

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 812**

51 Int. Cl.:

<b>C07H 21/02</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 7/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/86</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2004 PCT/US2004/038643**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2005 WO05046622**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2004 E 04811370 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 1687322**

54 Título: **Vectores a medida para tratar y prevenir cáncer pancreático**

30 Prioridad:

**12.11.2003 US 519354 P**

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

**12.07.2017**

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%)  
NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, OFFICE OF TECHNOLOGY TRANSFER, 6011 EXECUTIVE B ROCKVILLE, MD 20085, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 623 812 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**

Vectores a medida para tratar y prevenir cáncer pancreático

**CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se refiere al campo de las inmunizaciones y al uso de inmunoterapia dirigida para afectar la aparición de la enfermedad y/o progresión de la enfermedad para cáncer pancreático. La presente invención también se refiere a inmunoterapia del cáncer humano.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10 El cáncer pancreático es la cuarta causa más frecuente de muertes por cáncer en hombres y mujeres en los Estados Unidos. La Sociedad Americana del Cáncer estima que en los Estados Unidos en 2003 habrá 30.700 nuevos casos de cáncer pancreático y 30.000 muertes. Así, el pronóstico del cáncer pancreático es extremadamente malo.

15 El cáncer del páncreas generalmente se desarrolla sin síntomas iniciales. Si un cáncer se desarrolla en un área del páncreas cerca del conducto biliar común, su bloqueo puede conducir a ictericia (amarilleamiento de la piel y los ojos debido a la acumulación de pigmento). Algunas veces, este síntoma permite que el tumor se diagnostique en una etapa relativamente temprana. Actualmente, solo la biopsia da un cierto diagnóstico. Debido a la evolución temprana "silenciosa" de la enfermedad, la necesidad de biopsia puede llegar a ser obvia solo con enfermedad avanzada.

El fumar cigarrillos y puros aumentan el riesgo de cáncer pancreático; las tasas de incidencia son superiores a dos veces más altas para fumadores que para no fumadores. Otros factores de riesgo incluyen obesidad, inactividad física, pancreatitis crónica, diabetes y cirrosis. Las tasas de cáncer pancreático son más altas en países cuyas poblaciones toman una dieta rica en grasas. Las tasas son ligeramente más altas en hombres que en mujeres.

20 La cirugía, radioterapia y quimioterapia son las opciones de tratamiento actuales. Dependiendo de la etapa del cáncer pancreático, pueden usarse dos o incluso tres tipos de tratamiento, tanto simultáneamente como secuencialmente. Sin embargo, aunque estos tratamientos pueden prolongar la supervivencia y/o aliviar los síntomas en muchos pacientes, raramente producen una cura.

25 Además de la mala eficacia de los tratamientos actualmente disponibles, estas opciones actuales también están asociadas a efectos secundarios significativos. Hay dos tipos de cirugía para el cáncer pancreático, dependiendo del objetivo del tratamiento. Si el tumor es lo suficiente pequeño como para que haya una probabilidad de que pueda ser eliminado, entonces el objetivo puede ser extirpar completamente el tumor. Sin embargo, el cáncer puede haber ya metastatizado, en cuyo caso incluso la eliminación completa del tumor no presentará una cura. El segundo tipo de cirugía es la cirugía paliativa, que se usa cuando el cáncer está demasiado diseminado como para ser completamente eliminado, y está diseñada para aliviar los síntomas o prevenir otros problemas futuros.

30 La radioterapia es el tratamiento con rayos de energía alta tales como rayos X para destruir o encoger células cancerosas, usando tanto una fuente interna como externa. La radiación, frecuentemente combinada con la quimioterapia, puede usarse para pacientes cuyos tumores están demasiado diseminados para eliminarse quirúrgicamente. Efectos secundarios de la radioterapia incluyen cambios leves de la piel que parecen quemadura solar o bronceado, dolor de estómago, diarrea y cansancio.

35 Se usa una amplia variedad de fármacos para la quimioterapia del cáncer pancreático. Los efectos secundarios dependen del tipo de fármacos administrados, la dosificación y la duración del tratamiento. Efectos secundarios temporales incluyen náuseas y vómitos, pérdida del apetito, pérdida del pelo y llagas. Bajas cifras de células sanguíneas del tratamiento pueden producir un aumento del riesgo de infección, hemorragia o cardenales después de cortes menores, y fatiga. Además, el dolor puede ser un problema real para los pacientes con cáncer pancreático.

Por consiguiente, existe la necesidad de métodos de prevención y tratamiento mejorados de cáncer pancreático.

40 Como resultado de los avances en la genética y genómica molecular, se ha identificado que varios genes participan en el cáncer pancreático. Por tanto, sería ventajoso desarrollar un tratamiento para utilizar la información específica que puede obtenerse de análisis genéticos y de expresión, para desarrollar métodos de tratamiento más eficaces que los actualmente disponibles.

45 Un enfoque reciente al tratamiento del cáncer es la inmunoterapia, que se basa en la observación de que las células tumorales humanas expresan una variedad de antígenos asociados a tumor (AAT) que no se expresan o que son mínimamente expresados en tejidos normales. Estos antígenos, que incluyen antígenos de tumor viral, proteínas de oncogén celular y antígenos de diferenciación específica de tejido, pueden servir de dianas para el sistema inmunitario del huésped y provocar respuestas que producen la destrucción de tumor. Esta respuesta inmunitaria está principalmente mediada por linfocitos; los linfocitos T en general y los linfocitos T citotóxicos limitados al MHC de clase I en particular desempeñan una función central en el rechazo tumoral. Desafortunadamente, como se evidencia por la alta incidencia de cáncer en la población, la respuesta inmunitaria a las células neoplásicas frecuentemente deja de eliminar tumores. El objetivo de la inmunoterapia activa del cáncer es aumentar las

respuestas antitumorales, particularmente las respuestas de linfocitos T, con el fin de efectuar destrucción tumoral completa.

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

10 La clonación de genes que codifican AAT ha abierto nuevas posibilidades para la inmunoterapia del cáncer basada en el uso de vacunas contra el cáncer recombinantes o sintéticas: Tsang et al., J. Natl. Cancer Inst. 87: 982-90 (1995); Kawakami et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:6458-62 (1994). En los últimos años, se ha invertido mucho esfuerzo en la terapia génica como un medio para combatir el cáncer. El término "terapia génica" se ha usado para describir una amplia variedad de métodos usando técnicas de biotecnología recombinante para administrar diferentes materiales a una célula. Tales métodos incluyen, por ejemplo, la administración de un gen, ARN antisentido, un agente citotóxico, etc., por un vector a una célula de mamífero, preferentemente una célula humana tanto *in vivo* como *ex vivo*. La mayor parte del trabajo inicial se ha centrado en el uso de vectores retrovirales para transformar estas células. Este centro ha resultado de la capacidad de los retrovirus para infectar células y tener su material genético integrado en la célula huésped con alta eficiencia. El vector retroviral normalmente es un virus modificado tal como el virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV), que ha tenido sus secuencias de encapsidación delecionadas para prevenir la encapsidación del genoma retroviral entero.

15 Sin embargo, se ha informado de numerosas dificultades con retrovirus. Un problema que se ha desarrollado se observó inicialmente como una ventaja clave del virus, concretamente, la capacidad del virus de integrarse en el cromosoma. Sin embargo, tal integración puede ser problemática, dependiendo del sitio cromosómico de inserción viral. También han resultado tener esta propiedad varios otros virus que se creyó inicialmente que eran ampliamente episómicos en la naturaleza tales como virus adenoasociados (AAV). Aunque es ventajoso en causar la expresión a largo plazo, también proporciona las posibilidades de problemas tales como transformación celular no deseable. La transformación estable de las células somáticas de un paciente dificulta invertir la pauta de tratamiento si efectos secundarios no deseables imponen que debe detenerse.

20 También se han encontrado problemas en infectar ciertas células. Los retrovirus normalmente entran en las células mediante receptores de la superficie celular. Si tales receptores no están presentes sobre la célula, o no están presentes en números suficientes, entonces la infección puede no ser posible, o puede ser ineficiente. Estos virus también son relativamente lábiles en comparación con otros virus. También se ha informado de brotes de virus no mutantes de líneas celulares productoras de virus, causando el propio vector una enfermedad. Además, muchos de estos virus solo permiten la expresión génica en células en división. Vectores virales basados en lentivirus tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) no tienen estos problemas, pero siguen existiendo problemas sobre el uso de tales virus como vectores.

25 Se han propuesto otros virus como vectores, tales como el virus del herpes. Además, se han propuesto diversos vectores no virales tales como conjugados de ligando-ADN. Sin embargo, estos enfoques plantean todos ciertos problemas. Por ejemplo, un vector no debe él mismo llegar a ser una posible fuente de infección para el individuo tratado. Sin embargo, como ya se ha mencionado, se ha informado de brotes de retrovirus no mutantes en algunas líneas celulares. Similarmente, se ha encontrado que el uso del virus del herpes como vector produce la persistencia del virus. Además, muchos de estos vectores pueden contener y expresar solo una cantidad relativamente pequeña de material genético. Esto no es deseable para numerosas situaciones en las que se prefiere la capacidad para expresar múltiples productos.

30 Se han usado poxvirus durante muchos años como vectores, particularmente con respecto a proporcionar un antígeno extraño o auto-antígeno para generar una respuesta inmunitaria en un huésped. Las ventajas de los vectores de poxvirus incluyen: (i) facilidad de generación y producción; (ii) el gran tamaño del genoma que permite la inserción de múltiples genes; (iii) eficiente administración de genes a múltiples tipos de células, que incluyen células presentadoras de antígenos; (iv) altos niveles de expresión de proteínas; (v) presentación de antígenos óptima al sistema inmunitario; (vi) capacidad de provocar respuestas inmunitarias celulares, además de respuestas de anticuerpos; y (vii) la experiencia a largo plazo obtenida usando este vector en seres humanos como vacuna contra la viruela.

35 La atención se ha centrado en orthopox tales como Wyeth, NYVAC (patente de EE.UU. N.º 5.364.773) y variolovacuna Ankara modificada (MVA). MVA se derivó de la variolovacuna Ankara cepa CVA-1 que se usó en los años 50 como vacuna de la viruela. En 1958, se iniciaron experimentos de atenuación en el laboratorio del Dr. Anton Mayr (Universidad de Munich), que comprendieron dilución terminal de CVA en células de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) que por último lugar produjeron más de 500 pases. El MVA resultante es un virus defectuoso en la replicación atenuado, que está limitado a la replicación principalmente en células aviares. La comparación del genoma de MVA con su parental, CVA, reveló 6 delecciones principales de ADN genómico (delección I, II, III, IV, V y VI), ascendiendo a 31.000 pares de bases. Meyer et al., J. Gen. Virol. 72:1031-8 (1991). El MVA se ha administrado a numerosas especies de animal, que incluyen monos, ratones, cerdos, ovejas, ganado vacuno, caballos y elefantes sin efectos adversos locales o sistémicos. Más de 120.000 seres humanos han sido vacunados con seguridad con MVA por inyecciones intradérmicas, subcutáneas o intramusculares. También se ha informado que el MVA es

avirulento entre animales normales e inmunodeprimidos (Mayr et al., Zentralb. Bakteriologie. 167:375-90 (1978). Por consiguiente, además de la utilidad como vacuna de la viruela, las cepas más atenuadas son poxvirus particularmente atractivos para su uso como vectores para la modulación inmunitaria y terapia génica.

5 Por consiguiente, los poxvirus pueden ser genéticamente manipulados para contener y expresar ADN extraño con o sin alteración de la capacidad del virus que va a replicarse. Tal ADN extraño puede codificar antígenos de proteína que inducen una protección inmunitaria en un huésped inoculado con tales poxvirus recombinantes. Por ejemplo, los virus de la variolovacuna recombinantes han sido manipulados para expresar antígenos inmunizantes del virus del herpes, hepatitis B, rabia, gripe, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y otros virus (Kieny et al., Nature 312:163-6 (1984); Smith et al., Nature 302: 490-5 (1983); Smith et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:7155-9 (1983);  
10 Zagury et al., Nature 326:249-50 (1987); Cooney et al., Lancet 337:567-72 (1991); y Graham et al., J. Infect. Dis. 166:244-52 (1992)). También se ha mostrado que los virus de la variolovacuna recombinantes provocan respuestas inmunitarias contra el virus de la gripe, virus del dengue, virus respiratorio sincitial y virus de la inmunodeficiencia humana. El documento WO 01/24832 desvela virus de la variolovacuna recombinante que codifica antígenos asociados a tumor MUC-1 y CEA en vectores separados para el tratamiento del cáncer. También se han usado  
15 poxvirus para generar reacciones inmunitarias contra antígenos asociados a tumor tales como EEA, PSA y MUC. Véase también la patente de EE.UU. N.º 5.656.465.

Sin embargo, debido a que los poxvirus son virus citoplásmicos y así el ADN no se integra generalmente en los cromosomas de la célula huésped, los vectores de pox no son normalmente la primera elección para terapia génica donde se necesita una fuente continua de un agente durante un periodo de tiempo prolongado.

20 En vista del muy mal pronóstico del cáncer pancreático, y la ausencia de una supervivencia significativa proporcionada por los tratamientos actualmente disponibles, existe la necesidad de métodos de tratamiento mejorados para el cáncer pancreático.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

25 Los presentes inventores han descubierto ahora un nuevo método de tratamiento del cáncer pancreático en seres humanos que implica el uso de poxvirus recombinantes que contienen antígenos asociados a tumor pancreático y moléculas inmunomoduladoras. Por consiguiente, en el presente documento se desvela un sistema para cribar individuos para identificar aquellos en riesgo de desarrollar o padecer cáncer pancreático. El sujeto puede ser un ser humano.

30 La presente invención se define por las reivindicaciones. El sistema de la presente invención comprende administrar a un individuo en riesgo de desarrollar o padecer cáncer pancreático un primer poxvirus recombinante, y administrar a intervalos regulares a partir de aquí un segundo poxvirus recombinante, en el que el primer y segundo poxvirus recombinantes comprenden cada uno al menos un gen que codifica los antígenos asociados a tumor pancreático (AATP) CEA y MUC-1, o una porción antigénica o versión modificada de los mismos como se define en las reivindicaciones. Variantes preferidas incluyen wCEA(6D) y wMUC-1(6). Otras variantes preferidas tienen cambios de secuencia para crear un epítipo de CTL más inmunogénico. Preferentemente, el segundo poxvirus recombinante es de un género diferente que el primer poxvirus recombinante. Los genes que codifican los AATP se insertan preferentemente en una región no esencial del genoma del poxvirus. Poxvirus preferidos incluyen orthopox, tales como variolovacuna, y avipox, tales como viruela aviar y viruela del canario.

40 La invención también proporciona la co-administración de factor estimulante de granulocitos-macrófagos con los poxvirus recombinantes, además de la co-administración de moléculas inmunomoduladoras, tales como al menos una molécula coestimulante, tal como LFA-3, ICAM-1 y B7.1. Preferentemente, se usa una combinación de LFA-3, ICAM-1 y B7.1 (denominada TRICOM™).

45 Debido a su gran genoma, los poxvirus recombinantes según la presente invención pueden construirse como un único vehículo para administrar todas las moléculas terapéuticamente necesarias, que incluyen antígenos asociados al cáncer pancreático y/o moléculas coestimulantes, en el mismo vector.

En una realización, el sistema comprende administrar a un individuo una "sensibilización" inicial con una composición que contiene uno o más poxvirus recombinantes que llevan los AATP, seguido de uno o preferentemente múltiples "refuerzos" con una composición que contiene uno o más vectores de poxvirus que llevan los AATP.

50 La vacunación de sensibilización inicial puede comprender uno o más vectores de poxvirus. En una realización preferida, se usa un único vector de poxvirus para la administración de los AATP y moléculas coestimulantes. En otra realización, dos o más vectores de poxvirus comprenden la vacunación de sensibilización, que se administran simultáneamente en una única inyección. Por ejemplo, administrar simultáneamente a un huésped una mezcla de dos vectores de poxvirus, al menos uno de los cuales es competente para la replicación. Si ambos vectores son defectuosos en la replicación, entonces no tantas células serán transducidas por ambos virus. Un ejemplo de una estrategia de mezcla es usar un primer vector que comprende un ADN que codifica los antígenos asociados al  
55 cáncer pancreático y un segundo vector que comprende un ADN que codifica al menos uno, preferentemente tres, moléculas coestimulantes tales como TRICOM.

Las vacunaciones de refuerzo también pueden comprender uno o más vectores de poxvirus. En una realización preferida, se usa un único vector de poxvirus para la administración de los AATP y moléculas coestimulantes de la vacunación de refuerzo. En otra realización, dos o más vectores de poxvirus comprenden la vacunación de refuerzo, que se administra simultáneamente en una única inyección, como se ha descrito anteriormente como la estrategia de mezcla.

En una realización preferida, pueden usarse diferentes poxvirus para proporcionar un protocolo de sensibilización/refuerzo heterólogo usando vectores de pox que llevan diferentes conjuntos de moléculas terapéuticas, para inoculaciones a diferentes intervalos de tiempo. Una combinación de sensibilización/refuerzo heteróloga preferida es sensibilizar con una primera composición de vector de orthopox y reforzar con una segunda composición de vector de avipox. El vector de refuerzo puede administrarse cada 2-4 semanas, por ejemplo, durante un total de al menos 5-15 vacunaciones de refuerzo. Por ejemplo, el protocolo de 3 administraciones de la variolovacuna a intervalos regulares, por ejemplo, mensualmente, seguido de múltiples administraciones de viruela aviar a intervalos regulares, por ejemplo, mensualmente. En una realización preferida, el orthopox es variolovacuna, más preferentemente una variolovacuna tal como Wyeth o MVA o NYVAC. También pueden añadirse otros componentes al protocolo tal como administración de refuerzo o sensibilización adicional, de ADN o proteína. En una realización alternativa, los genes pueden estar en múltiples vectores de poxvirus que se administran a aproximadamente el mismo tiempo, en vez de en un único vector.

Puede usarse cualquier antígeno asociado a tumor pancreático en el presente sistema de vector. CEA, MUC-1, mini-MUC y las mucinas, que incluye MUC-4, son AATP particularmente preferidos.

La lista de antígenos asociados a tumor pancreático continúa aumentando. Antígenos asociados al cáncer pancreático preferidos para su uso en la presente invención incluyen CEA, también denominado antígeno carcinoembrionario (Clin. Cancer Res. 6:4176-85, 2000); MUC-1 (Marshall et al., J Clin Oncol. 18:3964-73 (2000)); mini-MUC-1; GM-CSF (patente de EE.UU. N.º 6.350.455); MUC-4 (solicitud de patente publicada de EE.UU. N.º 20020150894); MUC-2; MUC-3; MUC-5AC; MUC-5B; MUC-6; MUC-7; MUC-11; MUC-12; k-ras (patente de EE.UU. N.º 6.350.455; patente de EE.UU. N.º 5.985.290); péptidos ras, que incluyen péptidos que se corresponden con la mutación alojada en un tumor de individuo (Chiba et al., Oncogene 5:1603-10 (1990); Mitsudomi et al., Cancer Res. 51:4999-5002 (1991)); gastrina, que incluye el péptido de gastrina G17 (solicitud de patente de EE.UU. de número de serie 10/104.607, publicada como la solicitud N.º 20030091574; Brett et al., J Clin Oncol. 20:4225-31 (2002)); receptor de CCK-B/gastrina (ídem); componentes antigénicos de Viulizin® (Liu et al., Int. J. Oncol. 16:1015-20 (2000); Ferdinandi et al., Exp. Opin. Invest. Drugs 8:1721-35 (1999), solicitud publicada de EE.UU. N.º 20010009680; Anticancer Drugs. 2003 Apr;14(4):289-94; Cancer Chemotherapy and Pharmacology, Volumen 51, edición 3, páginas 247-255, 2003); HER2/neu (patente de EE.UU. N.º 5.550.214); receptor de HER2 (patente de EE.UU. N.º 5.772.997); mammoglobulina (patente de EE.UU. N.º 5.922.836; Aihara et al., Cancer Letters 150: 79-84 (2000)); interferón alfa; TNF alfa; inmunotoxina LMP-9 (Bigner et al., Clin Cancer Res. 1995 Dec;1(12):1545-55); CAA-P (<http://www.scrippsllabs.com/biochemicals.html#cancer>); PANC1A y PANC1B (patentes de EE.UU. N.º 5.998.165 y 5.840.870); y polipéptidos expresados por cualquiera de los genes del cáncer pancreático descritos en las siguientes patentes de EE.UU. y solicitudes publicadas: solicitud publicada de EE.UU. N.º 20010016651; patente de EE.UU. N.º 6.262.249; solicitud publicada de EE.UU. N.º 20020111308; solicitud publicada de EE.UU. N.º 20020082207; solicitud publicada de EE.UU. N.º 20020076721; solicitud publicada de EE.UU. N.º 20030091574; solicitud publicada de EE.UU. N.º 20030073144; 20020137911. Se seleccionan porciones de los mismos que producirán reacciones de MHC-1 o 2. El intento es estimular tanto una respuesta de linfocitos T CD4+ como una respuesta de linfocitos T CD8+.

En una realización preferida, los antígenos insertados en el poxvirus, que incluyen los AATP, pueden modificarse para potenciar su capacidad para provocar una reacción inmunitaria.

Puede usarse cualquier poxvirus con la presente invención. Se prefieren poxvirus atenuados o alterados en la replicación tales como avipox, viruela porcina y orthopox atenuado. En una realización preferida, el vector de pox es un orthopox atenuado tal como MVA o NYVAC.

En otra realización, el poxvirus recombinante que codifica el (los) antígeno(s) asociado(s) al cáncer pancreático también codifica al menos una molécula coestimulante. Se conocen moléculas coestimulantes en la técnica e incluyen B7 y otros activadores de CD4+ y CD8+. En una realización preferida, la molécula coestimulante es una combinación de ácidos nucleicos que codifica B7 (por ejemplo, B7-1), ICAM-1 y LFA-3, también conocida como TRICOM, que induce la activación de tanto linfocitos T CD4+ como CD8+. En una realización preferida, un ácido nucleico que codifica OX40L se añade al vector de poxvirus, además de la combinación de TRICOM.

En una realización preferida, ambos ácidos nucleicos que codifican el (los) antígeno(s) asociado(s) a tumor seleccionado(s) y la(s) molécula(s) coestimulante(s) se insertan en el mismo vector de poxvirus. Sin embargo, todavía puede usarse un sistema de vector de poxvirus que comprende múltiples vectores de poxvirus que se administran a estrechos intervalos (por ejemplo, de algunos días a una semana) entre sí.

