

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 261**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 31/00** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2006 PCT/GB2006/003507**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2007 WO07034188**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2006 E 06779508 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 1931375**

54 Título: **Método de quimioinmunoterapia**

30 Prioridad:

**21.09.2005 GB 0519303**

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

**24.07.2017**

73 Titular/es:

**OXFORD BIOMEDICA (UK) LIMITED (100.0%)  
MEDAWAR CENTRE, ROBERT ROBINSON  
AVENUE, THE OXFORD SCIENCE PARK  
OXFORD OX4 4GA, GB**

72 Inventor/es:

**HARROP, RICHARD;  
KELLEHER, MICHELLE;  
SHINGLER, WILLIAM;  
KINGSMAN, SUSAN y  
CARROLL, MILES**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 626 261 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

Método de quimioinmunoterapia

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una terapia de combinación para tratar a un individuo con un antígeno para provocar una respuesta inmunitaria específica de antígeno junto con el tratamiento de ese individuo con un agente quimioterapéutico.

10

## Antecedentes de la invención

El tratamiento de pacientes con cánceres avanzados es generalmente por quimioterapia. Sin embargo, para tumores sólidos, en particular, es raramente curativa y se requieren vías de terapia adicionales.

15

Los recientes progresos en inmunobiotecnología humana han abierto el campo de la inmunoterapia como un nuevo enfoque para el tratamiento del cáncer. La inmunización específica contra un antígeno diana se ha conseguido en algunos pacientes con varias vacunas diferentes antineoplásicas, pero se desean respuestas a largo plazo mejoradas.

20

Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de regímenes mejorados de terapia.

Como la quimioterapia tiene varios efectos perjudiciales observados sobre el sistema inmunitario, la quimioterapia y la inmunoterapia se consideran formas no relacionadas o, más habitualmente, antagonistas de terapia. Esto es porque, la mayoría de las quimioterapias eliminan las células diana por apoptosis y este modo de eliminación celular se ha considerado inmunológicamente como no estimulador o capaz de producir tolerancia inmunitaria - un estado en que las células T ya no pueden responder al antígeno presentado montando una respuesta inmunitaria. Además, un efecto secundario común de las quimioterapias es la inducción de linfopenia, es decir, una reducción en los linfocitos y esto se supone perjudicial para cualquier respuesta inmunitaria potencial.

30

El documento WO 02/38612 se refiere a un péptido 5T4 canino y menciona la terapia de combinación.

El documento WO 00/29428 se refiere a vectores víricos que expresan un ácido nucleico que codifica el 5T4 y describe una terapia de combinación que incluye terapia enzimática/con profármacos e inmunoterapia con 5T4.

35

## Sumario de la invención

La presente invención se refiere, en términos generales, a un tratamiento de combinación que comprende administrar un antígeno, para provocar una respuesta inmunitaria específica para ese antígeno, así como un agente o agentes quimioterapéuticos. En particular, la presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que el tratamiento para estimular una respuesta inmunitaria contra un antígeno administrando un antígeno se potencia por tratamiento con un agente o agentes quimioterapéuticos.

40

Por consiguiente, en un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso del antígeno asociado a tumores 5T4 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer, donde dicho tratamiento o prevención comprende administrar a un sujeto, de forma secuencial o separada, un agente o agentes quimioterapéuticos y el antígeno asociado a tumores 5T4, donde el antígeno asociado a tumores 5T4 se administra cuando el sujeto tiene un recuento de células Treg  $CD4^+CD25^+$  de al menos un 15 % inferior al recuento de Treg  $CD4^+CD25^+$  determinado antes de la administración del agente quimioterapéutico.

50

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona el uso de un agente o agentes quimioterapéuticos en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer, donde dicho tratamiento o prevención, comprende administrar a un sujeto, de forma secuencial o separada, un agente o agentes quimioterapéuticos y el antígeno asociado a tumores 5T4, donde el antígeno asociado a tumores 5T4 se administra a un recuento reducido de células Treg  $CD4^+CD25^+$  de al menos un 15 % inferior al recuento de Treg  $CD4^+CD25^+$  determinado antes de administrar el agente quimioterapéutico.

55

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona el antígeno asociado a tumores 5T4 para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer, donde dicho tratamiento o prevención comprende administrar a un sujeto, de forma secuencial o separada un agente o agentes quimioterapéuticos y el antígeno asociado a tumores 5T4 donde el antígeno asociado a tumores 5T4 se administra cuando el sujeto tiene un recuento reducido de células Treg  $CD4^+CD25^+$  de al menos un 15 % inferior al recuento de Treg  $CD4^+CD25^+$  determinado antes de administrar el agente quimioterapéutico.

60

En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un agente o agentes quimioterapéuticos para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer, donde dicho tratamiento o prevención comprende administrar a un sujeto, de

65

forma secuencial o separada, el agente o agentes quimioterapéuticos y el antígeno asociado a tumores 5T4, donde el antígeno asociado a tumores 5T4 se administra a un recuento reducido de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de al menos un 15 % inferior al recuento de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> determinado antes de administrar el agente quimioterapéutico.

5 Adecuadamente, para su uso en la presente invención, se proporciona una composición de los dos componentes para administración separada o posterior en una forma tal como un kit.

10 Por "antígeno" se incluye un medio para proporcionar una proteína o péptido antigénico a introducirse en un individuo. Como se describe en este documento, un antígeno puede proporcionarse a través del suministro de un péptido o proteína o a través del suministro de un ácido nucleico que codifica un péptido o proteína.

15 Por "antígeno" en el contexto de la presente invención también se entiende que incorpora un péptido antigénico derivado de un antígeno. En particular, el "antígeno asociado a tumores" pretende abarcar un péptido derivado de un antígeno asociado a tumores.

Un antígeno tal como un antígeno asociado a tumores puede proporcionarse para su uso como un medicamento de varias maneras diferentes. Puede administrarse como parte de un vector vírico. Varios vectores víricos adecuados serán conocidos para los expertos en la materia e incluyen varios vectores descritos en este documento.

20 La vacuna TroVax® (TroVax es una marca registrada de Estados Unidos y la Comunidad Europea de Oxford Biomedica plc) comprende un vector vírico derivado de MVA que se ha modificado para expresar el antígeno asociado a tumores, 5T4. En una realización, el antígeno tumoral para su uso en la combinación de la invención es 5T4 y se proporciona por la vacuna TroVax®.

25 Los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen cualquier agente convencional. En una realización, el agente quimioterapéutico se selecciona de irinotecán, fluorouracilo, leucovorina y oxaliplatino. En otra realización, un "agente quimioterapéutico" puede incluir una combinación de agentes quimioterapéuticos en una terapia tal como FOLFOX o IFL.

30 Por "simultánea" se entiende que dos agentes se administran de forma concurrente. Por "secuencial" se entiende que los dos agentes se administran uno después del otro en un tramo de tiempo tal que ambos están disponibles para actuar terapéuticamente dentro del mismo tramo de tiempo. El intervalo de tiempo óptimo entre la administración de los dos agentes variará dependiendo de la naturaleza precisa del método para suministrar el antígeno tumoral.

35 El término "separada" se usa para indicar que el hueco entre la administración del primer agente y la del segundo es sustancial.

40 La quimioterapia se administra antes de la administración del antígeno. Adecuadamente, la quimioterapia se administra 10 semanas antes de la administración del antígeno, preferiblemente menos de 10 semanas y, más preferiblemente, en aproximadamente 2 semanas antes de la administración del antígeno. En una realización preferida, la quimioterapia se administra 2 semanas antes de la administración del antígeno.

45 En una realización, el antígeno se administra por anticipado del inicio de la quimioterapia y después de nuevo después de la quimioterapia. En otra realización, el antígeno se administra durante la quimioterapia, así como antes y/o después de la quimioterapia.

50 En una realización, el antígeno se administra al menos 24 horas, preferiblemente 48 horas después de la quimioterapia. Preferiblemente, la administración del antígeno tiene lugar hasta 8 semanas, preferiblemente hasta 6 semanas, e incluso más preferiblemente entre 4 y 6 semanas después de la quimioterapia.

55 Por "recuento reducido de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>" se entiende un recuento de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que es inferior que el recuento de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> determinado antes de administrar un agente que disminuye el recuento de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, tal como un agente o agentes quimioterapéuticos u Ontak. El nivel de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> es al menos un 15 %, preferiblemente al menos un 30 %, un 50 %, un 70 %, un 90 % inferior que el nivel de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> determinado antes de administrar el agente que disminuye el recuento de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (por ejemplo, un agente o agentes quimioterapéuticos u Ontak). Mucho más preferiblemente, la vacunación coincidirá con el periodo en que la quimioterapia ha causado una reducción máxima de las células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

60 Adecuadamente, el uso en el tratamiento de un individuo comprende las etapas de:

a) administrar quimioterapia

65 b) administrar un antígeno.

En una realización, el uso comprende adicionalmente administrar un antígeno antes de administrar la quimioterapia. En otra realización, el uso comprende adicionalmente administrar un antígeno durante el mismo tramo de tiempo que la administración de la quimioterapia.

5 Adecuadamente, el uso en el tratamiento de un individuo comprende las etapas de:

a) administrar un antígeno tumoral para provocar una respuesta antitumoral,

b) administrar quimioterapia

10

c) administrar un antígeno tumoral.

En una realización, el uso comprende adicionalmente la etapa de determinar el recuento de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. En otra realización, el uso comprende determinar el recuento de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> o la función reducida de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> antes y/o durante y/o después de la quimioterapia.

15

Se describe un método de potenciación de una respuesta inmunitaria contra un antígeno por tratamiento con quimioterapia antes y/o durante y/o después de la sensibilización al antígeno.

20 Se describe un kit que comprende un medio para administrar un antígeno en combinación con un agente o agentes quimioterapéuticos para su administración.

Otros aspectos de la presente invención se presentan en las reivindicaciones adjuntas y en la siguiente descripción y análisis. Estos aspectos se presentan en encabezados de sección diferentes. Sin embargo, debe entenderse que los contenidos en dicho encabezado de sección no están necesariamente limitados a ese encabezado de sección particular.

25

Descripción detallada de la invención

30 Antígeno asociado a tumores (TAA)

En la presente invención, el antígeno asociado a tumores es 5T4.

35

5T4

5T4 se ha caracterizado previamente, por ejemplo, en el documento WO89/07947. La secuencia de 5T4 humano aparece en GenBank en el n.º de acceso Z29083. El antígeno 5T4 puede provenir de diferentes especies, tal como 5T4 murino (documento WO00/29428), 5T4 canino (documento WO01/36486) o 5T4 felino. El antígeno también puede derivar de una variante de origen natural de 5T4 encontrada en una especie particular, preferiblemente un mamífero. Dicha variante puede estar codificada por un gen relacionado de la misma familia génica, por una variante alélica de un gen particular o representar una variante de corte y empalme alternativo del gen 5T4. 5T4 y su uso también se ha descrito en el documento EP1036091.

40

Un epítipo peptídico derivado de 5T4 de una especie diferente o una variante de corte y empalme puede tener una secuencia diferente de aminoácidos del epítipo peptídico 5T4 de tipo silvestre humano análogo. Sin embargo, siempre que el péptido retenga la misma especificidad de unión cualitativa que el péptido humano (es decir, se une en el surco de unión peptídico de una molécula MHC del mismo haplotipo) entonces aún es un epítipo de acuerdo con la presente invención.

45

50 Péptidos inmunogénicos derivados de antígenos

"Antígenos" incluye epítipos peptídicos derivados de proteínas antigénicas específicas incluyendo antígenos asociados a tumores. Los epítipos adecuados incluyen epítipos de células T. Adecuadamente, dichos péptidos son "péptidos inmunogénicos", es decir, son capaces de estimular una respuesta inmunitaria antiantígeno asociado a tumores. Dicha respuesta inmunitaria incluye una respuesta de células T citotóxicas para péptidos, así como una respuesta de células T citotóxicas y/o respuesta de anticuerpos para antígenos proteicos en general.

55

A este respecto, el término "péptido" se usa en el sentido normal para indicar una serie de restos, típicamente L-aminoácidos, conectados uno al otro típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos α-amino y carboxilo de aminoácidos adyacentes. El término incluye péptidos modificados y análogos peptídicos sintéticos.

60

Un epítipo de células T es un péptido corto que puede derivar de un antígeno proteico. Las células presentadoras de antígeno pueden internalizar el antígeno y procesarlo en fragmentos cortos que son capaces de unirse a moléculas MHC. La especificidad de la unión del péptido al MHC depende de interacciones específicas entre el péptido y el surco de unión peptídico de la molécula MHC particular.

65

- Los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase I (y se reconocen por células T CD8<sup>+</sup>) tienen habitualmente entre 6 y 12, más habitualmente entre 8 y 12 aminoácidos u 8 y 10 aminoácidos de longitud. Típicamente, los péptidos son de 9 aminoácidos de longitud. El grupo amina aminoterminal del péptido hace contacto con un sitio invariable en un extremo del surco peptídico y el grupo carboxilato en el extremo carboxi se une a un sitio invariable en el otro extremo del surco. Por tanto, típicamente, dichos péptidos tienen un extremo carboxi hidrófobo o básico y ausencia de prolina en el extremo aminoterminal. El péptido descansa en una conformación extendida a lo largo del surco con contactos adicionales entre átomos de la cadena principal y cadenas laterales de aminoácidos conservados que revisten el surco. Las variaciones en la longitud del péptido se acomodan por una torsión en la estructura peptídica, a menudo en restos de prolina o glicina.
- Los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase II habitualmente son de al menos 10 aminoácidos, por ejemplo, de aproximadamente 13-18 aminoácidos de longitud y pueden ser mucho más largos. Estos péptidos descansan en una conformación extendida a lo largo del surco de unión peptídico de MHC II que está abierto en ambos extremos. El péptido se mantiene en su lugar principalmente por contactos de átomos de la cadena principal con restos conservados que revisten el surco de unión peptídico.
- Los péptidos antigénicos de la presente invención pueden prepararse usando métodos químicos (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin.). Por ejemplo, los péptidos pueden sintetizarse por técnicas en fase sólida (Roberge JY *et al.* (1995) Science 269: 202-204), escindir de la resina y purificarse por cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa (por ejemplo, Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, Nueva York NY). Puede conseguirse síntesis automatizada, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos ABI 43 1 A (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.
- El péptido como alternativa puede prepararse por medios recombinantes o por escisión de un polipéptido más largo. Por ejemplo, el péptido puede obtenerse por escisión de una proteína de longitud completa tal como 5T4 de longitud completa. La composición de un péptido puede confirmarse por análisis de aminoácidos o secuenciación (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman).
- La expresión "epítipo peptídico" abarca péptidos modificados. Por ejemplo, pueden mutarse los péptidos de antígeno asociado a tumores por inserción, delección o sustitución de aminoácidos, siempre que se retenga la especificidad de unión a MHC del péptido de antígeno asociado a tumores de tipo silvestre. En una realización preferida, el epítipo modificado tiene mayor afinidad por el surco de unión peptídico. Preferiblemente, el péptido contiene 5 o menos mutaciones de la secuencia de tipo silvestre, más preferiblemente 3 o menos, mucho más preferiblemente 1 o 0 mutaciones.
- Como alternativa (o adicionalmente) las modificaciones pueden hacerse sin cambiar la secuencia de aminoácidos del péptido. Por ejemplo, pueden incluirse D-aminoácidos u otros aminoácidos no naturales, puede remplazarse el enlace amida normal por éster o enlaces de estructura alquilo, sustituyentes N o C alquilo, modificaciones de cadena lateral y pueden incluirse limitaciones tales como puentes disulfuro y enlaces amida o éster de cadena lateral. Dichos cambios pueden producir mayor estabilidad *in vivo* del péptido y vida biológica más larga.
- Otras formas de modificación incluían modificaciones postraduccionales tales como fosforilación y glucosilación de los péptidos. Los péptidos modificados de forma postraducciona inducen esencialmente la misma respuesta inmunitaria que otros péptidos de acuerdo con la invención. Ciertas modificaciones podrían dar lugar a un aumento en la respuesta inmunitaria inducida mientras que otras disminuirían la respuesta. Otras modificaciones incluyen la adición o eliminación de un sitio de glucosilación o fosforilación para cambiar o modular la respuesta inmunitaria estimulada por estos péptidos.
- La modificación de epítipos puede realizarse basándose en predicciones de inducción de células T más eficaz derivadas usando el programa "Peptide Binding Predictions" ideado por K. Parker (NIH) que puede encontrarse en [http://www-bimas.dcrn.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken\\_parker\\_comboform](http://www-bimas.dcrn.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform) (véase también Parker, K. C *et al.* 1994. J. Immunol. 152:163).
- Un epítipo peptídico antigénico "modificado" incluye péptidos que se han unido o asociado de otro modo a péptidos transportadores o adyuvantes, para aumentar su capacidad de provocar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, los péptidos pueden fusionarse a péptidos transportadores independientes TAP para un transporte eficaz a HLA e interacción con moléculas HLA para potenciar los epítipos CTL (para una revisión véase Yewdell *et al.*, 1998 J Immunother 21:127-31; Fu *et al.*, (1998) J Virol 72:1469-81).
- En una realización adicional, los antígenos o péptidos derivados de dichos antígenos pueden fusionarse al antígeno central de hepatitis B para potenciar las respuestas T auxiliares y de anticuerpos (Schodel *et al.*, 1996 Intervirology 39:104-10).
- Para ser un epítipo, el péptido debe ser capaz de unirse al surco de unión peptídico de una molécula MHC de clase I o II y reconocerse por una célula T.

