recubren los pocillos de una placa de microtitulación. Tal como se muestra en las Figuras 4A y 4B, las respuestas de anticuerpos anti-PSA y anti-PAP se detectaron en ratones tratados con MVA-BN-PRO. La detección de los títulos de anticuerpos anti-PSA requería al menos dos administraciones y los títulos aumentaron después del tercer tratamiento con MVA-BN-PRO. En general, la respuesta de anticuerpos contra el PAP fue más modesta, ya que los títulos fueron siempre inferiores a los inducidos contra PSA. La baja respuesta de anticuerpos observada contra PAP es probablemente debida a la débil propiedad antigénica de las células B de esta proteína.

Inducción de Respuestas de células T Anti-PSA y Anti-PAP

Ratones BALB/c (5 animales en cada uno de los grupos) fueron tratados por vía subcutánea con el control (TBS), 2×10^6 ó 5×10^7 TCID50 de MVA-BN-PRO los días 1, 15, 31 (cada 2 semanas x3). Los bazo se recogieron 5 días después de la última inmunización y suspensiones celulares de cada uno de los grupos de ensayo se agruparon para el análisis. La inducción de respuestas de células T se evaluó mediante ELISpot que medía la producción de IFN γ después de la re-estimulación específica *in vitro* de antígenos. Los bancos de péptidos 15-meros con solapamientos 11-meros (OPL) y que cubren las secuencias de aminoácidos de PSA o PAP de longitud completa se utilizaron por separado para la re-estimulación. Tal como se muestra en la Figura 5, se detectaron respuestas de células T específicas de antígeno en células de bazo del grupo de tratamiento con MVA-BN-PRO tras la re-estimulación tanto con OPLs de PAP como de PSA, mientras que un OPL control derivado de la secuencia HER-2 ecd humana no tuvo efecto alguno (Figura 5A). No se detectaron respuestas de las células T en ratones de los grupos tratados con MVA-BN® (datos no mostrados) o TBS (Figura 5) cuando las células se volvieron a estimular con OPLs de PSA, PAP o HER-2. Estos datos indican que MVA-BN-PRO es un inductor potente de células T, ya que números significativos de células T específicas de antígeno podían ser detectados directamente en esplenocitos sin la expansión *ex vivo*.

La contribución de células CD4 cooperadoras y células T CD8 citotóxicas a las respuestas de células T anti-PAP y PSA inducidas en ratones tras el tratamiento con MVA-BN-PRO se examinó tras el agotamiento de poblaciones de subconjuntos de células T antes de la re-estimulación *in vitro* de células del bazo. Tal como se muestra en la Figura 6, se detectaron respuestas de células T en subconjuntos de células T agotados tanto en CD4 como en CD8 tras la re-estimulación con OPL de PSA o PAP.

En general, estos estudios demuestran que el tratamiento repetido de ratones con MVA-BN-PRO induce una amplia respuesta inmune adaptativa específica de antígenos a dos TAA que implica anticuerpos y subtipos de células efectoras tanto CD4 como CD8. Como se esperaba, la respuesta de anticuerpos se dirigió principalmente hacia PSA, mientras que PAP, un conocido débil inmunógeno de células B, activaba sólo una modesta respuesta de anticuerpos. Debido a que PSA y PAP están representadas esencialmente en la superficie de células tumorales como dianas de células T en la forma de complejos de molécula/péptido presentadores de antígenos, la activación de los componentes celulares del sistema inmune es un requisito crítico para la potencia de MVA-BN-PRO. Fuertes respuestas de células T CD4 y CD8 fueron inducidas contra ambos TAA en animales tratados con todas las dosis de MVA-BN-PRO testadas. Por lo tanto, MVA-BN-PRO tiene el potencial de mediar en la eliminación de células tumorales que presentan péptidos de PSA y/o PAP en su superficie.

Ejemplo 4

Actividad Anti-tumores en Ratones Tratados con MVA-BN-PRO

La capacidad de MVA-BN-PRO de afectar el crecimiento de células tumorales PSA-positivas en los ratones se evaluó en un modelo de tumor de cáncer profiláctico así como en uno terapéutico. Los datos demuestran que MVA-BN-PRO puede inhibir el crecimiento del tumor en ambos modelos. Además, MVA-BN-PRO fue capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales PAP-positivas en ratones en un modelo de tumor de cáncer terapéutico.

Inducción de Inmunidad Adaptativa Protectora Específica para Antígenos Tras el Tratamiento con MVA-BN-PRO (modelo profiláctico)

La capacidad de MVA-BN-PRO de prevenir el crecimiento del tumor se evaluó utilizando células E5 trasplantadas como un modelo de cáncer de próstata. E5 es un subclón de RM11, una línea celular de tumor de próstata murina (Elzey et al., Int J Cancer 15; 94 6):842-9 (2001)) obtenida después de la transfección de RM11 con ADN recombinante que codifica el gen PSA humano. En este estudio de eficacia, los ratones fueron inmunizados con MVA-BN-PRO tal como se describe arriba, *es decir*, tres veces a intervalos de 3 semanas, ya sea con TBS, MVA-BN[®] (5×10^7 TCID₅₀) o MVA-BN-PRO (2×10^6 , 1×10^7 ó 5×10^7 TCID₅₀). Los ratones fueron luego enfrentados a tumores mediante la inyección de 1×10^5 células E5 por vía intradérmica seis semanas después del último tratamiento. El crecimiento del tumor se observó dos veces por semana a partir de entonces y se midió el tamaño de los tumores en crecimiento sólidos.

Tal como se muestra en las Figuras 7C a 7E, los tumores en animales tratados previamente con todas las dosis de MVA-BN-PRO crecieron más lentamente que los tumores del grupo control TBS (Figura 7A), y > 50% de los ratones permaneció libre de tumores para todas las dosis ensayadas al final del estudio (día 29). En contraposición, se detectaron tumores medibles en el 100% de los ratones en los grupos de control TBS tan pronto como el Día 12 post-enfrentamiento al tumor. En ese día, se detectaron tumores medibles en sólo el 20% de los ratones de todos los grupos de tratamiento con MVA-BN-PRO. La diferencia de tamaños medios de los tumores era estadísticamente significativa entre todos los grupos tratados con MVA-BN-PRO y el grupo de control TBS en todos los instantes desde el Día 12 durante todo el estudio (Figura 7F).

De manera similar al grupo de control TBS, se detectaron tumores medibles en casi todos los ratones tratados con MVA-BN[®] (90%) tan pronto como el Día 12 post-enfrentamiento al tumor (Figura 7B). Sin embargo, 2 ratones en el grupo tratado con MVA-BN[®] (20%) estaban libres de tumores al final del estudio (Día 29; un ratón se mantuvo libre de tumores durante todo el estudio y la regresión del tumor se produjo en el otro ratón). Además, los tumores en el grupo tratado con MVA-BN[®] crecieron más lentamente que los tumores del grupo de control TBS hasta el Día 22 y se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas en los tamaños medios de tumor entre estos dos grupos en dos momentos (Día 19, $p = 0.034$ y Día 22, $p = 0.019$). El retraso del crecimiento del tumor en ratones tratados con MVA-BN[®] era sólo transitorio, ya que se observaron tamaños de tumores medios similares en ratones tratados con TBS y MVA-BN[®] en todos los otros momentos (Figura 7F).

La actividad anti-tumor mediada por MVA-BN-PRO descrita anteriormente se confirmó en un experimento de repetición, en donde los ratones fueron tratados con 2×10^6 TCID₅₀ de MVA-BN-PRO a intervalos de 2 semanas, y luego fueron enfrentados a células tumorales dos semanas post-tratamiento. Se muestran los datos post-implantación del tumor el día 29 en la Figura 8, junto con los datos coincidentes de la Figura 7 para el mismo día post-implantación. Se observó un retraso comparable en el crecimiento del tumor en ratones tratados con MVA-BN-PRO en ambos experimentos. Además, se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas en los tamaños medios de los tumores entre los grupos tratados con MVA-BN-PRO y TBS, así como entre los grupos tratados con MVA-BN-PRO y MVA-BN[®] ($p = 0,03$ y $p = 0,021$, respectivamente). El efecto transitorio de MVA-BN[®] observado en

los momentos tempranos en la Figura 7 no se detectó en el experimento de repetición (datos no mostrados). Estos datos demuestran que el tratamiento de ratones con MVA-BN-PRO induce una respuesta inmune adaptativa específica para el antígeno y el establecimiento de una memoria inmunológica. Cuando los ratones se enfrentaron posteriormente dos a seis semanas más tarde con células tumorales, la memoria inmune se recuerda e inhibe el crecimiento de las células tumorales.

Supresión de Tumores tras el Tratamiento con MVA-BN-PRO (Modelo Terapéutico)

La capacidad de MVA-BN-PRO de suprimir tumores establecidos se evaluó utilizando células E6 trasplantadas como un modelo de cáncer de próstata. E6 es un subclón de RM11, una línea celular de tumor de próstata murina (Elzey *et al.*, 2001), obtenida después de la transfección de RM11 con ADN recombinante que codifica el gen PSA humano. E6 es un productor de PSA inferior a E5, que se utilizó en el modelo profiláctico descrito anteriormente. Los ratones fueron enfrentados a tumores mediante la inyección de 1×10^5 células E6 por vía intradérmica y fueron tratados el mismo día, a continuación los Días 8 y 15, con TBS, MVA-BN[®] o MVA-BN-PRO (5×10^6 ó 5×10^7 TCID₅₀). El crecimiento del tumor se observó dos veces por semana y a partir de entonces se midió el tamaño de los tumores sólidos debajo de la piel.

Tal como se muestra en la Figura 9, los tumores en animales tratados con MVA-BN-PRO (Figuras 9C y 9D) crecieron de forma significativamente más lenta que los tumores en animales tratados con MVA-BN[®] (Figura 9A y 9B) o con TBS (Figura 9E). En ambos, los grupos de tratamiento con MVA-BN-PRO, se observó una estabilización o una regresión del tamaño del tumor en el 50% de los animales. La Figura 9F muestra la diferencia de tamaños medios de tumores entre los grupos. El volumen medio del tumor era estadísticamente significativamente diferente entre los animales tratados con 5×10^6 TCID₅₀ de MVA-BN-PRO y grupos control tratados con TBS o MVA-BN[®] ($p = 0,014$ y $p = 0,032$, respectivamente), mientras que no se alcanzó una significancia estadística entre el grupo tratado con 5×10^7 TCID₅₀ de MVA-BN-PRO y el grupo control de TBS ($p = 0,07$). Estos datos demuestran que el tratamiento de ratones con MVA-BN-PRO inhibe el crecimiento de tumores de próstata en ratones en el modelo terapéutico.