En una realización tal, los ácidos nucleicos que codifican el (los) antígeno(s) de tumor y molécula(s) coestimulante(s) se insertan en dos vectores de poxvirus diferentes. El primer y segundo vectores de poxvirus pueden ser de

- diferentes géneros de pox, que permiten inoculaciones consecutivas de los dos vectores recombinantes sin invocar la posible reacción inmunitaria del huésped contra el vector viral. El primer y segundo vectores de poxvirus recombinantes pueden administrarse al individuo en necesidad de los mismos simultáneamente o a intervalos que oscilan de horas a días o incluso semanas. Por ejemplo, una realización preferida del sistema usa una sensibilización/refuerzo adaptada al estado de enfermedad. Por ejemplo, la sensibilización puede ser dirigida a un amplio intervalo de antígenos asociados al cáncer pancreático, aprovechando la capacidad del genoma de pox para acomodar múltiples genes extraños. El refuerzo puede dirigirse a antígenos específicos para la etapa particular de la enfermedad. Por ejemplo, monitorizando la progresión de la enfermedad podría adaptarse un refuerzo para generar una reacción inmunitaria específica que refleja la expresión del antígeno para esa etapa particular de la enfermedad.
- 5 En una realización preferida, el antígeno de tumor que codifica vector de poxvirus recombinante se administra primero y TRICOM o TRICOM y OX40L se administran consiguientemente. En otra realización, la(s) molécula(s) coestimulante(s) que contiene(n) vector de poxvirus recombinante se administra(n) antes de administrar el (los) antígeno(s) que contienen el vector de poxvirus.
- 10 En una realización preferida, se administra GM-CSF al paciente antes de la administración de antígeno inicial. Puede administrarse GM-CSF usando un vector viral o una proteína aislada en una formulación farmacéutica. Están disponibles varias formas de fármaco de GM-CSF recombinante en el mundo, que incluyen sargramostim, que se comercializa con la marca LEUKINE<sup>®</sup> en los Estados Unidos por Berlex, Inc.
- 15 En una realización preferida, el antígeno de cáncer pancreático usado se adapta preferentemente según las necesidades de un paciente individual determinando qué antígenos están siendo expresados a altos niveles en las células cancerosas del paciente. El tipo y la etapa presente del cáncer pancreático se evalúan usando, por ejemplo, métodos histoquímicos y/o inmunohistoquímicos y/o patrón de transcripción y/o análisis de mutaciones de las células cancerosas.
- 20 También se describe en el presente documento un sistema de tratamiento de cáncer pancreático que comprende perfilar la expresión de una muestra de células tumorales obtenida de un individuo, administrar un vector de poxvirus recombinante que comprende un primer conjunto de antígenos de tumor y/o moléculas coestimulantes, seleccionados basándose en el análisis de las células tumorales/tipo en la primera etapa del tratamiento, y administrar dichos vectores al individuo. Puede realizarse el perfil de expresión de las posibles células tumorales, para construir un segundo poxvirus recombinante que expresa un segundo conjunto de antígenos asociados a tumor y/o moléculas coestimulantes para administración al individuo.
- 25 En el presente documento se describe además un sistema para prevenir o retrasar la aparición de cáncer pancreático en un individuo con un riesgo elevado de desarrollar cáncer pancreático, por ejemplo debido a una mutación hereditaria que predispone al individuo a cáncer pancreático. El sistema comprende administrar al individuo con una predisposición a cáncer pancreático un vector de poxvirus recombinante que codifica al menos un antígeno de tumor específico para el factor predisponente y/o una o más moléculas coestimulantes. El antígeno de tumor y las moléculas coestimulantes pueden ser codificados por el mismo vector de poxvirus recombinante. Alternativamente, puede usarse un sistema que comprende dos o más vectores de poxvirus.
- 30 También se describe en el presente documento un kit que comprende uno o más vectores de poxvirus recombinantes cada uno de los cuales codifica al menos una molécula coestimulante en un vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o más vectores de poxvirus recombinantes que codifican al menos un antígeno asociado al cáncer pancreático en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El kit comprende además instrucciones sobre qué combinación de los poxvirus recombinantes "listos" es apropiada para tratar diferentes tipos y etapas de cáncer pancreático. El kit también comprende alternativamente un componente de diagnóstico que comprende, por ejemplo, un chip de ADN de detección de mutaciones y/o un patrón de expresión que mide chip de ADNc para permitir la determinación del tipo y/o la etapa del cáncer pancreático de una muestra biológica obtenida del individuo en necesidad de tratamiento.
- 35 40 45

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

- 50 La Figura 2 muestra el esquema del vector rV-MUC-1. pT2137 dirige la inserción de la secuencia codificante de MUC-1 en el gen TK, que se localiza en la región J de Hind III del genoma de la variolovacuna. El gen MUC-1 está bajo el control de transcripción del promotor 40K de la variolovacuna. Además, el gen *lacZ* de *E. coli*, bajo el control del promotor C1 del virus de la viruela aviar, se incluye como un cribado para la progenie recombinante. Se usó una cepa clínica purificada en placa de la cepa Wyeth (New York City Board of Health) de la variolovacuna como el virus parental para esta vacuna recombinante. La recombinación *in vivo* entre el vector plasmídico y el ADN viral produjeron la formación de un virus recombinante en el que la secuencia del gen TK de la variolovacuna se interrumpió por el gen MUC-1, bajo la dirección transcripcional del promotor 40K, y el gen *lacZ*, bajo el control del promotor C1.
- 55

La Figura 3 muestra el mapa de endonucleasas de restricción del plásmido pT8016, que se usó para la generación de la vacuna recombinante rV-CEA(6D)/TRICOM.

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

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

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

La Figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos de MUC-1 balanceada usado en vectores de la presente invención, que incluye PANVAC-VF, también conocido como wMUC-1(6), como SEQ ID NO: 1.

La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos de MUC-1 balanceada usado en vectores de la presente invención, que incluye PANVAC-VF, también conocido como wMUC-1(6), como SEQ ID NO: 2.

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

La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos de CEA balanceado usado en vectores de la presente invención, que incluye PANVAC-VF, también conocido como wCEA(6D), como SEQ ID NO: 4.

La Figura 11 muestra el esquema del vector recombinante PANVAC-F. Para generar PANVAC-F, se usaron dos vectores plasmídicos. El primer plásmido, designado pT1154, dirige la inserción de secuencias codificantes de wCEA(6D) y wMUC-1(6) en la región FP14 del genoma del virus de la viruela aviar. El segundo plásmido, designado pT8150, dirige la inserción de secuencias codificantes de LFA-3, ICAM-1 y B7.1 (conjuntamente conocido como TRICOM) en la región I-J de BamH del genoma del virus de la viruela aviar. El gen wCEA(6D) está bajo el control de la transcripción del promotor 40K de la variolovacuna. El gen wMUC-1(6) está bajo el control de la transcripción del promotor temprano sintético/tardío (sE/L). El gen LFA-3 está bajo el control de la transcripción del promotor 30K de la variolovacuna, el gen ICAM-1 está bajo el control de la transcripción del promotor I3 de la variolovacuna y el gen B7.1 está bajo el control de la transcripción del promotor temprano sintético/tardío (sE/L). Además, pT1154 contiene el gen *lacZ* de *E. coli*, bajo el control del promotor 40K de la variolovacuna, que se incluye como un cribado para progenie recombinante, y pT8150 contiene el gen *GUS*, bajo el control del promotor 7.5, para su uso en el cribado para progenie recombinante.

La Figura 12 muestra el esquema del vector recombinante PANVAC-V. Se usó un derivado de la cepa Wyeth (New York City Board of Health) de la variolovacuna como virus parental para esta vacuna recombinante, llamado TBC-vTRICOM. Este virus parental, designado TBC-vTRICOM, contiene las secuencias codificantes de LFA-3, ICAM-1 y B7.1 insertadas en la región F de Hind III del genoma de la variolovacuna. La recombinación entre el vector plasmídico y el ADN viral produjeron la formación de un virus recombinante en el que el gen wCEA(6D), bajo el control de la transcripción del promotor 40K de la variolovacuna, el gen wMUC-1(6), bajo el control de la transcripción del promotor sE/L, y el gen *lacZ*, bajo el control del promotor 40K, se insertaron en la región J de Hind III del genoma de la variolovacuna del virus. El gen *lacZ* de *E. coli* insertado se flanqueó por secuencias de poxvirus duplicadas. La recombinación intramolecular entre estas secuencias produjo la delección del gen *lacZ*. Virus recombinantes de los que se delecionó el gen *lacZ* dieron lugar a placas incoloras que se seleccionaron y se purificaron en placa. El poxvirus recombinante purificado final contuvo solo los genes deseados que codifican las proteínas CEA, MUC-1, LFA-3, ICAM-1 y B7.1 y no el gen marcador (*lacZ*).

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

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

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los presentes inventores han descubierto ahora un nuevo método de tratamiento de cáncer pancreático en seres humanos que implica el uso de poxvirus recombinantes que contienen antígenos asociados a tumor pancreático y moléculas inmunomoduladoras. Por consiguiente, en el presente documento se desvela un sistema para cribar individuos para identificar aquellos en riesgo de desarrollar o padecer cáncer pancreático. El sistema de la presente invención comprende administrar a un individuo un primer poxvirus recombinante, y a intervalos regulares a partir de aquí, administrar un segundo poxvirus recombinante, en el que el primer y segundo poxvirus recombinantes comprenden cada uno al menos un gen que codifica los antígenos asociados a tumor pancreático (AATP) CEA y MUC-1, o una porción antigénica o versión modificada de los mismos, como se define en las reivindicaciones. Los genes que codifican los AATP se insertan preferentemente en una región no esencial del genoma del poxvirus. En una realización preferida, ambos genes están en el mismo vector de poxvirus. En una realización alternativa, los genes están en múltiples vectores. Poxvirus preferidos incluyen orthopox, tal como variolovacuna, y avipox, tales como viruela aviar y viruela del canario.

La invención también proporciona la co-administración de factor estimulante de granulocitos-macrófagos con los poxvirus recombinantes, además de la co-administración de moléculas inmunomoduladoras, tales como al menos una molécula coestimulante, tal como LFA-3, ICAM-1 y B7.1. Preferentemente, se usa la combinación de LFA-3, ICAM-1 y B7.1 (TRICOM).

#### Antígenos asociados a tumor pancreático

Puede usarse cualquier antígeno asociado a tumor pancreático en el presente sistema de vector. Hay numerosos antígenos que están asociados al cáncer pancreático, que se denominan en el presente documento antígenos asociados a tumor pancreático, o AATP. AATP particularmente preferidos incluyen CEA y MUC-1, además de otras mucinas tales como mini-MUC y MUC-4.

El sistema de vector de la presente invención tiene al menos los dos AATP, MUC-1 y CEA.

Puede usarse un único vector de pox para expresar CEA, MUC-1, mini-MUC, etc., si se desea, o los AATP pueden expresarse en múltiples vectores. También pueden expresarse múltiples copias de ciertos AATP, tanto en los mismos vectores como en múltiples vectores.

CEA es una glucoproteína oncofetal que se expresa a altos niveles sobre la superficie de casi todos los tumores del tubo gastrointestinal, que incluyen carcinomas colorrectales, gástricos y pancreáticos humanos, además de sobre muchos carcinomas de mama y adenocarcinomas de pulmón. Muraro et al., Cancer Res. 45:5769-89 (1985). En una realización, CEA es una CEA de longitud completa. Una CEA particularmente preferida tiene una modificación en un epítipo inmunodominante limitado a HLA-A2. Este epítipo, designado CAP1-6d, o algunas veces CEA-6D, se une con afinidad potenciada al receptor e induce CTL *in vitro* más eficientemente que el epítipo nativo. Estos CTL son capaces de lisar células tumorales humanas que expresan CEA nativa. Zaremba et al., Cancer Res. 57:4570-7 (1997). Otras variantes preferidas incluyen porciones de CEA que provocan una respuesta de clase I o II del MHC particular. En algunas realizaciones, estas secuencias pueden unirse juntas. Hay patrones conocidos que provocan reacciones de clase I de MHC o de clase II de MHC particulares. Adicionalmente, pueden introducirse cambios en la secuencia de ácidos nucleicos para hacer el "gen" más estable y menos propenso a la escisión durante la recombinación homóloga.

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

Otro AATP preferido es una mucina. Una mucina particularmente preferida es la mucina epitelial polimórfica humana, designada MUC-1. El polimorfismo de MUC-1 deriva de la variación en el número de secuencias de aminoácidos repetidas en tándem en la porción extracelular de la glucoproteína. MUC-1 se expresa en la superficie apical de células de epitelio glandular normales. Adenocarcinomas de mama y de ovario malignos glucosilan de forma anormal, además de expresar en exceso, MUC-1. La glucosilación anormal expone los epítopes de péptido, haciendo la mucina derivada de tumor antigénicamente distinta de la mucina normal. Se han identificado respuestas de linfocitos T contra MUC-1 en pacientes con cáncer de mama y de ovario, Jerome et al., Cancer Res. 51: 2908-16 (1991); Ioannides et al., J. Immunol. 151: 3693-3703 (1993).

En una realización, los vectores de pox de la presente invención contienen un fragmento de ADN que codifica un fragmento de MUC-1, algunas veces denominado mini-MUC. El fragmento de gen MUC-1 codificará una porción de MUC-1 suficiente para generar una reacción inmunitaria a MUC-1, pero no se somete a una amplia escisión como resultado de recombinación homóloga. Preferentemente, el fragmento tiene aproximadamente 5 a 25 unidades de



repetición en tándem de MUC-1, más preferentemente entre aproximadamente 6 y 15 unidades de repetición en tándem de MUC-1, y lo más preferentemente aproximadamente 6 a 12 unidades de repetición en tándem de MUC-1. Un fragmento de MUC-1 inmunogénico especialmente preferido tiene aproximadamente 6 unidades de repetición en tándem de MUC-1. Se entiende que como se usa en el presente documento, la expresión "aproximadamente 6-15 repeticiones en tándem de MUC-1" pretende incluir cada posible número de repeticiones dentro de ese intervalo, es decir, un fragmento con 6 repeticiones en tándem, un fragmento con 7 repeticiones en tándem, etc., hasta incluye incluyendo un fragmento con 15 repeticiones en tándem. Fragmentos de MUC-1 preferidos tienen la secuencia de ADN de MUC-1 humano. Una secuencia de ADN de MUC-1 preferido es la secuencia de ADNc de MUC-1 humano que tiene las unidades de repetición desveladas, por ejemplo, por Gendler et al. (J. Biol. Chem. 265:15286-93 (1990)).

Preferentemente, el AATP, por ejemplo, las secuencias de repetición de mucina, pueden alterarse (algunas veces denominadas balancearse) para minimizar la homología de nucleótidos sin cambiar la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos del segmento de ADN que codifica las repeticiones de mucina en tándem se altera de la secuencia nativa de tal manera para reducir duplicaciones de los codones. Por ejemplo, los aminoácidos normalmente tienen dos o más codones que codificarán el mismo resto (por ejemplo, la glicina está codificada por GGT, GGA, GGG o GGC). Usando otros codones que codifican el mismo aminoácido, puede reducirse adicionalmente la posibilidad de eventos de recombinación no deseados que reducen la homología al nivel de ácido nucleico. Adicionalmente, también pueden introducirse algunos cambios de aminoácidos conservativos en diferentes grupos de las repeticiones en tándem para reducir además la recombinación no deseada (por ejemplo, glicina/serina, valina/leucina), teniendo cuidado de no alterar un epítipo de péptido que reduciría su inmunogenicidad. La homología de nucleótidos también puede reducirse introduciendo cambios a la secuencia de aminoácidos, preferentemente sustituciones de aminoácidos conservativas en algunas de las repeticiones en tándem.

También pueden introducirse cambios en otros aminoácidos para potenciar la inmunogenicidad. Por ejemplo, una secuencia de MUC-1 particularmente preferida se denomina wMUC-1(6), cuya secuencia se representa en la Figura 7 como SEQ ID NO: 1. Esta variante contiene un cambio que convierte un codón de treonina en un codón de leucina, para crear un epítipo de CTL más inmunogénico, y 87 nucleótidos silenciosos que se introdujeron en la región de repetición para aumentar la estabilidad del gen MUC-1 sin cambiar la secuencia de aminoácidos. Además, se observan varias diferencias de nucleótidos al principio y al final de la región de repetición entre la secuencia de nucleótidos de Genbank de wMUC-1(6) y MUC-1 (N.º de acceso J05581). Esto es debido a la degeneración de la secuencia repetida al principio y final de la región de repetición. A diferencia, el gen wMUC-1(6) se diseñó para contener repeticiones idénticas sin degeneración. Otras diferencias de nucleótidos, que consisten en 11 nucleótidos en 8 codones, son mutaciones y no producen cambios de aminoácidos.

La lista de antígenos asociados a tumor pancreático continúa aumentando. Antígenos asociados al cáncer pancreático preferidos incluyen CEA, también denominado antígeno carcinoembrionario (Clin. Cancer Res. 6:4176-85, 2000); MUC-1 (Marshall et al., J. Clin Oncol. 18:3964-73 (2000)); mini-MUC-1; MUC-4 (solicitud de patente de EE.UU. publicada N.º 20020150894); MUC-2; MUC-3; MUC-5AC; MUC-5B; MUC-6; MUC-7; MUC-11; MUC-12; k-ras (patente de EE.UU. N.º 6.350.445; patente de EE.UU. N.º 5.985.290); péptidos ras, que incluyen péptidos que se corresponden con la mutación alojada en el tumor de un individuo (Chiba et al., Oncogene 5:1603-10 (1990); Mitsudomi et al., Cancer Res. 51:4999-5002 (1991)); gastrina, que incluye el péptido gastrina G17 (solicitud de patente de EE.UU. de número de serie 10/104.607, publicada como la solicitud N.º 20030091574; Brett et al., J Clin Oncol. 20:4225-31 (2002); receptor de CCK-B/gastrina (ídem); componentes antigénicos de Viulizin® (Liu et al., Int. J. Oncol. 16:1015-20 (2000); Ferdinandi et al., Exp. Opin. Invest. Drugs 8:1721-35 (1999), solicitud publicada de EE.UU. N.º 20010009680; Anticancer Drugs. 2003 Apr;14(4):289-94; Cancer Chemotherapy and Pharmacology, Volumen 51, Edición 3, páginas 247-255, 2003); HER2/neu (patente de EE.UU. N.º 5.550.214); receptor de HER2 (patente de EE.UU. N.º 5.772.997); mammoglobulina (patente de EE.UU. N.º 5.922.836; Aihara et al., Cancer Letters 150: 79-84 (2000)); interferón alfa; TNF alfa; inmunotoxina LMP-9 (Bigner et al., Clin Cancer Res. 1995 Dec;1(12):1545-55); CAA-P (<http://www.scrippsllabs.com/biochemicals.html#cancer>); PANC1A y PANC1B (patentes de EE.UU. N.º 5.998.165 y 5.840.870); VEGF; y polipéptidos expresados por cualquiera de los genes de cáncer pancreático descritos en las siguientes patentes de EE.UU. y solicitudes publicadas: solicitud publicada de EE.UU. N.º 20010016651; patente de EE.UU. N.º 6.262.249; solicitud publicada de EE.UU. N.º 20020111308; solicitud publicada de EE.UU. N.º 20020082207; solicitud publicada de EE.UU. N.º 20020076721; solicitud publicada de EE.UU. N.º 20030091574; y solicitudes publicadas de EE.UU. N.º 20030073144; 20020137911.

#### Moléculas coestimulantes

Otra realización particularmente preferida proporciona la co-administración de al menos una molécula coestimulante, que incluye LFA-3, ICAM-1 y B7.1. Preferentemente, dos moléculas coestimulantes. Incluso más preferentemente, tres moléculas coestimulantes. Es lo más preferido que los AATP se co-administren con LFA-3, ICAM-1 y B7.1 (TRICOM). Pueden usarse moléculas inmunomoduladoras adicionales tales como OX40L. Adicionalmente en realizaciones alternativas, puede administrarse solo una molécula coestimulante (por ejemplo, B7, LFA-3, ICAM-1) o combinaciones de las mismas tales como B7.1 y LFA-3, B7.1 e ICAM-1, y LFA-3 e ICAM-1.

En una realización preferida, el poxvirus que comprende al menos un ácido nucleico que codifica los antígenos asociados al cáncer pancreático también codifica al menos una molécula co-estimulante o inmunoestimulante. Alternativamente, la(s) molécula(s) coestimulante(s) y los antígenos están codificados por un sistema de vector de pox que comprende múltiples vectores de poxvirus recombinantes.

- 5 Un grupo preferido de ácidos nucleicos para la inserción en el poxvirus incluye moléculas coestimulantes, moléculas accesorias, y/o genes que codifican una citocina. Los términos "co-estimulante" e "inmunoestimulante" se usan indistintamente en esta memoria descriptiva. Ejemplos de moléculas coestimulantes incluyen, pero no se limitan a, B7-1, B7-2, ICAM-1, LFA-3, CD72, OX40L (con o sin OX40) y similares. Ejemplos de citocinas englobadas por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, IL-2, GM-CSF, TNF-alfa, IFN-gamma, IL-12, RANTES y similares.
- 10 Las moléculas coestimulantes pueden administrarse usando tanto un vector de poxvirus recombinante que codifica las moléculas coestimulantes como sin el vector como proteínas en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, los agonistas de OX40, que incluye OX40L y anticuerpos contra OX40, previenen la formación de tolerancia por la reacción inmunitaria a antígenos presentados (Weinberg et al. J Immunol. 164:2160-2169, 2000). Por tanto, para aumentar la respuesta inmunitaria contra un antígeno, el sistema de la presente invención puede tanto
- 15 administrar un poxvirus recombinante que expresa OX40L como anticuerpo contra OX40 en un vehículo farmacéuticamente aceptable antes, después de o simultáneamente con administrar un vector de poxvirus recombinante que codifica un antígeno asociado al cáncer. Para potenciar los efectos de OX40L puede añadirse un ácido nucleico que codifica OX40 a un vector de poxvirus. La secuencia de ácidos nucleicos de OX40 puede obtenerse fácilmente a partir de la base de datos de ácidos nucleicos Entrez con un número de acceso AJ277151 y la secuencia de OX40L está fácilmente disponible de la base de datos de ácidos nucleicos Entrez con un número de acceso: SEG\_AB042987S. Homo sapiens OX40...[gi:14279071] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>).
- 20

No tiene que usarse un gen que codifica una proteína co-estimulante entera o AATP, sino solo el dominio deseado. Por ejemplo, si se desea una reacción inmunitaria, solo necesita codificarse el fragmento necesario para estimular la reacción inmunitaria.

- 25 En una realización preferida, se administra un vector de poxvirus que contiene B7, LFA-3 y ICAM-1 conjuntamente con los antígenos asociados a tumor. En otra realización preferida, el poxvirus también codifica OX40L o intracuerpo de OX40. En otra realización, el poxvirus codifica OX40L o intracuerpo de OX40 solo. En otra realización más, el poxvirus codifica tanto OX40L como el intracuerpo de OX40 y OX40.