La presentación en superficie celular de los péptidos derivados de un antígeno dado no es aleatoria y tiende a estar dominada por una pequeña cantidad de epítomos que aparecen de forma frecuente. La dominancia de un péptido particular dependerá de muchos factores, tales como la afinidad relativa para la unión a la molécula MHC, el punto espacio temporal de generación dentro de la APC y la resistencia a la degradación. La jerarquía del epítomo para un antígeno se cree que cambia con la progresión de una respuesta inmunitaria. Después de una respuesta inmunitaria primaria a los péptidos inmunodominantes, puede suceder "propagación" del epítomo a determinantes subdominantes (Lehmann *et al.* (1992) Nature 358:155-157).

Para cualquier antígeno dado, también pueden existir epítomos crípticos. Los epítomos crípticos son aquellos que pueden estimular una respuesta de células T cuando se administran como un péptido pero que no logran producir dicha respuesta cuando se administran como un antígeno completo. Puede ser que durante el procesamiento del antígeno en péptidos en la APC se destruya el epítomo críptico.

El péptido para su uso en la invención puede ser un epítomo inmunodominante, un epítomo subdominante o un epítomo críptico.

Los epítomos para un antígeno pueden identificarse midiendo una respuesta de células T a péptidos solapantes que abarcan una parte del antígeno cuando se presentan por APC. Dichos estudios habitualmente producen "conjuntos anidados" de péptidos y el epítomo mínimo para una línea/clon de célula T particular puede evaluarse midiendo la respuesta a péptidos truncados.

El epítomo mínimo para un antígeno puede no ser el mejor epítomo para propósitos prácticos. También puede ser que los aminoácidos que flanquean el epítomo mínimo sean necesarios para la unión óptima al MHC.

Los péptidos se ensayan en un sistema de presentación de antígeno que comprende células presentadoras de antígeno y células T. Por ejemplo, el sistema de presentación de antígeno puede ser una preparación de esplenocitos murinos, una preparación de células humanas de amígdala o PBMC. Como alternativa, el sistema de presentación de antígeno puede comprender una línea/clon de célula T particular y/o un tipo de célula presentadora de antígeno particular.

La activación de células T puede medirse a través de la proliferación de células T (por ejemplo, usando incorporación de <sup>3</sup>H-timidina) o producción de citoquinas. La activación de células T CD4<sup>+</sup> de tipo TH1 puede detectarse, por ejemplo, a través de la producción de IFN $\gamma$  que puede detectarse por técnicas convencionales, tales como un ensayo ELISPOT.

#### *Hebra de poliepítomo*

Se ha descubierto que una manera particularmente eficaz de inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno es por el uso de una hebra de poliepítomo, que contiene una pluralidad de epítomos antigénicos de uno o más antígenos unidos juntos. Por ejemplo, para la malaria, se ha descrito una hebra de poliepítomo de epítomos peptídicos de células T CD8 principalmente de malaria (*P. falciparum*) que también expresa epítomos de células T CD4 de toxoide tetánico y del antígeno micobacteriano de 38 kDa de diversas cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

Por consiguiente, el antígeno asociado a tumores para su uso en la presente invención puede ser una hebra de poliepítomo que comprende al menos un péptido de un antígeno asociado a tumores. Adecuadamente, una hebra de poliepítomo está compuesta de al menos uno, dos, tres, cuatro o más epítomos peptídicos. La hebra también puede comprender otro epítomo que puede derivar de un antígeno tal como el antígeno 5T4 o un epítomo de otro antígeno - tal como otro TAA - o combinaciones de los mismos. Una hebra de poliepítomo puede comprender opcionalmente aminoácidos intermedios adicionales, entre los diferentes epítomos de antígeno tumoral. Adecuadamente, los epítomos se unen por secuencias adicionales que están ausentes de la proteína de longitud completa.

#### *Penetradores celulares*

La presente invención también proporciona el uso de un antígeno o un epítomo peptídico del mismo, o una hebra de poliepítomo en asociación con un penetrador celular.

Las células presentadoras de antígeno (tales como células dendríticas) pulsadas con péptidos han demostrado ser eficaces en la potenciación de la inmunidad antitumoral (Celluzzi *et al.* (1996) J. Exp. Med. 183 283-287; Young *et al.* (1996) J. Exp. Med. 183 7-11). Se ha demostrado que es posible prolongar la presentación de un péptido por células dendríticas (y, por tanto, potenciar la inmunidad antitumoral) uniéndolo a un péptido de penetración celular (CPP) (Wang y Wang (2002) Nature Biotechnology 20 149-154).

Un penetrador celular puede ser cualquier entidad que potencie el suministro intracelular del péptido/hebra de poliepítomo a la célula presentadora de antígeno. Por ejemplo, el penetrador celular puede ser un lípido que, cuando está asociado con el péptido, potencia su capacidad de cruzar la membrana plasmática. Como alternativa, el penetrador celular puede ser un péptido. Se han identificado varios péptidos de penetración celular (CPP) de

proteínas, incluyendo la proteína Tat de VIH (Frankel y Pabo (1988) Cell 55 1189-1193), la proteína VP22 de HSV (Elliott y O'Hare (1997) Cell 88 223-233) y el factor de crecimiento de fibroblastos (Lin *et al.* (1995) J. Biol. Chem. 270 14255-14258).

5 La expresión "asociado con" pretende incluir enlace directo, por ejemplo, por un enlace covalente. Ejemplos de enlaces covalentes para unión de aminoácidos incluyen puentes disulfuro y enlaces peptídicos. En una realización preferida, el péptido/hebra de poliepítipo y un CPP se unen por un enlace peptídico para crear una proteína de fusión.

10 La expresión también incluye enlace no covalente, tal como asociación por enlace electrostático, enlace de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. El penetrador celular y el péptido/hebra de poliepítipo pueden asociarse sin unión covalente o no covalente. Por ejemplo, el penetrador celular puede ser un lípido que encapsula el péptido/hebra de poliepítipo (por ejemplo, un liposoma)

15 *Composiciones para administrar antígenos asociados a tumores*

Sistema de vector

20 Una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno para su uso en la presente invención puede suministrarse o administrarse a un mamífero tal como un paciente humano mediante un sistema de vector.

25 Como se usa en este documento, un "vector" puede ser cualquier agente capaz de suministrar o mantener un ácido nucleico en una célula hospedadora, e incluye vectores víricos, plásmidos, ácidos nucleicos desnudos, ácidos nucleicos en complejo con polipéptido u otras moléculas y ácidos nucleicos inmovilizados en partículas en fase sólida. Dichos vectores se describen en detalle a continuación. Se entenderá que la presente invención, en su forma más amplia no está limitada a ningún vector específico para el suministro del ácido nucleico que codifica el antígeno asociado a tumores.

30 Los ácidos nucleicos que codifican antígenos, epítomos y hebras de poliepítipo de acuerdo con la presente invención pueden suministrarse o administrarse por técnicas víricas o no víricas.

35 Los sistemas de suministro no víricos incluyen, aunque sin limitación, métodos de transfección de ADN. En esta ocasión, la transfección incluye un proceso usando un vector no vírico para suministrar un gen que codifica un antígeno a una célula de mamífero diana.

40 Los métodos de transfección típicos incluyen electroporación, biolística de ácido nucleico, transfección mediada por lípidos, transfección mediada por ácido nucleico compactado, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, por mediación de agente catiónico, anfífilos faciales catiónicos (CFA) (Nature Biotechnology 1996 14; 556), cationes multivalentes tales como espermina, lípidos catiónicos o polilisina, complejos de 1,2,-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP)-colesterol (Wolff y Trubetskoy 1998 Nature Biotechnology 16: 421) y combinaciones de los mismos.

45 Los sistemas de suministro no víricos también pueden incluir, aunque sin limitación, sistemas de suministro bacterianos. El uso de bacterias como agentes antineoplásicos y como agentes de suministro para fármacos antineoplásicos se ha revisado en Expert Opin Biol Ther marzo de 2001; 1(2):291-300.

50 Las bacterias adecuadas incluyen, aunque sin limitación, patógenos bacterianos y bacterias comensales no patogénicas. A modo de ejemplo, pueden seleccionarse los géneros adecuados de *Salmonella*, *Mycobacterium*, *Yersinia*, *Shigella*, *Listeria* y *Brucella*. Los recientes avances en la patogénesis y biología molecular de estas bacterias ha permitido el desarrollo racional de portadores bacterianos nuevos y mejorados y sistemas de expresión génica más eficaces. Estos avances han mejorado el rendimiento y versatilidad de estos sistemas de suministro.

55 Las bacterias pueden ser bacterias intracelulares invasivas que son capaces de transferir plásmidos de expresión eucariotas a células hospedadoras de mamífero *in vitro* e *in vivo*. La transferencia plasmídica puede tener lugar cuando la bacteria recombinante muere dentro de la célula hospedadora, debido a atenuación metabólica o inducción de autólisis. Como alternativa, pueden usarse antibióticos y también se ha observado transferencia espontánea, que indica que este fenómeno también podría suceder en condiciones fisiológicas. Se ha informado de transferencia plasmídica para *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *S. typhi*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* recombinante, pero también pueden usarse otras bacterias invasivas.

60 Las bacterias pueden usarse para el suministro de vacunas de ADN. Dichas bacterias pueden entrar en el citosol de la célula hospedadora después de fagocitosis, por ejemplo, *Shigella* y *Listeria*, o permanecen en el compartimento fagosómico - tal como *Salmonella*. Ambas localizaciones intracelulares pueden ser adecuadas para un suministro satisfactorio de vectores de vacuna de ADN.

65

Los sistemas de suministro bacterianos pueden utilizar *Mycobacterium* en forma de cepas de *Mycobacterium* no patogénicas, sistemas de transferencia genética en forma de vectores de clonación o expresión y tecnología relacionadas para proporcionar productos que contienen, por ejemplo, adyuvantes de *Mycobacterium* inmunorreguladores no tóxicos, antígenos exógenos inmunoestimulantes no tóxicos específicos para una diversidad de enfermedades y cantidades no tóxicas de citoquinas que refuerzan la ruta TH1 (Tunis Med febrero de 2001; 79(2):65-81).

Las cepas de *Salmonella* - tales como cepas atenuadas - que comprenden deleciones génicas definidas, pueden usarse como sistemas de suministro adecuados - tal como el suministro de antígenos. Se han intentado varias estrategias para el suministro de estas cepas, que varían desde sistemas de integración basados en plásmidos a sistemas de integración cromosómicos. A modo de ejemplo, Rosenkranz *et al.* Vaccine 2003, 21(7-8), 798-801 describen plásmidos de expresión eucariotas que codifican citoquinas y evaluaron su capacidad de modular las respuestas inmunitarias en diferentes modelos experimentales. Los plásmidos que codifican IL4 e IL18 de ratón bajo el promotor de citomegalovirus se construyeron y transformaron en *Salmonella enterica* atenuada viva serovar Typhi cepa CVD 908-htrA, y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cepa SL3261.

El uso de *Salmonella typhimurium* atenuada como vector de suministro génico potencial se ha revisado en Anticancer Res 2002, 22(6A):3261-6.

*Brucella abortus* también puede usarse como sistema de suministro adecuado como se describe por Vemulapalli *et al.* Infect Immun (2000) 68(6):3290-6. *Brucella abortus* cepa RB51 es un mutante atenuado estable, rugoso ampliamente usado como vacuna viva para la brucelosis bovina. Esta cepa puede usarse como vector de suministro, por ejemplo, en el suministro de antígenos protectores de otros patógenos intracelulares para los que se necesita la inducción de una fuerte respuesta inmunitaria de tipo TH1 para una protección eficaz.

Boyd *et al.* Eur J Cell Biol (2000) 79 (10) 659-71 describen el uso de *Yersinia enterocolitica* para el suministro de proteínas en una amplia gama de tipos celulares. *Y. Enterocolitica* trasloca proteínas de virulencia, llamadas efectores Yop, al citosol de células eucariotas. No se informó de límite a la gama de células eucariotas en que, *Y. enterocolitica* puede traslocar Yops. Los efectores Yop YopE, YopH y YopT eran cada uno citotóxico para los tipos de células adherentes ensayados, mostrando que no solamente *Y. Enterocolitica* no es selectiva en su traslocación de efectores Yop particulares en cada tipo celular, sino también que la acción de estos efectores Yop no es específica de tipo celular. Para usar el sistema de traslocación de *Yersinia* para amplias aplicaciones, se construyó una cepa de traslocación de *Y. Enterocolitica* y un vector para el suministro de proteínas heterólogas en células eucariotas. Esta combinación de cepa y vector carece de los efectores Yop traslocados y permite el suministro en células eucariotas de proteínas heterólogas fusionadas a la señal mínima de secreción/traslocación N-terminal de YopE.

El documento US 5965381 describe una *Yersinia* recombinante para el suministro de proteínas en células eucariotas. Dicha *Yersinia* es deficiente en la producción de proteínas efectoras funcionales, pero está dotada de un sistema de secreción y traslocación funcional.

Las moléculas de adhesión celular son un gran grupo de moléculas implicadas en una diversidad de interacciones entre células y entre células y matriz extracelular (ECM) y se explotan por varios microorganismos patogénicos como receptores para la entrada en las células. Estas moléculas pueden usarse para dirigir y captar sistemas de suministro tanto de genes como de fármacos. Las moléculas de adhesión celular y su uso en transferencia génica, se ha revisado en Adv Drug Deliv Rev 15 de noviembre de 2000; 44(2-3):135-52.

El sistema de suministro de pistola génica también puede usarse para el suministro de ADN, que es un método altamente fiable en comparación con la inoculación intramuscular (Jpn J Pharmacol julio de 2000; 83(3):167-74).