La capacidad de MVA-BN-PRO de suprimir también tumores que expresan PAP establecidos se evaluó en un modelo de metástasis pulmonar experimental utilizando células CT26 que expresan de forma estable PAP humana. CT26 es un carcinoma colorrectal inducido químicamente de ratones BALB/c (Brattain *et al.*, 1980). En este modelo, se inyectan células CT26-PAP por vía intravenosa en ratones BALB/c y la carga tumoral se evalúa en los pulmones en donde crecen los nódulos tumorales. Los ratones fueron enfrentados a células CT26-PAP (5×10^5) células inyectadas por vía intravenosa el Día 1 y fueron tratados intraperitonealmente el Día 4 con una sola inyección de TBS, MVA-BN (5×10^7 TCID₅₀) o MVA-BN-PRO (2×10^6 y 5×10^7 TCID₅₀). Los ratones se sacrificaron después el Día 14 y se pesaron sus pulmones. Tal como se muestra en la Figura 10, La carga tumoral en ratones tratados con 5×10^7 TCID₅₀ de MVA-BN-PRO era significativamente menor que en los ratones de control ($p < 0,024$); esta actividad anti-tumoral era dependiente de la dosis, ya que la dosis más baja de MVA-BN-PRO no tenía efecto alguno. Además, esta actividad anti-tumor fue lo más probablemente mediada por la respuesta inmune específica para PAP, ya que la carga tumoral en ratones de control y grupos tratados con MVA-BN se mantuvo sin cambios.

Estos datos demuestran que el tratamiento de ratones con MVA-BN-PRO inhibe el crecimiento de tumores PAP-positivos establecidos en ratones. Por lo tanto, los dos antígenos prostáticos PSA y PAP codificados por MVA-BN-PRO contribuyen a la inducción de la respuesta inmune protectora capaz de suprimir el crecimiento de tumores PSA- o PAP-positivos.

Ejemplo 5

Inmunogenicidad de MVA-BN-PRO a través de la restricción de haplotipos

Las respuestas inmunes resultan de la interacción de epítomos derivados de antígenos con moléculas presentadoras de antígenos polimórficas en células inmuno-competentes. Un beneficio de los dos antígenos tumorales en MVA-BN-PRO es que potencialmente aumentan el número de epítomos derivados de antígenos tumorales que pueden interactuar con moléculas presentadoras de antígeno de diferentes haplotipos. Por consiguiente, se anticipa que MVA-BN-PRO será inmunogénica en individuos con una gama más amplia de haplotipos que las vacunas que contienen un único antígeno. Esta posibilidad se evaluó en modelos preclínicos utilizando animales con diferentes haplotipos. En este ejemplo, el vector descrito en el Ejemplo 1 se modificó para reemplazar el promotor ATI por un promotor sintético temprano/tardío (Ps; Chakrabarti S, Sisler JR, y Moss B, BioTechniques 23:1094-1097 (diciembre de 1997)). Por consiguiente, la proteína de PSA y PAP debería expresarse con otros genes tempranos y tardíos a lo largo de la fase infecciosa completa del MVA.

Secuencia del Promotor Ps:

5'-AAAAAATTGAAATTTTATTTTTTTTTTTTGGGAATATAAATAAT (SEQ ID NO: 6)

5 Ratonos BALB/c y C57BL/6 machos (5 animales en cada uno de los grupos) fueron inmunizados los días 1, 15 y 29 con 5×10^7 TCID₅₀ de MVA-BN-PRO. Las muestras de sangre se recogieron el día 42, y diluciones en serie de sueros mezclados se analizaron en cuanto a la presencia de IgG anti-PSA o anti-PAP por ELISA tal como se describe en el Ejemplo 3. Como se muestra en la Figura 11, se detectaron altos títulos de anticuerpos anti-PSA en los sueros de sólo ratones BALB/c. En cambio, aunque los títulos de anticuerpos anti-PAP se midieron en sueros de dos cepas de ratón, se detectaron títulos de anticuerpos anti-PAP más altos en el suero de ratones C57BL/6. Estos datos enfatizan la relación de haplotipos de la respuesta inmune para antígenos específicos y apoyan la idea de que 10 los antígenos tumorales múltiples en MVA-BN-PRO deben proporcionar inmunidad efectiva en una gama más amplia de individuos con diferentes haplotipos.

Ejemplo 6

Seguridad e inmunogenicidad de MVA-BN-PRO en seres humanos

15 MVA-BN-PRO está actualmente bajo investigación para el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata. En el momento de esta solicitud, 4 pacientes recibieron 1 a 3 tratamientos con $1E8$ TCID₅₀ de MVA-BN-PRO sin efectos adversos reseñados. La inmunogenicidad de MVA-BN-PRO en uno de estos pacientes se evaluó mediante la comparación de las respuestas de células T a PSA y PAP pre- y post-tratamiento. La presencia de células T secretoras de interferón gamma (IFN- γ) específico para antígenos en células mononucleares de la sangre periférica de pacientes (PBMC) se determinó utilizando un ensayo ELISpot. Las respuestas se determinaron antes del 20 tratamiento (Base) y 2 semanas después de la tercera vacunación subcutánea con 10^8 TCID₅₀ de MVA-BN-PRO (TC3). PBMC del paciente (2×10^5) en medio MATIS al 10% (RPMI, medio de Click, suero AB humano al 10%, 2- β -mercaptoetanol 0,5 M y 2% de penicilina/estreptomicina) se transfirieron a pocillos hidratadas de placas PVDF de 96 pocillos Multiscreen (Millipore, Cat. N° MSIPS4510) pre-revestidos con un anticuerpo de captura de IFN- γ anti-humano (Mabtech, clon MAb 1D1K, Cat. N° 3420-3) en 10 μ g/mL. Posteriormente, las PBMC se estimularon con 25 PSA a 5 μ g/mL (Biosdesign Cat.N° A86878H), un banco de 11-meros solapantes de 63 péptidos 15-meros (OPL) derivados de la secuencia de PSA de longitud completa a 63 μ M (1 μ M por péptido), PAP a 1 μ g/mL (Biosdesign, Cat. N° A81277H), un OPL 11-mero de 94 péptidos aminoácidos 15-meros derivada de la secuencia de longitud completa PAP a 94 μ M (1 μ M por péptido), una agrupación de 44 péptidos MHC de Clase I derivados de 10 antígenos asociados a tumores (TAA) de cáncer de próstata a 44 μ M (1 μ M por péptido), una agrupación de 15 péptidos MHC 30 de Clase II derivados de 5 TAA de cáncer de próstata a 15 μ M (1 μ M por péptido), o MVA (Bavarian Nordic, MVA-BN-PROD05A06-C) a una multiplicidad de infección (MOI) de 10.

Secuencia de los 63 péptidos de PSA OPL:

MWVPVFLTLSVTWI (a.a. 1-15 de SEQ ID NO: 3)
 35 VFLTLSVTWIGAAP (a.a. 5-19 de SEQ ID NO: 3)
 TLSVTWIGAAPLILS (a.a. 9-23 de SEQ ID NO: 3)
 TWIGAAPLILSRIVG (a.a. 13-27 de SEQ ID NO: 3)
 AAPLILSRIVGGWEC (a.a. 17-31 de SEQ ID NO: 3)
 ILSRIVGGWECEKHS (a.a. 21-35 de SEQ ID NO: 3)
 40 IVGGWECEKHSQPWQ (a.a. 25-39 de SEQ ID NO: 3)
 WECEKHSQPWQVLVA (a.a. 29-43 de SEQ ID NO: 3)
 KHSQPWQVLVASRGR (a.a. 33-47 de SEQ ID NO: 3)
 PWQVLVASRGRAVCG (a.a. 37-51 de SEQ ID NO: 3)
 LVASRGRAVCGGVLV (a.a. 41-55 de SEQ ID NO: 3)
 RGRAVCGGVLVHPQW (a.a. 45-59 de SEQ ID NO: 3)
 45 VCGGVLVHPQWVLTAA (a.a. 49-63 de SEQ ID NO: 3)
 VLVHPQWVLTAAHCI (a.a. 53-67 de SEQ ID NO: 3)
 PQWVLTAAHCIRNKS (a.a. 57-71 de SEQ ID NO: 3)
 LTAAHCIRNKSVILL (a.a. 61-75 de SEQ ID NO: 3)
 HCIRNKSVILLGRHS (a.a. 65-79 de SEQ ID NO: 3)
 50 NKSVILLGRHSLFHP (a.a. 69-83 de SEQ ID NO: 3)
 ILLGRHSLFHPEDTG (a.a. 73-87 de SEQ ID NO: 3)
 RHSLFHPEDTGQVFQ (a.a. 77-91 de SEQ ID NO: 3)

5 FHPEDTGQVFQVSHS (a.a. 81-95 de SEQ ID NO: 3)
 DTGQVFQVSHSFPHP (a.a. 85-99 de SEQ ID NO: 3)
 VFQVSHSFPHPPLYDM (a.a. 89-103 de SEQ ID NO: 3)
 SHSFPHPPLYDMSLLK (a.a. 93-107 de SEQ ID NO: 3)
 PHPLYDMSLLKNRFL (a.a. 97-111 de SEQ ID NO: 3)
 YDMSLLKNRFLRPGD (a.a. 101-115 de SEQ ID NO: 3)
 LLKNRFLRPGDDSSH (a.a. 105-119 de SEQ ID NO: 3)
 RFLRPGDDSSHDMLL (a.a. 109-123 de SEQ ID NO: 3)
 PGDDSSHDMLLRLS (a.a. 113-127 de SEQ ID NO: 3)
 10 SSHDLMLLRLSEPAE (a.a. 117-131 de SEQ ID NO: 3)
 LMLLRLSEPAELTDA (a.a. 121-135 de SEQ ID NO: 3)
 RLSEPAELTDAVKVM (a.a. 125-139 de SEQ ID NO: 3)
 PAELTDAVKVMDLPT (a.a. 129-143 de SEQ ID NO: 3)
 TDAVKVMDLPTQEPA (a.a. 133-147 de SEQ ID NO: 3)
 15 KVMDLPTQEPALGTT (a.a. 137-151 de SEQ ID NO: 3)
 LPTQEPALGTTTCYAS (a.a. 141-155 de SEQ ID NO: 3)
 EPALGTTTCYASGWGS (a.a. 145-159 de SEQ ID NO: 3)
 GTTCYASGWGSIEPE (a.a. 149-163 de SEQ ID NO: 3)
 YASGWGSIEPEEFLT (a.a. 153-167 de SEQ ID NO: 3)
 20 WGSIEPEEFLTPKKL (a.a. 157-171 de SEQ ID NO: 3)
 EPEEFLTPKKLQCVD (a.a. 161-175 de SEQ ID NO: 3)
 FLTPKKLQCVDLHVI (a.a. 165-179 de SEQ ID NO: 3)
 KKLQCVDLHVISNDV (a.a. 169-183 de SEQ ID NO: 3)
 CVDLHVISNDVCAQV (a.a. 173-187 de SEQ ID NO: 3)
 25 HVISNDVCAQVHPQK (a.a. 177-191 de SEQ ID NO: 3)
 NDVCAQVHPQKVTKF (a.a. 181-195 de SEQ ID NO: 3)
 AQVHPQKVTKFMLCA (a.a. 185-199 de SEQ ID NO: 3)
 PQKVTKFMLCAGRWT (a.a. 189-203 de SEQ ID NO: 3)
 TKFMLCAGRWTGGKS (a.a. 193-207 de SEQ ID NO: 3)
 30 LCAGRWTGGKSTCSG (a.a. 197-211 de SEQ ID NO: 3)
 RWTGGKSTCSGDSGG (a.a. 201-215 de SEQ ID NO: 3)
 GKSTCSGDSGGPLVC (a.a. 205-219 de SEQ ID NO: 3)
 CSGDSGGPLVCNGVL (a.a. 209-223 de SEQ ID NO: 3)
 SGGPLVCNGVLQGIT (a.a. 213-227 de SEQ ID NO: 3)
 35 LVCNGVLQGITSWGS (a.a. 217-231 de SEQ ID NO: 3)
 GVLQGITSWGSEPCA (a.a. 221-235 de SEQ ID NO: 3)
 GITSWGSEPCALPER (a.a. 225-239 de SEQ ID NO: 3)
 WGSEPCALPERPSLY (a.a. 229-243 de SEQ ID NO: 3)
 PCALPERPSLYTKVV (a.a. 233-247 de SEQ ID NO: 3)
 40 PERPSLYTKVVHYRK (a.a. 237-251 de SEQ ID NO: 3)
 SLYTKVVHYRKWIKD (a.a. 241-255 de SEQ ID NO: 3)
 KVVHYRKWIKDTIVA (a.a. 245-259 de SEQ ID NO: 3)
 YRKWIKDTIVANP (a.a. 249-261 de SEQ ID NO: 3)