- Los poxvirus que expresan B7-1, ICAM-1 y LFA-3, también conocidos como TRICOM, inducen la activación de tanto linfocitos T CD4+ como CD8+ (patente de EE.UU. N.º 6.045.802; Hodge et al., J. Natl. Cancer Inst. 92: 1228-39 (2000); Hodge et al, Cancer Research 59: 5800-07 (1999)). OX40 es un co-estimulante primario de linfocitos T que han encontrado antígeno, en vez de linfocitos T intactos, y promueve la expansión de linfocitos T después de inducirse la tolerancia a linfocitos T (Bansal-Pakal et al., Nature Med. 7: 907-12 (2001)). OX40L desempeña una función durante la activación de linfocitos T por a) sutinción de la proliferación a largo plazo de linfocitos T CD4+ y CD8+, b) potenciando la producción de citocinas Th1 tales como IL-2, IGn-y y TNF-α de tanto linfocitos T CD4+ como CD8+ sin cambiar la expresión de IL-4, c) protegiendo los linfocitos T de la apoptosis. La combinación de B7-1, ICAM-1, LFA-3 y OX40L potencia la activación inicial y luego potencia además la activación sostenida de linfocitos T intactos y efectores.
- 30
- 35

#### Adyuvantes

- 40 Las formulaciones de vacuna de la presente invención pueden incluir cualquier composición de adyuvante. Las moléculas coestimulantes, moléculas accesorias y citocinas de la presente invención son útiles como adyuvantes biológicos, que pueden administrarse por vía sistémica al huésped mediante inserción de ácidos nucleicos que codifican tales en el mismo o diferentes vectores de poxvirus recombinantes. Alternativamente, los adyuvantes pueden administrarse mediante otros medios no de vector.
- 45 El adyuvante puede administrarse usando un vector viral o como una proteína aislada en una formulación farmacéutica. En una realización preferida, el adyuvante se administra como una proteína aislada, tal como una proteína recombinante.

- En una realización preferida, los usos de la presente invención proporcionan que el adyuvante se administre al paciente a aproximadamente el mismo tiempo que el (los) vector(es) de poxvirus se administra(n) al paciente. Los usos de la invención también proporcionan administración del adyuvante durante varios días tanto antes como después de la administración del vector de poxvirus. Por ejemplo, el adyuvante puede administrarse cada día que el paciente se administra con un vector de poxvirus, y cada día a partir de aquí durante aproximadamente 1 a aproximadamente 5 días. Preferentemente, durante aproximadamente 3 días.
- 50

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

- 55 Cualquier adyuvante puede usarse conjuntamente con el presente sistema de vector. Un adyuvante particularmente preferido es el factor estimulante de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Se ha mostrado que el GM-CSF es una adyuvante de vacuna eficaz debido a que potencia el procesamiento de antígeno y la presentación por células dendríticas. Estudios experimentales y clínicos sugieren que GM-CSF recombinante puede reforzar la inmunidad del

huésped dirigida a una variedad de inmunógenos. Morrissey, J. Immunol. 139:113-119 (1987); Dranoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3539-40 (1983); Vieweg, Cancer Res. 54:1760-65 (1994). Otro adyuvante preferido es una saponina y/o molécula inmunoestimulante que contiene un dinucleótido CG sin metilar (patente de EE.UU. N.º 6.544.518).

- 5 Una realización preferida proporciona el uso de GM-CSF como adyuvante. GM-CSF puede administrarse usando un vector viral o una proteína aislada en una formulación farmacéutica. En una realización particularmente preferida, se administra proteína GM-CSF recombinante al paciente cada día de la vacunación con el (los) vector(es) de poxvirus, y durante cada uno de los tres días siguientes (es decir, un total de 4 días). Preferentemente, se administran 50 - 500 µg de GM-CSF recombinante por día. Incluso más preferentemente, 100 µg. Preferentemente, se administra GM-CSF recombinante por vía subcutánea. Preferentemente, se administra GM-CSF recombinante en o cerca del sitio de la vacunación del poxvirus.

En otra realización, el gen que codifica GM-CSF se inserta en un poxvirus u otro vector para la administración del gen en el huésped.

#### Vectores de poxvirus

- 15 Los poxvirus de la presente invención se refieren algunas veces en el presente documento como un vector viral o un sistema de vector o simplemente un vector. Los poxvirus que tienen utilidad en la presente invención incluyen vectores replicantes y no replicantes. Tales poxvirus incluyen, pero no se limitan a, orthopox tal como variolovacuna, avipox, por ejemplo viruela de las aves de caza y viruela del canario, viruela del mapache, viruela del conejo y similares, suipox, por ejemplo viruela porcina, capripox, por ejemplo viruela de las ovejas, leporipox e iridovirus. Otros virus de ADN incluyen iridovirus y similares.

- 20 Poxvirus parentales útiles en el método de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, orthopoxvirus tales como virus de la variolovacuna replicante (Perkus et al Science 229:981-984, 1985; Kaufman et al Int. J. Cancer 48:900-907, 1991, Moss Science 252:1662, 1991), variolovacuna Wyeth y virus de la variolovacuna altamente atenuados tales como variolovacuna modificada Ankara (MVA) (Sutter y Moss, Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A., 89:10847-10851; Sutter et al. Virology 1994) o NYVAC; avipoxvirus tales como virus de la viruela aviar, virus de la viruela del canario, tales como ALVAC y similares (Baxby y Paoletti, Vaccine 10:8-9, 1992; Rinns, M.M. et al (Eds) Recombinant Poxviruses CRC Press, Inc, Boca Raton 1992- Paoletti, E. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93:113491-11353; 1996) y suipoxvirus, capripoxvirus y similares.

- 30 Un virus de la variolovacuna preferido es una cepa Wyeth o derivado de la misma. Derivados de la cepa Wyeth incluyen, pero no se limitan a, derivados que carecen de un gen K1L funcional, y similares. En otra realización más, el virus es Dry-Vax, disponible como una vacuna de la viruela de los Centros de Control de Enfermedades, Atlanta, GA. En otra realización, el poxvirus parental es una cepa de viruela aviar, por ejemplo POXVAC-TC (Schering-Plough Corporation), y similares.

- 35 El poxvirus de la presente invención es capaz de infectar, transfectar o transducir células huésped en un huésped. El huésped incluye, pero no se limita a, mamíferos, que incluyen seres humanos, aves, peces y similares. Las células huésped son cualquier célula susceptible a infección, transfección o transducción por el poxvirus y capaz de expresar el poxvirus, que incluye cualquier gen extraño insertado en su interior, a niveles funcionales.

- 40 El poxvirus de la presente invención tiene preferentemente una baja eficiencia replicativa en la célula diana. Esto significa preferentemente que no se produce más de aproximadamente 1 progenie por célula, todavía más preferentemente, no más de 0,1 progenies por célula. La eficiencia de replicación puede determinarse fácilmente empíricamente determinando el título de virus después de la infección de la célula diana.

- 45 Como resultado de la baja eficiencia de replicación y la naturaleza citoplásmica no integrativa del vector, el sistema de vector no producirá replicación sostenida e infección de otras células. Así, el vector de pox y las células transformadas no afectarán adversamente las células en el animal huésped en localizaciones distantes de donde está la célula diana.

- 50 Para garantizar además que el vector de poxvirus usado para un animal huésped particular sea avirulento en ese animal, puede cribarse fácilmente un vector viral mirando el intervalo de huéspedes del virus y la especificidad de tejido. Por ejemplo, un método es mirar un intervalo de huéspedes naturales del virus. Preferentemente, el vector de virus seleccionado es de un virus cuyo intervalo de infección primario es para un animal huésped diferente del animal en el que va a usarse el sistema de administración génica. Por ejemplo, puede usarse swinepox como vector viral cuando el huésped es un primate tal como un ser humano. Sin embargo, para fines veterinarios donde el huésped es un cerdo no sería preferible. Sin embargo, pueden usarse ciertas cepas altamente atenuadas o modificadas tales como orthopoxvirus modificados (por ejemplo, la cepa MVA o NYVAC de variolovacuna o cepas genéticamente modificadas o seleccionadas para ser no virulentas en su intervalo de huéspedes normal o en una célula huésped deseada) que no son virulentos en su intervalo de huéspedes normal. También puede usarse especificidad por tejido para cribar preliminarmente para infectividad y eficiencia de replicación.

Si el huésped es humano, vectores preferidos incluyen vectores de pox, por ejemplo, suipox, tal como swinepox, avipox tal como viruela aviar, viruela del canario o viruela de la paloma, y capripoxvirus. Además, también se prefieren iridovirus tales como virus de la rana y virus de la fiebre porcina africana. Vectores virales preferidos para su uso con células humanas son poxvirus avirulentos no líticos tales como avipox (Taylor, et al., Vaccine, 6:497-503 (1985) y Jenkins, et al., AIDS Research And Human Retroviruses 7:991-998 (1991)) y suipox (Feller, et al., Virology 183:578-585 (1991)).

Según la presente invención, cualquier ácido nucleico que codifica un antígeno asociado al cáncer pancreático y/o molécula inmunoestimulante puede insertarse en el vector de poxvirus. Debido a que los poxvirus tienen un gran genoma, pueden usarse fácilmente para administrar una amplia variedad de material genético que incluye múltiples genes (es decir, actúan de vector multivalente). Los tamaños de los genomas de poxvirus oscilan entre aproximadamente 130 - 300 kbp con hasta 300 genes, dependiendo de la cepa del virus. Por tanto, es posible insertar grandes fragmentos de ADN extraño en estos virus y todavía mantener la estabilidad del genoma viral. El tamaño del genoma del poxvirus permite la construcción de los vectores de "arco iris" diseñados a medida que codifican combinaciones de antígeno/molécula inmunoestimulante individualizadas para proporcionar tratamiento diseñado a medida a individuos con diferentes tipos o etapas de cáncer pancreático.

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

Por tanto, los vectores de poxvirus recombinantes útiles según la presente invención codifican los antígenos asociados al cáncer pancreático y, preferentemente, también pueden evaluarse o tratarse una o más moléculas coestimulantes por los métodos descritos en la presente solicitud. Por ejemplo, el gen que codifica un antígeno asociado al cáncer pancreático se incorpora en el genoma del poxvirus recombinante o porción del mismo, junto con un gen que codifica una o más moléculas inmunoestimulantes. Alternativamente, el gen que codifica un antígeno asociado al cáncer pancreático y el gen que codifica una o más moléculas inmunoestimulantes se incorporan en poxvirus recombinantes separados. El antígeno asociado al cáncer pancreático puede expresarse sobre la superficie de una célula cancerosa o puede ser un antígeno interno. En una realización, el antígeno asociado al cáncer pancreático es un antígeno asociado a tumor (AAT) o porción del mismo.

No tiene que usarse un gen o ácido nucleico que codifica una proteína entera, sino solo el dominio deseado, para los genes que codifican los AATP, moléculas coestimulantes, moléculas accesorias y citocinas de la presente invención. Por ejemplo, si se desea una reacción inmunitaria, solo necesita codificarse el fragmento necesario para estimular la reacción inmunitaria.

#### Protocolos de sensibilización - refuerzo

La presente invención emplea un régimen de sensibilización-refuerzo, en el que un paciente recibe una "sensibilización" inicial con una composición que contiene uno o más vector(es) de poxvirus, seguido de uno o preferentemente múltiples "refuerzos" con una composición que contiene uno o más vector(es) de poxvirus.

En un ejemplo de una sensibilización, se usa un único vector de poxvirus para la administración de los AATP y moléculas coestimulantes. En otra realización, dos o más vectores de poxvirus comprenden la vacunación de sensibilización, que se administra simultáneamente en una única inyección. Por ejemplo, administrar simultáneamente a un huésped una mezcla de dos vectores de poxvirus, al menos uno de los cuales es competente para la replicación. Si ambos vectores son defectuosos en la replicación, entonces no tantas células serán transducidas por ambos virus. Un ejemplo de una estrategia de mezcla es usar un primer vector que comprende un ADN que codifica al menos un antígeno asociado al cáncer pancreático y un segundo vector que comprende un ADN que codifica al menos una, preferentemente tres, moléculas coestimulantes tales como TRICOM.

Las vacunaciones de refuerzo también pueden comprender uno o más vectores de poxvirus. En una realización preferida, se usa un único vector de poxvirus para la administración de los AATP y moléculas coestimulantes de la vacunación de refuerzo. En otra realización, dos o más vectores de poxvirus comprenden la vacunación de refuerzo, que se administran simultáneamente en una única inyección. Por ejemplo, administrar simultáneamente a un huésped una mezcla de dos vectores de poxvirus, al menos una de la cuales es competente para la replicación. Si ambos vectores son defectuosos en la replicación, entonces no tantas células conseguirán ser transducidas por ambos virus. Un ejemplo de una estrategia de mezcla es usar un primer vector que comprende un ADN que codifica al menos un antígeno asociado al cáncer pancreático y un segundo vector que comprende un ADN que codifica al menos una, preferentemente tres, moléculas coestimulantes tales como TRICOM.

Por ejemplo, el individuo puede inmunizarse al menos una vez con un primer vector de poxvirus recombinante (sensibilizar) que lleva los AATP y preferentemente al menos una molécula inmunomoduladora o coestimulante. En la realización preferida se usan un TRICOM o TRICOM y OX40L o TRICOM y OX40L y OX40. Inmunizaciones posteriores se consideran parte del protocolo de refuerzo. Preferentemente, los refuerzos se realizan con un segundo vector de poxvirus recombinante usando un tipo diferente de poxvirus que codifica los antígenos, y

preferentemente también la(s) molécula(s) coestimulante(s). Las inoculaciones normalmente se administran separadas al menos un mes. Otras variaciones pueden incluirse en el protocolo que incluye el uso de ADN que codifica los AATP o porciones inmunogénicas de los mismos, administración directa de los AATP o porciones inmunogénicas de los mismos, u otros vectores que contienen tales moléculas. Tal protocolo puede tener el péptido administrado como un refuerzo.

Preferentemente, se usa un vector alterado en la replicación o no replicante para tanto la sensibilización como el refuerzo. En una combinación preferida, la sensibilización es un orthopox, por ejemplo variolovacuna, preferentemente una variolovacuna tal como la cepa de la vacuna Wyeth. El refuerzo es preferentemente un vector de avipox tal como viruela aviar o una viruela del canario tal como ALVAC.

En seres humanos, los vectores de la variolovacuna que incluyen vectores de vacuna atenuada tales como MVA y NYVAC pueden administrarse varias veces. Otros poxvirus, tales como avipox, no provocan una respuesta de anticuerpo neutralizante en seres humanos, y así pueden administrarse repetidamente sin ningún efecto adverso. En la planificación del protocolo debe tenerse en cuenta esto. Normalmente, con estos tipos de cánceres es necesaria la administración repetida. Así, debe determinarse si el sujeto ha sido expuesto previamente a la variolovacuna (como en una vacuna de la viruela), y el factor que está en ella.

Un protocolo podría ser una sensibilización con una variolovacuna, tal como Wyeth o MVA, que codifica un AATP(s) y al menos una molécula coestimulante, seguido de al menos 6 refuerzos con un avipox tal como viruela aviar que codifica un AATP(s) y preferentemente al menos una molécula coestimulante.

Alternativamente, pueden administrarse moléculas inmunoestimulantes en un vehículo farmacéuticamente aceptable sin vector de poxvirus. Por ejemplo, puede administrarse un anticuerpo contra OX40 a un individuo antes, después de o simultáneamente con la inoculación con un poxvirus recombinante que codifica un antígeno asociado al cáncer.

En una realización preferida, el sistema de la presente invención comprende administrar a un huésped un primer y segundo poxvirus recombinante, cada uno de los cuales comprende un ADN que codifica los antígenos relacionados con el cáncer pancreático, y al menos una molécula coestimulante.

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

En otra realización, la presente invención proporciona un sistema que comprende administrar simultáneamente a un huésped una mezcla de dos vectores de poxvirus, uno de los cuales es competente para la replicación. Si ambos vectores son defectuosos en la replicación, entonces no muchas células conseguirán ser transducidas por ambos virus. Un ejemplo de una estrategia de mezcla es usar un primer vector que comprende un ADN que codifica los antígenos asociados al cáncer pancreático y un segundo vector que comprende un ADN que codifica al menos una molécula coestimulante. En una realización preferida, los dos ADN diferentes se insertan en vectores de poxvirus de diferentes géneros. Por ejemplo, el ADN que codifica el (los) antígeno(s) asociado(s) al cáncer pancreático se inserta en un vector derivado de suipox y la(s) molécula(s) coestimulante(s) que codifica(n) ADN se inserta(n) en un vector derivado de avipox.

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

El sistema de la presente invención es particularmente útil para generar reacciones inmunitarias mediadas por célula contra células cancerosas. Por consiguiente, la presente invención proporciona además un kit que tiene un primer y un segundo poxvirus recombinante, cada uno de los cuales tiene incorporado en su genoma o porción del mismo un gen que codifica los antígenos específicos de célula de cáncer pancreático en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El primer poxvirus recombinante también puede comprender uno o más genes que codifican una o más moléculas inmunoestimulantes o coestimulantes. En otra realización, el segundo poxvirus recombinante también puede comprender uno o más genes que codifican una o más moléculas inmunoestimulantes en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El kit proporciona además recipientes, agujas de inyección e instrucciones sobre cómo para usar el kit. Adicionalmente, el kit también puede comprender un componente de diagnóstico que incluye sistemas de detección de mutaciones y/o sistemas de perfilado de la expresión. En otra realización, el kit proporciona además un adyuvante tal como GM-CSF, y/o instrucciones para el uso de un adyuvante comercialmente disponible con los componentes de kit comprados.

Una célula huésped infectada con ambos virus recombinantes expresa tanto los antígeno de cáncer pancreático como la(s) molécula(s) inmunoestimulante(s). Los antígenos pueden expresarse en la superficie celular de la célula huésped infectada. La molécula inmunoestimulante puede expresarse en la superficie celular o puede ser

activamente secretada por la célula huésped. La expresión de ambos antígenos y la molécula inmunoestimulante proporciona el péptido limitado a MHC necesario para los linfocitos T específicos y la señal apropiada para el linfocito T para ayudar en el reconocimiento del antígeno y la proliferación o expansión clónica de linfocitos T específicos de antígeno. El resultado global es una regulación por incremento del sistema inmunitario. En una realización preferida, la regulación por incremento de la respuesta inmunitaria es un aumento en los linfocitos T colaboradores específicos de antígeno y/o linfocitos citotóxicos, que son capaces de destruir o inhibir el crecimiento de una célula de cáncer pancreático. En la realización preferida, la(s) molécula(s) inmunoestimulante(s) y los antígenos de cáncer pancreático se proporcionan en el mismo vector de poxvirus.

#### Construcción de vectores virales

Las técnicas básicas de inserción de genes en virus son conocidas para el experto e implican, por ejemplo, recombinación entre las secuencias de ADN viral que flanquean un gen en un plásmido donante y secuencias homólogas presentes en el virus parental (Mackett, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7415-7419 (1982)). Por ejemplo, un virus recombinante tal como un poxvirus para su uso en administrar el gen puede construirse en dos etapas conocidas en la técnica y análogas a los métodos de creación de recombinantes sintéticos del virus de la viruela aviar descritos en la patente de EE.UU. N.º 5.093.258. Otras técnicas incluyen usar un único sitio de endonucleasa de restricción que está naturalmente presente o se inserta artificialmente en el vector viral parental.

Primero, el ácido nucleico que va a insertarse en el virus puede ponerse en un plásmido, por ejemplo, una construcción de plásmido de *E. coli*, en la que el ADN homólogo a una sección de ADN tal como el del poxvirus ha sido insertado. Por separado, la secuencia de genes de ADN que va a insertarse se une a un promotor. El enlace promotor-gen está posicionado en la construcción de plásmido de manera que el enlace promotor-gen esté flanqueado en ambos extremos por ADN homólogo a una secuencia de ADN que flanquea una región de ADN de pox que es la región de inserción deseada. La construcción de plásmido resultante se amplifica entonces por crecimiento dentro de bacterias de *E. coli* y se aísla. Preferentemente, el plásmido también contiene un origen de replicación, tal como el origen de replicación de *E. coli*, y un marcador tal como un gen de resistencia a antibióticos para la selección y propagación en *E. coli*.

Segundo, el plásmido aislado que contiene la secuencia de genes de ADN que va a insertarse se transfecta en un cultivo celular, por ejemplo, fibroblastos de embrión de pollito, junto con el poxvirus. La recombinación entre ADN de pox homólogo en el plásmido y el genoma viral, respectivamente, produce un poxvirus modificado por la presencia de la construcción de promotor-gen en su genoma, en un sitio que no afecta la viabilidad del virus.

El gen se inserta en un sitio o región (región de inserción) en el virus que no afecta la viabilidad del virus del virus recombinante resultante. El experto puede identificar fácilmente tales regiones en un virus por, por ejemplo, probando aleatoriamente segmentos de virus ADN para regiones que permiten la formación recombinante sin afectar gravemente la viabilidad del virus del recombinante.

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

En la viruela aviar, además de la región TK, otras regiones de inserción incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a las siguientes: el fragmento J de BamHI [Jenkins, et al., AIDS Research and Human Retroviruses 7:991-998 (1991

)], el fragmento HindIII de EcoRI, fragmento BamHI, fragmento HindIII de EcoRV, fragmento BamHI y el fragmento HindIII expuestos en la solicitud de OEP N.º 0 308 220 A1. (Calvert, et al., J. de Virol. 67:3069-3076 (1993); Taylor, et al., Vaccine 6:497-503 (1988); Spehner, et al., (1990) y Bournsnel, et al., J. de Gen. Virol. 71:621-628 (1990)). Otros poxvirus preferidos útiles según el sistema de tratamiento de la presente invención es un avipox, que incluye, pero no se limita a, viruela aviar, y viruela del canario, que incluye ALVAC. Un virus avipox particularmente preferido es la viruela aviar.

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

En una realización preferida, el sitio de inserción en la viruela aviar se designa el sitio de inserción LUS. En la viruela aviar, hay dos secuencias únicas largas (LUS) en cada extremo del genoma viral (N.º de acceso de Genbank AF198100), y así dos sitios de inserción LUS en cada genoma. El sitio de inserción LUS en el extremo izquierdo del genoma está entre las posiciones 7470 - 7475 en la secuencia genómica de la viruela aviar, y se encuentra 3' de

FPV006 y 5' de FPV007 125L. El sitio de inserción LUS en el extremo derecho del genoma está entre las posiciones 281065 y 281070 en la secuencia genómica de la viruela aviar, y se encuentra 5' de FPV254 y 3' de FPV255. En esta realización, una inserción que representa una secuencia de interés puede insertarse en cualquier posición dentro del sitio de inserción especificado.