Los sistemas de suministro vírico incluyen, aunque sin limitación, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados (AAV), vectores de virus del herpes, vectores de retrovirus, vectores de lentivirus o vectores de baculovirus, virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), poxvirus tales como: virus de la viruela de los canarios (Taylor *et al.* 1995 Vaccine 13:539-549), entomopoxvirus (Li Y *et al.* 1998 XIIth International Poxvirus Symposium pág. 144. Resumen), viruela del pingüino (Standard *et al.* J Gen Virol. 1998 79:1637-46), alfavirus y vectores de ADN basados en alfavirus.

Los ejemplos de retrovirus incluyen, aunque sin limitación: virus de la leucemia murina (MLV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), virus del tumor mamario de ratón (MMTV), virus del sarcoma de Rous (RSV), virus del sarcoma de Fujinami (FuSV), virus de la leucemia murina de Moloney (Mo-MLV), virus del osteosarcoma murino FBR (FBR MSV), virus del sarcoma murino de Moloney (Mo-MSV), virus de la leucemia murina de Abelson (A-MLV), virus 29 de la mielocitomatosis aviar (MC29) y virus de la eritroblastosis aviar (AEV).

Puede encontrarse una lista detallada de retrovirus en Coffin *et al.* ("Retroviruses" 1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pág. 758-763).

Los lentivirus pueden dividirse en grupos de primates y no de primates. Ejemplos de lentivirus de primates incluyen, aunque sin limitación: virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causante del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) humano y el virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV). El grupo de lentivirus no de primates incluye el virus visna/maedi (VMV) prototipo de "virus lento", así como el virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV) relacionado, el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) y el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) más recientemente descrito y el virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV).

Una distinción entre la familia de lentivirus y otros tipos de retrovirus es que los lentivirus tienen la capacidad de infectar células tanto en división como no en división (Lewis *et al.* 1992 EMBO. J 11: 3053-3058; Lewis y Emerman 1994 J. Virol. 68: 510-516). En contraste, otros retrovirus - tales como MLV - son incapaces de infectar células que no están en división tales como las que componen, por ejemplo, el músculo, el cerebro, el pulmón y el tejido hepático.

El vector para su uso en la presente invención puede configurarse como un vector dividido por intrones. Un vector dividido por intrones se describe en las solicitudes de patente PCT WO 99/15683 y WO 99/15684.

Si las características de los adenovirus se combinan con la estabilidad genética de los retrovirus/lentivirus, entonces puede usarse esencialmente el adenovirus para transducir células diana para que lleguen a ser células productoras de retrovirus transitorias que podrían infectar de forma estable células adyacentes. Dichas células productoras de retrovirus modificadas para expresar el antígeno 5T4 pueden implantarse en organismos tales como animales o seres humanos para su uso en el tratamiento de la angiogénesis y/o el cáncer.

El vector para su uso en la presente invención puede configurarse como un vector pseudotipado.

En el diseño de vectores retrovíricos, puede ser deseable modificar partículas con diferentes especificidades de célula diana para el virus nativo, para posibilitar el suministro de material genético a una gama expandida o alterada de tipos celulares. Una manera para conseguir esto es modificando la proteína de envuelta vírica para alterar su especificidad. Otro enfoque es introducir una proteína de envuelta heteróloga en la partícula de vector para reemplazar o añadir la proteína de envuelta nativa del virus.

El término pseudotipado significa incorporar al menos una parte o sustituir una parte o reemplazar todo un gen *env* de un genoma vírico con un gen *env* heterólogo, por ejemplo, un gen *env* de otro virus. El pseudotipado no es un fenómeno nuevo y pueden encontrarse algunos ejemplos en el documento WO 99/61639, el documento WO-A-98/05759, el documento WO-A-98/05754, el documento WO-A-97/17457, el documento WO-A-96/09400, el documento WO-A-91/00047 y en Mebatsion *et al.* 1997 Cell 90, 841-847.

El pseudotipado puede mejorar la estabilidad del vector retrovírico y la eficacia de transducción. Se ha descrito un pseudotipo de virus de leucemia murina empaquetado con virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) (Miletic *et al.* (1999) J. Virol. 73:6114-6116) y se ha demostrado que es estable durante ultracentrifugación y capaz de infectar varias líneas celulares de diferentes especies.

#### Vectores de poxvirus

Los antígenos tales como TAA son débilmente inmunogénicos, reconociéndose como "propios" por el sistema inmunitario y, por tanto, tolerados en gran medida. El uso de vectores de poxvirus a veces es capaz de causar que los antígenos se presenten de modo que esta tolerancia pueda superarse al menos en parte (especialmente si se delecionan los genes de evasión inmunitaria - véase a continuación) posibilitando, por tanto, que un hospedador genere una respuesta inmunitaria.

Los vectores de poxvirus son preferidos para su uso en la presente invención. Los virus de la viruela se modifican para la expresión génica recombinante y para el uso como vacunas vivas recombinantes. Esto implica el uso de técnicas recombinantes para introducir ácidos nucleicos que codifican antígenos foráneos en el genoma del virus de la viruela. Si el ácido nucleico se integra en un sitio en el ADN vírico que es no esencial para el ciclo vital del virus, es posible que el virus de la viruela recombinante recién producido sea infeccioso, es decir, infecte células foráneas y, por tanto, exprese la secuencia de ADN integrada. El virus de la viruela recombinante preparado de esta manera puede usarse como vacunas vivas para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades patológicas e infecciosas.

La expresión del péptido o péptidos antigénicos en virus de la viruela recombinantes, tales como virus vaccinia, requiere el ligamiento de promotores de vaccinia al ácido nucleico que codifica el péptido o péptidos 5T4. Los vectores plasmídicos (también llamados vectores de inserción), se han construido para insertar ácidos nucleicos en virus vaccinia a través de recombinación homóloga entre las secuencias víricas que flanquean el ácido nucleico en un plásmido donante y la secuencia homóloga presente en el virus precursor (Mackett *et al.* 1982 PNAS 79: 7415-7419). Un tipo de vector de inserción está compuesto de: (a) un promotor de virus vaccinia que incluye el sitio de inicio de la transcripción; (b) varios sitios de clonación de endonucleasas de restricción únicas localizados en dirección 3' desde el sitio de inicio de la transcripción para la inserción de ácido nucleico; (c) secuencias no esenciales del virus vaccinia (tal como el gen de la timidina quinasa (*TK*)) que flanquean el promotor y los sitios de

clonación que dirigen la inserción del ácido nucleico en la región no esencial homóloga del genoma vírico; y (d) un origen bacteriano de replicación y un marcador de resistencia a antibióticos para dar replicación y selección en *E. coli*. Los ejemplos de dichos vectores se describen por Mackett (Mackett *et al.* 1984, *J. Virol.* 49:857-864).

5 El plásmido aislado que contiene el ácido nucleico a insertar se transfecta en un cultivo celular, por ejemplo, fibroblastos de embrión de pollo, junto con el virus precursor, por ejemplo, poxvirus. La recombinación entre el ADN homólogo de viruela en el plásmido y el genoma vírico respectivamente produce virus de la viruela recombinante modificado por la presencia de la construcción de promotor-gen en su genoma, en un sitio que no afecta a la viabilidad del virus. Como se indica anteriormente, el ácido nucleico se inserta en una región (región de inserción) en el virus que no afecta a la viabilidad del virus del virus recombinante resultante. Dichas regiones pueden identificarse fácilmente en un virus por, por ejemplo, ensayo aleatorio de segmentos de ADN vírico para regiones que permiten la formación recombinante sin afectar de forma importante a la viabilidad del virus del recombinante. Una región que puede usarse fácilmente y está presente en muchos virus es el gen de la timidina quinasa (TK). Por ejemplo, el gen TK se ha encontrado en todos los genomas de virus de la viruela 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); ortopoxvirus: Weir, *et al.* *J. Virol* 46:530 (1983) (vaccinia); Esposito, *et al.* *Virology* 135:561 (1984) (virus de la viruela del mono); Hruby, *et al.* *PNAS*, 80:3411 (1983) (vaccinia); Kilpatrick, *et al.* *Virology* 143:399 (1985) (virus del tumor de 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 Method*, 20:341 (1988) (viruela aviar, viruela de la codorniz); entomopoxvirus (Lytvyn, *et al.* *J. Gen. Virol* 73:3235-3240 (1992)].

En vaccinia, además de la región TK, otras regiones de inserción incluyen, por ejemplo, HindIII M.

25 En la viruela aviar, además de la región TK otras regiones de inserción incluyen, por ejemplo, BamHI J [Jenkins, *et al.* *AIDS Research and Human Retroviruses* 7:991-998 (1991)] el fragmento EcoRI-HindIII, el fragmento BamHI, el fragmento EcoRV-HindIII, el fragmento BamHI y el fragmento HindIII expuesto en la solicitud EPO n.º 0 308 220 A1. [Calvert, *et al.* *J. of Virol* 67:3069-3076 (1993); Taylor, *et al.* *Vaccine* 6:497-503 (1988); Spehner, *et al.* (1990) y Bournnell, *et al.* *J. of Gen. Virol* 71:621-628 (1990)].

30 En la viruela porcina, los sitios de inserción preferidos incluyen región del gen de la timidina quinasa.

Un promotor puede seleccionarse fácilmente dependiendo del hospedador y el tipo de célula diana. Por ejemplo, en virus de la viruela, deben usarse promotores del virus de la viruela, tal como el 7.5K de vaccinia o 40K o C1 de viruela aviar. También pueden usarse construcciones artificiales que contienen secuencias apropiadas de viruela. 35 También pueden usarse elementos potenciadores en combinación para aumentar el nivel de expresión. Además, el uso de promotores inducibles, que también es bien conocido en la técnica, es preferido en algunas realizaciones.

La expresión del gen foráneo puede detectarse por ensayos enzimáticos o inmunológicos (por ejemplo, inmunoprecipitación, radioinmunoensayo o inmunotransferencia). Las glucoproteínas de membrana de origen natural producidas a partir de células infectadas con vaccinia recombinante se glucosilan y pueden transportarse a la superficie celular. Pueden obtenerse altos niveles de expresión usando promotores fuertes. 40

Otros requisitos para los vectores víricos para su uso en vacunas incluyen buena inmunogenicidad y seguridad. MVA es una cepa de vaccinia con la replicación alterada con un buen registro de seguridad. La mayoría de tipos celulares y tejidos humanos normales, MVA no se replica. La replicación de MVA se observa en unos pocos tipos celulares transformados tales como células BHK21. Carroll *et al.* (1997) han demostrado que el MVA recombinante es igual de bueno que los vectores vaccinia recombinantes convencionales para generar una respuesta de células T CD8<sup>+</sup> protectora y es una alternativa eficaz al virus vaccinia competente en la replicación habitualmente usado. Las cepas de virus vaccinia derivadas de MVA o cepas desarrolladas independientemente que tienen las características de MVA que hacen que MVA sea particularmente adecuado para su uso en una vacuna, también son adecuadas para su uso en la presente invención. 45 50

Preferiblemente, el vector es un vector de virus vaccinia tal como MVA o NYVAC. El más preferido es el virus de Ankara modificado con la cepa vaccinia (MVA, *Modified Vaccinia Ankara*) o una cepa derivada del mismo. Las alternativas a vectores de vaccinia incluyen vectores de viruela aviar tales como viruela aviar o viruela del canario conocidos como ALVAC y cepas derivadas de los mismos que pueden infectar y expresar proteínas recombinantes en células humanas, pero son incapaces de replicarse. 55

En un aspecto de la presente invención, se deleta al menos un gen de evasión inmunitaria del vector del virus de la viruela. 60

Los virus, especialmente los virus grandes tales como virus de la viruela que tienen una gran capacidad codificante y, por tanto, pueden codificar una diversidad de genes, han desarrollado varias técnicas para evadir el sistema inmunitario de sus hospedadores. Por ejemplo, son capaces de evadir las defensas no específicas tales como el complemento, los interferones y la respuesta inflamatoria, así como interferir o bloquear la función de las citoquinas. 65

Varios de estos polipéptidos de evasión inmunitaria se han delecionado de MVA, con la excepción de la proteína de resistencia a interferón en la región terminal izquierda.

Los virus de la viruela, en general, son virus ADN grandes que establecen infecciones agudas, en lugar de latentes. Codifican muchas proteínas antigénicas de modo que la variación antigénica es difícil, dependiendo por tanto de la evasión inmunitaria activa para protegerse a sí mismos del sistema inmunitario de mamífero. Poseen varios genes que codifican polipéptidos que son responsables de interferir con varios aspectos del sistema inmunitario: alteran la acción del interferón, interfieren con el complemento, la actividad de citoquinas, las respuestas inflamatorias y el reconocimiento de CTL (para una revisión Smith *et al.*, (1997) *Immunol Rev* 159:137-154). La eliminación de estas proteínas es beneficiosa en promover la capacidad de los inmunógenos débiles codificados en un vector de virus de la viruela de provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto.

Un gen o polipéptido de evasión inmunitaria es un gen, o su producto, que ayuda al virus a evadirse del sistema inmunitario de mamífero. Preferiblemente, el gen o producto génico interfiere con el trabajo del sistema inmunitario, al menos a un nivel. Esto puede conseguirse de varias maneras, tal como interfiriendo en las rutas de señalización proporcionando competidores para las moléculas de señalización, proporcionando miméticos del receptor soluble de citoquinas y similares.

Los genes de evasión inmunitaria incluyen, aunque sin limitación, los siguientes:

*Genes de evasión de interferón.* Vaccinia posee al menos tres genes que interfieren con la acción de IFN. El gen E3L expresa un polipéptido de 25 kDa que compite con la proteína quinasa P1 por la unión a ARNbc, un evento que conduce a activación de P1, fosforilación de eIF2 $\alpha$  y fallo resultante del ensamblaje del complejo de inicio de la traducción. Esta ruta habitualmente es sensible a activación de IFN, por tanto, está impedida por la expresión de E3L, permitiendo de ese modo que el inicio de la traducción prosiga sin impedimentos.

El gen K3L expresa un polipéptido de 10,5 kDa que también interfiere con la actividad de P1, ya que es efectivamente un mimético de eIF2 $\alpha$  y actúa como competidor para la proteína quinasa P1. Su modo de acción es, por tanto, similar a E3L.

Se predice que el gen A18R codifica una helicasa, que parece interferir con la ruta de 2',5'-oligoadenilato que, a su vez, es sensible a IFN. 2',5'-A activa la RNasa L, que actúa previniendo la traducción vírica. La expresión de A18R parece reducir los niveles de 2',5'-A en células infectadas.

*Complemento.* Se sabe que el producto del gen B5R de vaccinia está altamente relacionado con el factor H, un regulador de la ruta alternativa del complemento. Esta ruta puede activarse por el antígeno en solitario, a diferencia de la ruta clásica. El producto del gen B5R, por tanto, puede interferir con la ruta alternativa del complemento.

El gen C21L está relacionado, a su vez, con la proteína de unión a C4b en seres humanos e interactúa con células que albergan C4b sobre la superficie para evitar la unión al receptor del complemento CR1.

*Receptores solubles de citoquinas.* El producto del gen WR B15R de vaccinia (B16R en la cepa de vaccinia Copenhagen) está relacionado con IL1-R.

La ORF SaIF19R, del gen WR, A53R en la cepa de vaccinia Copenhagen, codifica un receptor de TNF. Sin embargo, en el virus de tipo silvestre se cree que estos dos genes son inactivos debido a la fragmentación de las ORF.

Se cree que el gen B8R codifica un receptor soluble de IFN $\gamma$ , proporcionando al virus otro mecanismo más de evasión de IFN.