Secuencia de los 94 péptidos de OPL PAP:

45 MRAAPLLLARAASLS (a.a. 1-15 de SEQ ID NO: 4)
 PLLLARAASLSLGFL (a.a. 5-19 de SEQ ID NO: 4)
 ARAASLSLGFLFLLF (a.a. 9-23 de SEQ ID NO: 4)
 SLSLGFLFLFFWLD (a.a. 13-27 de SEQ ID NO: 4)
 GFLFLFFWLDERSVL (a.a. 17-31 de SEQ ID NO: 4)
 50 LFFWLDERSVLAKEL (a.a. 21-35 de SEQ ID NO: 4)
 WLDRSVLAKELKFVT (a.a. 25-39 de SEQ ID NO: 4)
 SVLAKELKFVTLVFR (a.a. 29-43 de SEQ ID NO: 4)
 KELKFVTLVFRHGDR (a.a. 33-47 de SEQ ID NO: 4)
 FVTLVFRHGDRSPID (a.a. 37-51 de SEQ ID NO: 4)
 55 VFRHGDRSPIDTFPT (a.a. 41-55 de SEQ ID NO: 4)
 GDRSPIDTFPTDPIK (a.a. 45-59 de SEQ ID NO: 4)
 PIDTFPTDPIKESSW (a.a. 49-63 de SEQ ID NO: 4)
 FPTDPIKESSWPQGF (a.a. 53-67 de SEQ ID NO: 4)
 PIKESSWPQGFQGLT (a.a. 57-71 de SEQ ID NO: 4)

5 SSWPQGGFGLTQLGM (a.a. 61-75 de SEQ ID NO: 4)
 QGFGQLTLGMEQHY (a.a. 65-79 de SEQ ID NO: 4)
 QLTQLGMEQHYELGE (a.a. 69-83 de SEQ ID NO: 4)
 LGMEQHYELGEYIRK (a.a. 74-87 de SEQ ID NO: 4)
 QHYELGEYIRKRYRK (a.a. 77-91 de SEQ ID NO: 4)
 LGEYIRKRYRKFLNE (a.a. 81-95 de SEQ ID NO: 4)
 IRKRYRKFLNESYKH (a.a. 85-99 de SEQ ID NO: 4)
 YRKFLNESYKHEQVY (a.a. 89-103 de SEQ ID NO: 4)
 LNESYKHEQVYIRST (a.a. 93-107 de SEQ ID NO: 4)
 10 YKHEQVYIRSTDVDR (a.a. 97-111 de SEQ ID NO: 4)
 QVYIRSTDVDRTLMS (a.a. 101-115 de SEQ ID NO: 4)
 RSTDVDRTLMSAMTN (a.a. 105-119 de SEQ ID NO: 4)
 VDRTLMSAMTNLAAL (a.a. 109-123 de SEQ ID NO: 4)
 LMSAMTNLAALFPPE (a.a. 113-127 de SEQ ID NO: 4)
 15 MTNLAALFPPEGVSI (a.a. 117-131 de SEQ ID NO: 4)
 AALFPPEGVSIWNPI (a.a. 121-135 de SEQ ID NO: 4)
 PPEGVSIWNPIILLWQ (a.a. 125-139 de SEQ ID NO: 4)
 VSIWNPIILLWQPIPV (a.a. 129-143 de SEQ ID NO: 4)
 NPILLWQPIPVHTVP (a.a. 133-147 de SEQ ID NO: 4)
 20 LWQPIPVHTVPLSED (a.a. 137-151 de SEQ ID NO: 4)
 LPVHTVPLSEDQLLY (a.a. 141-155 de SEQ ID NO: 4)
 TVPLSEDQLLYLPFR (a.a. 145-159 de SEQ ID NO: 4)
 SEDQLLYLPFRNCPR (a.a. 149-163 de SEQ ID NO: 4)
 LLYLPFRNCPRFQEL (a.a. 153-167 de SEQ ID NO: 4)
 25 PFRNCPRFQELESET (a.a. 157-171 de SEQ ID NO: 4)
 CPRFQELESETLKSE (a.a. 161-175 de SEQ ID NO: 4)
 QELESETLKSEEFQK (a.a. 165-179 de SEQ ID NO: 4)
 SETLKSEEFQKRLHP (a.a. 169-183 de SEQ ID NO: 4)
 KSEEFQKRLHPYKDF (a.a. 173-187 de SEQ ID NO: 4)
 30 FQKRLHPYKDFIATL (a.a. 177-191 de SEQ ID NO: 4)
 LHPYKDFIATLGKLS (a.a. 181-195 de SEQ ID NO: 4)
 KDFIATLGKLSGLHG (a.a. 185-199 de SEQ ID NO: 4)
 ATLGKLSGLHGQDLF (a.a. 189-203 de SEQ ID NO: 4)
 KLSGLHGQDLFGIWS (a.a. 193-207 de SEQ ID NO: 4)
 35 LHGQDLFGIWSKVYD (a.a. 197-211 de SEQ ID NO: 4)
 DLFGIWSKVYDPLYC (a.a. 201-215 de SEQ ID NO: 4)
 IWSKVYDPLYCESVH (a.a. 205-219 de SEQ ID NO: 4)
 VYDPLYCESVHNFTL (a.a. 209-223 de SEQ ID NO: 4)
 LYCESVHNFTLPSWA (a.a. 213-227 de SEQ ID NO: 4)
 40 SVHNFTLPSWATEDT (a.a. 217-231 de SEQ ID NO: 4)
 FTLPSWATEDTMTKL (a.a. 221-235 de SEQ ID NO: 4)
 SWATEDTMTKLRELS (a.a. 225-239 de SEQ ID NO: 4)
 EDTMTKLRELSLSL (a.a. 229-243 de SEQ ID NO: 4)
 TKLRELSLSLSLY (a.a. 234-247 de SEQ ID NO: 4)
 45 ELSELSLSLYGIHK (a.a. 237-251 de SEQ ID NO: 4)
 LSLSLYGIHKQKEK (a.a. 241-255 de SEQ ID NO: 4)
 SLYGIHKQKEKSRLQ (a.a. 245-259 de SEQ ID NO: 4)
 IHKQKEKSRLQGGVL (a.a. 249-263 de SEQ ID NO: 4)
 KEKSRLQGGVLVNEI (a.a. 253-267 de SEQ ID NO: 4)
 50 RLQGGVLVNEILNHM (a.a. 257-271 de SEQ ID NO: 4)
 GVLVNEILNHMKRAT (a.a. 261-275 de SEQ ID NO: 4)
 NEILNHMKRATQIPS (a.a. 265-279 de SEQ ID NO: 4)
 NHMKRATQIPSYKKL (a.a. 269-283 de SEQ ID NO: 4)
 RATQIPSYKKLIMYS (a.a. 274-287 de SEQ ID NO: 4)
 55 IPSYKKLIMYSAHDT (a.a. 277-291 de SEQ ID NO: 4)
 KKLIMYSAHDTTVSG (a.a. 281-295 de SEQ ID NO: 4)
 MYSAHDTTVSGLQMA (a.a. 285-299 de SEQ ID NO: 4)
 HDTTVSGLQMALDVY (a.a. 289-303 de SEQ ID NO: 4)
 VSGLQMALDVYNGLL (a.a. 293-307 de SEQ ID NO: 4)
 60 QMALDVYNGLLPPYA (a.a. 297-311 de SEQ ID NO: 4)
 DVYNGLLPPYASCHL (a.a. 301-315 de SEQ ID NO: 4)

5 GLLPPYASCHLTELY (a.a. 305-319 de SEQ ID NO: 4)
 PYASCHLTELYFEKG (a.a. 309-323 de SEQ ID NO: 4)
 CHLTELYFEKGEYFV (a.a. 313-327 de SEQ ID NO: 4)
 ELYFEKGEYFVEMY (a.a. 317-331 de SEQ ID NO: 4)
 EKGEYFVEMYRNET (a.a. 321-335 de SEQ ID NO: 4)
 YFVEMYRNETQHEP (a.a. 325-339 de SEQ ID NO: 4)
 MYYRNETQHEPYPLM (a.a. 329-343 de SEQ ID NO: 4)
 NETQHEPYPLMLPGC (a.a. 333-347 de SEQ ID NO: 4)
 HEPYPLMLPGCSPSC (a.a. 337-351 de SEQ ID NO: 4)
 10 PLMLPGCSPSCPLER (a.a. 341-355 de SEQ ID NO: 4)
 PGCSPSCPLERFAEL (a.a. 345-359 de SEQ ID NO: 4)
 PSCPLERFAELVGPV (a.a. 349-363 de SEQ ID NO: 4)
 LERFAELVGPVIPQD (a.a. 353-367 de SEQ ID NO: 4)
 AELVGPVIPQDWSTE (a.a. 357-371 de SEQ ID NO: 4)
 15 GPVIPQDWSTECMTT (a.a. 361-375 de SEQ ID NO: 4)
 PQDWSTECMTTNSHQ (a.a. 365-379 de SEQ ID NO: 4)
 STECMTTNSHQGTED (a.a. 369-383 de SEQ ID NO: 4)
 MTTNSHQGTEDSTD (a.a. 373-386 de SEQ ID NO: 4)

20 **Secuencia de los 44 péptidos TAA MHC de Clase I con TAA correspondiente y la posición en la secuencia TAA:**