- 5 En otra realización preferida, el sitio de inserción en la viruela aviar se designa el sitio de inserción FP14. Este sitio está entre las posiciones 67080 - 67097 en la secuencia genómica de la viruela aviar, y se encuentra 5' de FPV060 y 3' de FPV061. En esta realización, la secuencia de ADN en el sitio de inserción especificado, es decir, entre los nucleótidos, está delecionada en el virus recombinante y se sustituye con inserciones definidas que representan una secuencia de interés.
- 10 En otra realización más preferida, el novedoso sitio de inserción en la viruela aviar se designa el sitio de inserción 43K. Este sitio está en la posición 128178 de la secuencia genómica de la viruela aviar, y se encuentra 5' de FPV107 y 5' de FPV108. Estos genes se transcriben de forma divergente, y el sitio de inserción se encuentra entre los dos elementos promotores para los dos ORF. En esta realización, una inserción que representa una secuencia de interés puede insertarse en esta posición dentro del genoma de la viruela aviar.
- 15 Regiones de inserción de la viruela aviar particularmente preferidas son la región FP14 y la región J de BamHI. En un vector preferido, los AATP CEA y MUC-1 se insertan en la región FP14 y las moléculas coestimulantes LFA-3, ICAM-1 y B7.1 se insertan en la región J de BamHI.

En una realización preferida, el sitio de inserción en la variolovacuna se designa el sitio de inserción 44/45. Este sitio de inserción se identificó por primera vez en MVA, donde el sitio de inserción 44/45 se encuentra entre los ORF 044L y 045L, y el sitio de inserción está entre las posiciones 37346-37357 en la secuencia genómica de MVA (N.º de acceso de Genbank U94848). Esta región está 5' del codón de iniciación de la traducción de MVA 044L y 3' del codón de terminación de la traducción de MVA 045L. En la variolovacuna Copenhague, para el sitio de inserción 44/45 los ORF correspondientes son F14L (homólogo a 044L de MVA) y F15L (045L de MVA), y el sitio de inserción es 5' del codón de iniciación de la traducción de la variolovacuna F14L y 3' del codón de terminación de la traducción de la variolovacuna F15L. La variolovacuna Copenhague, que contiene esta región y tiene su secuencia disponible como el Número de acceso de GenBank M35027, es una variolovacuna prototípica. El sitio de inserción análogo a sitios tales como 44/45 también puede usarse en otras cepas de la variolovacuna que incluyen variolovacuna Wyeth, NYVAC (donde no se cree que se modifique el sitio de inserción) y TROYVAC. En esta realización, la secuencia de ADN en el sitio de inserción especificado, es decir, entre los nucleótidos, está delecionada en el virus recombinante y se sustituye con inserciones definidas que representan una secuencia de interés.

20

25

30

Otro sitio de inserción útil según la presente invención es el sitio de inserción en la variolovacuna designado como el sitio de inserción 49/50. Este sitio de inserción se identificó por primera vez en MVA, donde el sitio de inserción 49/50 se encuentra entre los ORF 049L y 050L, y el sitio de inserción está entre las posiciones 42687 - 42690 en la secuencia genómica de MVA (N.º de acceso de Genbank U94848). Esta región es 5' del codón de iniciación de la traducción de 049L de MVA y 3' del codón de terminación de la traducción de 050L de MVA. En la variolovacuna Copenhague, para el sitio de inserción 49/50, los ORF correspondientes son E2L (homólogo a 049L de MVA) y E3L (050L de MVA), y el sitio de inserción es 5' del codón de iniciación de la traducción de la variolovacuna E2L y 3' del codón de terminación de la traducción de la variolovacuna E3L. La variolovacuna Copenhague es una variolovacuna prototípica. Similarmente, el sitio de inserción 49/50 también puede usarse en otras cepas de variolovacuna que incluyen NYVAC (donde no se cree que se modifique el sitio de inserción) y TROYVAC. En esta realización, la secuencia de ADN en el sitio de inserción especificado, es decir, entre los nucleótidos, está delecionada en el virus recombinante y se sustituye con inserciones definidas que representan una secuencia de interés.

35

40

En otra realización preferida más, el sitio de inserción en la variolovacuna se designa el sitio de inserción 124/125. Este sitio de inserción se identificó por primera vez en MVA, donde el sitio de inserción 124/125 se encuentra entre los ORF 124L y 125L, y el sitio de inserción está entre las posiciones 118481 - 118482 en la secuencia genómica de MVA (N.º de acceso de Genbank U94848). Esta región está 5' del codón de iniciación de la traducción de 124L de MVA y 3' del codón de terminación de la traducción de 125L de MVA. En la variolovacuna Copenhague, para el sitio de inserción 124/125 los ORF correspondientes son A13L (homólogo a 124L de MVA) y A14L (125L de MVA), y el sitio de inserción está 5' del codón de iniciación de la traducción de variolovacuna A13L y 3' del codón de terminación de la traducción de la variolovacuna A14L. Similarmente, el sitio de inserción 124/125 también puede usarse en otras cepas de variolovacuna que incluyen NYVAC (donde no se cree que se modifique el sitio de inserción) y TROYVAC. En esta realización, la secuencia de ADN en el sitio de inserción especificado, es decir, entre los nucleótidos, está delecionada en el virus recombinante y se sustituye con inserciones definidas que representan una secuencia de interés.

45

50

Además del requisito de que el gen se inserte en un sitio de inserción, la expresión satisfactoria del (de los) gen(es) insertado(s) por el poxvirus recombinante modificado requiere la presencia de un promotor operativamente unido al gen deseado, es decir, en la relación apropiada con el gen insertado. El promotor debe ponerse de manera que se localice en la dirección 5' del gen que va a expresarse. Los promotores son muy conocidos en la técnica y pueden seleccionarse fácilmente dependiendo del huésped y el tipo de célula a la que se desea dirigirse.

55

Por ejemplo en poxvirus, pueden usarse promotores poxvirales, que incluyen, pero no se limitan a, el promotor 7.5K de la variolovacuna, el promotor 30K de la variolovacuna, el promotor 40K de la variolovacuna, el promotor I3 de la variolovacuna. Otros promotores preferidos incluyen el promotor temprano sintético/tardío (sE/L) y el promotor 7.5. También pueden usarse elementos potenciadores en combinación para aumentar el nivel de expresión. Además, en algunas realizaciones se prefiere el uso de promotores inducibles, que también son muy conocidos en la técnica.

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

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

En otra realización preferida, el genoma del poxvirus se modifica para llevar un ácido nucleico que codifica un antígeno asociado al cáncer pancreático que está operativamente unido a un promotor "inducible". Tales sistemas inducibles permiten la cuidadosa regulación de la expresión génica. Véase Miller y Whelan, Human Gen Therapy, 8:803-815 (1997). La expresión "promotor inducible" o "sistema inducible", como se usa en el presente documento, incluye sistemas en los que la actividad del promotor puede regularse usando un agente externamente administrado. Tales sistemas incluyen, por ejemplo, sistemas que usan el represor *lac* de *E. coli* como modulador de la transcripción para regular la transcripción de los promotores de célula de mamífero que llevan el operador *lac* (Brown et al. Cell, 49:603-612, 1987); sistemas que usan el represor de tetraciclina (*tetR*) (Gossen y Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551, 1992; Yao et al., Human Gen Ther. 9:1939-1950, 1998; Shokelt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6522-6526, 1995). Otros de tales sistemas incluyen el dímero FK506, VP16 o p65 usando castradiol, RU486/mifepristona, difenol muristerona o rapamicina (véase, Miller y Whelan, arriba, en la Figura 2). Otro ejemplo más es un sistema inducible por ecdisona (véase, por ejemplo Karns et al, MBC Biotechnology 1:11, 2001). Están disponibles sistemas inducibles, por ejemplo, de Invitrogen, Clontech y Ariad. Se prefieren sistemas que usan un represor con el operón. Se adaptarían estos promotores sustituyendo el promotor de mamífero por porciones de promotores de pox.

En una realización preferida de la invención, el promotor puede ser selectivamente activo en células cancerosas; un ejemplo de un promotor tal es el promotor de PEG-3, como se describe en la solicitud de patente internacional N.º PCT/US99/07199, publicación N.º WO 99/49898 (publicada en inglés el 7 de octubre de 1999); otros ejemplos no limitantes incluyen el promotor del gen del antígeno específico de la próstata (O'Keefe et al., 2000, Prostate 45:149-157), el promotor del gen de la calicreína 2 (Xie et al., 2001, Human Gen Ther. 12:549-561), el promotor del gen de la alfa-fetoproteína humana (Ido et al., 1995, Cancer Res. 55:3105-3109), el promotor del gen *c-erbB-2* (Takakuwa et al., 1997, Jpn. J. Cancer Res. 88:166-175), el promotor del gen del antígeno carcinoembrionario humano (Lan et al., 1996, Gastroenterol. 111:1241-1251), el promotor del gen del péptido liberador de gastrina (Inase et al., 2000, Int. J. Cancer 85:716-719), el promotor del gen de la telomerasa transcriptasa inversa humana (Pan y Koenman, 1999, Med. Hypotheses 53:130-135), el promotor del gen de hexocinasa II (Katabi et al., 1999, Human Gen Ther. 10:155-164), el promotor del gen de L-plastina (Peng et al., 2001, Cancer Res. 61:4405-4413), el promotor del gen de enolasa específica de neurona (Tanaka et al., 2001, Anticancer Res. 21:291-294), el promotor del gen *midkina* (Adachi et al., 2000, Cancer Res. 60:4305-4310), el promotor del gen de mucina humana MUC-1 (Stackhouse et al., 1999, Cancer Gene Ther. 6:209-219) y el promotor del gen de mucina humana MUC-4 (Nº de acceso de GenBank AF241535, publicado el 19 de junio de 2001 por J Biol. Chem., "JBC Papers in Press" como el manuscrito M104204200).

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

En una realización preferida de la presente invención, se introduce un "elemento regulador de la transcripción" o "TRE" para la regulación del gen de interés. Como se usa en el presente documento, un TRE es una secuencia de polinucleótidos, preferentemente una secuencia de ADN, que regula (es decir, controla) la transcripción de una secuencia de polinucleótidos operativamente unida por una ARN polimerasa para formar ARN. Como se usa en el



presente documento, un TRE aumenta la transcripción de una secuencia de polinucleótidos operativamente unida en una célula huésped que permite que funcione el TRE. El TRE comprende un elemento potenciador y/o elemento promotor de pox, que puede o puede no derivar del mismo gen. Los componentes de promotor y potenciador de un TRE pueden estar en cualquier orientación y/o distancia desde la secuencia codificante de interés, y comprender

5 multímeros de la anterior, en tanto que se obtenga la actividad de transcripción deseada. Como se trata en el presente documento, un TRE puede o puede no carecer de un elemento silenciador. Por ejemplo, el elemento regulador específico de la glándula mamaria proporciona un grupo de TRE útiles según la presente invención. Un ejemplo es el promotor de la alfa-lactalbúmina (ALA) humana (para la construcción específica véase, por ejemplo, Anderson et al. Cancer Gene Ther 7:845-852, 2000).

10 Otra realización preferida de la presente invención proporciona un "potenciador" para la regulación del gen de interés. Un potenciador es un término bien entendido en la materia y es una secuencia de polinucleótidos derivada de un gen que aumenta la transcripción de un gen que está operativamente unido a un promotor a un grado que es mayor que la activación de la transcripción efectuada por el propio promotor cuando se une operativamente al gen, es decir, aumenta la transcripción del promotor.

15 La activación de la transcripción puede medirse de varias formas conocidas en la técnica (y descritas más abajo en más detalle), pero se mide generalmente por la detección y/o cuantización de ARNm o el producto de proteína de la secuencia codificante bajo el control de (es decir, operativamente unido a) el elemento regulador. Como se trata en el presente documento, el elemento regulador puede ser de longitudes variables, y de composición de secuencia variable. Por la activación de la transcripción, se pretende que la transcripción aumente por encima de los niveles

20 basales en la célula diana al menos aproximadamente 2 veces, preferentemente al menos aproximadamente 5 veces, preferentemente al menos aproximadamente 10 veces, más preferentemente al menos aproximadamente 20 veces. Más preferentemente al menos aproximadamente 50 veces, más preferentemente al menos aproximadamente 100 veces, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 200 veces, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 400 a aproximadamente 500 veces, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 1000 veces. Los niveles basales son generalmente el nivel de actividad, si lo hay, en células no diana, o el nivel de actividad (si lo hay) de una construcción indicadora que carece del TRE de interés como se prueba en un tipo de célula diana.

En la presente invención, los vectores de poxvirus dirigidos a células diana de cáncer específicas también pueden generarse con el uso de TRE que son preferencialmente funcionales en las células tumorales diana. En esta

30 realización, el (los) vector(es) de poxvirus se administra(n) directamente en el sitio del tumor (es decir, inyección intratumoral), y se desea una reacción local directa. Ejemplos no limitantes de TRE heterólogos específicos de células tumorales, y ejemplos no limitantes de posibles células de cáncer pancreático diana respectivas, incluyen TRE de los siguientes genes: glucoproteína similar a mucina DF3 (MUC-1), antígeno carcinoembrionario (CEA), activador de plasminógeno urocinasa (uPA) y su gen receptor (cánceres de mama, colon y hígado), y HER-2/neu (c-erbB2/neu).

35

En la presente invención pueden usarse TRE específicos de tumor conjuntamente con TRE específicos de tejido tales como el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular. Se conocen en la técnica TRE específicos de tejido adicionales.

#### Genes adicionales

40 Un grupo preferido de ácidos nucleicos para inserción en el vector de poxvirus útil según la presente invención codifican anticuerpos. Los anticuerpos se han usado desde hace tiempo en la ciencia biomédica como herramientas *in vitro* para la identificación, purificación y manipulación funcional de antígenos diana. Los anticuerpos han sido explotados *in vivo* para tanto aplicaciones de diagnóstico como terapéuticas. En muchos casos, se conocen secuencias de aminoácidos e incluso de nucleótidos específicas de las porciones relevantes de las cadenas

45 pesadas y ligeras de anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, puede producirse un poxvirus que codifica al menos las CDR de los fármacos contra el cáncer de anticuerpo monoclonal rituximab, trastuzumab y cetuximab. Un poxvirus puede codificar anticuerpos tetrámeros o anticuerpos monocatenarios de longitud completa. En una realización, avances recientes en la ingeniería de los anticuerpos han permitido ahora que el gen que codifica anticuerpos se manipule de manera que el dominio de unión a antígeno también pueda expresarse

50 intracelularmente. Estos anticuerpos intracelulares se llaman "intracuerpos" (Marasco et al. Gene Therapy, 4:11-15, 1997; patentes de EE.UU. N.º 5.965.371; 5.851.829; 6.329.173; y 6.072.036). Preferentemente, los ácidos nucleicos que codifican intracuerpos codifican un anticuerpo humanizado de cadena única. Un anticuerpo preferido es un anticuerpo contra OX40 como se ha descrito anteriormente (intracuerpo de OX40).

#### Vectores a medida

55 En una realización, el sistema de la presente invención permite que el tratamiento sea adaptado al individuo particular y estado de enfermedad. En esta realización, el AATP usado puede ser adaptado al paciente individual determinando qué AATP están siendo expresados a altos niveles en las células cancerosas del paciente.

5 Con el desarrollo de la farmacogenética y la farmacogenómica, es ahora factible obtener información detallada sobre el tipo de cáncer pancreático que afecta a un individuo. Por consiguiente, pueden evaluarse el tipo y la etapa presente del cáncer pancreático usando métodos histoquímicos, inmunohistoquímicos y genéticos. Estos datos pueden dar información adicional sobre la expresión de antígenos que puede esperarse a medida que avanza la enfermedad. De esta forma, pueden añadirse AATP adicionales que se espera que se expresen a medida que la enfermedad avanza para maximizar la respuesta inmunitaria.

10 Los antígenos del cáncer pancreático útiles según la presente invención se adaptan preferentemente al paciente individual determinando qué antígenos están siendo anormalmente expresados o expresados a niveles anormalmente altos en las células cancerosas o precancerosas del individuo. Los antígenos útiles según el sistema de la presente invención también pueden seleccionarse según la etapa de las células cancerosas. Generalmente, se usan datos farmacogenéticos y farmacogenómicos, además de inmunohistoquímicos, de las células del individuo para determinar la selección de antígenos asociados al cáncer pancreático preferidos en el sistema de la presente invención. En una realización preferida, el paciente tiene más de un tipo de cáncer, y los antígenos apropiados se seleccionan basándose en el cáncer específico expresado por el paciente.

15 El diseño a medida de antígenos del cáncer pancreático para ajustarse a las necesidades de un paciente individual puede realizarse usando información obtenida de, por ejemplo, análisis inmunohistoquímico de una biopsia de tumor pancreático. Alternativamente, puede realizarse un análisis de matrices de ácido nucleico del perfil de expresión de la muestra de tumor pancreático particular usando ARNm aislado de la muestra de tejido de cáncer pancreático.

20 Otras matrices de ácidos nucleicos útiles adecuadas para el diseño a medida de los antígenos para los métodos de la presente invención usando vectores de poxvirus incluyen, por ejemplo, una matriz de cáncer que permite la caracterización de perfiles de expresión de genes implicados en cánceres pancreáticos.

#### Pacientes de cáncer pancreático / sujetos para administración

25 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden usarse para el tratamiento de cáncer, particularmente para la inmunoterapia de cáncer pancreático. Primero se criba el paciente para determinar la presencia de cáncer pancreático. También puede cribarse el paciente para determinar qué etapa de cáncer pancreático tiene el paciente.

30 Las composiciones farmacéuticas, formulaciones de vacuna y métodos de la presente invención pueden usarse para tratar un individuo con cualquier etapa de cáncer pancreático, que incluye, pero no se limita a, adenocarcinoma del páncreas, cáncer pancreático recurrente, cáncer pancreático de etapa II; cáncer pancreático de etapa III; cáncer pancreático de etapa IV (un cáncer metastásico); cáncer pancreático de etapa IVA; y cáncer pancreático de etapa IVB. Preferentemente, el cáncer ha sido histológicamente confirmado. En una realización, el adenocarcinoma pancreático es inextirpable.

En una realización preferida, los vectores de poxvirus de la presente invención se usan para tratar pacientes con cáncer pancreático de etapa IIIa o etapa IIIb.

35 En una realización preferida, los vectores de poxvirus de la presente invención se usan para tratar pacientes con cáncer pancreático metastásico (etapa IV).

En una realización, el paciente que tiene cáncer pancreático ya ha fracasado en otras pautas de tratamiento, por ejemplo, quimioterapia.

40 Si el individuo tiene otros cánceres, preferentemente se añadirían antígenos asociados a tumor adicionales que están asociados a aquellas afecciones. Dentro de tales métodos, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se administran a un paciente, normalmente a animales de sangre caliente, preferentemente un ser humano.

45 En una realización, las composiciones farmacéuticas pueden usarse para prevenir el desarrollo de un cáncer, particularmente en un individuo en riesgo más alto de desarrollar tal cáncer que otros individuos, o para tratar un paciente aquejado con cáncer pancreático.

50 Las composiciones farmacéuticas y vacunas pueden administrarse tanto antes de como tras la extirpación quirúrgica de tumores primarios y/o tratamiento tal como administración de radioterapia o fármacos quimioterapéuticos convencionales. Como se trata más adelante, la administración de las composiciones farmacéuticas puede ser por cualquier método adecuado, que incluye administración por vías intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica, anal, vaginal, tópica y oral.

55 El sistema de tratamiento de cáncer pancreático usando poxvirus recombinantes descrito en el presente documento puede usarse para cualquier huésped. Preferentemente, el huésped es un mamífero. Mamíferos preferidos incluyen primates tales como seres humanos y chimpancés, animales domésticos tales como caballos, vacas, cerdos, etc., y mascotas tales como perros y gatos. Más preferentemente, el mamífero huésped es un primate o animal doméstico. Todavía más preferentemente, el mamífero huésped es un ser humano.

Administración de vectores de poxvirus

La introducción del vector viral que lleva el gen que va a administrarse a la célula huésped diana puede efectuarse por cualquier método conocido para aquellos expertos en la materia.

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

10 La administración profiláctica del poxvirus recombinante sirve para prevenir, mejorar o retrasar el cáncer pancreático. Cuando se proporciona terapéuticamente, el poxvirus recombinante se proporciona en o después del diagnóstico del cáncer pancreático. Así, la presente invención puede proporcionarse tanto antes del cáncer pancreático anticipado como después del inicio de la formación de tumor pancreático.

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

20 La vía de inoculación puede ser escarificación, intravenosa (I.V.), intramuscular (I.M.), subcutánea (S.C.), intradérmica (I.D.), intraperitoneal (I.P.), intratumoral, y similares, que conlleva provocar una respuesta protectora contra el agente causante de la enfermedad. En una realización preferida, se usa administración subcutánea. La dosis se administra al menos una vez. Pueden administrarse dosis posteriores como se indica.

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

30 En proporcionar un mamífero con el poxvirus recombinante de la presente invención, preferentemente un ser humano, la dosificación de poxvirus recombinante administrado variará dependiendo de factores tales como la edad del mamífero, peso, altura, sexo, afección médica general, historia médica previa, progresión de la enfermedad, carga tumoral y similares.

35 El término "dosis unitaria", como se refiere al inóculo, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de poxvirus recombinante calculada para producir el efecto inmunogénico deseado en asociación con el diluyente requerido. Las especificaciones para la novedosa dosis unitaria de un inóculo de la presente invención están impuestas por, y dependen de, las características únicas del virus recombinante y el efecto inmunológico particular que va a lograrse.

40 En general, se desea proporcionar al receptor con una dosificación de virus recombinante en el intervalo de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^{10}$  unidades formadoras de placa (ufp), aunque puede administrarse una dosis más baja o más alta. Una dosificación preferida es aproximadamente  $2 \times 10^8$  ufp, por ejemplo en un volumen de aproximadamente 0,5 ml.

Se inyectaría una cantidad suficiente de los vectores virales para obtener una concentración en suero en el órgano de interés de la proteína que oscila entre aproximadamente 1  $\mu\text{g/ml}$  y 20  $\mu\text{g/ml}$ . Más preferentemente entre aproximadamente 0,1  $\mu\text{g/ml}$  y 10  $\mu\text{g/ml}$ . Todavía más preferentemente, entre aproximadamente 0,5  $\mu\text{g/ml}$  y 10  $\mu\text{g/ml}$ .

45 Ejemplos de métodos de administración del poxvirus recombinante en mamíferos incluyen, pero no se limitan a, exposición de células tumorales al virus recombinante *ex vivo*, o inyección del poxvirus recombinante en el huésped afectado por administración intravenosa, S.C., I.D. o I.M. del virus. Alternativamente, el poxvirus recombinante o combinación de vectores recombinantes pueden administrarse localmente por inyección directa en la lesión cancerosa o tumor o administración tópica en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La cantidad de poxvirus recombinante que lleva la secuencia de ácidos nucleicos de uno o más antígenos en combinación con secuencias de ácidos nucleicos que codifican múltiples moléculas coestimulantes que van a administrarse se basa en el título de partículas virales. Un intervalo preferido del inmunogén que va a administrarse es aproximadamente  $10^5$  a  $10^{12}$  (por ejemplo, aproximadamente  $10^7$  a  $10^{10}$  unidades formadoras de placa (ufp) por sujeto. La equivalencia de ufp a partículas de virus se diferencia según el método de valoración de ufp específico usado, aunque una ufp normalmente es igual a aproximadamente 5 a 100 partículas de virus. Si el mamífero que va a inmunizarse ya está aquejado con cáncer o cáncer metastásico, la vacuna puede administrarse conjuntamente con otros tratamientos terapéuticos tales como quimioterapia o radiación.