*Inflamación.* Se cree que varios genes están implicados en la prevención de las respuestas inflamatorias a infección vírica. Estos incluyen A44L, K2L, B13R y B22R.

En un aspecto de la presente invención, la mayoría de los genes de evasión inmunitaria se delecionan del vector del virus de la viruela recombinante. Preferiblemente, todos los genes de evasión inmunitaria se delecionan. Por tanto, en un aspecto de la presente invención, el vector del virus de la viruela recombinante es un vector MVA recombinante en que se ha alterado o delecionado el gen de la proteína de resistencia a interferón K3L.

Se prefieren virus de la viruela que no son peligrosos para el sujeto pretendido. Por tanto, por ejemplo, para su uso en seres humanos, se prefieren virus de la viruela que están restringidos al rango de hospedador, tales como los virus de la viruela aviar o atenuados de otro modo, tales como cepas atenuadas de vaccinia (incluyendo NYVAC y MVA). Son mucho más preferidas las cepas del virus vaccinia atenuado, aunque las cepas no de vaccinia se emplean habitualmente en sujetos con inmunidad preexistente a viruela.

Se introduce una construcción que contiene al menos un ácido nucleico que codifica uno o más epítomos del antígeno asociado a tumores flanqueados por secuencias de ADN de MVA adyacentes a una deleción de origen natural, por ejemplo, deleción II, dentro del genoma de MVA, en células infectadas con MVA, para permitir la recombinación homóloga.

Una vez se ha introducido la construcción en la célula eucariota y se ha combinado el ADN del epítomo del antígeno asociado a tumores con el ADN vírico, el virus de vaccinia recombinante deseado puede aislarse, preferiblemente con la ayuda de un marcador (Nakano *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1593-1596 [1982], Franke *et al.* Mol. Cell. Biol. 1918-1924 [1985], Chakrabarti *et al.* Mol. Cell. Biol. 3403-3409 [1985], Fathi *et al.* Virology 97-105 [1986]).

La construcción a insertar puede ser lineal o circular. Se prefiere un ADN circular como especialmente un plásmido. La construcción contiene secuencias que flanquean el lado izquierdo y derecho de una deleción de origen natural, por ejemplo, la deleción II, dentro del genoma de MVA (Altenburger, W., Suter, C.P. y Altenburger J. (1989) Arch. Virol. 105, 15-27). La secuencia de ADN foráneo se inserta entre las secuencias que flanquean la deleción de origen natural.

Para la expresión de al menos un ácido nucleico, es necesario que haya secuencias reguladoras, que son necesarias para la transcripción del ácido nucleico, presentes en dirección 5' del ácido nucleico. Dichas secuencias reguladoras son conocidas para los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, las del gen de 11 kDa de vaccinia que se describen en el documento EP-A-198.328 y las del gen de 7,5 kDa (documento EP-A-110.385).

La construcción puede introducirse en las células infectadas por MVA por transfección, por ejemplo, mediante precipitación con fosfato cálcico (Graham *et al.* Virol. 52, 456-467 [1973; Wigler *et al.* Cell 777-785 [1979] mediante electroporación (Neumann *et al.* EMBO J. 1, 841-845 [1982]), por microinyección (Graessmann *et al.* Meth. Enzymology 101, 482-492 (1983)), mediante liposomas (Straubinger *et al.* Methods in Enzymology 101, 512-527 (1983)), mediante esferoblastos (Schaffner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2163-2167 (1980)) o por otros métodos conocidos para los expertos en la materia. Se prefiere la transfección mediante liposomas.

Los vectores recombinantes para su uso en la presente invención pueden tener tropismo por un tipo celular específico en el mamífero. A modo de ejemplo, los vectores recombinantes de la presente invención pueden modificarse para infectar APC profesionales tales como células dendríticas y macrófagos. Se sabe que las células dendríticas son las que orquestan la respuesta inmunitaria satisfactoria especialmente la respuesta mediada por células. Se ha demostrado que el tratamiento *ex vivo* de las células dendríticas con antígeno o vectores víricos que contienen dicho antígeno diana, inducirá respuestas inmunitarias eficaces cuando se infunde en animales o seres humanos singénicos (véase, Nestlé FO, *et al.* Vaccination of melanoma patients with peptide - or tumor lysate - pulsed dendritic cells, Nat Med. Marzo de 1998; 4(3):328-32 y Kim CJ, *et al.* Dendritic cells infected with poxviruses encoding MART-1/Melan A sensitize T lymphocytes *in vitro*. J Immunother. Julio de 1997; 20(4):276-86). Los vectores recombinantes también pueden infectar células tumorales. Como alternativa, los vectores recombinantes son capaces de infectar cualquier célula en el mamífero.

Otros ejemplos de vectores incluyen sistemas de suministro *ex vivo*, que incluyen, aunque sin limitación, métodos de transfección de ADN tales como electroporación, biolística de ADN, transfección mediada por lípidos y transfección mediada por ADN compactado.

El vector puede ser un vector de ADN plasmídico. Como se usa en este documento, "plásmido" se refiere a elementos concretos que se usan para introducir ADN heterólogo en células para la expresión o replicación del mismo. La selección y uso de dichos vehículos pertenece a las habilidades de la técnica.

Adecuadamente, el sistema de vector para la administración del antígeno asociado a tumores es la vacuna TroVax®, una vacuna contra el cáncer en desarrollo clínico para el suministro de 5T4 usando un vector de virus vaccinia atenuado (MVA). TroVax® actualmente se está evaluando en ensayos clínicos en fase II en pacientes con cáncer colorrectal, renal y de próstata en fase final. Los ensayos usando TroVax se describen, por ejemplo, en el documento PCT/GB2005/000026. Además, también se conciben variaciones o modificaciones basadas en TroVax para administrar antígenos asociados a tumores.

#### *Células pulsadas*

La presente invención también proporciona la administración de un antígeno usando células pulsadas con antígeno asociado a tumores o péptidos.

Preferiblemente, las células a pulsarse son capaces de expresar moléculas MHC de clase I o clase II.

Las moléculas MHC de clase I pueden expresarse en casi todos los tipos celulares, pero la expresión de moléculas MHC de clase II está limitada a las llamadas células presentadoras de antígeno (APC) "profesionales"; células B, células dendríticas y macrófagos. Sin embargo, la expresión de MHC de clase II puede inducirse en otros tipos celulares por tratamiento con IFN $\gamma$ .

La expresión de moléculas MHC de clase I o MHC de clase II también puede conseguirse por ingeniería genética (es decir, proporcionar un gen que codifica la molécula MHC relevante a la célula a pulsar). Este enfoque tiene la ventaja de que puede elegirse uno o más haplotipos apropiados de MHC que se unen específicamente al péptido o péptidos.

5 Preferiblemente, la célula a pulsarse es una célula presentadora de antígenos, es decir, una célula que, en una respuesta inmunitaria normal, es capaz de procesar un antígeno y presentarlo en la superficie celular junto con una molécula MHC. Las células presentadoras de antígeno incluyen células B, macrófagos y células dendríticas. En una realización especialmente preferida, la célula es una célula dendrítica.

10 Preferiblemente, la célula es capaz de expresar una molécula MHC que se une a un péptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención en su surco de unión peptídico. Por ejemplo, la célula puede expresar uno de los siguientes elementos de restricción de HLA: B8, Cw7 o A2 (para MHC de clase I).

15 Los protocolos de pulsación con péptidos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Redchenko y Rickinson (1999) *J. Virol.* 334-342; Nestle *et al.* (1998) *Nat. Med.* 4 328-332; Tjandrawan *et al.* (1998) *J. Immunotherapy* 21 149-157). Por ejemplo, en un protocolo convencional para cargar células dendríticas con péptidos, las células se incuban con péptido a 50 µg/ml con β-2 microglobulina a 3 µg/ml durante dos horas en medio sin suero. El péptido no unido después se retira por lavado.

20 La célula pulsada de la invención puede usarse como vacuna, por ejemplo, para estimular una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica contra un antígeno asociado a tumores específico.

25 La presente invención, por lo tanto, también proporciona un método para tratar y/o prevenir una enfermedad, que comprende la etapa de administrar una célula pulsada con péptido a un sujeto que lo necesita en combinación con un agente quimioterapéutico.

#### Ácido nucleico

30 El antígeno para su uso en la composición o medicamento o para su administración en una combinación de acuerdo con la invención se proporciona a través de una molécula de ácido nucleico que codifica dicho antígeno asociado a tumores.

35 Un "ácido nucleico", como se menciona en este documento, puede ser ADN o ARN, de origen natural o sintético o cualquier combinación de los mismos. Los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención se limitan solamente en que cumplen la función de codificar un péptido de antígeno asociado a tumores de tal manera que pueda traducirse por la maquinaria de células de un organismo hospedador. Por tanto, los ácidos nucleicos naturales pueden modificarse, por ejemplo, para aumentar la estabilidad de los mismos. El ADN y/o ARN, pero especialmente el ARN, puede modificarse para mejorar la resistencia a nucleasas de los miembros. Por ejemplo, las modificaciones conocidas para los ribonucleótidos incluyen 2'-O-metilo, 2'-fluoro, 2'-NH<sub>2</sub> y 2'-O-alilo. Los ácidos nucleicos modificados de acuerdo con la invención pueden comprender modificaciones químicas que se han hecho para aumentar la estabilidad *in vivo* del ácido nucleico, potenciar o mediar el suministro del mismo o reducir la tasa de eliminación del organismo. Ejemplos de dichas modificaciones incluyen sustituciones químicas en las posiciones de ribosa y/o fosfato y/o base de una secuencia de ARN dada. Véase, por ejemplo, el documento WO 92/03568; el documento U.S. 5.118.672; Hobbs *et al.*, (1973) *Biochemistry* 12:5138; Guschlbauer *et al.*, (1977) *Nucleic Acids Res.* 4:1933; Schibaharu *et al.*, (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:4403; Pieken *et al.*, (1991) *Science* 253:314.

50 Los ácidos nucleicos que codifican antígenos adecuados o un péptido derivado de los mismos serán conocidos para los expertos en la materia o pueden obtenerse usando métodos que son convencionales para los expertos en la materia. Por ejemplo, un ADN para su uso en la presente invención se puede obtener por síntesis química, usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o escisión directa de un polinucleótido más largo, tal como la secuencia codificante completa del antígeno asociado a tumores o un fragmento de la misma.

55 Los ácidos nucleicos que codifican antígenos adecuados y péptidos o hebras de polipeptido derivadas de los mismos pueden tener codones optimizados. La optimización de codones se ha descrito previamente en el documento WO 99/41397 y en el documento WO01/79518. Diferentes células difieren en su uso de codones particulares. Esta desviación de codones corresponde a una desviación en la abundancia relativa de ARNt particulares en el tipo celular. Alterando los codones en la secuencia de modo que estén adaptados para coincidir con la abundancia relativa de los ARNt correspondientes, es posible aumentar la expresión proteica. De la misma manera, es posible disminuir la expresión eligiendo deliberadamente codones para los que los ARNt correspondientes se sabe que son infrecuentes en el tipo celular particular. Por tanto, hay un grado adicional de control traduccional disponible. Se conocen las tablas de uso de codones en la técnica para muchas células de mamífero, así como para una diversidad de otros organismos.

*Variantes/fragmentos/homólogos/derivados*

La presente invención abarca el uso de secuencias de nucleótidos y aminoácidos que codifican antígenos y variantes, homólogos, derivados y fragmentos de los mismos.

5 El término "variante" se usa para indicar un polipéptido o secuencia de nucleótidos de origen natural que difiere de una secuencia de tipo silvestre.

10 El término "fragmento" indica que un polipéptido o secuencia de nucleótidos comprende una fracción de una secuencia objeto. Preferiblemente, la secuencia comprende al menos un 50 %, más preferiblemente al menos un 65 %, más preferiblemente al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 90 %, mucho más preferiblemente al menos un 90 % de la secuencia objeto. Si el fragmento es un fragmento de un aminoácido entonces preferiblemente los fragmentos son de 6-12 aminoácidos de longitud. Más preferiblemente, los fragmentos son de 8, 9 o 10 aminoácidos de longitud.

15 El término "homólogo" significa una entidad que tiene una cierta homología con las secuencias de aminoácidos objeto y las secuencias de nucleótidos objeto. En esta ocasión, el término "homología" puede equipararse a "identidad".

20 En el presente contexto, se acepta que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos, que puede ser al menos un 75, 85 o 90 % idéntica, preferiblemente al menos un 95 o un 98 % idéntica a la secuencia objeto. Típicamente, los homólogos comprenderán la misma actividad que la secuencia de aminoácidos objeto. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, restos de aminoácido que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

25 En el presente contexto, se acepta que una secuencia homóloga incluye una secuencia de nucleótidos, que puede ser al menos un 75, 85 o 90 % idéntica, preferiblemente al menos un 95 o un 98 % idéntica a la secuencia objeto. Típicamente, los homólogos comprenderán la misma actividad que la secuencia objeto. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, restos de aminoácido que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

35 Los métodos para determinar la identidad de secuencia son conocidos para los expertos en la materia.

Un homólogo adecuado de 5T4 se describe en el documento GB 0615655.8.

*Vacuna/composición farmacéutica*

40 La presente invención usa una vacuna/composición farmacéutica que comprende un antígeno, un epítipo peptídico derivado de un antígeno asociado a tumores, una hebra de polipeptido, una secuencia de ácido nucleico, un sistema de vector y/o una célula como se describe anteriormente para su uso en combinación con un agente o agentes quimioterapéuticos.

45 Para administrar el antígeno o derivados como se describe anteriormente, la vacuna puede prepararse como un inyectable, como solución líquida o suspensión, también puede prepararse una forma sólida adecuada para su disolución o suspensión en, líquido antes de su inyección. La preparación también puede emulsionarse o la proteína puede encapsularse en liposomas. Los ingredientes inmunogénicos activos a menudo se mezclan con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos.

50 Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH y/o adyuvantes que potencian la eficacia de la vacuna. Los ejemplos de adyuvantes que pueden ser eficaces incluyen, aunque sin limitación: hidróxido de aluminio, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, mencionada como nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, mencionada como MTP-PE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa y el esqueleto de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno al 2 %/Tween 80.

60 Los ejemplos adicionales de adyuvantes y otros agentes incluyen hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio y potasio (alumbre), sulfato de berilio, sílice, caolín, carbono, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua, muramil dipéptido, endotoxina bacteriana, lípido X, *Corynebacterium parvum* (*Propionobacterium acnes*), *Bordetella pertussis*, polirribonucleótidos, alginato sódico, lanolina, lisolecitina, vitamina A, saponina, liposomas, levamisol, DEAE-dextrano, copolímeros bloqueados u otros adyuvantes sintéticos. Dichos adyuvantes

65

están disponibles en el mercado en diversas fuentes, por ejemplo, Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.) o adyuvante incompleto o adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Michigan).

5 Típicamente, se usan adyuvantes tales como Amphigen (aceite en agua), Alhydrogel (hidróxido de aluminio) o una mezcla de Amphigen y Alhydrogel. Solamente el hidróxido de aluminio está aprobado para uso en seres humanos.

10 La proporción de inmunógeno y adyuvante puede variarse sobre un amplio intervalo siempre que ambos estén presentes en cantidades eficaces. Por ejemplo, el hidróxido de aluminio puede estar presente en una cantidad de aproximadamente un 0,5 % de la mezcla de vacuna (base de  $Al_2O_3$ ). Convenientemente, las vacunas se formulan para que contengan una concentración final de inmunógeno en el intervalo de 0,2 a 200  $\mu\text{g/ml}$ , preferiblemente de 5 a 50  $\mu\text{g/ml}$ , muchos más preferiblemente de 15  $\mu\text{g/ml}$ .