	Péptidos	Secuencia
PSMA		
	4-12	LLHETDSAV (a.a. 4-12 de SEQ ID NO: 7)
	109-117	ELAHYDVLL (a.a. 109-117 de SEQ ID NO: 7)
	168-176	PSLYTKVVHY (a.a. 168-176 de SEQ ID NO: 7)
	173-181	DLVYVNYAR (a.a. 173-181 de SEQ ID NO: 7)
	178-186	NYARTEDFF (a.a. 178-186 de SEQ ID NO: 7)
	199-207	KIVIARYGK (a.a. 199-207 de SEQ ID NO: 7)
	207-215	KVFRGNKVK (a.a. 207-215 de SEQ ID NO: 7)
	227-235	LYSDPADYF (a.a. 227-235 de SEQ ID NO: 7)
	260-268	NLNGAGDPL (a.a. 260-268 de SEQ ID NO: 7)
	347-356	HSTNGVTRII (a.a. 347-356 de SEQ ID NO: 7)
	354-363	RIYNVIGTLR (a.a. 354-363 de SEQ ID NO: 7)
	403-411	GTLKKEGWR (a.a. 403-411 de SEQ ID NO: 7)
	431-440	STEWAEENSR (a.a. 431-440 de SEQ ID NO: 7)
	441-450	LLQERGVAYI (a.a. 441-450 de SEQ ID NO: 7)
	461-469	TLRVDCTPL (a.a. 461-469 de SEQ ID NO: 7)
	557-566	ETYELVEKFY (a.a. 557-566 de SEQ ID NO: 7)
	641-649	EIASKFSER (a.a. 641-649 de SEQ ID NO: 7)
	663-671	MMNDQLMFL (a.a. 663-671 de SEQ ID NO: 7)
	680-688	GLPDRPFYR (a.a. 680-688 de SEQ ID NO: 7)
	711-719	ALFDIESKV (a.a. 711-719 de SEQ ID NO: 7)
PSCA		
	7-15	ALLMAGLAL (a.a. 7-15 de SEQ ID NO: 8)
	14-22	ALQPGTALL (a.a. 14 a 22 de SEQ ID NO: 8)
	21-30	LLCYSCAKV (a.a. 21-30 de SEQ ID NO: 8)
	76-84	DYYVGKKNI (a.a. 76-84 de SEQ ID NO: 8)
	108-116	ALLPALGLL (a.a. 108-116 de SEQ ID NO: 8)
	109-117	LLPALGLLL (a.a. 109-117 de SEQ ID NO: 8)
	115-123	LLLWGPQ (a.a. 115-123 de SEQ ID NO: 8)

STEAP1

86-94 FLYTLLREV (a.a. 86-94 de SEQ ID NO: 9)
 102-116 HQQYFYKIPILVINK (a.a. 102-116 de SEQ ID NO: 9)
 262-270 LLLGTIHAL (a.a. 262-270 de SEQ ID NO: 9)
 292-300 MIAVFLPIV (a.a. 292-300 de SEQ ID NO: 9)

PTHrp

42-51 QLLHDKGKS (a.a. 42-51 de SEQ ID NO: 10)
 59-68 FLHHLIAEIH (a.a. 59-68 de SEQ ID NO: 10)
 59-65 FLHHLIA (a.a. 59-65 de SEQ ID NO: 10)
 165-173 TSTTSLELD (a.a. 165-173 de SEQ ID NO: 10)

TARP

4-13 FPPSPLFFFL (a.a. 4-13 de SEQ ID NO: 11)
 27-35 FVFLRNFSL (a.a. 27-35 de SEQ ID NO: 11)
 29-37 FLRNFSLML (a.a. 29-37 de SEQ ID NO: 11)

Proteína

31-39 CLAAGITYV (SEQ ID NO: 12)

Eph

58-66 IMNDMPIYM (SEQ ID NO: 13)
 550-558 VLAGVGFFI (SEQ ID NO: 14)

Survivina

96-104 LTLGEFLKL (SEQ ID NO: 15)

hTERT

973-981 KLFGLRLK (SEQ ID NO: 16)

HER2

665-673 VVLGVVFGI (SEQ ID NO: 17)

Secuencia de los 15 péptidos TAA MHC de Clase II con TAA y la posición correspondiente en la secuencia TAA

Calicreína 4

125-139 SVSESDTIRSISIAS (SEQ ID NO: 18)
 155-169 LLANGRMPTVLQCVN (SEQ ID NO: 19)
 160-174 RMPTVLQCVNVSVVS (SEQ ID NO: 20)

Histona H4

14-28 GAKRHRKVLDRDNIQG (a.a. 14-28 de SEQ ID NO: 21)
 16-39 KRHRKVLDRDNIQGITKPAIRRLAR (a.a. 16-39 de SEQ ID NO: 21)
 31-45 TKPAIRRLARRGGVK (a.a. 31-45 de SEQ ID NO: 21)
 49-63 LIYEETRGVLKVFLE (a.a. 49-63 de SEQ ID NO: 21)
 71-94 TYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQG (a.a. 71-94 de SEQ ID NO: 21)

TARP

1-14 MQMFPPSPLFFFLQ (SEQ ID NO: 11)
 14-27 QLLKQSSRRLEHTF (SEQ ID NO: 11)

ENAH (hMena)

502-510 TMNGSKSPV (SEQ ID NO: 22)

PSMA

334-348 TGNFSTQKVKMHIHS (a.a. 334-348 de SEQ ID NO: 7)
 459-473 NYTLRVDCTPLMYSL (a.a. 459-473 de SEQ ID NO: 7)
 687-701 YRHVIYAPSSHNKYA (a.a. 687-701 de SEQ ID NO: 7)

730-744 RQIYVAAFTVQAAAE (a.a. 730-744 SEQ ID NO: 7)

Después de 40 horas de incubación a 37°C, 5% de CO₂, se detectó una secreción de IFN- γ con 1 μ g/mL del anticuerpo IFN- γ anti-humano biotinilado (Mabtech, MAb clon 7-B6-1, Cat. N° 3420-6), seguido de la adición de estreptavidina-fosfatasa alcalina (BD Pharmingen, Cat. N° 554065) diluido 1/5000. Placas de ELISpot se desarrollaron con el sustrato Vector Blue (Vector Lab Inc., Cat. N° SK-5300) y las manchas se contaron con un lector automático de manchas (Cellular Technology Ltd. ImmunoSpot software S3B Analyzer y CTL ImmunoSpot 4.0 Professional). Tal como se muestra en la Figura 12, se detectó una respuesta de células T pre-existente a PSA antes del tratamiento con MVA-BN-PRO en el Paciente JD-1001. Células T anti-PSA aumentaron significativamente después del tratamiento, mientras que después del tratamiento sólo se detectaron células T anti-PAP. Estos datos indican que MVA-BN-PRO es inmunogénico en seres humanos y que se puede conseguir la inducción simultánea de respuestas tanto anti-PSA como anti-PAP. El tratamiento de MVA-BN-PRO también resultó en una fuerte respuesta de células T al vector MVA-BN. Lo más importante, el tratamiento con MVA-BN-PRO también resultó en la propagación de respuestas de células T a otros antígenos tumorales tal como se ilustra por la producción de IFN- γ por parte de las células T estimuladas con agrupaciones de péptidos TAA MHC I y II. Esto indica que las respuestas inmunes inducidas por MVA-BN-PRO condujeron a la muerte de las células tumorales, seguido de la amplificación de respuestas antitumorales a otros antígenos tumorales. La dispersión del antígeno es un evento importante en la inducción de la inmunidad protectora anti-tumores, ya que evita la evasión del tumor a respuestas inducidas por vacunas. Por lo tanto, la capacidad de MVA-BN-PRO para mediar en la respuesta inmune a dos antígenos tumorales en los seres humanos es una propiedad que ofrece una inmunoterapia eficaz.

ES 2 608 604 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BN IMMUNOTHERAPEUTICS INC.

<120> USO DE MVA PARA TRATAR EL CÁNCER DE PRÓSTATA

<130> BNIT0002PCT-EP

5 <140> PCT/US2008/080229
<141> 16-10-2008

<150> 60/960.893

<151> 18-10-2007

<160> 22

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 786

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<400> 1

```

atgtgggtcc cggttgctt ctcaccctg tccgtgacgt ggattggcgc tgcgccctc      60
atcctgtctc ggattgtggg aggctgggag tgcgagaagc attccaacc ctggcagggtg      120
cttgtggcct ctcgtggcag ggcagtctgc ggcggtgttc tgggtgcacc ccagtgggtc      180
ctcacagctg cccactgcat caggaacaaa agcgtgatct tgctgggtcg gcacagtctg      240
tttcatcctg aagacacagg ccaggatatt caggctcagc acagcttccc acaccgctc      300
tacgatatga gcctcctgaa gaatcgattc ctcaggccag gtgatgactc cagccacgac      360
ctcatgctgc tccgcctgtc agagcctgcc gagctcacgg atgctgtgaa ggtcatggac      420
ctgcccacc aggagccagc actggggacc acctgctacg cctcaggctg gggcagcatt      480
gaaccagagg agttcttgac cccaaagaaa cttcagtgtg tggacctcca tgttatttcc      540
aatgacgtgt gtgcgcaagt tcaccctcag aaggtagcca agttcatgct gtgtgctgga      600
cgctggacag ggggcaaaaag cacctgctcg ggtgattctg ggggcccact tgtctgtaat      660
ggtgtgcttc aaggatcac gtcattggggc agtgaacat gtgccctgcc cgaaaggcct      720
tcctgtaca ccaagggtgt gcattaccgg aagtggatca aggacaccat cgtggccaac      780
ccctga                                           786
    
```

20 <210> 2
<211> 1161
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 608 604 T3

atgagagctg caccctcct cctggccagg gcagcaagcc ttagccttgg cttcttgttt 60
ctgctttttt tctggctaga ccgaagtgta ctagccaagg agttgaagtt tgtgactttg 120
gtgtttcggc atggagaccg aagtccatt gacaccttc cactgacct cataaaggaa 180
tcctcatggc cacaaggatt tggccaactc acccagctgg gcatggagca gcattatgaa 240
cttgagagat atataagaaa gagatataga aaattcttga atgagtccta taaacatgaa 300
caggtttata ttcgaagcac agacgttgac cggactttga tgagtgctat gacaaacctg 360
gcagccctgt ttccccaga aggtgtcagc atctggaatc ctatcctact ctggcagccc 420
atcccggctg acacagttcc tctttctgaa gatcagttgc tatacctgcc tttcaggaac 480
tgccctcgtt ttcaagaact tgagagtgg actttgaaat cagaggaatt ccagaagagg 540
ctgcaccctt ataaggattt tatagctacc ttgggaaaac tttcaggatt acatggccag 600
gacctttttg gaatttgagg taaagtctac gaccctttat attgtgagag tgttcacaat 660
ttcactttac cctcctgggc cactgaggac accatgacta agttgagaga attgtcagaa 720
ttgtccctcc tgtccctcta tggaaattcac aagcagaaaag agaaatctag gctccaaggg 780
gggtgcctgg tcaatgaaat cctcaatcac atgaagagag caactcagat accaagctac 840
aaaaaactta tcatgtattc tgcgcatgac actactgtga gtggcctaca gatggcgcta 900
gatgtttaca acggactcct tcctccctat gcttcttgcc acttgacgga attgtacttt 960
gagaaggggg agtactttgt ggagatgtac tatcggaatg agacgcagca cgagccgtat 1020
cccctcatgc tacctggctg cagccctagc tgtcctctgg agaggtttgc tgagctggtt 1080
ggccctgtga tccctcaaga ctggtccacg gagtgtatga ccacaaacag ccatcaaggt 1140
actgaggaca gtacagatta g 1161