El programa para la administración de los vectores de poxvirus normalmente implica administración repetida del vector de refuerzo, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, el vector de sensibilización inicial puede administrarse 1 - 3 veces, por ejemplo cada 2 - 4 semanas durante un total de 6 - 12 semanas. El vector de refuerzo se administra entonces cada 2 - 4 semanas a partir de aquí, por ejemplo durante un total de al menos 5 - 15 vacunaciones de refuerzo. En una realización preferida, el sujeto recibe una vacunación con el vector de sensibilización, seguido cada 2 semanas a partir de aquí con el vector de refuerzo durante 6 refuerzos, seguido de cada 4 semanas a partir de aquí y continuando dependiendo de la progresión de la enfermedad.

El sistema de la invención puede usarse ventajosamente con otras pautas de tratamiento. Por ejemplo, el sistema puede usarse conjuntamente con opciones de tratamiento tradicionales para el cáncer pancreático que incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia, acupuntura y acupresión.

Protocolos de quimioterapia para el tratamiento de cáncer pancreático son muy conocidos en la técnica, y pueden incluir una variedad de agentes quimioterapéuticos. Un grupo preferido de agentes quimioterapéuticos son capecitabina, irinotecan o 5-fluorouracilo.

Otros agentes quimioterapéuticos preferidos son docetaxel, gemcitabina

Agentes quimioterapéuticos adicionales incluyen los taxanos farmacéuticamente aceptables, tales como, por ejemplo, docetaxel, taxotere, paclitaxel, 7-epi-taxol, 10-deacetiltaxol, además de mezclas de los mismos, 5-fluorouracilo (5-FU), cisplatino, gemcitabina, irinotecan (también llamado Camposar.RTM. o CPT-11), y tamoxifeno. El 5-FU puede administrarse con leucovorina. La quimioterapia puede comprender dosis de 5-FU que oscilan de 50 a 1000 mg/m<sup>2</sup>/d, con leucovorina a 90 mg/d a 100 mg/d o irinotecan que oscilan de 200-300 mg/m<sup>2</sup>/d, gemcitabina que oscilan de 100-1500 mg/m<sup>2</sup>/d; cisplatino (platinol) que oscilan de 40 mg-100 mg/m<sup>2</sup>/d; y tamoxifeno de 10 mg-20 mg de comprimido por día. Por ejemplo, las combinaciones de agentes quimioterapéuticos comprenden 5-FU-cisplatino, 5-FU-gemcitabina o 5-FU con leucovorina y cisplatino.

Otros ejemplos de fármacos antineoplásicos que pueden usarse en las diversas realizaciones de la invención, que incluyen composiciones farmacéuticas y formas de dosificación y kits de la invención, incluyen, pero no se limitan a: acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sodio; bropirimina; busulfano; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; elsamitricina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxiiurea; clorhidrato de idarubicina; ifosfamida; ilmofofina; interleucina II (incluyendo interleucina II recombinante, o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-I a; interferón gamma-I b; iproplatino; clorhidrato de irinotecan; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; mecloretamina; clorhidrato de óxido de mecloretamina clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalan; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedpa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamina; ormaplatino; oxisurano; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromano; piposulfano; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfimer sódico; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; riboprina; roglitimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan sódico; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinstatina; clorhidrato de zorubicina; improfosulfano, benzodepa, carbocuna, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida, trimetilolomelamina, clornafazina, novembicina, fenesterina, trofosfamida, estermustina, clorozotocina, gemzar, nimustina, ranimustina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, aclacinomicinas, actinomicina F(1), azaserina, bleomicina, carubicina, carzinofilina, cromomicina, daunorubicina, daunomicina, 6-diazo-5-oxo-1-norleucina, doxorubicina, olivomicina, plicamicina, porfiromicina, puomicina, tubercidina, zorubicina, denopterina, pteropterina, 6-mercaptopurina, ancitabina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, enocitabina, pulmozima, aceglatona, glucósido de aldofosfamida, bestrabucilo, defofamida, demecolcina, elfornitina, acetato de eliptinio, etoglúcido, flutamida, hidroxiiurea, lentinano, fenamet, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, razoxano, espirogermanio, tamoxifeno, taxotere,

ácido tenuazónico, triazicuona, 2,2',2"-triclorotrietilamina, uretano, vinblastina, vincristina, vindesina y agentes relacionados. 20-epi-1,25-dihidroxitamina D3; 5-etniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografolida; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína-1 morfogenética antidorsalizante; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastona; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores de los genes de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetron; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosporina; derivados de beta-lactama; beta-aletina; beta-clamicina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilpermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; IL-2 del virus de la viruela del canario; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína cinasas (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemina B; deslorelina; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diacuona; didemina B; didox; dietilnoespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenilespiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetron; doxifluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texafirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; heregulina; hexametileno bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor de los receptores del factor de crecimiento 1 similar a la insulina; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetron; jasplaquinolida; kahalalida F; triacetato de lamelarina-N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón alfa de leucocitos; leuprolida+estrógeno+progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos de platino lipófilos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecan; texafirina de lutecio; lisofilina; péptidos líticos; maitasina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteína de matriz; menogarilo; merbarona; meterilina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario de emparejamiento incorrecto; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; mitotoxina factor de crecimiento de fibroblastos-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotrofina coriónica humana; monofosforil lípido A+estreptocinasa de pared celular de miobacteria; mopidamol; inhibidor de los genes de resistencia a múltiples fármacos; terapia basada en multisupresor tumoral 1; antineoplásico de mostaza; micaperóxido B; extracto de pared celular micobacteriana; miriaporona; N-acetilidinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridróico; endopeptidasa neutra; nilutamide; nisamicina; moduladores del óxido nítrico; antioxidante de nitrógeno; nitrulina; O6-bencilguanina; octreotida; oquicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetron; ondansetron; oracina; inductor de citocina oral; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; taxel; análogos de taxel; derivados de taxel; palaumina; palmitoilrizoxina; ácido pamidróico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; paceliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato de pentosán sódico; pentostatina; pentrozol; perflubron; perfosfamida, alcohol perilítico; fenacinomicina; acetato de fenilo; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; clorhidrato de pilocarpina; pirarubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor de los activadores del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfimer sódico; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores de proteasoma; modulador inmune basado en proteína A; inhibidor de proteína cinasa C; inhibidores de proteína cinasa C, microalgal; inhibidores de proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietileno y hemoglobina piridoxilada; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetron; inhibidores de ras farnesil proteína transferasa; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohituquina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcifitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de la senescencia; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de la transducción de señales; proteína de unión a antígenos monocatenaria; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato sódico; fenilacetato sódico, solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicarnicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiastina 1; escualamina; inhibidor de citoblastos; inhibidores de la división de citoblastos; estiapiamida; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista de los péptidos intestinales vasoactivos superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glucosaminoglicanos sintéticos; talimustina; metyoduro de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; tecogalan sódico; tegafur; telarapirilio; inhibidores de la telomerasa; temporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista de receptores de timopoyetina; timotrinano;

hormona estimulante de la tiroides; etiopurpurina de etilo de estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor de citoblastos totipotentes; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de tirosina cinasas; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital, antagonistas de receptores de urocinaasa; vapreotida; variolina B; sistema vectorial, terapia génica de eritrocitos; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb y zinostatina estimalámero. Fármacos antineoplásicos adicionales preferidos son 5-fluorouracilo y leucovorina. Terapéuticos para el cáncer adicionales incluyen anticuerpos monoclonales tales como rituximab, trastuzumab y cetuximab.

La magnitud de una dosis profiláctica o terapéutica de cada principio activo en el tratamiento de un paciente con un tumor sólido normalmente variará con los principios activos específicos, la gravedad y tipo de tumor, y la vía de administración. La dosis y la frecuencia de dosis pueden variar según la edad, peso corporal, respuesta y los antecedentes personales del paciente; también debe considerarse la probabilidad de reaparición metastásica. Pautas de dosificación adecuadas pueden ser fácilmente seleccionadas por aquellos expertos en la materia con consideración adecuada de tales factores siguiendo, por ejemplo, dosificaciones informadas en la bibliografía y recomendadas en el Physician's Desk Reference® (54th ed., 2000). A menos que se indique lo contrario, la magnitud de una dosis profiláctica o terapéutica de cada fármaco usado en una realización de la invención será aquella que es conocida para aquellos expertos en la materia por ser segura y eficaz, o es reglamentariamente autorizada.

En el presente documento también se desvela una composición farmacéutica que comprende un poxvirus recombinante y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Además de ser un sistema de tratamiento con prácticamente ningún efecto secundario tóxico, el efecto del material genético administrado usando el sistema de la invención puede ser fácilmente y cuidadosamente monitorizado y regulado. Vectores de poxvirus preferidos tales como swinepox solo expresan el material genético durante aproximadamente dos semanas. Así, si se proporciona tratamiento eficaz dentro del periodo de tiempo y debido a que el sistema de vector es auto-limitante, no se producirá material innecesario después de ese periodo de tiempo. Si se necesitan dosificaciones adicionales, la administración adicional del material puede llevarse a cabo repitiendo la inyección. Como se ha descrito anteriormente, en ciertos casos, la adición de un segundo, tercer, etc., material antigénico o inmunoestimulante también puede añadirse con los vectores posteriores.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1: rV-MUC-1

rV-MUC-1 consiste en un virus de la variolovacuna recombinante vivo que expresa el antígeno de tumor MUC-1 humano. MUC-1 se expresa en exceso en varios cánceres, que incluyen carcinomas de mama, ovario y pancreático. Además, la glucosilación anormal de MUC-1 en células de carcinoma hace que el MUC-1 derivado de tumor sea antigénicamente distinto de MUC-1 normal.

En resumen, el virus parental usado para la generación de la vacuna rV-MUC-1 era una cepa clínica de placa del material de semilla de virus usado por Wyeth para producir la vacuna de la viruela Dryvax® autorizada. Se construyó rV-MUC-1 mediante recombinación homóloga *in vivo* entre el ADN del virus de la variolovacuna parental y un vector plasmídico que contiene el gen MUC-1. El vector plasmídico también lleva el gen *lacZ* de *E. coli*, que se insertó simultáneamente en el genoma recombinante con el gen MUC-1. Se usó un ensayo cromogénico para  $\beta$ -galactosidasa, codificado por el gen *lacZ*, para seleccionar el candidato a vacuna final, que se verificó por análisis de expresión genómica y de proteínas. El virus recombinante se usó entonces para generar un material de virus maestro, que se caracterizó por análisis de expresión genómica y de proteínas y probando para potencia, esterilidad, micoplasma y actividad de transcriptasa inversa. Todos los resultados de las pruebas han apoyado la identidad y seguridad del virus recombinante para su uso en la producción de vacuna.

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

El esqueleto de plásmido, que incluye el origen de replicación bacteriano y el gen de resistencia a ampicilina, se derivó del vector plasmídico pUC8 por delección de un fragmento Hae II de 442 pares de bases (pb) que contiene los policonectores pUC8 y el gen *lacZ*. Se insertó un conector que contenía un único sitio Hind III en el único sitio Nde I en este vector para facilitar la clonación adicional. Se aislaron las secuencias J de Hind III de la variolovacuna y el promotor 40K de ADN genómico preparado a partir de la cepa WR (Panicali et al., 1981) de virus de la variolovacuna. Las secuencias de la región J de Hind III, que flanquean los genes MUC-1 y *lacZ*, incluyen un

fragmento de Dra I-EcoR I de 508 pb en la dirección 5' de la secuencia de 40K-MUC-1 y un fragmento de EcoR I-Dra I de 633 pb en la dirección 3' de la secuencia de C1-*lacZ*. El elemento promotor 40K se aisló como un fragmento de Dra I-FnuD II de 161 pb de la región H de Hind III del virus de la variolovacuna (Rosel et al., J. Virol. 60:436-49 (1986)). El elemento promotor C1 se aisló como un fragmento Sau3A I de 240 pb del virus de la viruela aviar (Jenkins et al., 1991). El gen *lacZ* de *E. coli* se aisló como un fragmento BamH I de 3100 pb de pDP500 (Panicali et al., 1986).

El gen que codifica MUC-1 se aisló en el Instituto del Cáncer Dana-Farber de una genoteca de ADNc derivado de ARN de la línea celular de carcinoma de mama MCF-7 humano (Siddiqui et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2320-23 (1989)). Se usó una versión truncada del gen, que consiste en la secuencia señal, seis secuencias de repetición en tándem relacionadas, pero no idénticas, y la secuencia codificante única de 3'. El gen estuvo contenido en un fragmento de 1831 pb que incluía la secuencia codificante truncada, 6 nucleótidos de la región no traducida 5' y 298 nucleótidos de la región no traducida 3' (Gendler et al., J. Biol. Chem. 265:15286-93 (1990)).

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

Se usó una cepa clínica purificada en placa de la cepa Wyeth (New York City Board of Health) de la variolovacuna como virus parental para esta vacuna recombinante. La recombinación *in vivo* entre el vector plasmídico y el ADN viral produjeron la formación de un virus recombinante en el que la secuencia del gen TK de la variolovacuna estaba interrumpida por el gen MUC-1, bajo la dirección de la transcripción del promotor 40K, y el gen *lacZ*, bajo el control del promotor C1, como se ilustra en la Figura 2.

Se usó un ensayo cromogénico para  $\beta$ -galactosidasa para identificar y aislar virus recombinantes que contienen las secuencias de *lacZ* y MUC-1. Este método se aprovecha de la capacidad de virus de la variolovacuna para formar placas distintas cuando crecen sobre monocapas de células permisivas. Después de la recombinación *in vivo*, las células se infectaron con virus de progenie hasta que las distintas placas fueron visibles, momento en el que las placas se superpusieron con un sustrato cromogénico para  $\beta$ -galactosidasa (Bluo-Gal™). Las placas virales que expresan *lacZ* aparecieron azules sobre un fondo claro. Se recogieron placas positivas de la monocapa de células y su progenie se propagó adicionalmente. Rondas repetidas de aislamiento de placas y volver a sembrar en presencia de Bluo-Gal produjeron la purificación del recombinante deseado, que entonces se amplificó y se sometió a análisis de expresión genómica y de proteínas.

La línea de células huésped usada para la preparación del virus recombinante rV-MUC-1 fue la línea celular de riñón de mono verde africano CV-1, obtenida de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC N.º CCL 70). Se establecieron bancos de células maestros y de trabajo (MCB y WCB) y se caracterizaron según las recomendaciones Puntos a considerar. Todos los datos apoyaron la seguridad de la línea celular para su uso en la producción de vacuna (BB-MF 6587, Volumen 1, p. 40-49 y Modificación N.º 2).

Se fabricó rV-MUC-1 por infección de células dérmicas primarias de embrión de pollo (CED), obtenidas de pollos libres de patógenos específicos, con el virus recombinante. Se sembraron células CED en botellas rotatorias y se infectaron con el material de virus maestro. Al final del periodo de infección, las células se recogieron y se sacaron muestras para la prueba en proceso. Entonces, las células se lisaron por congelación y descongelación para liberar el virus. El lisado celular se clarificó por centrifugación a baja velocidad y el virus se purificó por centrifugación a través de un colchón de sacarosa al 36 %. El virus en masa purificado se almacenó a -70 °C o más frío hasta que se determinó el título. Entonces se descongeló el virus en masa purificado y la concentración se ajustó en consecuencia. El producto se administró asépticamente en viales estériles y se almacenó a -70 °C o más frío.

Se realizaron pruebas en el proceso y de producto final de rV-MUC-1 según el Art. 21 del CFR Parte 610 y las recomendaciones Puntos a considerar. El producto en masa en bruto se analizó para la presencia de diversos contaminantes, que incluyen bacterias y hongos, micoplasma, *M. tuberculosis* y virus casuales. El ensayo *in vitro* para los virus casuales requirió tratamiento especializado (dilución y neutralización) del material de prueba con el fin de eliminar la interferencia por el virus de la variolovacuna producto. Se probó el recipiente final para esterilidad, identidad (análisis de expresión genómica y de proteína), potencia (valoración de virus), seguridad general, aspecto y pureza. La prueba de seguridad general se realizó usando una dilución 1:10 del material del recipiente final, otra vez para eliminar la interferencia por el virus de la variolovacuna producto. La caracterización de producto adicional incluyó la cuantificación de ADN en suero y celular presente en el producto final, y la evaluación de la estabilidad de la vacuna.

La prueba de seguridad preclínica de rV-MUC-1 comprendió una evaluación de neurovirulencia, que se evaluó por una prueba de DL<sub>50</sub> intracraneal estándar en ratones recién destetados. Los resultados indicaron que el producto era menos neurovirulento que la vacuna de la viruela Dryvax autorizada, y apoyó la seguridad de esta vacuna para administración humana.

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

rV-CEA(6D)/TRICOM consiste en un virus de la variolovacuna recombinante vivo que co-expresa una forma modificada de antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno 3 asociado a la función de leucocitos (LFA-3), molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1) y B7.1. CEA es una proteína oncofetal que se expresa en exceso en carcinomas colorrectales, gástricos, pancreáticos, de mama y de pulmón de células no pequeñas humanas. LFA-3, ICAM-1 y B7.1 son moléculas coestimulantes expresadas en células presentadoras de antígenos que se requieren para la eficiente activación de linfocitos T.

En resumen, el virus parental usado para la generación de esta vacuna era una cepa clínica de placa del material de semilla de virus usado por Wyeth para producir la vacuna de la viruela Dryvax<sup>®</sup> autorizada. Como se muestra en la Figura 4, se construyó rV-CEA(6D)/TRICOM mediante recombinación homóloga *in vivo* entre el ADN de la variolovacuna parental y un vector plasmídico, pT8016 (véase la Figura 3), que contiene los genes CEA(6D), LFA-3, ICAM-1 y B7.1. El vector plasmídico también lleva el gen *lacZ* de *E. coli*, que se insertó simultáneamente en el genoma recombinante con los genes CEA(6D), LFA-3, ICAM-1 y B7.1. Se usó un ensayo cromogénico para β-galactosidasa, codificado por el gen *lacZ*, para seleccionar el candidato a vacuna final, que se verificó por análisis de expresión genómica y de proteínas. Entonces, el virus recombinante se usó para generar un material de virus maestro, que se caracterizó por análisis de expresión genómica y de proteínas y probando para potencia, esterilidad, micoplasma y actividad de transcriptasa inversa. Todos los resultados de las pruebas han apoyado la identidad y seguridad del virus recombinante para su uso en la producción de vacuna.

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

El esqueleto de plásmido de pT8016, que incluye el origen de replicación bacteriano y el gen de resistencia a ampicilina, se derivó del vector plasmídico pUC8 por delección de un fragmento Hae II de 442 pares de bases (pb) que contiene los policonectores pUC8 y el gen *lacZ*. Se insertó un conector que contenía un único sitio Hind III en el único sitio Nde I en este vector para facilitar la clonación adicional. Las secuencias J de Hind III de la variolovacuna y las secuencias promotoras de la variolovacuna se aislaron de ADN genómico preparado a partir de la cepa WR de la variolovacuna (Panicali et al., J. Virol. 37:1000-10 (1981)) o de TBC-Wy. Secuencias de la región J de Hind III, que flanquean los genes CEA(6D), LFA-3, ICAM-1, B7.1 y *lacZ*, incluyen un fragmento Dra I-EcoR I de 508 pb en la dirección 5' de la secuencia de 40K-CEA(6D) y un fragmento EcoR I-Dra I de 633 pb en la dirección 3' de la secuencia de C1-*lacZ*. El elemento promotor 40K se aisló como un fragmento Dra I - FnuD II de 161 pb de la región<sup>20</sup> H de Hind III de la cepa WR del virus de la variolovacuna. Se aisló el elemento promotor 30K (M2L) como un fragmento Sal I-Rsa I de 415 pb de la región M de Hind III del genoma de la variolovacuna (Goebel et al., Virology 179:247-66 (1990)). El elemento promotor I3 se aisló por amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una secuencia de 201 pb inmediatamente 5' al codón de iniciación de la traducción del gen I3 (Schmitt et al., J. Virol. 62:1889-97)). El promotor sE/L se aisló como un fragmento Hind III-Sal I de 60 pb de pJS-8, un derivado de pSC65 (Chakrabarti et al., BioTechniques 23:1094-97 (1997)). El elemento promotor C1 se aisló como un fragmento Sau3A I de 240 pb del virus de la viruela aviar (Jenkins et al., AIDS Res. Hum. Retrovir. 7:991-9 (1991)). El gen *lacZ* de *E. coli* se aisló como un fragmento BamH I de 3100 pb de pDP500 (Panicali et al., Gene 47:193-9 (1986)).

Se aislaron secuencias de CEA de un clon de ADNc humano de una genoteca de ADNc de células de carcinoma de colon construida en el Instituto Nacional del Cáncer (Kaufman et al., Int. J. Cancer 48:900-7 (1991)). Entonces se alteró el gen de CEA por mutagénesis *in vitro* para expresar la proteína de longitud completa que contiene un epítipo modificado. Esta mutación cambió el aminoácido codificado en la posición 609 (donde los aminoácidos están numerados empezando en la primera metionina, que incluye la secuencia conductora) de asparagina a ácido aspártico. El gen modificado, designado CEA(6D), se diseñó para potenciar la inmunogenicidad de CEA. El gen CEA(6D) estuvo contenido en un fragmento de 2109 pb que incluye la secuencia codificante entera para CEA y ninguna de la región no traducida 5' o 3'. El gen que codifica LFA-3 se aisló en el Instituto Nacional del Cáncer por amplificación por PCR de ADNc Quick-Clone de bazo humano (Clontech Inc.) usando la secuencia publicada (Wallner et al., J. Exp. Med. 166:923-32

(1987)). El gen estuvo contenido en un fragmento de 759 pb que incluye la secuencia codificante entera para LFA-3, 2 nucleótidos de la región no traducida 5' y 4 nucleótidos de la región no traducida 3'. El gen que codifica ICAM-1 se aisló en el Instituto Nacional del Cáncer por amplificación por PCR de ADNc transcrito de forma inversa a partir de



ARN de una línea de linfocitos B transformada por el virus de Epstein-Barr derivada de un hombre sano, usando la secuencia publicada (Staunton et al., Cell 52:925-33 (1988)). El gen estuvo contenido en un fragmento de 1721 pb que incluye la secuencia codificante entera para ICAM-1, 29 nucleótidos de la región no traducida 5' y 93 nucleótidos de la región no traducida 3'. El gen que codifica B7.1 se aisló en el Instituto Nacional del Cáncer por amplificación por PCR de ADNc derivado de ARN de la línea celular Raji humana (ATCC N.º CCL 86), usando la secuencia publicada (Chen et al., Cell 71:1093-1102 (1992)). El gen estuvo contenido en un fragmento de 1180 pb que incluye la secuencia codificante entera para B7.1, 22 nucleótidos de la región no traducida 5' y 291 nucleótidos de la región no traducida 3'.