15 Después de la formulación, la vacuna puede incorporarse en un recipiente estéril que después se precinta y almacena a baja temperatura, por ejemplo, 4 °C o puede secarse por congelación. La liofilización permite el almacenamiento a largo plazo en una forma estabilizada.

20 La vacuna puede administrarse de una manera conveniente tal como por vía oral, intravenosa (cuando es soluble en agua), intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica o por supositorio o por implante (por ejemplo, usando moléculas de liberación lenta).

25 Las vacunas se administran convencionalmente por vía parenteral, por inyección, por ejemplo, de forma subcutánea o intramuscular. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales. Para los supositorios, los aglutinantes y vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dichos supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo de un 0,5 % a un 10 %, preferiblemente de un 1 % a un 2 %. Las formulaciones orales incluyen excipientes empleados normalmente tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones adoptan la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen de un 10 % a un 95 % de ingrediente activo, preferiblemente de un 25 % a un 70 %. Cuando la composición de vacuna se liofiliza, el material liofilizado puede reconstituirse antes de su administración, por ejemplo, como una suspensión. La reconstitución se logra preferiblemente en tampón.

35 Las cápsulas, comprimidos y píldoras para administración oral a un paciente pueden proporcionarse con un recubrimiento entérico que comprende, por ejemplo, Eudragit "S", Eudragit "L", acetato de celulosa, acetato ftalato de celulosa o hidroxipropilmetilcelulosa.

40 Los péptidos y polipéptidos pueden formularse en la vacuna como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos (formadas con los grupos amino libres del péptido) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico o maleico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina y procaína.

45 Los péptidos 5T4 pueden administrarse con moléculas coestimuladoras tales como las implicadas en la interacción entre los pares de receptor-ligando expresados sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno y las células T. Dichas moléculas coestimuladoras pueden administrarse por administración de la molécula proteica o del ácido nucleico correspondiente que codifica la molécula proteica. Las moléculas coestimuladoras adecuadas incluyen CD40, B7-1, B7-2, CD54, miembros de la familia ICAM (por ejemplo, ICAM-1, -2, o -3), CD58, ligandos de SLAM, polipéptidos que se unen al antígeno estable al calor, polipéptidos que se unen a miembros de la familia del receptor de TNF (por ejemplo, 4-1BBL, TRAF-1, TRAF-2, TRAF-3, OX40L, TRAF-5, CD70) y CD154. Los péptidos también pueden administrarse en combinación con quimioquinas o citoquinas estimuladoras incluyendo, por ejemplo, IL2, IL3, IL4, SCF, IL6, IL7, IL12, IL15, IL16, IL18, G-CSF, GM-CSF, IL1-alfa, IL11, MIP-11, LIF, ligando de c-kit, trombopoyetina y ligando de flt3, TNF- $\alpha$  e interferones tales como IFN $\alpha$  o IFN $\gamma$ . Las quimioquinas también pueden usarse en combinación con el antígeno o los péptidos, tales como CCL3 o CCL5 o pueden fusionarse con los péptidos de la invención (por ejemplo, CXCL10 y CCL7). Cuando el antígeno o los péptidos se administran administrando un ácido nucleico que codifica el péptido, la molécula coestimuladora también puede administrarse administrando el ácido nucleico correspondiente que codifica la molécula coestimuladora.

60 Por ejemplo, el tratamiento con anti-CTLA-4, anti-CD25, anti-CD4, la proteína de fusión IL13Ra2-Fc, y combinaciones de las mismas (tal como anti-CTLA-4 y anti-CD25) han demostrado regular positivamente las respuestas inmunitarias antitumorales y serían adecuados para usarse en combinación con los péptidos de la presente invención. El inhibidor de células T reguladoras (Treg) Ontak (conjugado de IL2 y toxina diftérica DAB<sub>389</sub>IL2) también ha demostrado potenciar la capacidad antitumoral mediada por vacuna, por tanto, los inhibidores de Treg también son adecuados para su uso con las vacunas de la presente invención.

65

*Regímenes heterólogos de vacunación*

Los regímenes de administración de vacunas/composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden determinarse por ensayo de eficacia convencional. Son especialmente preferidos, sin embargo, los regímenes que incluyen etapas de sensibilización y refuerzo sucesivas. Se observa que dichos regímenes consiguen una ruptura de la tolerancia inmunitaria y la inducción de respuestas de células T (véase, Schneider *et al.*, 1998 Nat Med 4:397-402), así como la inducción de respuestas de células B y anticuerpos.

Los regímenes de sensibilización-refuerzo pueden ser homólogos (donde la misma composición se administra en dosis posteriores) o heterólogos (donde las composiciones de sensibilización y refuerzo son diferentes). Por ejemplo, la composición de sensibilización puede ser un vector no vírico (tal como un plásmido) que codifica un antígeno asociado a tumores y la composición de refuerzo puede ser un vector vírico (tal como un vector de virus de la viruela) que codifica un antígeno asociado a tumores, donde cualquiera de los dos o ambos "antígenos asociados a tumores" son un epítipo o hebra de poliepitipo de la presente invención.

*Métodos profilácticos/terapéuticos*

Se describe el uso de una combinación de acuerdo con la presente invención en la fabricación de un medicamento para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad.

Se describe un método para tratar y/o prevenir una enfermedad en un sujeto, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una combinación de acuerdo con la presente invención.

Como se usa en este documento, los términos "tratamiento", "tratar" y "terapia" incluyen efectos curativos, efectos paliativos, efectos de alivio, prevención de la progresión, efectos profilácticos y cualquier efecto que mejore la supervivencia de un paciente.

Cuando la vacuna es o comprende un epítipo peptídico de clase I, la respuesta inmunitaria provocada puede implicar la activación de linfocitos T citotóxicos específicos de 5T4. Cuando la vacuna es o comprende un epítipo de clase II la respuesta inmunitaria provocada puede implicar la activación de células T<sub>H1</sub> y/o T<sub>H2</sub>.

De forma ventajosa, la respuesta es una respuesta inmunoterapéutica antitumoral que es eficaz para inhibir, detener o revertir el desarrollo de un tumor en un sujeto.

*Agentes quimioterapéuticos*

Los "agentes quimioterapéuticos" para su uso en la combinación de la presente invención son aquellos agentes que son agentes adecuados para terapias antineoplásicas o antitumorales.

Los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen compuestos convencionales usados en quimioterapia, agentes intercalantes y compuestos que contienen platino, por ejemplo. Los agente adecuados incluyen, aunque sin limitación, ácido retinoico todo-trans, actimida, azacitidina, azatioprina, bleomicina, carboplatino, capecitabina, cisplatino, clorambucilo, ciclofosfamida, citarabina, daunorrubicina, docetaxel, doxilfluridina, doxorubicina, epirubicina, etopósido, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxurea, idarrubicina, irinotecán, lenalidomida, leucovorina, mecloretamina, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, pemetrexed, revlimid, temozolomida, tenipósido, tioguanina, valrubicina, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina.

En una realización, un agente quimioterapéutico para su uso en la combinación del presente agente puede ser, en sí mismo, una combinación de diferentes agentes quimioterapéuticos. Las combinaciones adecuadas incluyen FOLFOX e IFL. FOLFOX es una combinación que incluye 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, y oxaliplatino. El tratamiento IFL incluye irinotecán, 5-FU, y leucovorina.

En una realización, el agente quimioterapéutico es ciclofosfamida. En esta realización, la ciclofosfamida puede administrarse preferiblemente en una forma de baja dosis. Se ha observado que la ciclofosfamida de baja dosis potencia una respuesta antitumoral en un enfoque de inmunoterapia de transferencia celular adoptiva (véase, Dudley *et al.* J. Clin. Oncol. (2005) 23, 2346-2357).

En otra realización, la composición puede comprender adicionalmente un inhibidor de quinasa, para un uso separado, simultáneo o combinado en el tratamiento de tumores. Los inhibidores de quinasa adecuados incluyen aquellos que han demostrado poseer actividad antitumoral, tal como gefitinib (Iressa) y erlotinib (Tarceva) y estos podrían usarse en combinación con los péptidos. Los inhibidores de receptores tirosina quinasa, tales como malato de sunitinib y sorafenib que han demostrado ser eficaces en el tratamiento de carcinoma de células renales también son adecuados para usarse en la composición.

65

*Otras terapias de combinación*

- La invención se refiere adicionalmente al uso de moléculas dirigidas a antígeno tumoral, tales como anticuerpos anti-antígeno tumoral, por ejemplo, scFv anti-5T4. Las moléculas dirigidas a antígeno tumoral también incluyen receptores de células T (TCR), incluyendo los TCR sintéticos descritos en el documento WO 2004/033695 y el documento WO 99/60119. Estos anticuerpos pueden usarse para (i) abordar 5T4 natural o exógeno *in situ* y/o (ii) suministrar moléculas inmunopotenciadoras, tales como B7.1, a 5T4 natural o exógeno *in situ* (Carroll *et al.* (1998) J Natl Cancer Inst 90(24):1881-7). Esto potencia la inmunogenicidad de 5T4 en el sujeto.
- La presente invención también puede usarse con la transferencia adoptiva de linfocitos de infiltración tumoral aislados de pacientes (Dudley *et al.* J. Clin. Oncol. (2005) 23:2346-2357).

*Enfermedades*

- Las enfermedades que pueden tratarse y/o prevenirse de acuerdo con la invención incluyen cualquiera de aquellas en que una respuesta inmunitaria específica de antígeno puede contribuir a esa prevención y/o tratamiento.

En particular, la enfermedad (que se puede prevenir/tratar usando una combinación de acuerdo con la presente invención) es un cáncer. Más particularmente, la enfermedad puede ser un carcinoma de, por ejemplo, mama, pulmón, estómago, páncreas, endometrio, cuello del útero, colorrectal, riñón o próstata, así como melanoma.

Por ejemplo, el documento WO89/07947 describe un cribado inmunohistoquímico de tejidos neoplásicos usando un anticuerpo monoclonal anti-5T4. Por tanto, como el antígeno asociado a tumores es 5T4, la enfermedad es un cáncer que puede demostrar ser positivo a 5T4 por ensayo de diagnóstico (tal como con un anticuerpo anti-5T4), por ejemplo: un carcinoma invasivo de la ampolla de Vater, mama, colon, endometrio, páncreas o estómago; un carcinoma escamoso de la vejiga, cuello del útero, pulmón o esófago; un adenoma tubulovelloso del colon; un tumor muleriano mixto maligno del endometrio; un carcinoma de células claras del riñón; un cáncer pulmonar (no microcítico indiferenciado, carcinoma de gigantocitos, carcinoma broncoalveolar, leiomiomasarcoma metastásico); un cáncer de ovario (un tumor de Brenner, cistadenocarcinoma, teratoma sólido); un cáncer de testículo (seminoma, teratoma quístico maduro); un fibrosarcoma de tejido blando; un teratoma (tumores anaplásicos de células germinales) o un cáncer trofoblástico (coriocarcinoma (por ejemplo, en el útero, el pulmón o el cerebro), tumor del sitio placentario, mola hidatiforme).

Dosificación y administración

*Administración y recuento de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>*

Los antígenos y vacunas de la presente invención se administran a un recuento reducido de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Preferiblemente, la cronología óptima de vacunación coincidiría con el periodo en que el agente que reduce el recuento de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, tal como un agente o agentes quimioterapéuticos u Ontak, ha causado una disminución/reducción máxima de la función de las Treg.

*Determinación del recuento de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>*

El grado de reducción puede determinarse por análisis de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de la sangre del paciente recogida en periodos de 24 horas después de una dosis de quimioterapia, hasta la siguiente dosis de quimioterapia o durante hasta 6 semanas después de la última administración de quimioterapia. Las células Treg son un subconjunto específico de células T CD4<sup>+</sup> que expresa CD25 a niveles mayores que las células CD4 negativas; y, por tanto, los niveles de Treg se evalúan determinando el porcentaje de todas las células T CD4<sup>+</sup> que son CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Por lo tanto, los niveles de células T (Treg) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>hi. Por lo tanto, los niveles de células T (Treg) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>hi respecto a los niveles totales de células T CD4<sup>+</sup> se determinarán antes y después de la administración del agente reductor de Treg.

En el caso de ciclofosfamida, la reducción máxima de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sucedía cuatro días después de la administración de CY (Lutsiak *et al.* 2005 Blood 105:2862-2868).

Los niveles de otros tipos de células T reguladoras, tales como células TH3 que producen TNF-β, células Tr1 que producen IL10 y células T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, pueden determinarse por secreción de citoquinas, tinción de algunos marcadores de superficie celular y la capacidad de suprimir respuestas inmunitarias (Marshall *et al.*, 2004. Blood. 103:1755-1762; Wei *et al.*, 2005. Cancer Res 65: 5020-6; Leong *et al.*, 2006 Immunol. Lett. 15:229-236; para revisiones, véase Levings y Roncarlo, 2005. CTMI 292:303-326; Huehn, Siegmund y Hamann, 2005. CITR 293:89-114; Faria y Weiner, 2005 Immunol. Rev. 206:232-259; Weiner, 2001 Immunol. Rev. 182:207-214; Weiner *et al.*, 2001. Microbes infect. 3:947-954; Roncarlo *et al.*, 2001 Immunol. Rev. 182:68-79).

Ciclos de quimioterapia

Es evidente para los expertos en la materia que las composiciones y usos de la presente invención pueden adaptarse para los agentes quimioterapéuticos específicos y antígenos usados en la invención sin experimentación excesiva. En particular, un agente o agentes quimioterapéuticos usados en la presente invención podrían requerir una administración y pauta de dosificación específicas. Estas pautas de administración y dosificación podrían variar para un diferente agente quimioterapéutico. En líneas generales, un agente o agentes quimioterapéuticos podrían administrarse a cortos intervalos frecuentes (por ejemplo, cada 1 o 2 horas) seguidos por periodos más largos sin administración (por ejemplo, intervalos de 2 semanas). Esta sucesión de administración y ausencia de administración constituye un ciclo de quimioterapia. Un tratamiento de quimioterapia podría consistir en varios ciclos dependiendo del agente usado. El periodo entre ciclos de quimioterapia constituye el periodo de reposo. Un periodo de reposo varía entre diferentes agentes quimioterapéuticos y tratamientos. Se dan ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos y los periodos de reposo recomendados en la siguiente tabla.