- <210> 3
- <211> 261
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 3

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
1 5 10 15
Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
20 25 30
Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
35 40 45
Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
50 55 60
His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
65 70 75 80
Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
85 90 95
Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
100 105 110
Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu

ES 2 608 604 T3

115 120 125
 Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln
 130 135 140
 Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
 145 150 155
 Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu
 165 170 175
 His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val
 180 185 190
 Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr
 195 200 205
 Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Val Leu Gln
 210 215 220
 Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro
 225 230 235 240
 Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr
 245 250 255
 Ile Val Ala Asn Pro
 260

- <210> 4
- <211> 386
- <212> PRT
- 5 <213> Homo sapiens
- <400> 4

Met Arg Ala Ala Pro Leu Leu Leu Ala Arg Ala Ala Ser Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Phe Leu Phe Leu Leu Phe Phe Trp Leu Asp Arg Ser Val Leu Ala
 20 25 30
 Lys Glu Leu Lys Phe Val Thr Leu Val Phe Arg His Gly Asp Arg Ser
 35 40 45
 Pro Ile Asp Thr Phe Pro Thr Asp Pro Ile Lys Glu Ser Ser Trp Pro
 50 55 60
 Gln Gly Phe Gly Gln Leu Thr Gln Leu Gly Met Glu Gln His Tyr Glu
 65 70 75 80
 Leu Gly Glu Tyr Ile Arg Lys Arg Tyr Arg Lys Phe Leu Asn Glu Ser
 85 90 95

ES 2 608 604 T3

Tyr Lys His Glu Gln Val Tyr Ile Arg Ser Thr Asp Val Asp Arg Thr
 100 105 110
 Leu Met Ser Ala Met Thr Asn Leu Ala Ala Leu Phe Pro Pro Glu Gly
 115 120 125
 Val Ser Ile Trp Asn Pro Ile Leu Leu Trp Gln Pro Ile Pro Val His
 130 135 140
 Thr Val Pro Leu Ser Glu Asp Gln Leu Leu Tyr Leu Pro Phe Arg Asn
 145 150 155 160
 Cys Pro Arg Phe Gln Glu Leu Glu Ser Glu Thr Leu Lys Ser Glu Glu
 165 170 175
 Phe Gln Lys Arg Leu His Pro Tyr Lys Asp Phe Ile Ala Thr Leu Gly
 180 185 190
 Lys Leu Ser Gly Leu His Gly Gln Asp Leu Phe Gly Ile Trp Ser Lys
 195 200 205
 Val Tyr Asp Pro Leu Tyr Cys Glu Ser Val His Asn Phe Thr Leu Pro
 210 215 220
 Ser Trp Ala Thr Glu Asp Thr Met Thr Lys Leu Arg Glu Leu Ser Glu
 225 230 235 240
 Leu Ser Leu Leu Ser Leu Tyr Gly Ile His Lys Gln Lys Glu Lys Ser
 245 250 255
 Arg Leu Gln Gly Gly Val Leu Val Asn Glu Ile Leu Asn His Met Lys
 260 265 270
 Arg Ala Thr Gln Ile Pro Ser Tyr Lys Lys Leu Ile Met Tyr Ser Ala
 275 280 285
 His Asp Thr Thr Val Ser Gly Leu Gln Met Ala Leu Asp Val Tyr Asn
 290 295 300
 Gly Leu Leu Pro Pro Tyr Ala Ser Cys His Leu Thr Glu Leu Tyr Phe
 305 310 315 320
 Glu Lys Gly Glu Tyr Phe Val Glu Met Tyr Tyr Arg Asn Glu Thr Gln
 325 330 335
 His Glu Pro Tyr Pro Leu Met Leu Pro Gly Cys Ser Pro Ser Cys Pro
 340 345 350
 Leu Glu Arg Phe Ala Glu Leu Val Gly Pro Val Ile Pro Gln Asp Trp
 355 360 365
 Ser Thr Glu Cys Met Thr Thr Asn Ser His Gln Gly Thr Glu Asp Ser
 370 375 380
 Thr Asp
 385

<210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 gtttgaata aaatTTTT ataataatc 30

5

10

ES 2 608 604 T3

<210> 6
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 6
 aaaaaattga aatatttttttttttttg gaatataaat aat 43

<210> 7
 <211> 750
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 7

Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg
 1 5 10 15
 Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe
 20 25 30
 Phe Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Ser Ser Asn Glu
 35 40 45
 Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu
 50 55 60
 Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu His Asn Phe Thr Gln Ile
 65 70 75 80
 Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln Leu Ala Lys Gln Ile
 85 90 95
 Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu Leu Ala His
 100 105 110
 Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile
 115 120 125
 Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Asn Thr Ser Leu Phe

15

ES 2 608 604 T3

130	135	140
Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile Val Pro Pro 145 150 155 160		
Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr 165 170 175		
Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg Asp Met 180 185 190		
Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val 195 200 205		
Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala Lys Gly 210 215 220		
Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Gly Val Lys 225 230 235		
Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val Gln Arg Gly 245 250 255		
Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr 260 265 270		
Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val Gly 275 280 285		
Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys 290 295 300		
Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg 305 310 315 320		
Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Thr Gly Asn 325 330 335		
Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu Val 340 345 350		
Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Pro 355 360 365		
Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe Gly 370 375 380		
Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg 385 390 395 400		
Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile		

ES 2 608 604 T3

675 680 685

His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser
 690 695 700

Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val Asp
 705 710 715 720

Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala
 725 730 735

Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala
 740 745 750

<210> 8
 <211> 123
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 8

Met Lys Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Met Ala Gly Leu Ala Leu Gln
 1 5 10 15

Pro Gly Thr Ala Leu Leu Cys Tyr Ser Cys Lys Ala Gln Val Ser Asn
 20 25 30

Glu Asp Cys Leu Gln Val Glu Asn Cys Thr Gln Leu Gly Glu Gln Cys
 35 40 45

Trp Thr Ala Arg Ile Arg Ala Val Gly Leu Leu Thr Val Ile Ser Lys
 50 55 60

Gly Cys Ser Leu Asn Cys Val Asp Asp Ser Gln Asp Tyr Tyr Val Gly
 65 70 75 80

Lys Lys Asn Ile Thr Cys Cys Asp Thr Asp Leu Cys Asn Ala Ser Gly
 85 90 95

Ala His Ala Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala
 100 105 110

Leu Gly Leu Leu Leu Trp Gly Pro Gly Gln Leu
 115 120

10
 <210> 9
 <211> 339
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 9

Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
 1 5 10 15

20

ES 2 608 604 T3

Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
 20 25 30
 Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
 35 40 45
 Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
 50 55 60
 Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
 65 70 75 80
 Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
 85 90 95
 Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
 100 105 110
 Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
 115 120 125
 Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
 130 135
 Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
 145 150 155 160
 Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
 165 170 175
 Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
 180 185 190
 Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
 195 200 205
 Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
 210 215 220
 Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys
 245 250 255
 Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Ile His Ala Leu Ile Phe
 260 265 270
 Ala Trp Asn Lys Trp Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp Tyr Thr Pro
 275 280 285
 Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Ile Val Val Leu Ile Phe
 290 295 300
 Lys Ser Ile Leu Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile
 305 310 315 320
 Arg His Gly Trp Glu Asp Val Thr Lys Ile Asn Lys Thr Glu Ile Cys
 325 330 335
 Ser Gln Leu

ES 2 608 604 T3

<210> 10
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 10

Met Gln Arg Arg Leu Val Gln Gln Trp Ser Val Ala Val Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Tyr Ala Val Pro Ser Cys Gly Arg Ser Val Glu Gly Leu Ser Arg
 20 25 30
 Arg Leu Lys Arg Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile
 50 55 60
 Ala Glu Ile His Thr Ala Glu Ile Arg Ala Thr Ser Glu Val Ser Pro
 65 70 75 80
 Asn Ser Lys Pro Ser Pro Asn Thr Lys Asn His Pro Val Arg Phe Gly
 85 90 95
 Ser Asp Asp Glu Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Glu
 100 105 110
 Thr Tyr Lys Glu Gln Pro Leu Lys Thr Pro Gly Lys Lys Lys Gly
 115 120 125
 Lys Pro Gly Lys Arg Lys Glu Gln Glu Lys Lys Lys Arg Arg Thr Arg
 130 135 140
 Ser Ala Trp Leu Asp Ser Gly Val Thr Gly Ser Gly Leu Glu Gly Asp
 145 150 155 160
 His Leu Ser Asp Thr Ser Thr Thr Ser Leu Glu Leu Asp Ser Arg Arg
 165 170 175

10

<210> 11
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 11

ES 2 608 604 T3

Met Lys Thr Asn Asp Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro
 1 5 10 15
 Glu Lys Ser Leu Asp Lys Glu His Arg Cys Ile Val Arg His Glu Asn
 20 25 30
 Asn Lys Asn Gly Val Asp Gln Glu Ile Ile Phe Pro Pro Ile Lys Thr
 35 40 45
 Asp Val Ile Thr Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn
 50 55 60
 Asp Thr Leu Leu Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr
 65 70 75 80
 Leu Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys
 85 90 95
 Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
 100 105 110

5 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

10 Cys Leu Ala Ala Gly Ile Thr Tyr Val
 1 5

15 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

20 Ile Met Asn Asp Met Pro Ile Tyr Met
 1 5

25 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

30 Val Leu Ala Gly Val Gly Phe Phe Ile
 1 5

35 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15

ES 2 608 604 T3

Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
 1 5

5 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Lys Leu Phe Gly Val Leu Arg Leu Lys
 1 5

10
 15 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly Ile
 1 5

20
 25 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Ser Val Ser Glu Ser Asp Thr Ile Arg Ser Ile Ser Ile Ala Ser
 1 5 10 15

30
 35 <210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Leu Leu Ala Asn Gly Arg Met Pro Thr Val Leu Gln Cys Val Asn
 1 5 10 15

40
 45 <210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Arg Met Pro Thr Val Leu Gln Cys Val Asn Val Ser Val Val Ser
 1 5 10 15

50 <210> 21
 <211> 103

ES 2 608 604 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

5

Met Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala
1 5 10 15
Lys Arg His Arg Lys Val Leu Arg Asp Asn Ile Gln Gly Ile Thr Lys
20 25 30
Pro Ala Ile Arg Arg Leu Ala Arg Arg Gly Gly Val Lys Arg Ile Ser
35 40 45
Gly Leu Ile Tyr Glu Glu Thr Arg Gly Val Leu Lys Val Phe Leu Glu
50 55 60
Asn Val Ile Arg Asp Ala Val Thr Tyr Thr Glu His Ala Lys Arg Lys
65 70 75 80
Thr Val Thr Ala Met Asp Val Val Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg
85 90 95
Thr Leu Tyr Gly Phe Gly Gly
100