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

Se usó una cepa clínica purificada en placa de la cepa Wyeth (New York City Board of Health) de la variolovacuna como virus parental para esta vacuna recombinante. La recombinación *in vivo* entre el vector plasmídico y el ADN viral produjeron la formación de un virus recombinante en el que el gen de timidina cinasa estuvo interrumpido por el gen CEA(6D), bajo el control de la transcripción del promotor 40K de la variolovacuna, el gen LFA-3, bajo el control de la transcripción del promotor 30K de la variolovacuna, el gen ICAM-1, bajo el control de la transcripción del promotor I3 de la variolovacuna, el gen B7.1, bajo el control de la transcripción del promotor sE/L, y el gen *lacZ*, bajo el control del promotor C1, como se ilustra en la Figura 4.

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

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

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

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

rF-CEA(6D)/TRICOM consiste en un virus de la viruela aviar recombinante vivo que co-expresa una forma modificada de antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno 3 asociado a la función de leucocitos (LFA-3), molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1) y B7.1. CEA es una proteína oncofetal que se expresa en exceso en carcinomas colorrectal, gástrico, pancreático, de mama y de pulmón de células no pequeñas humanos. LFA-3, ICAM-1 y B7.1 son moléculas coestimulantes expresadas sobre células presentadoras de antígenos que se requieren para la eficiente activación de linfocitos T.

En resumen, el virus parental usado para la generación de esta vacuna se purificó en placa de una cepa de vacuna adaptada a cultivo de tejido de FPV. Se construyó rF-CEA(6D)/TRICOM mediante recombinación homóloga *in vivo* entre el ADN de la viruela aviar parental y un vector plasmídico que contiene los genes CEA(6D), LFA-3, ICAM-1 y B7.1. El vector plasmídico también lleva el gen *lacZ* de *E. coli*, que se insertó simultáneamente en el genoma recombinante con los genes CEA(6D), LFA-3, ICAM-1 y B7.1. Se usó un ensayo cromogénico para  $\beta$ -galactosidasa, codificado por el gen *lacZ*, para seleccionar el candidato a vacuna final, que se verificó por análisis de expresión genómica y de proteínas. Entonces, el virus recombinante se usó para generar un material de virus maestro, que se caracterizó por análisis de expresión genómica y de proteínas y probando para potencia, esterilidad, micoplasma y actividad de transcriptasa inversa. Todos los resultados de las pruebas han soportado la identidad y seguridad del virus recombinante para su uso en la producción de vacuna.

La generación de virus de la viruela aviar recombinantes se lleva a cabo mediante recombinación homóloga *in vivo* entre ADN de la viruela aviar y un vector plasmídico que lleva las secuencias heterólogas a insertar. El vector plasmídico contiene uno o más genes quiméricos, cada uno de los cuales comprende un promotor de poxvirus asociado a una secuencia codificante de proteína, flanqueado por secuencias virales de una región no esencial del genoma del virus de la viruela aviar. El plásmido se transfecta en células infectadas con el virus parental de la viruela aviar, y la recombinación entre las secuencias de la viruela aviar en el plásmido y el ADN correspondiente en el genoma viral produce la inserción en el genoma viral de los genes quiméricos en el plásmido.

El vector plasmídico (pT2187) usado para la inserción de los genes CEA(6D), LFA-3, ICAM-1 y B7.1 en el genoma del virus de la viruela aviar parental por recombinación *in vitro* se ilustra en la Figura 5. Este vector contiene los siguientes elementos: (1) un origen de replicación procarionota para permitir la amplificación del vector en un huésped bacteriano; (2) el gen que codifica resistencia al antibiótico ampicilina, para permitir la selección de células huésped procarionotas que contienen el plásmido; (3) secuencias de ADN homólogas a la región I-J de BamH del genoma de la viruela aviar, que dirigen la inserción de secuencias extrañas en esta región mediante recombinación homóloga; (4)

un gen quimérico que comprende el promotor 40K de la variolovacuna de la transcripción asociado al gen CEA(6D); (5) un segundo gen quimérico que comprende el promotor 30K de la variolovacuna de la transcripción asociado al gen LFA-3; (6) un tercer gen quimérico que comprende el promotor I3 de la variolovacuna de la transcripción asociado al gen ICAM-1; (7) un cuarto gen quimérico que comprende el promotor sE/L de la transcripción asociado al gen B7.1; (8) un quinto gen quimérico que comprende el promotor de la transcripción C1 de la viruela aviar asociado al gen *lacZ* de *E. coli*.

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

Se aislaron secuencias de CEA de un clon de ADNc humano de una genoteca de ADNc de células de carcinoma de colon construida en el Instituto Nacional del Cáncer (Kaufman et al., 1991). Entonces se alteró el gen de CEA por mutagénesis *in vitro* para expresar la proteína de longitud completa que contiene un epítipo modificado. Esta mutación cambió el aminoácido codificado en la posición 609 de asparagina a ácido aspártico (donde los aminoácidos están numerados empezando en la primera metionina, que incluye la secuencia conductora). El gen modificado, designado CEA(6D), se diseñó para potenciar la inmunogenicidad de CEA. El gen CEA(6D) estuvo contenido en un fragmento de 2109 pb que incluye la secuencia codificante entera para CEA y ninguna de la región no traducida 5' o 3'. El gen que codifica LFA-3 se aisló en el Instituto Nacional del Cáncer por amplificación por PCR de ADNc Quick-Clone de bazo humano (Clontech Inc.) usando la secuencia publicada (Wallner et al., 1987). El gen estuvo contenido en un fragmento de 759 pb que incluye la secuencia codificante entera para LFA-3, 2 nucleótidos de la región no traducida 5' y 4 nucleótidos de la región no traducida 3'. El gen que codifica ICAM-1 se aisló en el Instituto Nacional del Cáncer por amplificación por PCR de ADNc transcrito de forma inversa a partir de ARN de una línea de linfocitos B transformada por el virus de Epstein-Barr derivada de un hombre sano, usando la secuencia publicada (Staunton et al., 1988). El gen estuvo contenido en un fragmento de 1721 pb que incluye la secuencia codificante entera para ICAM-1, 29 nucleótidos de la región no traducida 5' y 93 nucleótidos de la región no traducida 3'. El gen que codifica B7.1 se aisló en el Instituto Nacional del Cáncer por amplificación por PCR de ADNc derivado de ARN de la línea celular Raji humana (ATCC # CCL 86), usando la secuencia publicada (Chen et al., 1992). El gen estuvo contenido en un fragmento de 1180 pb que incluye la secuencia codificante entera para B7.1, 22 nucleótidos de la región no traducida 5' y 291 nucleótidos de la región no traducida 3'.

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

Se usó una cepa clínica purificada en placa de la cepa de la vacuna POXVAC-TC del virus de la viruela aviar como el virus parental para esta vacuna recombinante. La recombinación *in vivo* entre el vector plasmídico y el ADN viral produjeron la formación de un virus recombinante en el que el gen CEA(6D), bajo el control de la transcripción del promotor 40K de la variolovacuna, el gen LFA-3, bajo el control de la transcripción del promotor 30K de la variolovacuna, el gen ICAM-1, bajo el control de la transcripción del promotor I3 de la variolovacuna, el gen B7.1, bajo el control de la transcripción del promotor sE/L, y el gen *lacZ*, bajo el control del promotor C1, se insertaron en la región I-J de BamH del genoma del virus de la viruela aviar, como se ilustra en la Figura 6.

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

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

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

#### EJEMPLO 4: PANVAC™-F

5 PANVAC-F consiste en un virus de la viruela aviar recombinante vivo que co-expresa una forma modificada (balanceada) de MUC-1, wMUC-1(6), una forma modificada (balanceada) de antígeno carcinoembrionario, wCEA(6D), antígeno 3 asociado a la función de leucocitos (LFA-3), molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1) y B7.1. La secuencia de nucleótidos de MUC-1 balanceada usada en PANVAC-F, también conocida como wMUC-1(6), se muestra en la Figura 7 como SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos correspondiente de wMUC-1(6) se muestra en la Figura 8 como SEQ ID NO: 2. La secuencia de nucleótidos de CEA balanceado usado en PANVAC-F, también conocido como wCEA(6D), se muestra en la Figura 9 como SEQ ID NO: 3; la secuencia de aminoácidos correspondiente de wCEA(6D) se muestra en la Figura 10 como SEQ ID NO: 4.

15 La generación de virus de la viruela aviar recombinantes se lleva a cabo mediante recombinación homóloga *in vivo* entre ADN de la viruela aviar y un vector plasmídico que lleva las secuencias heterólogas a insertar. Como se ha descrito anteriormente, el vector plasmídico contiene uno o más genes quiméricos, cada uno de los cuales comprende un promotor de poxvirus asociado a una secuencia codificante de proteína, flanqueado por secuencias virales de una región no esencial del genoma del virus de la viruela aviar. El plásmido se transfecta en células infectadas con el virus parental de la viruela aviar, y la recombinación entre las secuencias de la viruela aviar en el plásmido y el ADN correspondiente en el genoma viral produce la inserción en el genoma viral de los genes quiméricos en el plásmido.

20 Para la generación de la vacuna recombinante PANVAC-F, se usaron dos vectores plasmídicos. El primer plásmido, designado pT1154, dirige la inserción de las secuencias codificantes de wCEA(6D) y wMUC-1(6) en la región FP14 del genoma del virus de la viruela aviar. El segundo plásmido, designado pT8150, dirige la inserción de las secuencias codificantes de LFA-3, ICAM-1 y B7.1 (conjuntamente conocidos como TRICOM) en la región I-J de BamH del genoma del virus de la viruela aviar. El gen wCEA(6D) está bajo el control de la transcripción del promotor 40K de la variolovacuna. El gen wMUC-1(6) está bajo el control de la transcripción del promotor temprano sintético/tardío (sE/L). El gen LFA-3 está bajo el control de la transcripción del promotor 30K de la variolovacuna, el gen ICAM-1 está bajo el control de la transcripción del promotor I3 de la variolovacuna y el gen B7.1 está bajo el control de la transcripción del promotor temprano sintético/tardío (sE/L). Además, pT1154 contiene el gen *lacZ* de *E. coli*, bajo el control del promotor 40K de la variolovacuna, que se incluye como un cribado para progenie recombinante, y pT8150 contiene el gen *GUS*, bajo el control del promotor 7.5, para su uso en el cribado para progenie recombinante.

35 Se usó una cepa clínica purificada en placa de la cepa de la vacuna POXVAC-TC del virus de la viruela aviar como el virus parental para esta vacuna recombinante. La recombinación *in vivo* entre los vectores plasmídicos y el ADN viral produjo la formación de un virus recombinante en el que las secuencias de pT1154 se insertaron en FP14, y las secuencias de pT8150 se insertaron en la región J de BamHI, como se ilustra en la Figura 11.

PANVAC-F se ha usado conjuntamente con PANVAC-V en un ensayo clínico en curso para el tratamiento de pacientes con adenocarcinoma metastásico (etapa IV) del páncreas. Los resultados y descripción adicional de este ensayo se describen más adelante en el Ejemplo 11.

#### EJEMPLO 5: PANVAC™-V

45 PANVAC-V consiste en un virus de la variolovacuna recombinante vivo que co-expresa una forma modificada (balanceada) de MUC-1, wMUC-1(6), una forma modificada (balanceada) de antígeno carcinoembrionario, wCEA(6D), antígeno 3 asociado a la función de leucocitos (LFA-3), molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1) y B7.1. La secuencia de nucleótidos de MUC-1 balanceada usada en PANVAC-V, también conocida como wMUC-1(6), se muestra en la Figura 7 como SEQ ID NO: 1. La secuencia de CEA balanceado usado en PANVAC-V, también conocido como wCEA(6D), se muestra en la Figura 9 como SEQ ID NO: 3.

50 Para la generación de la vacuna recombinante PANVAC-V, se usó un procedimiento recientemente desarrollado que produce el aislamiento de un virus recombinante que contiene los genes extraños deseados, pero no contiene genes que codifican marcadores de selección. Este procedimiento se aprovecha de la inestabilidad genética de secuencias duplicadas dentro del genoma del poxvirus, produciendo la delección de secuencias de nucleótidos localizadas entre las secuencias duplicadas. Usando este procedimiento, virus recombinantes contienen inicialmente el gen *lacZ* de *E. coli* junto con los genes extraños de interés. Estos virus recombinantes se identifican y purifican usando un cribado colorimétrico para el producto génico de *lacZ*. Durante la posterior propagación de virus recombinantes, la recombinación intramolecular entre secuencias duplicadas que flanquean el gen *lacZ* produce la delección de este gen, dejando un virus recombinante que solo contiene los genes de interés.

55 Se usó un derivado de la cepa Wyeth (New York City Board of Health) de la variolovacuna como el virus parental para esta vacuna recombinante, llamado TBC-vTRICOM. Este virus parental, designado TBC-vTRICOM, contiene las secuencias codificantes de LFA-3, ICAM-1 y B7.1 insertadas en la región F de Hind III del genoma de la

varioloavacuna. La Figura 14 muestra la derivación de TBC-vTRICOM. Primero, la vacuna Wyeth se purificó en placa por Flow Laboratories y luego se expandió en células CV-1, para crear TBC-Wy. A continuación, el plásmido pT1068 se insertó usando células CV-1, para delecionar F13L (37K), creando TBC-Wy-Delta37. Entonces se insertaron LFA-3, ICAM-1, B7.1 y F13L en este virus usando el plásmido pT5132 sobre células CED, creando TBC-vTRICOM.

5 Se usó un vector plasmídico designado pT1153, que dirige la inserción de secuencias codificantes de CEA y MUC-1 modificadas en la región J de Hind III del genoma del virus TBC-vTRICOM, para generar la vacuna recombinante PANVAC-V. El gen CEA modificado, designado wCEA(6D), está bajo el control de la transcripción del promotor 40K de la varioloavacuna, y el gen MUC-1 modificado, designado wMUC-1(6), está bajo el control de la transcripción del promotor temprano sintético/tardío (sE/L). El plásmido también contiene una porción de la región J de Hind III de la varioloavacuna que codifica el gen timidina cinasa (TK). Además, el gen *lacZ* de *E. coli*, bajo el control del promotor 40K de la varioloavacuna, se incluye como cribado transitorio para la progenie recombinante. La recombinación entre el vector plasmídico y el ADN viral produjo la formación de un virus recombinante en el que el gen wCEA(6D), bajo el control de la transcripción del promotor 40K de la varioloavacuna, el gen wMUC-1(6), bajo el control de la transcripción del promotor sE/L, y el gen *lacZ*, bajo el control del promotor 40K, se insertaron en la región J de Hind III del genoma de la varioloavacuna del virus, como se ilustra en la Figura 12.

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

Se aislaron secuencias de CEA de un clon de ADNc humano de una genoteca de ADNc de células de carcinoma de colon construida en el Instituto Nacional del Cáncer (Kaufinan et al., Int. J. Cancer 48:900-7 (1991)). Entonces se alteró el gen de CEA por mutagénesis *in vitro* para expresar la proteína de longitud completa que contiene un epítipo modificado. Esta mutación cambió el aminoácido codificado en la posición 609 de asparagina a ácido aspártico (donde los aminoácidos están numerados empezando en la primera metionina, que incluye la secuencia conductora). El gen modificado, designado CEA(6D), se diseñó para potenciar la inmunogenicidad de CEA.

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

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

Se usó el ensayo cromogénico para  $\beta$ -galactosidasa para identificar y aislar virus recombinantes que contienen las secuencias de *lacZ*, CEA y MUC-1, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

El gen *lacZ* de *E. coli* insertado se flanqueó por secuencias de poxvirus duplicadas. La recombinación intramolecular entre estas secuencias produjo la delección del gen *lacZ*. Virus recombinantes de los que el gen *lacZ* se delecionó dieron lugar a placas incoloras que se seleccionaron y purificaron en placa. El poxvirus recombinante purificado final contuvo solo los genes deseados que codifican las proteínas CEA, MUC-1, LFA-3, ICAM-1 y B7.1 y ningún gen marcador (*lacZ*). Se amplificaron recombinantes positivos en células CED para producir un material de semilla. El material de semilla se sometió entonces a valoración, prueba de esterilidad, y análisis de expresión genómica y de proteínas.

#### EJEMPLO 6: Pan 1-1

En el estudio de fase I, pacientes con cáncer pancreático inextirpable se administraron con una mezcla de rV-CEA(6D)/TRICOM™ (véase el Ejemplo 2, anteriormente) con rV-MUC-1 (véase el Ejemplo 1, anteriormente),

seguido de rF-CEA(6D)/TRICOM (véase el Ejemplo 3, anteriormente), a dosis esperadas para generar respuestas inmunitarias y clínicas esperadas con toxicidad mínima, basándose en los estudios previos. Por consiguiente, el estudio de fase 1 administró una dosis de 'sensibilización' de  $1 \times 10^8$  ufp de rV-CEA(6D)/TRICOM™ mezclado con  $1 \times 10^9$  ufp de rV-MUC-1 por vía subcutánea (SC), seguido 2 semanas después de una dosis de 'refuerzo' de  $1 \times 10^9$  ufp de rF-CEA(6D)/TRICOM™ administrado SC. Los 'refuerzos' de  $1 \times 10^9$  ufp de rF-CEA(6D)/TRICOM™ administrado SC se repitieron a intervalos de dos semanas, durante un total de tres 'refuerzos'. Se administró SC sargramostim (100 µg) humano recombinante en el sitio de inyección de vacuna como adyuvante, en el momento de cada inmunización y durante tres días consecutivos a partir de aquí. Se vieron los pacientes en cada visita de vacunación y cuatro semanas tras el 'refuerzo' final para el examen físico y la recogida de datos de laboratorio e información de acontecimientos adversos.

Los resultados del estudio de fase I Pan1-1 se describen más adelante, en el Ejemplo 11.

#### EJEMPLO 7: Vacunas adicionales

Usando los procedimientos expuestos en los Ejemplos 1 - 6, puede generarse una variedad de vectores de vacuna. Sitios de inserción preferidos en los vectores de viruela aviar y variolovacuna, que incluyen vectores MVA, se describen anteriormente. Sitios de inserción de la viruela aviar preferidos son 43K, FP14 y la secuencia única larga (LUS). Sitios de inserción de la variolovacuna preferidos son MVA, 44/45; MVA 49/50 y MVA 124/125.

Por ejemplo, el vector de vacuna del Ejemplo 2 (rV-CEA(6D)/TRICOM) puede modificarse para excluir el antígeno CEA, generando así rV-TRICOM. Esto puede incluir secuencias murinas (es decir, rV-TRICOM-murino) o secuencias humanas (es decir, rV-TRICOM-humano). Similarmente, en otro ejemplo, el vector de vacuna del Ejemplo 3 (rF-CEA(6D)/TRICOM) puede modificarse para excluir el antígeno CEA, generando así rF-TRICOM, que puede ser secuencias humanas o murinas.

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

Por ejemplo, un virus recombinante de la viruela aviar designado rF-MUC-1 contiene el ácido nucleico que codifica el gen MUC-1 humano o alternativamente una o más regiones de repetición de MUC-1 humano como se ha descrito anteriormente (SEQ ID NO: 1), bajo el control del promotor 40K y se ha descrito (Grosenbach, D. W., Barrientos, J. C., Schlom, J. y Hodge, J. W., Cancer Res 61, 4497-505, 2001). El virus recombinante de la viruela aviar que contiene el ácido nucleico que codifica MUC-1 humano y los genes B7-1, ICAM-1 y LFA-3 murinos se designa rF-MUC-1-TRICOM es el mismo vector que el descrito por Grosenbach et al. solo con antígeno de MUC-1 en lugar de antígeno CEA (Grosenbach, D. W., Barrientos, J. C., Schlom, J. y Hodge, J. W., Cancer Res 61, 4497-505, 2001). El virus recombinante de la viruela aviar designado rF-OX40L se generó por inserción del gen OX40L murino bajo el control del promotor 40K en el genoma de rF-CEA en el sitio FP14 en el genoma. El ADNc de OX40L se amplificó de linfocitos B murinos activados por anti-CD40/anti-IgM por RT-PCR usando cebadores específicos para los extremos 5'-(dGGTACCGGTACCATGGAAGGGGAAGGGTTC) (SEQ ID NO: 5) y 3'-(dCTCGAGCTCGAGTCACAGTGGTACTTGGTTC) (SEQ ID NO: 6) del marco de lectura abierto. El ADNc se clonó en un vector de transferencia de poxvirus. El análisis de secuencias confirmó que no se introdujo ninguna mutación en el proceso de clonación. El virus recombinante de la viruela aviar designado rF-MUC-1-TRICOM/OX40L se generó por inserción del gen OX40L murino bajo el control del promotor 40K en el genoma de rF-TRICOM en el sitio FP14 en el genoma. Se generaron ambos virus de la viruela aviar recombinantes que expresan OX40L por métodos previamente descritos (Gritz, L., Destree, A., Cormier, N., Day, E., Stallard, V., Caiazza, T., Mazzara, G. and Panicali, D., J Virol 64, 5948-57, 1990). Estos virus también expresan el gen MUC-1 humano y el gen beta-galactosidasa bacteriano.

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

#### EJEMPLO 8: Respuesta inmunitaria a AAT expresados por poxvirus recombinantes en un modelo murino

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

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

En un experimento, se evaluó el efecto de muB7.1 sobre las respuestas inmunitarias provocado por MUC-1 expresado en variolovacuna. Se vacunó un grupo de ratones C57BL/6 con una mezcla de rV-MUC-1 y virus no recombinante de la variolovacuna ( $10^7$  ufp de cada virus) en los días 0, 14 y 28. El segundo grupo de ratones se vacunó con una mezcla de rV-MUC-1 y rV-muB7.1 ( $10^7$  ufp de cada virus) en el día 0, y entonces con una mezcla de rV-MUC-1 y virus no recombinante de la variolovacuna ( $10^7$  ufp de cada virus) en los días 14 y 28. Los ratones se sacrificaron en el día 35 y se evaluó la actividad de linfocitos T citotóxicos en un ensayo de liberación de indio estándar. Se detectaron CTL específicos de MUC-1 en ambos grupos; sin embargo, el porcentaje de lisis específica fue aproximadamente 1,5 veces más alto en ratones que recibieron la mezcla rV-MUC-1/rV-muB7.1 (Akagi et al., J Immunother. 20:38-47 (1997))

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

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

Modelos murinos permiten no solo la medición de respuestas inmunitarias provocadas por vacunas del cáncer, sino también la evaluación de efectos antitumorales profilácticos o terapéuticos estimulados por estas vacunas. Por ejemplo, para evaluar la capacidad de vacunas basadas en poxvirus para proteger contra la exposición tumoral, se inmunizaron ratones por escarificación de la cola con una mezcla de rV-CEA y rV-muB7.1. Cuando los ratones inmunizados se expusieron a células MC-38 que expresan CEA, los tumores dejaron de establecerse, que indica que la inmunización había dado lugar a protección de la exposición al tumor. Esta protección fue acompañada por respuestas de linfocitos T específicas de CEA correspondientes (Hodge et al., Cancer Res 55:3598-3603 (1995)). Se informaron resultados similares después de que los ratones se inmunizaran con un único virus recombinante de la variolovacuna que expresó tanto CEA como muB7.1 (Kalus, 1999). Posteriormente, la mezcla (rV-CEA + rV-muB7.1) se comparó con la construcción de gen dual (rV-CEA/muB7.1) en un modelo de protección de tumor. Tanto la mezcla como el recombinante único provocaron respuestas antitumorales; sin embargo, se requirieron dosis más altas de los virus mezclados para obtener respuestas inmunitarias comparables a aquellas obtenidas usando el recombinante único.