Clase de fármaco	Fármaco	Dosificación y vía habitual
Fármacos alquilantes	Mecloretamina (mostaza de nitrógeno) Clorambucilo (Leukeran) Ciclofosfamida (Cytoksan) Melfalán (Alkeran) Ifosfamida (Ifex)	6 mg / m <sup>2</sup> IV 4 - 10 mb / día po 600 mg / m <sup>2</sup> / IV 50 - 200 mg / m <sup>2</sup> po 1 mg / kg po q 4 sem 2-4 g / m <sup>2</sup> / día IV X 3-5 días q 3-4 sem
Antimetabolitos Antagonista de folato	Metotrexato	2,5 - 5,0 mg / día po 25 -50 mg / 1 dosis / sem po 100 - 10,000 mg / m <sup>2</sup> IV (con rescate)
Antagonista de purina Antagonista de pirimidina	6-Mercaptopurina 5-Fluorouracilo  Citarabina Gemcitabina (Gemzar)	100 mg / m <sup>2</sup> / día po 300 - 1000 / m <sup>2</sup> IV o infusión continua 100 mg / m <sup>2</sup> IV infusión continua 1200 g / m <sup>2</sup> / sem IV
Veneno del huso (de plantas) Vincas	Vinblastina (Velban) Vincristina (Oncovin)  Vinorelbina (Navelbine) Paclitaxel (Taxol)  Docetaxel (Taxotere)	0,1 - 0,2 mg / kg IV q 7 - 10 días 1,4 mg / m <sup>2</sup> / sem IV 20 mg / m <sup>2</sup> / sem IV 135 mg - 200 g / ml IV q 3 sem 100 g / m <sup>2</sup> IV q 3 sem
Podofilotoxinas	Etopósido (VePesid)	100 mg / m <sup>2</sup> / día IV durante 3 - 5 días 100 mg / día po
	Irinotecán (Camptosar)  Topotecán (Hycamtin)	durante 14 días / mo 100 - 125 g / m <sup>2</sup> IV sem IV 1,5 g / m <sup>2</sup> IV al día x 5 días q 3 - 4 sem
Antibióticos	Doxorrubicina (Adriamicina)  Bleomicina (Blenoxane) Mitomicina	40 - 75 mg / m <sup>2</sup> rápidamente IV o 30 mg / m / día durante 3 días por IV continua 6 - 15 U / m <sup>2</sup> sc o IV habitualmente 10 a 12 mg / m <sup>2</sup> , lentamente IV
Nitrosoureas	Carmustina (BiCNU) Lomustina (CeeNU)	150 - 200 mg / m <sup>2</sup> IV q 6 sem 100 - 130 mg / m <sup>2</sup> po q 6 sem
Iones orgánicos	Cisplatino (Platinol)  Carboplatino (Paraplatino)	60 - 100 mg / m <sup>2</sup> IV o 20 mg / m <sup>2</sup> IV al día x 5 días 300 g / m <sup>2</sup> o área diana bajo la curva de 5 - 6 IV q 3 sem

Se entiende que un tratamiento, que consiste en varios ciclos y periodos de reposo definidos podría variar también entre diferentes pacientes. Además, dicho tratamiento podría variar para diferentes combinaciones y mezclas de agente quimioterapéutico. Un experto en la materia seleccionará la cantidad adecuada de ciclos y periodos de reposo para cada paciente y agente quimioterapéutico o combinación de agente quimioterapéutico.

Los regímenes de administración de antígeno y agente o agentes quimioterapéuticos de acuerdo con la presente invención se adaptan al agente específico y combinaciones de agentes usadas. Se entiende que un tratamiento completo que emplea las composiciones y usos de la presente invención podría abarcar varios ciclos de quimioterapia diferentes. Se entiende adicionalmente que los patrones de tratamiento podrían repetirse cualquier cantidad de veces según lo necesario. En particular, las composiciones y usos de la presente invención cubren la administración de vacunas antes y/o durante y/o después de la administración de un agente quimioterapéutico, un ciclo quimioterapéutico o un tratamiento quimioterapéutico completo de varios ciclos de acuerdo con la combinación de agente quimioterapéutico/vacuna elegida. Se entiende adicionalmente que las composiciones y usos de acuerdo con la presente invención se usan dentro de un régimen de tratamiento que incluye también otros tratamientos tales como cirugía y/o radioterapia.

Preferiblemente, el antígeno se administraría durante periodos de reposo dentro o después de los ciclos de quimioterapia. La cronología podría optimizarse midiendo la reducción de los niveles de Treg o la función de Treg durante cada tratamiento quimioterapéutico.

5 **Dosificación**

Un experto en la materia puede determinar fácilmente una dosis apropiada de una de las presentes composiciones a administrar a un sujeto sin experimentación excesiva. Típicamente, un médico determinará la dosificación real que deberá ser la más adecuada para un paciente individual y dependerá de una diversidad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y duración de la acción de ese compuesto, la edad, peso corporal, salud general, género, dieta, modo y tiempo de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular y la terapia en curso individual. Las dosificaciones descritas en este documento son ejemplares del caso promedio. Por supuesto, puede haber casos individuales en los que se justifican intervalos de dosificación superiores o inferiores, y están dentro del alcance de esta invención.

Por ejemplo, se establecen dosis adecuadas para la administración de los regímenes terapéuticos FOLFOX e IFL en la sección de ejemplos en este documento. Además, los regímenes adecuados para la administración de estos regímenes en combinación con la administración de un antígeno tumoral se exponen en ese documento.

La invención se describe adicionalmente, con fines ilustrativos solamente, en los siguientes ejemplos en que se hace referencia a las siguientes figuras.

La figura 1 muestra un diagrama del régimen de vacunación y control descrito en la sección de ejemplos.

Figura 2: TV2-FOLFOX: Dimensiones del tumor en todo el curso temporal del ensayo clínico. La figura ilustra la suma de las lesiones tumorales diana para pacientes evaluables en tres puntos temporales de exploración TC (antes de vacunación con TroVax (selección) y en las semanas 14 y X+8).

Figura 3: TV2-IFL: Dimensiones del tumor en todo el curso temporal del ensayo clínico. La figura ilustra la suma de las lesiones tumorales diana en tres puntos temporales: antes de la vacunación con TroVax (selección) y en las semanas X y X+14.

La figura 4a muestra las respuestas de 5T4 en TV2-IFL, la fig. 4b muestra las respuestas 5T4 en TV2-FOLFOX, la fig. 4c muestra las respuestas MVA en TV2-IFL, la fig. 4d muestra las respuestas MVA en TV2-FOLFOX, la fig. 4e muestra las respuestas TT en TV2-IFL y la fig. 4f muestra las respuestas TT en TV2-FOLFOX.

Figura 5: Porcentajes de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (cuadrante a mano derecha) para el paciente TV2-016 en diversos puntos temporales durante el ensayo TV2. Los resultados se muestran como el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup>.

Figura 6: Confirmación del fenotipo Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> por tinción para la expresión intracelular de FoxP3. Se sincronizaron las células T CD4<sup>+</sup> (A) y se averiguó su expresión de CD25 (B). Se seleccionaron las que expresan CD25<sup>hi</sup> estableciendo un cuadrante estricto (B; cuadrante derecho superior). Las células en este cuadrante a mano derecha se sincronizaron y eran las que más expresaban FoxP3 (C; cuadrante a mano derecha superior).

Figura 7. El porcentaje medio de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dentro de la población de células T CD4<sup>+</sup> para pacientes de TV2-IFK (negro n=7) y de FOLFOX (gris n=6).

**Ejemplos**

50 **Sumario**

Estos ejemplos resumen la cinética de las respuestas inmunitarias detectadas en ensayos tanto TV2 IFL como FOLFOX e investigan las relaciones entre las respuestas clínicas e inmunológicas.

55 **Respuestas inmunitarias, y cinética**

Todos los pacientes evaluables en los ensayos clínicos tanto TV2 IFL (n=12) como FOLFOX (n=11) generaron respuestas inmunitarias celulares específicas de 5T4 y/o humorales como se detalla a continuación:

Ensayo (n.º de pacientes evaluables)	N.º de pacientes que muestran respuestas inmunitarias específicas de 5T4			
	ELISA	Proliferación	ELISPOT	Cualquier ensayo
IFL (n = 12)	10 (83 %)	10 (83 %)	11 (92 %)	12 (100 %)
FOLFOX (n = 11)	10 (91 %)	10 (91 %)	10 (91 %)	11 (100 %)

- En ambos ensayos, los títulos medios de anticuerpo aumentaron después de cada una de las 6 vacunaciones (en comparación con el punto temporal de muestreo previo).

- En el ensayo FOLFOX, los títulos medios de anticuerpo durante quimioterapia (semanas 4-19) fueron comparables con los posteriores a quimioterapia (semanas X+2 - X+10). Sin embargo, en el ensayo IFL, los títulos medios de anticuerpo durante quimioterapia fueron significativamente inferiores que los posteriores a quimioterapia, lo que sugiere que el régimen de quimioterapia IFL puede afectar a las respuestas de anticuerpo.
- En ambos ensayos, el mayor título medio de anticuerpo se produjo en la semana X+8, es decir, después de la 6.<sup>a</sup> inmunización.
- Las respuestas medias proliferativas de 5T4 mostraron poco o ningún aumento después de cualquiera de las 6 vacunaciones, aunque los pacientes individuales mostraron aumentos.
- En ambos ensayos, las repuestas proliferativas fueron mayores después de completarse la quimioterapia en comparación con durante la quimioterapia.
- En ambos ensayos, las respuestas proliferativas específicas de 5T4 mostraron un aumento significativo entre las semanas 19 y X+2; este no fue el caso para las respuestas MVA o TT, lo que sugiere que ambos regímenes de quimioterapia afectan a la detección de las respuestas proliferativas contra un autoantígeno, pero no contra antígenos foráneos *ex vivo*.
- En general, los pacientes incluidos en los ensayos TV2 generaron respuestas inmunitarias celulares específicas de 5T4 y humorales de mayor magnitud y longevidad que las observadas en un ensayo previo (TV1) en que los pacientes reclutados en un ensayo de monoterapia con TroVax® se habían tratado previamente con quimioterapia en algún momento antes de que se administrara TroVax.

#### 20 Respuestas clínicas

Se investigaron las posibles tendencias relacionadas con las respuestas inmunitarias específicas de 5T4 con la respuesta clínica clasificando la magnitud de la respuesta inmunitaria de cada paciente junto con su respuesta tumoral presentada.

- TV2-FOLFOX: Los datos presentados indican que los altos títulos de anticuerpos específicos de 5T4 y las respuestas ELISPOT (pero no proliferativas) están asociadas más frecuentemente con respuestas completas y parciales que con enfermedad estable o progresiva.

Esta observación es constante cuando las respuestas se analizan sobre el curso temporal de control completo, durante y después de la quimioterapia. Si se integran los datos tanto de ELISA como de ELISPOT y la magnitud de las respuestas combinadas se tabulan junto con las respuestas clínicas, los valores mayores se agrupan más frecuentemente con respuestas tumorales positivas (CR + PR). Los pacientes clasificados como SD o PD a 14 sem o X+8 sem tienen los valores combinados más bajos. La combinación de los datos de ELISA y ELISPOT, producen tendencias más fuertes que cada ensayo analizado individualmente.

- TV2-IFL: Se producían fuertes respuestas inmunitarias en el ensayo IFL principalmente después de completarse la quimioterapia. Se evaluará el beneficio clínico controlando la supervivencia y haciendo comparaciones entre las respuestas inmunológicas y se investigará la supervivencia global una vez los datos estén disponibles.

40 Análisis de datos: Análisis de cinética de respuesta inmunitaria

- a. En cada ensayo, se han analizado solamente los datos de pacientes evaluables (según protocolo).
- b. Todos los datos se presentan de una manera similar. Se tabulan las respuestas específicas de antígeno para cada paciente evaluable en cada punto temporal analizado. Además, las respuestas inmunitarias medias específicas de antígeno se tabulan sobre una base de población para cada ensayo en:

1. Cada punto temporal
2. Antes de la vacunación (semanas -2 y 0)
3. Durante la quimioterapia (semanas 4-19)
4. Después de quimioterapia (semanas X+2 a X+14 (IFL) o X+10 (FOLFOX))

Debe indicarse que se produjeron 2 inyecciones de TroVax durante la quimioterapia y 2 después de completarse la quimioterapia. Además, el periodo de tiempo de 15 semanas durante la quimioterapia incluye 6 puntos temporales de recogida de muestras de sangre. Después de completarse la quimioterapia, los pacientes IFL se controlaron durante 14 semanas que también incluye 6 puntos temporales de muestreo. Los pacientes FOLFOX se controlan durante 10 semanas después de completarse la quimioterapia y esto comprende 5 puntos temporales de muestreo.

- c. Se tabula el aumento factorial en la respuesta inmunitaria después de cada vacunación. Además, también se indica el aumento factorial entre las semanas 19 y X+2 (es decir, el final de la quimioterapia y después de completarse la quimioterapia).

60 Análisis de datos: Análisis de correlaciones entre la respuesta inmunitaria y la respuesta tumoral

65 Se han determinado las respuestas inmunitarias medias específicas de 5T4 para todos los pacientes evaluables para cada uno de los 3 ensayos centrales de inmunocontrol (ELISA, proliferación y ELISPOT). Las respuestas se

han clasificado en orden ascendente y se han comparado frente a las respuestas tumorales respectivas (algunas exploraciones TC son excepcionales). Las respuestas inmunitarias medias específicas de 5T4 se determinaron durante 3 periodos de tiempo: (i) sobre todos los puntos temporales después de TroVax, es decir, desde la semana 2 hasta la semana X+10 para pacientes FOLFOX y desde la semana 2 hasta X+14 para paciente IFL, (ii) sobre todos los puntos temporales después de TroVax que se producen durante el periodo de quimioterapia (semanas 4-19) y (iii) sobre todos los puntos temporales después de TroVax que se producen después de completarse la quimioterapia (semanas X+2 a X+10 para FOLFOX o X+14 para IFL).

Además, se integraron las respuestas de ELISPOT específica de 5T4, de proliferación y de anticuerpos y se compararon frente a las respuestas clínicas presentadas.

Para conseguir esto, cada paciente evaluable simplemente se valoró respecto a la magnitud de la mayor respuesta inmunitaria detectada. Por ejemplo, al paciente con el mayor título medio de anticuerpo contra 5T4 en todo el periodo de control seleccionado (es decir, todos los puntos temporales después de TroVax, durante la quimioterapia, después de la quimioterapia) se le dio un valor del 100 %, todos los demás pacientes se valoraron con un porcentaje de la mayor respuesta. Para integrar los ensayos, simplemente se sumaron los valores por ensayo para cada paciente. Dicho análisis no tiene en consideración la magnitud de las respuestas inmunitarias de los pacientes, sino que da un "peso" igual a todos los ensayos.

#### Métodos y protocolos

##### TroVax + FOLFOX

Se realizó un ensayo clínico en fase II para un estudio abierto de TroVax proporcionado junto con 5-fluorouracilo/leucovorina/oxaliplatino (FOLFOX) para determinar la seguridad y la inmunogenicidad antes, durante y después de la quimioterapia.

##### a) Diseño del estudio

Esta es una administración al descubierto de hasta seis inyecciones de TroVax junto con una pauta convencional de 5-FU/oxaliplatino/leucovorina en pacientes con cáncer colorrectal avanzado. Se incluyó un total de 15 pacientes para obtener 10 pacientes evaluables. El régimen de dosificación es dos inyecciones, proporcionadas antes de la quimioterapia, dos durante la quimioterapia (asumiendo que dure hasta 6 meses) y dos inyecciones después de que la quimioterapia hubiera terminado. Los pacientes podían estar en el estudio durante un máximo de 40 semanas para evaluar la tolerabilidad del régimen de tratamiento, la inducción de la inmunidad humoral y celular contra el antígeno de superficie celular 5T4 y la respuesta inmunitaria contra el vector.

##### b) Tratamiento

##### TroVax

Los pacientes se inmunizan con una única inyección intramuscular de TroVax 10x en las semanas 0, 2, 11, 17 y 2 y 6 semanas después de la última dosis de quimioterapia.

##### Oxaliplatino/5-FU/leucovorina

Los pacientes comienzan la quimioterapia en la semana 4. La quimioterapia se proporciona a intervalos de 2 semanas durante 12 semanas (6 ciclos, semanas 4, 6, 8, 10, 12, 14). Se hace una evaluación de la respuesta en la semana después de completarse el ciclo 6 (semana 14; exploración TC/RM). Se administran ciclos adicionales de quimioterapia (hasta un máximo de 6 ciclos, semanas 16, 18, 20, 22, 24, 26) si se considera de interés para el paciente por el investigador.

##### c) Tratamientos simultáneos

La quimioterapia con 5-FU/leucovorina se proporciona por el régimen de Gramont modificado (MdG) junto con oxaliplatino (OxMdG).