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

10

15

Thr Met Asn Gly Ser Lys Ser Pro Val Gly
1 5 10

20

REIVINDICACIONES

1. Un virus MVA recombinante que codifica un polipéptido que comprende un antígeno prostático específico (PSA) humano y un polipéptido que comprende un antígeno de la fosfatasa ácida prostática (PAP) humana.
- 5 2. El virus MVA recombinante de la reivindicación 1, en donde el virus MVA comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 y/o de SEQ ID NO: 2.
3. El virus MVA recombinante de la reivindicación 1 o 2, en donde el MVA es MVA-BN depositado en la ECACC bajo el número V00083008.
4. El MVA recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en la profilaxis y/o el tratamiento de un cáncer mediado por células que sobre-expresan PSA y/o PAP.
- 10 5. El MVA recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el cáncer es cáncer de próstata y/o metástasis del cáncer de próstata.
6. El MVA recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, en donde el MVA recombinante se administra antes de, al mismo tiempo que o después de una dosis tumoricida de un taxano.
7. El MVA recombinante para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el taxano es docetaxel o paclitaxel.
- 15 8. El MVA recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 7 en un método para inducir respuestas inmunes de células B y de células T contra PSA y/o PAP, que comprende administrar a un paciente una dosis de cebado de dicho MVA recombinante y una o más dosis de refuerzo de dicho MVA recombinante.
- 20 9. El MVA recombinante para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde una dosis de cebado de 1×10^8 TCID₅₀ y dos dosis de refuerzo de 2×10^8 y 4×10^8 TCID₅₀ se administran al paciente, dándolas preferentemente a las cuatro y ocho semanas después de la dosis de cebado.
10. Una composición inmunogénica que comprende un virus MVA recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
11. Un kit que comprende el MVA recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 25 12. El kit de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende, además:
 - (i) instrucciones para administrar el MVA recombinante antes de la detección del cáncer de próstata;
 - (ii) instrucciones para administrar el MVA recombinante a un paciente de cáncer de próstata;
 - (iii) instrucciones para administrar el MVA recombinante a un paciente de cáncer de próstata antes de, al mismo tiempo que o después del tratamiento con una dosis tumoricida de un taxano, o
 - 30 (iv) instrucciones para administrar el MVA recombinante para la profilaxis de la metástasis del cáncer de próstata después de detectar un aumento de un marcador asociado a células de tumor de próstata.
- 35 13. El virus MVA recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso como un medicamento contra el cáncer.