Protección satisfactoria usando muB7.1 condujo a estudios que evaluaron combinaciones de moléculas coestimulantes. En otro experimento de exposición a tumor, se vacunaron SC ratones C57BL/6 con tanto rV-CEA como rV-CEA/muTRICOM™, luego se expusieron 100 días después a células de carcinoma de colon MC-38 que expresaron CEA. Todos los ratones vacunados con rV-CEA sucumbieron a los tumores, mientras que todos los ratones vacunados con rV-CEA/muTRICOM™ sobrevivieron a la exposición tumoral. Las respuestas de linfocitos T también fueron significativamente más altas en animales vacunados con rV-CEA/muTRICOM (Hodge et al., Cancer Research 59: 5800-07 (1999)).

En los estudios de protección de tumor previamente descritos, CEA, aunque se expresó en una línea de células tumorales murinas, representó un antígeno extraño en los ratones vacunados. Con el fin de determinar si respuestas antitumorales similares podrían ser provocadas o no en un ámbito en el que CEA representa un "auto"-antígeno, se realizaron estudios de inmunoterapia tumoral usando ratones transgénicos para CEA. En un experimento, se inocularon primero animales con células MC-38 que expresan CEA, luego se inmunizaron cuatro días después con rV-CEA, rV-CEA/muB7.1 o rV-CEA/muTRICOM™. Solo los ratones que recibieron rV-CEA/muTRICOM™ permanecieron libres de tumor. Estos ratones también tuvieron las respuestas de linfocitos T específicas de CEA más altas (Hodge et al., Cancer Research 59: 5800-07 (1999)).

En un modelo de inmunoterapia más riguroso, ratones transgénicos para CEA con metástasis de carcinoma hepático positivas para CEA establecidas se trataron por vacunación semanal durante cuatro semanas con rV-muCEA/TRICOM™ más GM-CSF murino e IL-2. De los dieciséis ratones tratados, nueve (56 %) siguieron vivos durante las 25 semanas. Por el contrario, en el grupo de control (que recibió variolovacuna no recombinante más citocinas), solo uno de los dieciséis (5 %) sobrevivió pasadas las 16 semanas (Grosenbach, 2001).

#### EJEMPLO 10: Expresión de TRICOM™ en células presentadoras de antígenos en un modelo murino

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

potenciaban significativamente la proliferación de linfocitos T intactos, linfocitos T alógenos y linfocitos T específicos de péptido *in vitro*. Además, las DC pulsadas por péptidos infectadas con rV- o rF-muTRICOM™ indujeron actividad de CTL más alta *in vivo* que las DC pulsadas con péptidos sin infectar correspondientes (Hodge et al., J Natl Cancer Inst. 92:1228-1239 (2000)).

5 Se han obtenido resultados similares usando DC humanas. El origen y la etapa de madurez de las DC humanas afectan los niveles de moléculas coestimulantes presentadas por estas células. Zhu y colaboradores han demostrado que varias horas después de la infección con rF-TRICOM™, las DC humanas hiperexpresan eficientemente las tres moléculas coestimulantes (Zhu, 2001). Además, las DC autólogas pulsadas con péptido infectadas con rF-muTRICOM™ fueron más potentes en linfocitos T activantes *in vitro* que las DC pulsadas con péptido sin infectar, como se mide por la producción de interferón-gamma después de 24 horas de incubación. Estos resultados se obtuvieron usando péptidos de tanto antígenos virales fuertes como débiles, además de péptidos de auto-antígenos asociados a tumor (CEA y PSA). La activación de linfocitos T potenciada no estuvo acompañada por la elevada apoptosis de linfocitos T.

15 La potencia de otras células presentadoras de antígenos (APC) tales como células progenitoras de la médula ósea (BMPC) también puede aumentarse usando vectores de poxvirus que expresan TRICOM™ (Rad, 2001). BMPC murinas infectadas con rV- o rF-muTRICOM™ potenciaron significativamente la activación de tanto poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ intactos como efectores. Una población de APC genérica, esplenocitos murinos, también podría convertirse en más eficiente en la presentación del antígeno por infección con cualquiera de los vectores TRICOM™ (Hodge et al., Vaccine 19:3552-3567 (2001)). Los esplenocitos infectados requirieron menos concanavalina A (que actúa como señal 1) para activar linfocitos T intactos. Además, cuando se usó una cantidad constante de concanavalina A para el ensayo, se requirieron menos esplenocitos infectados para la activación de linfocitos T. Los esplenocitos infectados con TRICOM™ también indujeron mayor activación de linfocitos T específica de antígeno que los esplenocitos sin infectar, que se aproximan a niveles logrados con DC no infectadas como se mide por la producción de interferón-gamma.

#### 25 EJEMPLO 11: Datos del ensayo clínico

Se diseñó PANVAC-VF para estimular el sistema inmunitario para dirigir y destruir células cancerosas que expresan dos proteínas (o antígenos), antígeno carcinoembrionario (CEA) y mucina-1 (MUC-1), encontradas en más del 90 por ciento de las células tumorales pancreáticas. Se administraron las vacunas de Therion mediante una inyección subcutánea en un modo de "sensibilización-refuerzo", empleando variolovacuna como el vector de sensibilización, seguido de dosis secuencial con un vector de viruela aviar, como se describe a continuación. Las vacunas también incorporan TRICOM, diseñado para potenciar y sostener una respuesta inmunitaria dirigida contra células tumorales.

Se han realizado dos estudios clínicos de fase I de etiqueta abierta: PAN 1-1 y TBC-PAN-002, cada uno con el objetivo primario de seguridad. En resumen, los estudios enrolaron a un total de 22 pacientes con cáncer pancreático avanzado (etapa III o IV), 20 de los cuales tuvieron enfermedad metastásica (etapa IV); todos habían recibido quimioterapia previa. Basándose en una revisión de múltiples estudios de fase III que implican a otros quimioterapéuticos, la mediana esperada de la supervivencia global de esta población de pacientes es aproximadamente 3 meses.

#### PAN 1-1

40 PAN 1-1 fue un estudio de etiqueta abierta para evaluar la seguridad y tolerabilidad de rV-CEA(6D)/TRICOM mezclado con rV-MUC-1 seguido de rF-CEA(6D)/TRICOM en combinación con sargramostim en el tratamiento de pacientes con adenocarcinoma del páncreas. La población del estudio incluyó pacientes  $\geq 18$  años de edad que tenían adenocarcinoma del páncreas histológicamente confirmado, cuya enfermedad fue inextirpable en opinión del investigador, y que tuvo un grado de actividad ECOG de  $\leq 2$ .

45 Los pacientes recibieron un dosis de sensibilización de  $1 \times 10^8$  ufp de rV-CEA(6D)/TRICOM mezclado con  $1 \times 10^8$  ufp de rV-MUC-1 SC en el día 0, seguido de una dosis de refuerzo de  $1 \times 10^9$  ufp de rF-CEA(6D)/TRICOM SC en los días 14, 28 y 42. Se administró SC sargramostim (100  $\mu\text{g}$ ) en el sitio de inyección en el día de cada administración de vacuna y durante tres días consecutivos a partir de aquí. A criterio del investigador, se dejó que los pacientes continuaran en una fase de tratamiento de extensión tras el día 70. Tres pacientes entraron en la fase de extensión; el estudio se completó el 11 de diciembre de 2003 tras la retirada del paciente final.

50 Los parámetros de seguridad evaluados durante el transcurso de este estudio incluyeron historia médica, constantes vitales, examen físico, pruebas de laboratorio (hematología, química y análisis de orina), ECG, grado de actividad ECOG y documentación de medicaciones concomitantes.

55 Se enrolaron doce pacientes en el estudio y recibieron la vacunación de sensibilización. Dos de estos doce pacientes fueron sustituciones de pacientes que se retiraron prematuramente del estudio por motivos distintos de la toxicidad. Nueve pacientes completaron el ciclo completo del tratamiento por protocolo (una inyección de sensibilización y tres de refuerzo). Cinco pacientes completaron la visita de seguimiento final (día 70: 28 días tras la última dosis). Así, de las 40 vacunaciones planeadas originales (diez pacientes; cuatro vacunaciones cada una), se administraron 42 vacunaciones a los 12 pacientes enrolados en este estudio. Tres de estos pacientes entraron en la

fase de extensión y recibieron vacunaciones mensuales durante un periodo adicional de cinco meses. Así, para los tres pacientes enrolados en la fase de extensión, cada uno recibió un total de nueve vacunaciones durante un periodo de aproximadamente siete meses (fase central más fase de extensión).

5 Basándose en los datos disponibles, rV-CEA(6D)/TRICOM, rV-MUC-1 y rF-CEA(6D)/TRICOM en combinación con sargramostim fueron bien tolerados. No hubo toxicidades limitantes de la dosis (DLT) o acontecimientos adversos graves causalmente relacionados con la pauta de tratamiento y ningún paciente se retiró debido a DLT, acontecimiento relacionado con la inoculación, u otro acontecimiento adverso relacionado con el tratamiento. Reacciones adversas causalmente relacionadas con la pauta de tratamiento se limitaron a acontecimientos de grado 1 y 2 asociados a reacciones del sitio de inyección cutáneas locales y acontecimientos sistémicos de fatiga, escalofríos y fiebre.

10 Como se observa anteriormente, al final de la fase de tratamiento central de 70 días, tres pacientes entraron en la fase de extensión del estudio. Estos tres pacientes recibieron cinco refuerzos adicionales de rF-CEA(6D)/TRICOM y posteriormente se retiraron del estudio debido a la progresión de la enfermedad. Ningún paciente siguió en el estudio. Veintiún AE, posiblemente o indudablemente relacionados con la vacuna, fueron informados en los tres pacientes durante el periodo de cinco meses de la fase de extensión. Todos los AE relacionados con la vacuna [rF-CEA(6D)/TRICOM] fueron de gravedad de grado 1. El AE más común fue eritema de grado 1 en el sitio de inyección, tras los refuerzos mensuales. Estos datos, aunque en un pequeño número de pacientes, sugieren que los refuerzos mensuales continuados con vacunas basadas en la viruela aviar son bien tolerados durante más de 6 meses.

15 Todos los pacientes enrolados en el estudio PAN 1-1 siguieron siendo seguidos para datos de supervivencia. Ocho de los 12 pacientes enrolados en el estudio PAN 1-1 han muerto. La mediana de la supervivencia global (OS) es 7,9 meses. De importancia, todos estos pacientes tuvieron enfermedad metastásica en el nivel inicial y todos habían fallado en la quimioterapia de primera línea. Basándose en los datos de control histórico, la mediana de OS esperada en esta población de pacientes es aproximadamente 3 - 4 meses (Heinemann, Semin Oncol. 2002 Dec;29(6 Suppl 20):9-16). Aunque el tamaño de muestra es pequeño y el análisis está limitado por comparación con datos de control históricos, estos datos son alentadores.

#### TBC-PAN-002

El protocolo del ensayo clínico TBC-PAN-002 era un estudio de etiqueta abierta de fase I para evaluar la seguridad y tolerabilidad de PANVAC-VF en combinación con sargramostim en el tratamiento de pacientes con adenocarcinoma del páncreas. La población del estudio incluye pacientes  $\geq 18$  años de edad que tienen adenocarcinoma del páncreas histológicamente confirmado, cuya enfermedad es inextirpable en opinión del investigador y que tienen un estado de rendimiento de Karnofsky de  $\geq 80$ . Los pacientes del estudio deben también haber recibido variolovacuna previa (inmunización contra la viruela) y debe esperarse que vivan al menos 4 meses.

30 Para TBC-PAN-002, los pacientes recibieron una dosis de 'sensibilización' de  $2 \times 10^8$  ufp de PANVAC-V SC en el día 0, seguido de una dosis de 'refuerzo' de  $1 \times 10^9$  ufp de PANVAC-F SC en los días 14, 28 y 42. Se administra SC sargramostim (100  $\mu\text{g}$ ) en el sitio de inyección en el día de cada administración de vacuna y durante tres días consecutivos a partir de aquí.

35 Tras el día 70, a criterio del investigador, se dejó que los pacientes que fueron clínicamente estables entraran en una fase de extensión de vacunaciones continuadas. Los pacientes en la fase de extensión recibieron refuerzos mensuales de PANVAC-F a  $1 \times 10^9$  ufp con sargramostim mensualmente hasta la progresión de la enfermedad, como se ha determinado por el investigador. Durante la fase de extensión, continuarán recogiéndose datos de seguridad.

40 Los parámetros de seguridad evaluados durante el transcurso de este estudio incluyen historia médica, constantes vitales, examen físico, pruebas de laboratorio (hematología, química, análisis de orina) y medicaciones concomitantes. La seguridad se evalúa examinando estos parámetros y tabulando acontecimientos adversos emergentes del tratamiento que se producen entre el nivel inicial y los días 14, 28, 42 y 70. Además, se recogieron lecturas de ECG en el nivel inicial, día 28 y día 70, y se determinó una evaluación del estado de rendimiento de Karnofsky en el nivel inicial, día 28 y día 70. Los resultados de las pruebas de laboratorio fuera del intervalo u otros acontecimientos no evaluados como cambios clínicamente significativos desde el nivel inicial no se informan como acontecimientos adversos.

45 Los AE más comunes (43 %) relacionados con las vacunas fueron reacción del sitio de inyección en el sitio de administración de la vacuna. Estos AE fueron todos de grado 1 e incluyeron eritema, hinchazón, prurito, ampollas, induración y dolor. En particular, de las diez administraciones de virus de la variolovacuna (PANVAC-V), hubo tres AE de grado 1 (ampolla, eritema y prurito). De importancia, todas las vacunaciones en este estudio se administraron por vía subcutánea (y serán en todos los estudios futuros de PANVAC-VF). Estos datos demuestran que el perfil de AE relacionado con la administración subcutánea de la vacuna es significativamente más benigno que el perfil de AE tras la administración intradérmica por escarificación. La administración intradérmica de la variolovacuna está clásicamente asociada a la formación de vesículas, pústulas y cicatrices, todos los cuales pueden contener virus infecciosos. Así, aunque los sitios de inyección no se cultivaron en el actual estudio, el perfil de AE tras la



vacunación con PANVAC-V sugiere que PANVAC-V puede no ser eliminado del paciente tras la vacunación. La administración de PANVAC-F estuvo más comúnmente asociada a reacciones del sitio de inyección. De las 28 vacunaciones PANVAC-F administradas a los 10 pacientes, 20 se asociaron a AE, y 15 de estas 20 (75 %) se limitaron a eritema de grado 1.

- 5 La mayoría de los AE relacionados con la vacuna (63 de 74; 85 %) fueron de gravedad de grado 1. Hubo diez AE de grado 2 relacionados con la vacuna (cinco fatiga, tres cefalea, uno vómitos, uno náuseas). Hubo 1 fiebre de grado 3 que fue una toxicidad limitante de la dosis (véase más adelante). Tras las reacciones del sitio de inyección, los AE más comunes fueron fatiga, anorexia, náuseas, vómitos, fiebre, cefalea y mialgia. Es posible que varios de estos AE puedan reflejar un síndrome relacionado con la vacuna.
- 10 Se ha informado de veintitrés acontecimientos adversos graves (SAE) en cinco pacientes. Todos los SAE se clasificaron como no relacionados con la vacuna por los investigadores. Tres de los acontecimientos (disfunción/insuficiencia hepática, progresión de la enfermedad de cáncer pancreático y reaparición de neumonía) produjeron muerte. Un paciente experimentó una DLT fiebre de grado 3 que se resolvió sin secuelas: este paciente recibió la inyección de vacuna de sensibilización en el día 0, y las vacunaciones de refuerzo en los días 14 y 28.
- 15 Sargramostim se administró por protocolo siguiendo las vacunaciones del día 0 y día 14. En la tarde del día 28, siguiendo la segunda administración de PANVAC-F y una administración de sargramostim, el paciente indicó una temperatura de 104,5 °F, que era una reacción de grado 3 y una DLT, ya que el investigador clasificó este acontecimiento como definitivamente relacionado con la vacuna. El paciente se trató con 500 mg de acetaminofeno por vía oral, y el acontecimiento se resolvió sin secuelas. Este paciente continuó en el estudio.
- 20 Basándose en los datos preliminares disponibles, PANVAC-VF en combinación con sargramostim parece ser bien tolerado y no es clínicamente significativo, hasta la fecha se han observado acontecimientos adversos graves causalmente relacionados con la pauta de tratamiento. La mediana de OS es 6,3 meses.

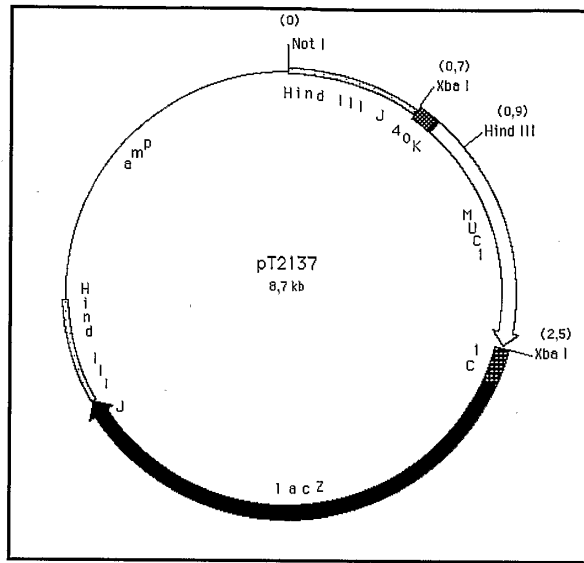
#### TBC-PAN-003

- 25 El protocolo del ensayo clínico TBC-PAN-003 es un estudio controlado aleatorizado de fase III para evaluar la seguridad y eficacia de PANVAC-VF en combinación con sargramostim frente al mejor cuidado de apoyo o quimioterapia paliativa en pacientes con adenocarcinoma del páncreas metastásico (etapa IV) que han fallado a una pauta de quimioterapia que contiene gemcitabina. El protocolo para el tratamiento de pacientes en este ensayo clínico sigue el protocolo para TBC-PAN-002, descrito anteriormente.

## REIVINDICACIONES

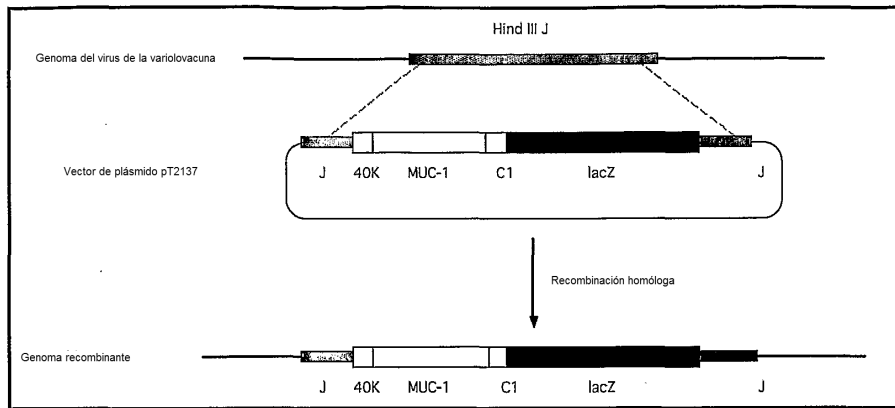
- 5 1. Un primer vector de poxvirus que contiene uno o más segmentos de ADN que codifican (i) antígeno carcinoembrionario (CEA), una porción antigénica del mismo, o una versión modificada del mismo que comprende SEQ ID NO: 4, y (ii) mucina (MUC), una porción antigénica de la misma, o una versión modificada de la misma que comprende SEQ ID NO: 2, para su uso en inducir una respuesta inmunológica contra una célula pancreática maligna en un individuo,
- 10 en el que en un segundo vector de poxvirus que contiene uno o más segmentos de ADN que codifican (i) CEA, una porción antigénica del mismo, o una versión modificada del mismo que comprende SEQ ID NO: 4, y (ii) MUC, una porción antigénica de la misma, o una versión modificada de la misma que comprende SEQ ID NO: 2, se administra al individuo a intervalos regulares después de la administración del primer vector.
- 15 2. Uso de un primer vector de poxvirus que contiene uno o más segmentos de ADN que codifican (i) antígeno carcinoembrionario (CEA), una porción antigénica del mismo, o una versión modificada del mismo que comprende SEQ ID NO: 4, y (ii) mucina (MUC), una porción antigénica de la misma, o una versión modificada de la misma que comprende SEQ ID NO: 2, para la preparación de un medicamento para inducir una respuesta inmunológica contra una célula pancreática maligna en un individuo,
- 20 en el que en un segundo vector de poxvirus que contiene uno o más segmentos de ADN que codifican (i) CEA, una porción antigénica del mismo, o una versión modificada del mismo que comprende SEQ ID NO: 4, y (ii) MUC, una porción antigénica de la misma, o una versión modificada de la misma que comprende SEQ ID NO: 2, se administra al individuo a intervalos regulares después de la administración del primer vector.
- 25 3. Los vectores de poxvirus para el uso de la reivindicación 1, o el uso de la reivindicación 2, que comprenden además factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), en los que el GM-CSF está codificado por el primer vector de poxvirus, el segundo vector de poxvirus, o ambos vectores.
4. Los vectores de poxvirus para el uso de la reivindicación 1, o el uso de la reivindicación 2, que comprenden además factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), en los que el GM-CSF está codificado por un vector diferente del primer vector de poxvirus o el segundo vector de poxvirus.
- 30 5. Los vectores de poxvirus para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 4, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que comprenden además al menos una molécula coestimulante, en los que el al menos una molécula coestimulante está codificada por el primer vector de poxvirus, el segundo vector de poxvirus, o ambos vectores.
- 35 6. Los vectores de poxvirus para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 4, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que comprenden además al menos una molécula coestimulante, en los que la al menos una molécula coestimulante está codificada por un vector diferente del primer vector de poxvirus o el segundo vector de poxvirus.
- 40 7. Los vectores de poxvirus para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 6, o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en los que el primer y segundo vectores de poxvirus están seleccionados del grupo que consiste en un vector de orthopoxvirus; vector de avipoxvirus; un vector de suipoxvirus; un vector de capripoxvirus; un vector de leporipoxvirus; y un vector de iridovirus.
8. Los vectores de poxvirus para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 7, o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en los que el primer vector de poxvirus, el segundo vector de poxvirus, o ambos vectores, están seleccionados del grupo que consiste en un vector de poxvirus alterado en la replicación y no replicante.
- 45 9. Los vectores de poxvirus para el uso según la reivindicación 8, o el uso según la reivindicación 8, en los que el primer vector de poxvirus, el segundo vector de poxvirus, o ambos vectores, es un vector de orthopox.
10. Los vectores de poxvirus para el uso según la reivindicación 9, o el uso según la reivindicación 9, en los que el vector de orthopoxvirus es la variolovacuna.
- 50 11. Los vectores de poxvirus para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 10, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en los que la mucina está seleccionada del grupo que consiste en MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5AC, MUC-5B, MUC-6, MUC-7, MUC-11, MUC-12, y porciones antigénicas de las mismas.
12. Los vectores de poxvirus para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 10, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en los que el uno o más segmentos de ADN codifica MUC balanceada.
13. Los vectores de poxvirus para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 10, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en los que el uno o más segmentos de ADN codifican MUC-1 balanceada o un fragmento de MUC-1 balanceada que comprende 5 a 25 repeticiones en tándem.