El régimen convencional dado en el Leeds Teaching Hospitals NHS Trust es el siguiente:

1. Infusión de dos horas de leucovorina de 175 mg (o 350 mg de ácido folínico racémico) en 250 ml de dextrosa al 5 %.
2. Infusión de dos horas de oxaliplatino a 85 mg/m<sup>2</sup> en 250 ml de dextrosa al 5 %.
3. Inyección en embolada de 5 minutos de 5-fluorouracilo a 400 mg/m<sup>2</sup>.
4. Infusión de 46 horas de 5-fluorouracilo a 2400 mg/m<sup>2</sup> proporcionada a través de una bomba Baxter LV5.

Se proporcionan antimiméticos, incluyendo antagonistas intravenosos de 5HT-3 y dexametasona, antes de cada ciclo de quimioterapia. Se proporciona a los pacientes terapia antiemética oral, que consiste en un curso de 3 días

de dosis en reducción de dexametasona y domperidona, según lo necesario. Toda la terapia antiemética necesaria se registra en el CRF.

TroVax + IFL

5 a) Plan de tratamiento y métodos

10 A los pacientes que cumplen los criterios de entrada se les invita a entrar en el estudio. Después de dar un consentimiento completamente informado, a los pacientes se les somete a un examen físico para documentar la salud general para continuar con el ensayo. Si es posible, se obtiene tejido para la determinación del estado de 5T4. En ese momento, se documentan las metástasis y/o las recidivas locales usando exploraciones TC relevantes y se comprueba el nivel del antígeno superficial CEA (5 ml) en la sangre. Se extrae sangre para examen hematológico y bioquímica clínica (10 ml), exploración de hormonas de la pituitaria (ACTH, TSH, LH, FSH; 10 ml), ensayo de autoanticuerpos (10 ml) e inmunológico (anticuerpos contra 5T4 y vector, respuestas celulares contra 5T4 y otros antígenos; 100 ml). Esta exploración no debe producirse más de dos semanas antes de que comience la pauta de inmunización.

20 En la semana 0 y la semana 2, los pacientes se inmunizan con una única inyección intramuscular de TroVax. Antes de ambas inyecciones, se extrae de nuevo sangre para la medición de CEA y el ensayo inmunológico (100 ml).

25 Los pacientes comienzan la quimioterapia en la semana 4. La quimioterapia continua a intervalos de dos semanas durante hasta 12 meses si los pacientes responden, aunque seis meses es la duración común del tratamiento. Se obtiene sangre antes de la dosis de quimioterapia en las semanas 4 y 6 para el ensayo de CEA e inmunológico (100 ml). Se obtiene sangre para el análisis hematológico (5 ml) antes de cada dosis de quimioterapia.

Se proporcionan inyecciones adicionales de TroVax en las semanas 11 y 17 (es decir, en el intervalo entre las dosis de quimioterapia). Se extrae sangre para el ensayo de CEA e inmunológico (100 ml) antes de cada una de estas inyecciones y dos semanas después (semanas 13 y 19).

30 La quimioterapia entonces continúa durante tanto tiempo como el médico del paciente decida que es apropiado. Al final de la quimioterapia, se obtiene una exploración TC que vuelve a estadificar la enfermedad. Dos semanas después de que finalice la quimioterapia (semanas X+2), se proporciona de nuevo TroVax por una única inyección intramuscular. Antes de la inyección y 2 semanas después de la misma (semanas X+4), se obtiene sangre para el ensayo de CEA e inmunológico (100 ml). Se proporciona una inyección final cuatro semanas después de la inyección previa (semanas X+6). Antes de esta inyección y dos (semanas X+8) y cuatro semanas (semanas X+10) después de la misma, se obtiene sangre para el ensayo de CEA e inmunológico (100 ml). Se realiza una visita de seguimiento final cuatro semanas después (semanas X+14).

40 b) Tratamientos simultáneos

45 Régimen de Gramont: Los pacientes reciben leucovorina (200 mg/m<sup>2</sup>/día) como una infusión intravenosa de dos horas, seguida por 5-FU con un bolo intravenoso a 400 mg/m<sup>2</sup>/día y después como una infusión continua de 22 horas a 600 mg/m<sup>2</sup>/día, repetida en 2 días consecutivos. Se administra irinotecán (180 mg/m<sup>2</sup>; infusión intravenosa de 30 minutos) en el día 1, simultáneamente con la administración de leucovorina. Este ciclo se repite cada 2 semanas.

De Gramont modificado: Los pacientes reciben leucovorina y 5-FU en bolo en el día 1, seguido por 5-FU en infusión durante 46 horas.

50 A los pacientes incluidos en este ensayo no se les puede proporcionar ningún otro tratamiento antineoplásico mientras dure el ensayo. Una necesidad de dicho tratamiento exige la eliminación del paciente del ensayo.

55 Se prescriben medicaciones pretendidas para aliviar los síntomas a discreción del investigador y se registran en el cuaderno de recogida de datos (CRF). Los pacientes también deben mantener un registro de cualquier medicina sin receta consumida y estas deben anotarse en el CRF.

Inmunocontrol

60 Los ensayos usados para emprender el inmunocontrol pueden dividirse en los que miden respuestas celulares o humorales y se enumeran a continuación:

Medición de respuestas celulares

## 1. Ensayo de proliferación

5 Este ensayo se realiza usando PBMC procesadas de sangre fresca y establecidas en el día de la toma de muestras de sangre.

El ensayo de proliferación se basa en la capacidad de las células inmunitarias (principalmente células T CD4<sup>+</sup>) de responder a proteínas específicas. Una de las maneras en que una célula T responderá después de la interacción con su proteína diana, es por rápida división celular. La respuesta a dichos estímulos puede medirse simplemente contando la cantidad de células presentes en un cultivo antes y después de la adición de un agente estimulante. Sin embargo, esto puede ser laborioso y difícil ya que las células respondedoras pueden constituir solamente una pequeña proporción de la población de células totales. En la práctica, por lo tanto, cualquier división celular potenciada se mide por la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en ADN celular, un proceso que está muy relacionado con cambios subyacentes en la cantidad de células. Las respuestas proliferativas inducidas por una proteína de ensayo pueden compararse con las inducidas por el medio en solitario (sin control de estimulación). Los datos se transforman para producir un índice de estimulación (S.I.) que se define como: "CPM medias de PBMC incubadas con antígeno de ensayo dividido por las CPM medias de PBMC incubadas con medio en solitario". Esta medida relativa de actividad celular se utiliza ampliamente para posibilitar las comparaciones entre muestras tomadas durante estudios longitudinales (por ejemplo, pacientes incluidos en ensayos clínicos) y para manipular las diferencias en la proliferación de fondo con el medio en solitario.

La preparación de plasma y PBMC a partir de sangre completa y la medición de las respuestas proliferativas específicas de antígeno en muestras clínicas, fue de acuerdo con técnicas convencionales usando un recolector de células y TopCount. Los métodos se describen, por ejemplo, en Braybrooke JP, Slade A, Deplanque G, *et al.*: Phase I study of MetXia-P450 gene therapy and oral cyclophosphamide for patients with advanced breast cancer or melanoma. Clin Cancer Res 11:1512-1520, 2005 y Harrop R, Ryan MG, Golding H, *et al.*: Monitoring of human immunological responses to vaccinia virus. Methods Mol Biol 269:243-266, 2004.

## 30 2. ELISPOT

El ensayo de inmunotransferencia ligado a enzimas (ELISPOT) se describió hace más de 13 años para la detección de células inmunitarias específicas a nivel de célula individual. El ensayo ELISPOT se usa para una amplia gama de aplicaciones incluyendo el control de las respuestas celulares en pacientes con cáncer que experimentan tratamiento inmunoterapéutico. El ensayo ELISPOT de IFN $\gamma$  muestra un alto nivel de sensibilidad que permite la detección de <10 células respondedoras por millón de PBMC. Con este ensayo es posible detectar células T de memoria que responden funcionalmente a un estímulo antigénico a través de la secreción de la citoquina IFN $\gamma$ . Además, el ensayo ELISPOT de IFN $\gamma$  no requiere el uso de células frescas o sustancias radiactivas, haciendo que sea una técnica más simple y más transferible que otros ensayos tales como el ensayo de liberación de cromo que se ha usado tradicionalmente en ensayos de vacuna para medir las respuestas de células T.

Una ventaja importante del ELISPOT de IFN $\gamma$  es que es una medición directa de una respuesta inmunitaria mediada por células TH1. Por tanto, es útil para controlar la eficacia de una vacuna para inducir inmunidad mediada por células. Pueden ensayarse PBMC recién recogidas o congeladas para la evaluación en el ELISPOT de IFN $\gamma$ . Esta es una ventaja distintiva en el análisis de muestras tomadas de pacientes en múltiples puntos temporales durante todo el programa del ensayo clínico. El uso de PBMC congeladas posibilita formar lotes de las muestras y, por tanto, reduce la variabilidad global del ensayo. Además, la disponibilidad de muestras de ensayo congeladas significa que pueden repetirse los ensayos.

50 Las PBMC se siembran en placas en pocillos recubiertos y se incuban durante una noche a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % con el antígeno apropiado. Después de aproximadamente 6 horas de cocultivo, las células de memoria específicas para el antígeno empiezan a secretar IFN $\gamma$  que se captura, a su vez, por el antígeno unido a membrana. Por tanto, la unión de IFN $\gamma$  sucede en el entorno inmediato que rodea la célula que secreta la citoquina. Después de aproximadamente 20 horas, las células se retiran por lavado. Posteriormente, el ensayo utiliza dos anticuerpos específicos de citoquina de alta afinidad dirigidos contra diferentes epítopos sobre la misma molécula de citoquina. Se generan manchas con una reacción colorimétrica en que se escinde el sustrato soluble, dejando un precipitado insoluble en el sitio de la reacción. La mancha resultante representa una huella de la célula productora de citoquina original. La cantidad de manchas es una medición directa de la frecuencia de células T productoras de citoquina y la cantidad de manchas aumenta de forma proporcional con la potencia de la respuesta inmunitaria. Las células T CD8<sup>+</sup>, las células T CD4<sup>+</sup> auxiliares y las células NK activadas secretan esta citoquina. La comparación de la frecuencia de células T específicas de antígeno antes, durante y después de un ciclo de inmunización debe reflejar la inmunogenicidad relativa de la vacuna que se está evaluando.

65 La preparación de plasma y PBMC a partir de sangre completa y la medición de las respuestas inmunitarias celulares contra vectores en muestras de ensayo clínico se realizaron por ELISPOT usando un lector de placa ELISPOT automatizado siguiendo protocolos convencionales como se describe, por ejemplo, en Braybrooke JP,

Slade A, Deplanque G, *et al.*: Phase I study of MetXia-P450 gene therapy and oral cyclophosphamide for patients with advanced breast cancer or melanoma. Clin Cancer Res 11:1512-1520, 2005. Harrop R, Ryan MG, Golding H, *et al.*: Monitoring of human immunological responses to vaccinia virus. Methods Mol Biol 269:243-266, 2004.

5 Medición de repuestas humorales (ELISA)

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) se basa en la capacidad de los anticuerpos de unirse a su proteína diana de una manera altamente específica. El análisis de repuestas de anticuerpos específicos de antígeno por ELISA es una técnica ampliamente utilizada y bien establecida. El ensayo puede usarse para proporcionar una medida relativa de las concentraciones de anticuerpos específicos de antígeno en suero (u otros fluidos). Una de las muchas aplicaciones de la técnica es controlar los niveles de anticuerpos después de una vacunación para determinar si el tratamiento aumenta la concentración del anticuerpo de interés.

Para medir la respuesta de anticuerpos específicos de antígeno, la proteína diana se une a la superficie de una placa ELISA de 96 pocillos. Después de una etapa de bloqueo (para minimizar la unión no específica de los anticuerpos directamente al plástico), se añade plasma a la placa y se incuba a temperatura ambiente. Cada pocillo entonces se lava para minimizar adicionalmente la unión no específica de los anticuerpos. Se añade un anticuerpo secundario, específico para la especie del suero de ensayo (por ejemplo, antihumano), a cada pocillo. El anticuerpo secundario se conjuga a una enzima (por ejemplo, peroxidasa) que, tras la incubación con un sustrato cromogénico (por ejemplo, OPD) cataliza su conversión en un producto soluble coloreado que puede cuantificarse usando un espectrofotómetro. Generalmente, cuanto mayor sea el cambio de color mayor será la concentración del anticuerpo presente en el suero de ensayo.

La preparación de plasma y PBMC a partir de sangre completa y la medición de los títulos de anticuerpos específicos de antígeno, se realizó por ELISA siguiendo técnicas convencionales y usando un lector de placa Dynex MRX para ensayos inmunológicos junto con un lavador de placas Dynex de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se describen métodos adecuados, por ejemplo, en Braybrooke JP, Slade A, Deplanque G, *et al.*: Phase I study of MetXia-P450 gene therapy and oral cyclophosphamide for patients with advanced breast cancer or melanoma. Clin Cancer Res 11:1512-1520, 2005. Harrop R, Ryan MG, Golding H, *et al.*: Monitoring of human immunological responses to vaccinia virus. Methods Mol Biol 269:243-266, 2004.

30 Controles de ensayo

Para la medición de las respuestas de anticuerpos por ELISA, se usa plasma humano combinado recuperado de 5 donantes sanos como control negativo. Como control positivo, se usa el plasma recuperado de pacientes incluidos en ensayos clínicos previos (paciente TV1-102 (10 sem) o paciente BC2-102 de ensayos clínicos TV1 o BC2 respectivamente). Se incluyen plasmas tanto de control negativo como de control positivo en todas las placas de ensayo y se aplican criterios de aceptación "apto/no apto" a cada placa.

40 Criterios de aceptación/métodos estadísticos a usar.

Los criterios de aceptación de ensayo y la manipulación de datos son los siguientes. Una respuesta inmunitaria positiva debido a vacunación se define por separado para cada ensayo como se detalla a continuación:

45 ELISA

El título de anticuerpos se define como la mayor dilución de plasma en que la densidad óptica media (D.O.) del plasma de ensayo es  $\geq 2$  veces la D.O. media del control negativo (suero humano normal; NHS) a la misma dilución.

Se informará una respuesta de anticuerpos específicos de 5T4 positiva inducida por vacunación si:

- 50 a. El título de anticuerpos en comparación con NHS es  $\geq 10$  y
- b. El título de anticuerpos después de la inyección es  $\geq 2$  veces el título de anticuerpos determinado en ambos puntos temporales previos a la inyección.

55 Ensayo de proliferación

Los resultados de los ensayos de proliferación se presentarán como un índice de estimulación (S.I.) que se define como:

$$60 \quad \text{S.I.} = \frac{\text{Incorporación de } ^3\text{H-timidina por PBMC cultivadas con antígeno de ensayo}}{\text{Incorporación de } ^3\text{H-timidina por PBMC cultivadas con medio en solitario}}$$

Se informará una respuesta proliferativa 5T4 positiva inducida por vacunación si:

- 65 a. El índice de estimulación (S.I.) para el antígeno 5T4 (proteína o péptido) es  $\geq 2$  y
- b. El C.V. de réplicas que contiene el antígeno 5T4 es  $< 100$  % y

c. El S.I. inducido por el antígeno 5T4 después de la inmunización es  $\geq 2$  veces mayor que el S.I. mayor inducido por el antígeno en cualquiera de los puntos temporales previos a la inyección.