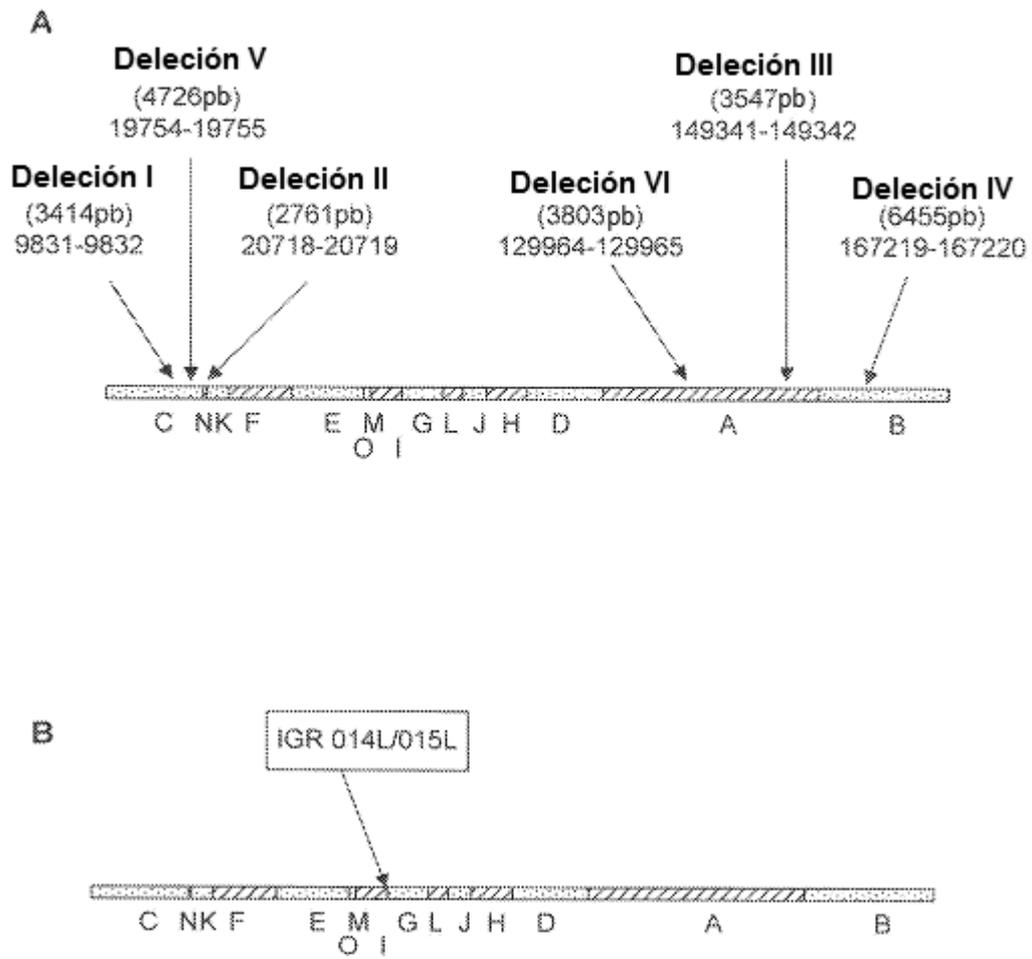


FIGURA 1

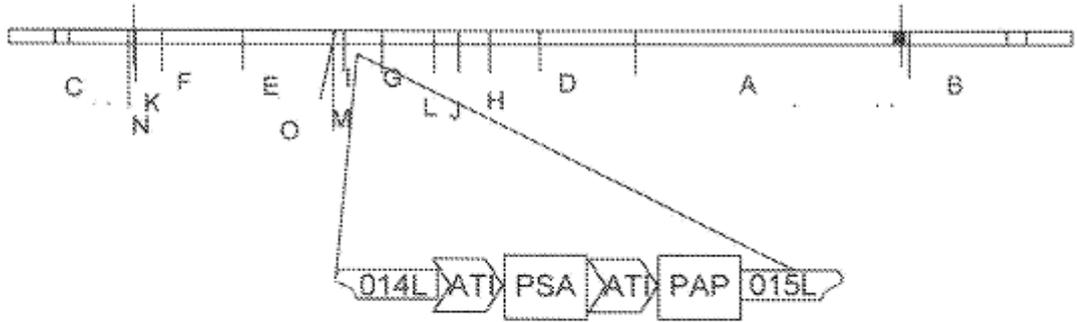


FIGURA 2

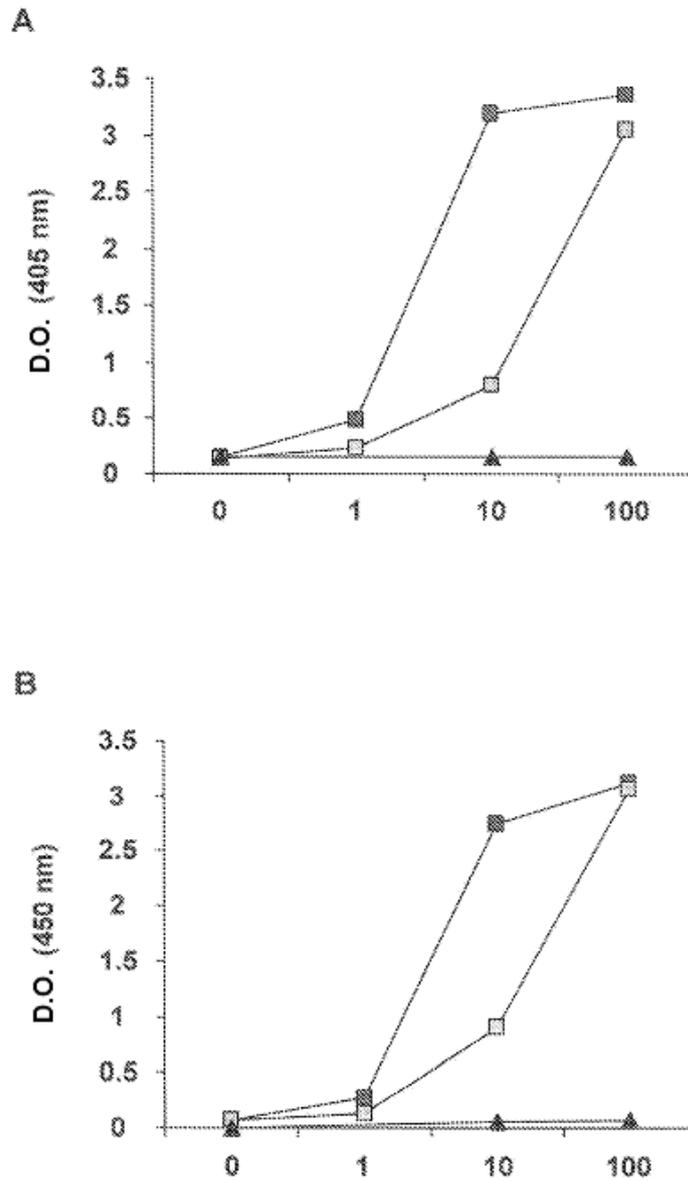


FIGURA 3

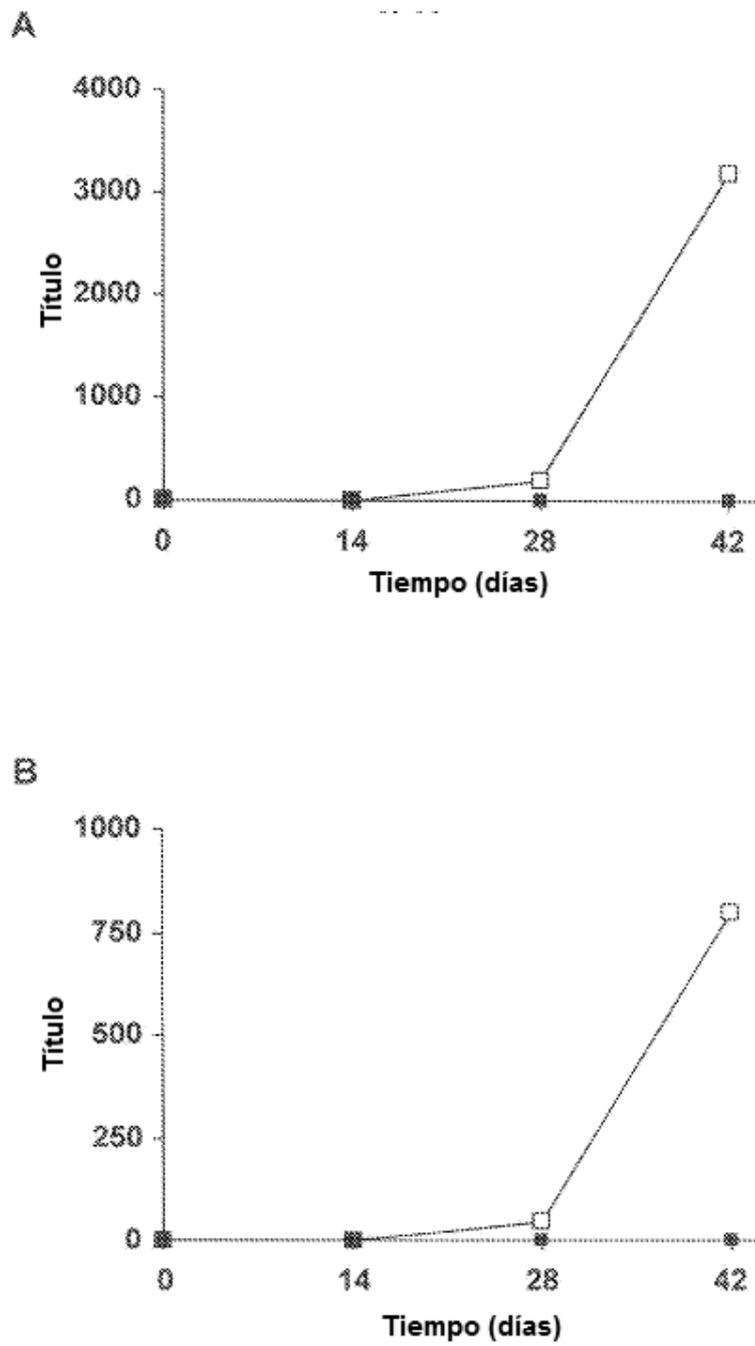


FIGURA 4

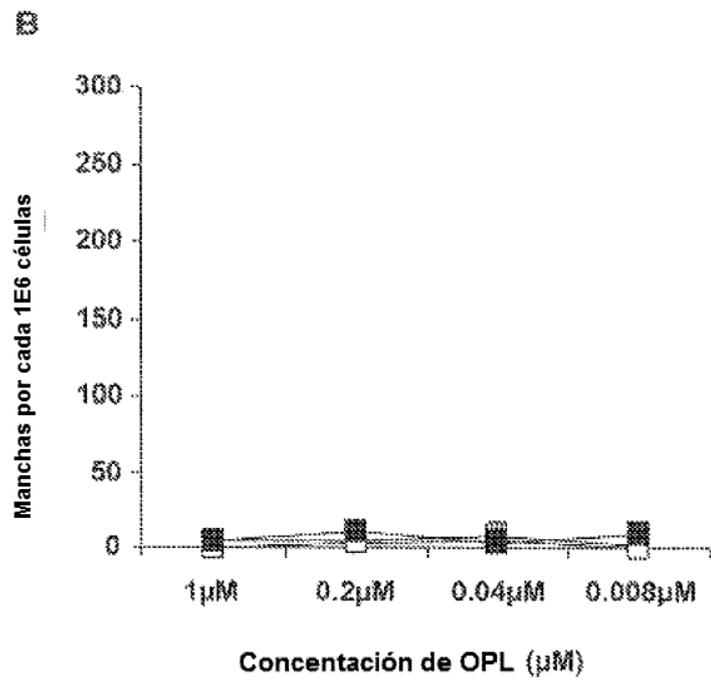
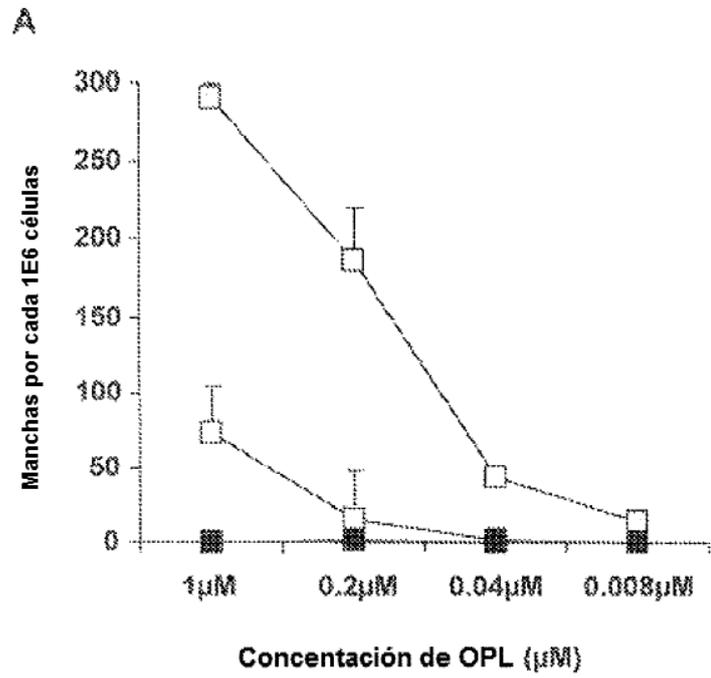


FIGURA 5

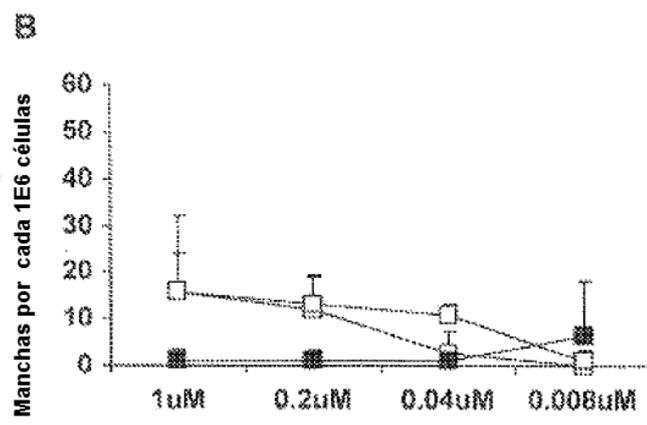
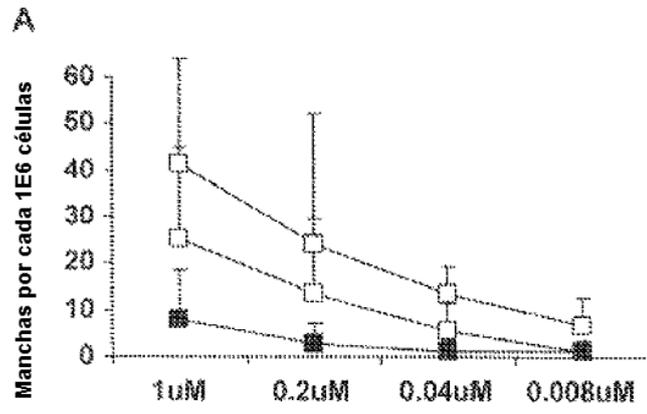