14. Los vectores de poxvirus para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 13, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, en los que el primer vector es un vector de orthopox, y el segundo vector es un vector de avipox.
- 5 15. Los vectores de poxvirus para el uso de la reivindicación 14, o el uso de la reivindicación 14, en los que el vector de orthopox es variolovacuna.
16. Los vectores de poxvirus para el uso de la reivindicación 15, o el uso de la reivindicación 15, en los que la variolovacuna es una variolovacuna atenuada.
17. Los vectores de poxvirus para el uso de la reivindicación 16, o el uso de la reivindicación 16, en los que la variolovacuna atenuada es MVA o NYVAC.
- 10 18. Los vectores de poxvirus para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en los que el vector de orthopox es para administración en una a tres administraciones a intervalos fijos, y el vector de avipox es para administración en múltiples administraciones a intervalos fijos.
- 15 19. Los vectores de poxvirus para el uso de la reivindicación 18, o el uso de la reivindicación 18, en los que el intervalo conjunto es 20 días a 90 días.
20. Un kit para potenciar una reacción inmunitaria protectora contra un tumor pancreático que comprende:
- 20 (a) un primer vector de poxvirus que contiene uno o más segmentos de ADN que codifican (i) antígeno carcinoembrionario (CEA), una porción antigénica del mismo, o una versión modificada del mismo que comprende SEQ ID NO: 4, y (ii) mucina (MUC), una porción antigénica de la misma, o una versión modificada de la misma que comprende SEQ ID NO: 2, y
- (b) al menos un segundo vector de poxvirus que contiene uno o más segmentos de ADN que codifican (i) CEA, una porción antigénica del mismo, o una versión modificada del mismo que comprende SEQ ID NO: 4, y (ii) MUC, una porción antigénica de la misma, o una versión modificada de la misma que comprende SEQ ID NO: 2,
- 25 en el que el segundo vector de poxvirus es para administración a un individuo con tumor pancreático a intervalos regulares después de la administración del primer vector.



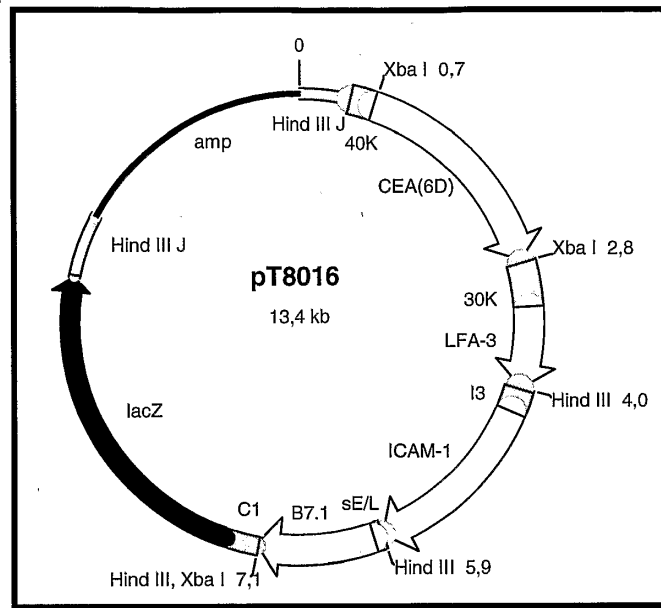
**Figura 1**

**Mapa de endonucleasas de restricción del plásmido pT2137**



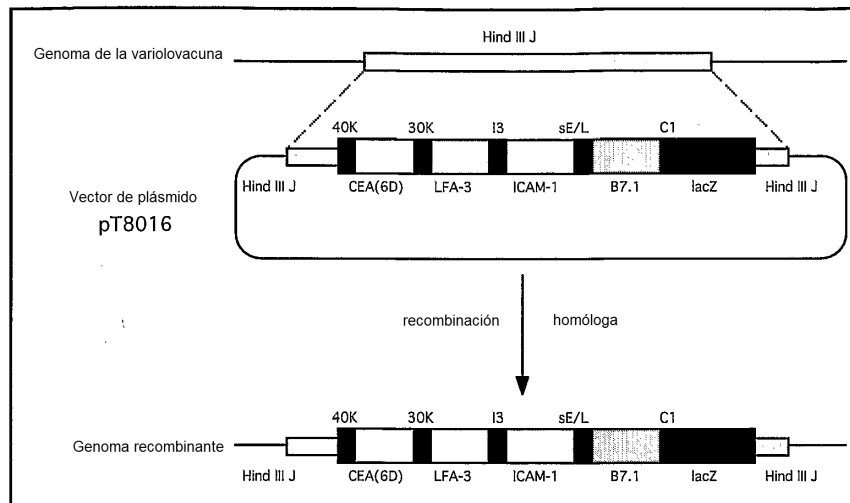
**Figura 2**

**Esquema del vector rV-MUC-1**



**Figura 3**

**Mapa de endonucleasas de restricción del plásmido pT8016**

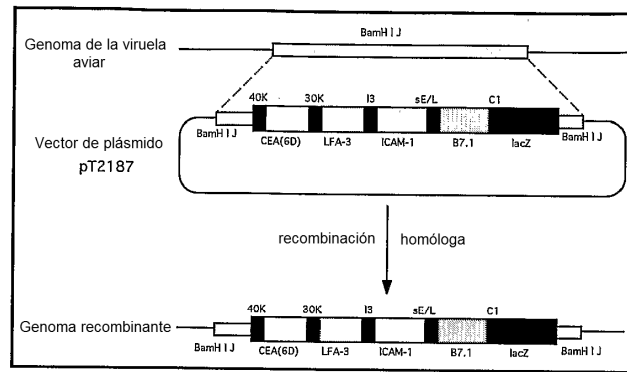


**Figura 4**

**Generación de virus de la variolovaccina recombinante rV-CEA(6D)/TRICOM**







**Figura 6**

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

# ES 2 623 812 T3

```
1  ATGACACCGG GCACCCAGTC TCCTTTCTTC CTGCTGCTGC TCCTCACAGT GCTTACAGTT
61  GTTACGGGTT CTGGTCATGC AAGCTCTACC CCAGGTGGAG AAAAGGAGAC TTCGGCTACC
121 CAGAGAAGTT CAGTGCCCGAG CTCTACTGAG AAGAATGCTG TGAGTATGAC AAGCTCCGTA
181 CTCTCCAGCC ACAGCCCCGG TTCAGGCTCC TCCACCACTC AGGGACAGGA TGTCACCTG
241 GCCCCGGCCA CGGAACCAGC TTCAGGTTC ACTGCCCTGT GGGGACAGGA TGTCACCTCG
301 GTACCAGTTA CTAGACCAGC TTTAGGTAGC ACAGCACCTC CTGCTCATGG AGTAACTAGT
361 GCTCCTGATA CTCGTCCAGC TCCTGGCAGT ACTGCACCAC CGGCACATGG CGTAACATCA
421 GCACCTGATA CAAGACCTGC ACCTGGATCT ACAGCGCCGC CTGCGCACGG AGTGACATCG
481 GCGCCCCGATA CGCGCCCCGC TCCCGGTAGC ACCGCACCCG CCGCCCCAGG TGTTACAAGT
541 GCACCCGATA CCCGGCCGGC ACCCGGAAGT ACCGCTCCAC CTGCACACGG GGTCAACAAGC
601 GCGCCAGACA CTCGACCTGC GCCAGGGTCG ACTGCCCTC CCGCGCATGG TGTGACCTCA
661 GCTCCTGACA CAAGGCCAGC CCCAGCTAGC ACTCTGGTGC ACAACGGCAC CTCTGCCAGG
721 GCTACCCAAA CCCAGCCAG CAAGAGCACT CCATTCFCAA TTCCCAGCCA CCACTCTGAT
781 ACTCCTACCA CCCTTGCCAG CCATAGCACC AAGACTGATG CCAGTAGCAC TCACCATAGC
841 ACGGTACCTC CTCTCACCTC CTCCAATCAC AGCACTTCTC CCCAGTTGTC TACTGGGGTC
901 TCTTCTTTT TCCTGTCTTT TCACATTCA AACCTCCAGT TTAATTCTC TCTGGAAGAT
961 CCCAGCACCG ACTACTACCA AGAGCTGCAG AGAGACATT CTGAAATGTT TTGTCAGATT
1021 TATAAACAA GGGGTTTTCT GGGCCTCTCC AATATTAAGT TCAGGCCAGG ATCTGTGCTG
1081 GTACAATTGA CTCTGGCCTT CCGAGAAGGT ACCATCAATG TCCACGACGT GGAGACACAG
1141 TTCAATCAGT ATAAAACGGA AGCAGCCTCT CGATATAACC TGACGATCTC AGACGTCAGC
1201 GTGAGTGTAT TGCCATTTC TTTCTCTGCC CAGTCTGGGG CTGGGGTGCC AGGCTGGGGC
1261 ATCGCGCTGC TGGTGCTGGT CTGTGTTCTG GTTGGCGTGG CCATTGTCTA TCTCATTGCC
1321 TTGGCTGTCT GTCAGTGCCG CCGAAAGAAC TACGGGCAGC TGACATCTT TCCAGCCCGG
1381 GATACCTACC ATCCTATGAG CGAGTACCCC ACCTACCACA CCCATGGGCG CTATGTGCCC
1441 CCTAGCAGTA CCGATCGTAG CCCCTATGAG AAGGTTCTG CAGGTAATGG TGGCAGCAGC
1501 CTCTCTTACA CAAACCCAGC AGTGGCAGCC ACTTCTGCCA ACTTGTAG
```

## FIGURA 7

**SECUENCIA DE wMUC-1(6), SEQ. ID. NO: 1**

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAV  
SMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAALWGQDVT SVPVTRPAL  
GSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAP  
DTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAHGVT SAPDTRPAPGSTAPPAH  
GVT SAPDTRPAPASTLVHNGTSARATTT PASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHST  
KTDASSTHHSTVPPLTSSNHSTSPQLSTGVSFFFLSFHISNLQFNSSLEDPSTD  
YYQELQRDI SEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLT LAFREGTINVHDVE  
TQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVFPFSAQSGAGVPGWGIALLVLCVIVA  
LAI VYLIALAVCQRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDR  
SPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL

**FIGURA 8**

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE wMUC-1(6), SEQ. ID. NO: 2

# ES 2 623 812 T3

```
1 ATGGAGTCTC CCTCGGCCCT TCCCACAGA TGGTGCATCC CCTGGCAGAG GCTCCTGCTC
61 ACAGCCTCAC TTCTAACCTT CTGGAACCCG CCCACCACTG CCAAGCTCAC TATTGAATCC
121 ACGCCGTTCA ATGTCGCAGA GGGGAAGGAG GTGCTTCTAC TTGTCCACAA TCTGCCCCAG
181 CATCTTTTGG GCTACAGCTG GTACAAAGGT GAAAGAGTGG ATGGCAACCG TCAAATATA
241 GGATATGTAA TAGGAACTCA ACAAGCTACC CCAGGGCCCC CATAACAGTG TCGAGAGATA
301 ATATACCCCA ATGCATCCCT GCTGATCCAG AACATCATCC AGAATGACAC AGGATTCTAC
361 ACCCTACACG TCATAAAGTC AGATCTTGTG AATGAAGAAG CAACTGGCCA GTTCCGGGTA
421 TACCCGGAAC TCCCTAAGCC TTCTATTAGC TCCAATAATA GTAAGCCTGT CGAAGACAAA
481 GATGCCGTCG CTTTACATG CGAGCCCGAA ACTCAAGACG CAACATATCT CTGGTGGGTG
541 AACACCCAGT CCCTGCCTGT GTCCCTAGA CTCCAACCTCA GCAACGGAAA TAGAATCTG
601 ACCCTGTTTA ACGTGACCAG GAACGACACA GCAAGCTACA AATGCGAAAC CCAAATCCA
661 GTCAGCGCCA GGAGGTCTGA TTCAGTGATT CTCAACGTGC TTTACGGACC CGATGCTCCT
721 ACAATCAGCC CTCTAAACAC AAGCTATAGA TCAGGGGAAA ATCTGAATCT GAGCTGTCAT
781 GCCGCTAGCA ATCCTCCCGC CCAATACAGC TGGTTTGTC ATGGCACTTT CCAACAGTCC
841 ACCCAGGAAC TGTTCATTCC CAATATTACC GTGAACAATA GTGGATCCTA CACGTGCCAA
901 GCTCACAATA GCGACACCGG ACTCAACCGC ACAACCGTGA CGACGATTAC CGTGATGAG
961 CCACCAAAAC CATTATAAC TAGTAACAAT TCTAACCCAG TTGAGGATGA GGACGCAGTT
1021 GCATTAACCT GTGAGCCAGA GATTCAAAAT ACCACTTATT TATGGTGGGT CAATAACCAA
1081 AGTTTGCCGG TTAGCCACG CTTGCAGTTG TCTAATGATA ACCGCACATT GACACTCCTG
1141 TCCGTTACTC GCAATGATGT AGGACCTTAT GAGTGTGGCA TTCAGAATGA ATTATCCGTT
1201 GATCACTCCG ACCCTGTTAT CCTTAATGTT TTGTATGGCC CAGACGACCC AACTATATCT
1261 CCATCATAACA CCTACTACCG TCCCAGCGTG AACTTGAGCC TTTCTTGCCA TGCAGCATCC
1321 AACCCCCCTG CACAGTACTC CTGGCTGATT GATGGAAACA TTCAGCAGCA TACTCAAGAG
1381 TTATTTATAA GCAACATAAC TGAGAAGAAC AGCGGACTCT ATACTTGCCA GGCCAATAAC
1441 TCAGCCAGTG GTCACAGCAG GACTACAGTT AAAACAATAA CTGTTTCCGC GGAGCTGCCC
1501 AAGCCCTCCA TCTCCAGCAA CAACTCCAAA CCCGTGGAGG ACAAGGATGC TGTGGCCTTC
1561 ACCTGTGAAC CTGAGGCTCA GAACACAACC TACCTGTGGT GGGTAAATGG TCAGAGCCTC
1621 CCAGTCAGTC CCAGGCTGCA GCTGTCCAAT GGCAACAGGA CCCTCACTCT ATTCAATGTC
1681 ACAAGAAATG ACGCAAGAGC CTATGTATGT GGAATCCAGA ACTCAGTGAG TGCAAACCGC
1741 AGTGACCCAG TCACCCTGGA TGCTCTCTAT GGGCCGGACA CCCCATCAT TTCCCCCCA
1801 GACTCGTCTT ACCTTTCGGG AGCGGACCTC AACCTCTCCT GCCACTCGGC CTCTAACCCA
1861 TCCCCGCGAGT ATTCTTGGCG TATCAATGGG ATACCGCAGC AACACACACA AGTTCTCTTT
1921 ATCGCCAAA TCACGCCAAA TAATAACGGG ACCTATGCCT GTTTTGTCTC TAACTTGGCT
1981 ACTGGCCGCA ATAATTCAT AGTCAAGAGC ATCACAGTCT CTGCATCTGG AACTTCTCCT
2041 GGTCTCTCAG CTGGGGCCAC TGTCGGCCTC ATGATTGGAG TGCTGGTTGG GGTGCTCTG
2101 ATATAG
```

## FIGURA 9

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

nsnpvededavaltcepeiqttylwwvnnqslpvsprlqlsndnrtltllsvtrndvgpy  
ecgiqnelsvdhsdpvilnvlygpddptispsytyyrpgvnlslschaasnppaqyswli  
gniqghtqelfisniteknsglytcqannsaghsrttvktitvsaelpkpsissnnskp  
edkdavaftcepeaqnttylwwvngqslpvsprlqlsngnrtltlfnvtrndarayv  
cgignsvsanrdsdpvtdvlygpdtpiisppdssylsgadlnlschsaasnpspqyswrin  
gipqghtqvlfiakitpnngtyacfvsnlatgrnnsivksitvsasgtspglsagatvg  
imigvlgvali

**SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE wCEA HUMANO (6D), SEQ. ID. NO: 4**

***FIG. 10***

# Plásmidos de PANVAC-F pT1154 y pT8150

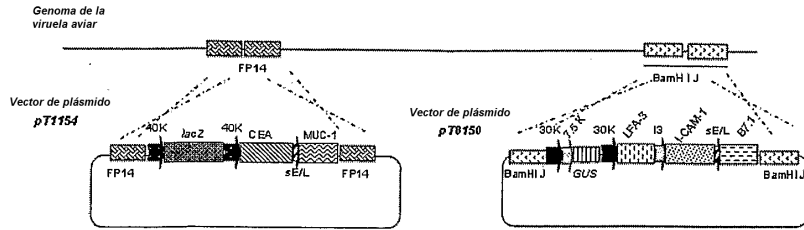


FIGURA 11

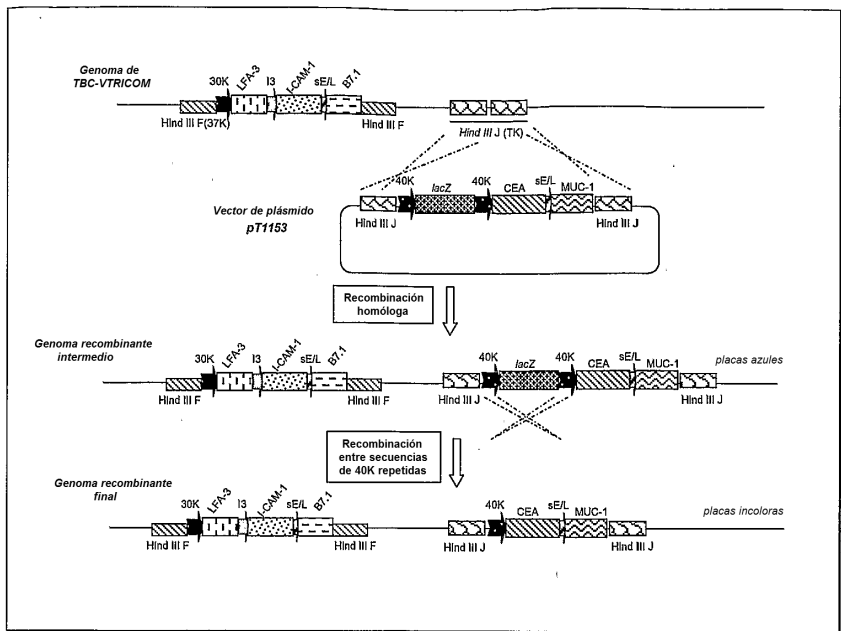


FIGURA 12

**GENERACIÓN DE VIRUS DE LA VARIOLOVACUNA RECOMBINANTE PANVAC-V**

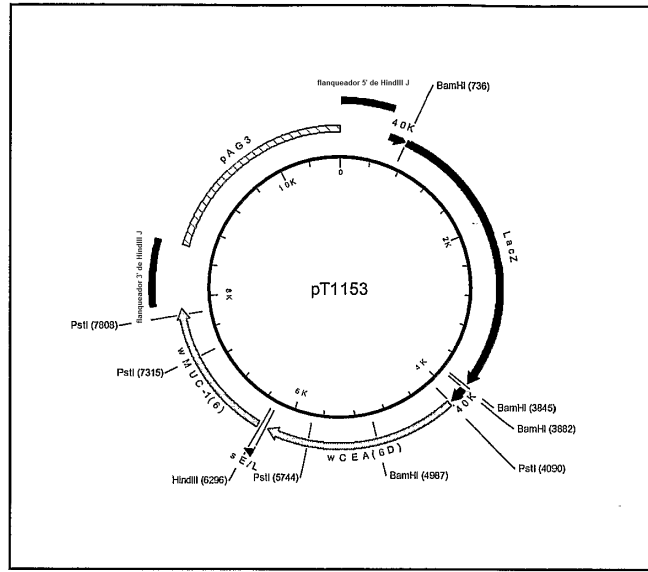
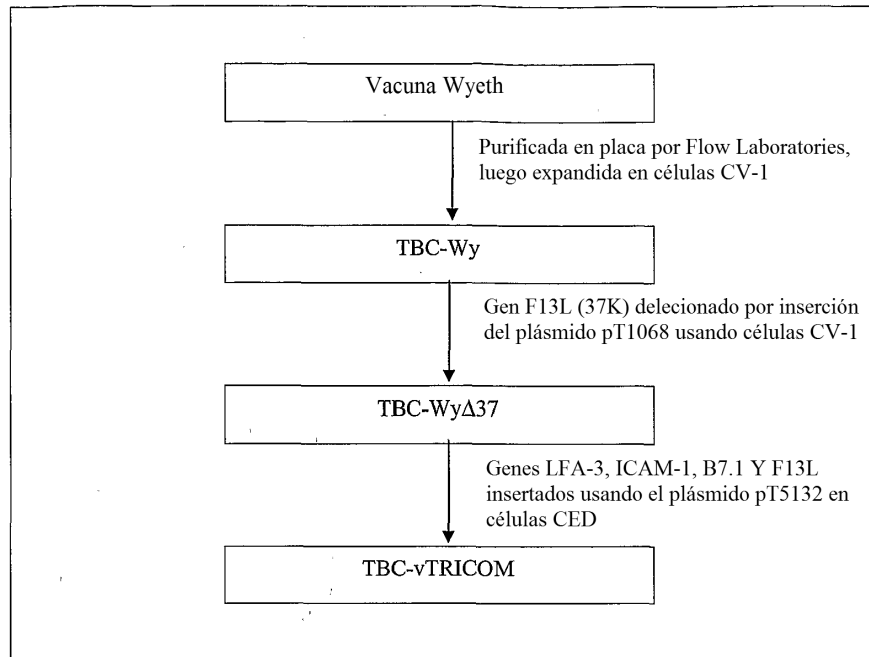


FIGURA 13

MAPA DE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN DEL PLÁSMIDO PT1153





**Figura 14**

**Derivación de virus parental TBC-vTRICOM**