FIGURA 6

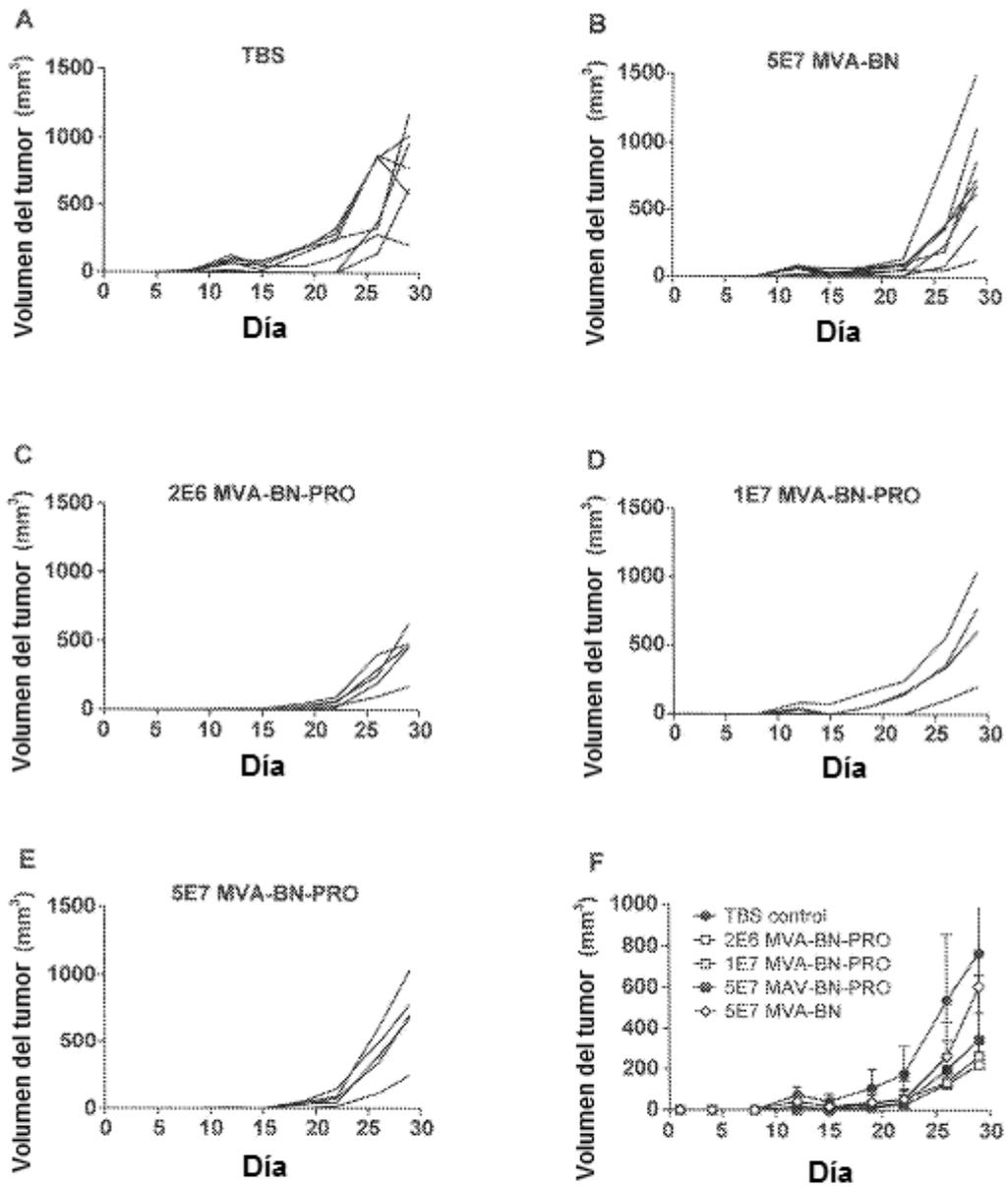


FIGURA 7

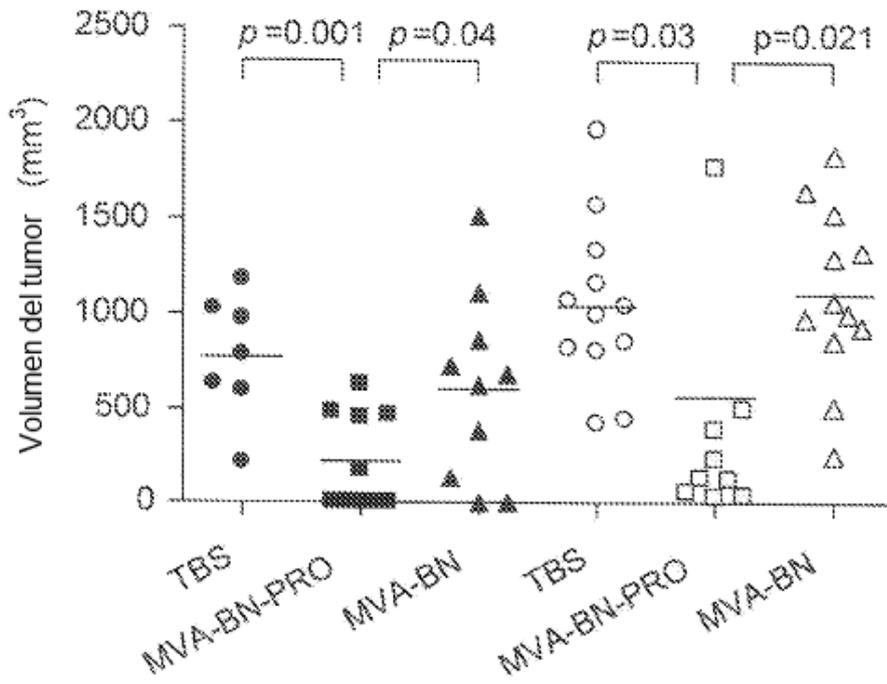


FIGURA 8

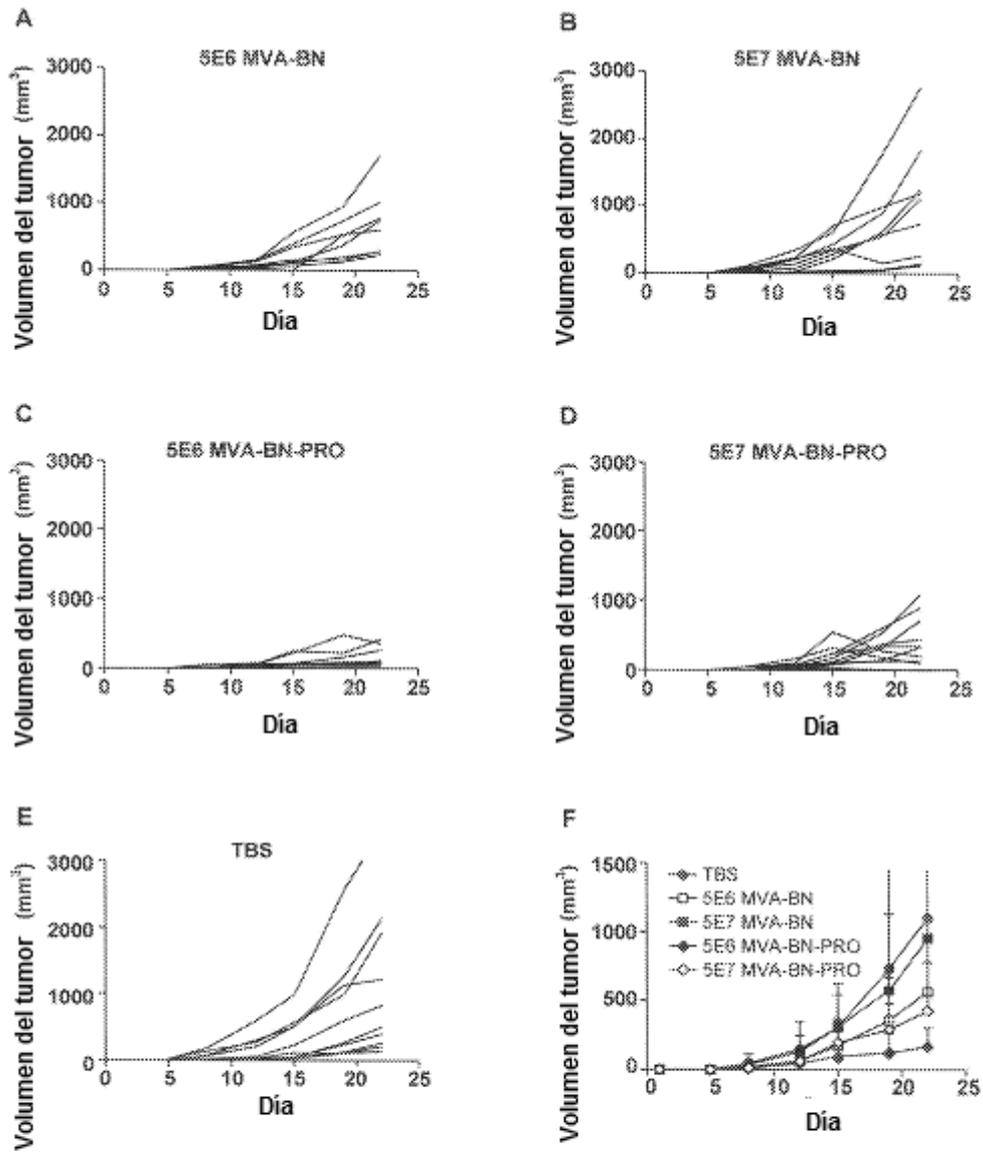


FIGURA 9

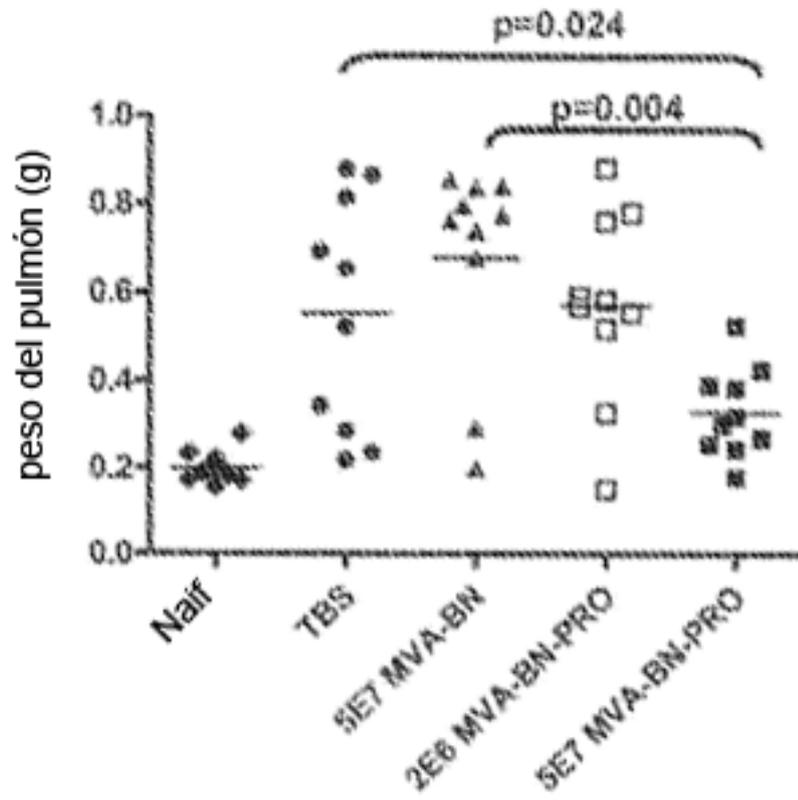


FIGURA 10

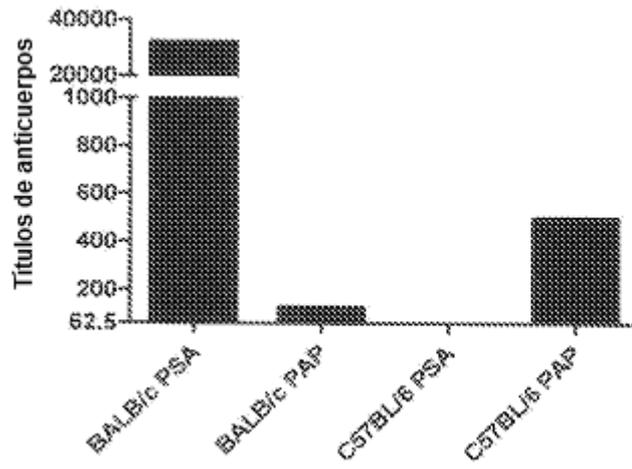


FIGURA 11

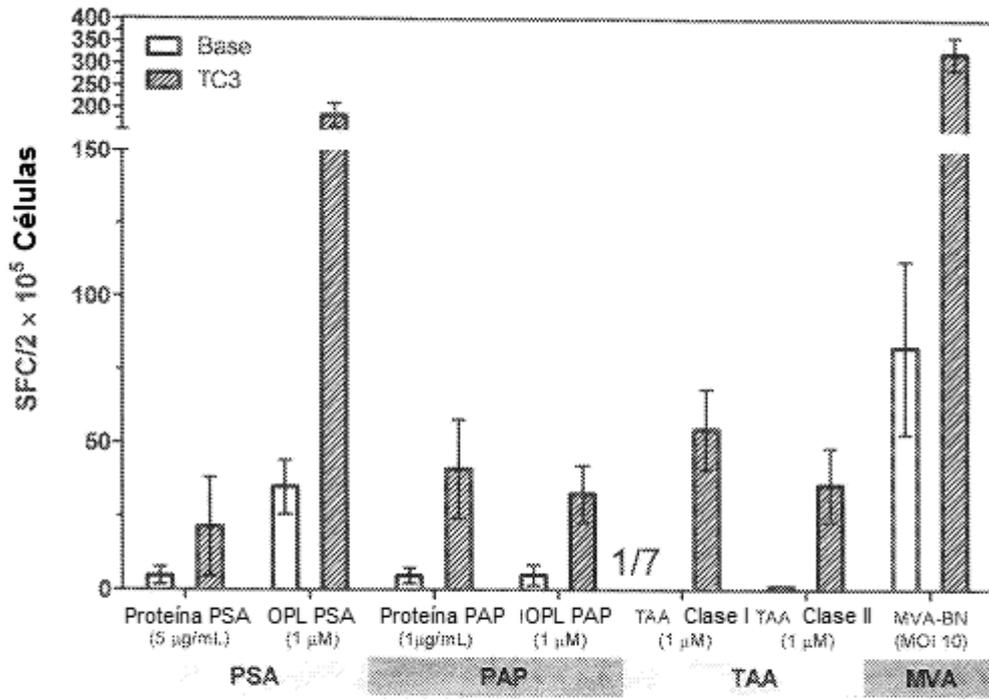


FIGURA 12