ELISPOT

- 5 Se informará una respuesta ELISPOT de 5T4 positiva inducida por vacunación si:
- a. La media de unidades formadoras de manchas (SFU)/pocillo en respuesta a un antígeno 5T4 (proteína o péptido) es  $\geq 3$  veces la media de SFU/pocillo en pocillos que contiene medio en solitario y
  - 10 b. La media de SFU por pocillo en respuesta a un antígeno 5T4 es  $\geq 10$  y
  - c. La frecuencia de precursores específicos de antígeno 5T4 (cantidad de células específicas de antígeno por  $10^6$  PBMC totales), después de la inmunización es  $\geq 2$  veces la frecuencia de precursor en cualquiera de los puntos temporales previos a la inyección.

15 Resultados

1. TV2-FOLFOX

20 1.1 Ensayo clínico y datos de los pacientes

Se reclutaron diecisiete pacientes en el ensayo TV2-FOLFOX de los cuales 11 llegaron a ser evaluables para evaluación de las repuestas inmunológicas (Tabla 1)

25 Tabla 1: Datos clínicos. Los 17 pacientes ITT (intención de tratar) se incluyen en la tabla. Los pacientes evaluables (n=11) se indican por sombreado (datos de supervivencia actuales hasta la fecha). Clave: WD = Retirada del paciente, por lo tanto, sin resultado disponible; N/A = Medición tomada pero no actualmente disponible.

ID de Paciente	Vivo/Muerto	Respuesta tumoral		Suma de lesiones diana			Supervivencia (semanas desde la semana 0)
		14 sem	X+8 sem	Selección	14 sem	X+8 sem	
101	Vivo	PR	PR	26	Demasiado pequeña	8	91
102	Muerto	CR	CR	51	0	0	58
103	Vivo	PR	PR	243	153	137	78
104	Vivo	SD	PD	50	44	20	70
105	Muerto	PR	SD	80	38		53
106	Vivo	NE	NE	69	NE	NE	67
107	Vivo	PR	PD	25	16		63
108	Vivo	CR	CR	101	N/A		61
109	Muerto	WD	0	WD	WD	WD	5
110	Vivo	WD	0	WD	WD	WD	60
111	Muerto	WD	NE	WD	WD	WD	9
112	Muerto	NE	NE	ND	150	N/A	41
113	Vivo	PD	PD	86	42		54
114	Vivo	¿¿CR??	0	51	0		52
115	Muerto	NE	0	122	N/A		37
116	Vivo	PR	0	43	24		50
117	Vivo	SD	0	154	135		50

30 La fig. 2 muestra TV2-FOLFOX: Dimensiones del tumor durante todo el curso de tiempo del ensayo clínico. La figura ilustra la suma de las lesiones tumorales diana para los pacientes evaluables en 3 puntos temporales de exploración TC (antes de la vacunación con TroVax (selección) y a las semanas 14 y X+8).

De los 11 pacientes evaluables, todos mostraron una reducción en la carga tumoral en la semana 14. Las exploraciones TC están solamente disponibles para 4 pacientes en la semana X+8, todos los cuales mostraron disminuciones adicionales en la carga tumoral en comparación con la semana 14.

35 1.2 Respuestas inmunológicas

1.2.1 Respuestas de anticuerpos

40 Se ilustran en la tabla 2 los títulos de anticuerpos específicos de 5T4 para cada paciente evaluable a través de todo el curso temporal de control.

Tabla 2: Respuestas de anticuerpos específicos de 5T4. Los resultados se expresan como un título de anticuerpos específicos de 5T4 (la mayor dilución de suero a la que una muestra de ensayo tiene una D.O. media (490 nm)  $\geq 2$  veces la de una muestra de control negativo (suero humano normal; NHS)) en cada punto temporal de muestreo. Los resultados tabulados en negrita que tienen  $\geq 10$  representan respuestas de anticuerpos positivas. Los títulos medios se presentan para todos los pacientes en cada punto temporal y también en múltiples puntos temporales previos a la vacunación, durante la quimioterapia y después de la quimioterapia. Además, el aumento factorial en el título medio de anticuerpos en comparación con el punto temporal previo se muestra después de cada vacunación.

Tabla 2

Paciente	Título de anticuerpos específicos de 5T4 en puntos temporales (semanas) posterior a la inmunización primaria													
	-2	0	2	4	6	11	13	17	19	X+2	X+4	X+6	X+8	X+10
101	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
102	<10	<10	10	1280	80	40	40	20	40	20	80	80	80	80
103	<10	<10	<10	80	20	<10	<10	<10	20	<10	20	20	320	320
104	<10	<10	<10	<10	<10	<10	10	<10	10	<10	<10	<10	40	20
105	<10	<10	<10	40	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	160	80
107	<10	<10	<10	160	1280	160	160	80	320	<10	160	160	1280	160
108	<10	<10	<10	40	40	<10	1280	320	320	20	640	160	640	1280
113	<10	<10	<10	160	<10	<10	20	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
114	<10	<10	20	320	160	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	10
116	<10	<10	10	20	20	<10	10	<10	80	<10	80	40	80	40
117	<10	<10	<10	10	10	<10	10	<10	40	<10	20	<10	160	80
Título medio	<10	<10	3,6	207	147,3	18,2	139,1	38,2	75,5	3,6	90,9	42	250,9	188,2
Factor $\uparrow$				52			7,7		2	0,05	23		3,7	
Título medio	<10		3,6	102,6						115,1				

Sobre el curso completo de tiempo de inmunización posterior a TroVax, el título medio de anticuerpos específicos de 5T4 fue 100. La mayoría de los pacientes se seroconvirtieron en la semana 4 (es decir, después de 2 vacunaciones con TroVax). Los títulos medios de anticuerpos en el ensayo FOLFOX eran altos durante la quimioterapia (título medio de 103), disminuyeron después de completarse la quimioterapia (entre las semanas 19 y X+2) y aumentaron moderadamente después de completarse la quimioterapia (título medio de 115). Se observaron aumentos en el título medio de anticuerpos después de cada una de las 6 vacunaciones.

### 1.2.2 Respuestas proliferativas

Las tablas 3a-b detallan las respuestas proliferativas específicas de antígeno para cada paciente evaluable a través de todo el curso temporal de control. Las respuestas a 5T4 (3a) y MVA (3b) se han analizado. 5T4 representa el antígeno clave contra el que se espera inducir una potente y duradera respuesta inmunitaria. Como vector usado para suministrar 5T4, MVA representa un "control interno" muy útil sobre el que pueden "comparar" las respuestas. Se espera que los pacientes generen fuertes respuestas inmunitarias contra MVA (un patógeno complejo y foráneo) y dichas respuestas pueden compararse, tanto en términos de su magnitud como de cinética, con las inducidas contra 5T4.

Tablas 3a-b: Resumen de las respuestas proliferativas de PBMC recuperadas de pacientes después de reestimulación *in vitro* con 5T4 (a) y MVA (b). Los resultados se expresan como un índice de estimulación (proliferación inducida por medio en solitario  $\div$  por la proliferación inducida por antígeno de ensayo). Un índice de estimulación  $\geq 2$  (indicado por texto en negrita) se considera una respuesta positiva en ese punto temporal. Las respuestas proliferativas que son positivas (S.I.  $\geq 2$ ) y al menos 2 veces mayores que las respuestas previas a la inyección (semana -2 o 0) se indican en negrita.

Tabla 3a: TV2-FOLFOX: Respuestas proliferativas a 5T4

Paciente	Puntos temporales de muestreo (semanas)													
	-2	0	2	4	6	11	13	17	19	X+2	X+4	X+6	X+8	X+10
101	23,4	9,4	12	3,5	17	29,1	2	1,7	1,9	4,4	1,9	0,8	2,7	1,1
102	10,4	2,9	0,3	2,1	4,4	11	20,7	5,2	0,72	2,45	6,05	1,99	6,97	6,21
103	4,7	2,1	2,5	6,3	6,2	1,8	0,6	2,7	2,05	3,31	7,25	4,86	2,15	2,57
104	1,6	0,6	0,6	0,4	1	1,16	0,64	1,13	0,41	7,11	2,90	1,10	16,10	0,24
105	2,3	0,9	1,6	3,4	1,2	0,9	1,2	2,41	1,33	8,67	9,75	13,53	17,34	0,60
107	2,6	1	1,3	1,5	0,96	0,53	7,27	4,49	1,78	7,60	13,63	24,55	16,47	26,93
108	0,7	3,8	0,3	0,90	5,02	0,41	2,57	5,00	7,85	1,46	6,35	1,39	11,93	5,39
113	0,57	2,11	1,25	0,75	9,95	5,33	9,52	4,19	3,54	2,23	8,48	12,66	7,91	52,68
114	3,50	1,71	0,39	2,11	1,08	4,26	1,66	0,81	4,09	9,18	26,66	5,76	10,17	51,99
116	0,38	0,39	11,41	4,21	5,92	9,71	0,66	5,84	3,10	23,67	7,36	11,56	0,78	18,66

ES 2 626 261 T3

Paciente	Puntos temporales de muestreo (semanas)													
	-2	0	2	4	6	11	13	17	19	X+2	X+4	X+6	X+8	X+10
117	2,65	1,52	1,68	6,86	9,93	8,38	0,65	2,09	3,95	5,57	12,71	18,35	25,99	19,53
S.I. medio	4,8	2,4	3	2,9	5,7	6,6	4,3	3,2	2,8	6,9	9,4	8,8	10,8	16,9
Factor ↑			1,2	0,97			0,7		0,9	2,5	1,4		1,2	
S.I. medio	3,6				4,3				10,5					

Tabla 3b: TV2-FOLFOX: Respuestas proliferativas a MVA

Paciente	Puntos temporales de muestreo (semanas)													
	-2	0	2	4	6	11	13	17	19	X+2	X+4	X+6	X+8	X+10
101	4,7	2,8	69	26,7	23	7,8	2,7	1,1	15,6	3,7	0,7	1,1	2,0	14,2
102	1,5	1,3	6,3	6	3,2	5,6	6,5	5	4,19	22,76	10,68	1,98	33,17	16,06
103	0,7	0,9	13,8	5,8	0,3	7,5	6,3	14,7	72,1	5,96	17,92	17,93	5,35	12,01
104	0,4	0,9	5,4	0,1	2,6	0,4	0,56	11,33	2,40	1,92	1,47	0,92	17,21	0,62
105	1,3	0,5	1	45,4	4,8	2,58	94,32	9,06	22,51	46,25	143,03	80,49	116,15	0,80
107	1,4	0,2	7	62,1	45,76	39,37	71,10	43,13	1,13	30,23	351,08	131,36	118,01	167,20
108	0,4	0,4	19,5	18,12	3,11	33,92	1,27	40,55	25,41	3,00	155,15	3,22	154,92	9,90
113	21,64	18,07	40,50	18,74	8,92	6,10	15,94	8,22	4,71	2,59	37,35	51,55	40,05	69,76
114	0,50	1,29	1,17	11,21	1,12	2,38	20,86	1,62	5,45	26,36	201,10	51,28	39,54	101,36
116	0,66	0,31	37,81	14,96	6,15	4,61	1,31	4,65	2,06	13,86	4,83	2,15	0,74	3,65
117	2,83	2,13	13,34	170,57	48,10	23,02	0,63	10,37	11,70	34,63	164,26	122,77	274,13	236,88
S.I. medio	3,3	2,6	19,5	34,5	13,4	12,1	20,1	13,6	15,2	17,4	98,9	42,2	72,8	57,5
Factor †			7,5	1,8			1,7		1,1	1,1	5,7		1,7	
S.I. medio	2,9			18,2						57,8				

La media de las respuestas proliferativas a 5T4 y MVA muestran diferencias tanto en la magnitud como en la longevidad de la respuesta. Cada antígeno se abordará a su vez:

A. 5T4

5 Para todos los pacientes FOLFOX evaluables, la respuesta media proliferativa específica de 5T4 se evaluó después de la vacunación con TroVax en comparación con antes de la inyección (6,8 en comparación con 3,6). Dichas respuestas fueron más fuertes después de completarse la quimioterapia en comparación con durante la quimioterapia (10,5 en comparación con 4,3 respectivamente). Este diferencial está más marcado entre las semanas 10 19 y X+2, es decir, entre el último punto temporal en que la mayoría de los pacientes aún estaban recibiendo quimioterapia y el primer punto temporal después de completarse la quimioterapia. Esta observación fue particularmente inesperada porque los pacientes no recibieron una vacunación dentro de este periodo (la última vacunación fue en la semana 17). Los pacientes FOLFOX mostraron un aumento de 2,5 veces en las respuestas 15 medias proliferativas entre las semanas 19 y X+2, que fue el aumento factorial mayor observado entre puntos temporales consecutivos, siendo mayor que después de cualquiera de las 6 vacunaciones. Se detectaron aumentos muy pequeños en las respuestas medias proliferativas de 5T4 en el ensayo FOLFOX después de la 1.<sup>a</sup>, 5.<sup>a</sup> y 6.<sup>a</sup> vacunación, pero no en vacunaciones administradas durante la quimioterapia.

B. MVA

20 Como se esperaba, las respuestas proliferativas medias a MVA fueron de mayor magnitud que las correspondientes respuestas a 5T4. La respuesta proliferativa media específica de MVA después de la vacunación con TroVax fue de 35 en comparación con un S.I. previo a la inyección de 2,9. Las respuestas proliferativas específicas de MVA fueron mayores después de completarse la quimioterapia que durante la quimioterapia (57,8 en comparación con 18,2, 25 respectivamente), se observó un aumento similar con 5T4. Sin embargo, a diferencia de 5T4, hubo poca diferencia en las respuestas proliferativas detectadas en las semanas 19 y X+2.

1.3 Comparaciones de respuestas inmunológicas y clínicas

30 1.3.1 Sumario de respuestas inmunológicas a través de todos los ensayos

Tabla 4: Sumario de respuestas inmunitarias detectadas en todos los pacientes evaluables

ID de paciente	Respuesta tumoral		Respuestas inmunológicas anecdóticas
	14 sem	X+8 sem	
101	PR	PR	ELISA: sin Ab contra 5T4 PROLIF: sin respuesta cf selección ELISPOT: muy fuerte a proteína, débil a combinación de péptidos n.º 5
102	CR	CR	ELISA: muy fuerte, comenzando pronto y sostenida PROLIF: sin respuesta cf selección ELISPOT: muy fuerte a proteína y péptido de clase I y II
103	PR	PR	ELISA: moderada, comenzando pronto, aumentando después de Cx PROLIF: sin respuesta cf selección ELISPOT: débil
104	SD	PD	ELISA: débil PROLIF: moderada y transitoria posterior a quimioterapia ELISPOT: débil
105	PR	SD	ELISA: débil, aumentado después de Cx PROLIF: buena después de quimioterapia ELISPOT: muy fuerte a péptidos de clase I
107	PR	NA	ELISA: muy fuerte, comenzando pronto y sostenida PROLIF: fuerte después de quimioterapia ELISPOT: fuerte y sostenida a péptidos de clase I
108	CR	CR	ELISA: muy fuerte, comenzando pronto y sostenida PROLIF: moderada y transitoria ELISPOT: muy fuerte después de quimioterapia a proteína a péptido de clase I
113	PD	PD	ELISA: débil y transitoria PROLIF: fuerte y sostenida ELISPOT: muy débil
114	CR	NA	ELISA: moderada pronto pero no sostenida PROLIF: fuerte después de quimioterapia ELISPOT: débil a proteína
116	PR	NA	ELISA: respuesta de Ab moderada antes, durante y después de Cx PROLIF: muy fuerte y sostenida todo el tiempo

ID de paciente	Respuesta tumoral		Respuestas inmunológicas anecdóticas
	14 sem	X+8 sem	
			ELISPOT: débil antes y después de Cx
117	SD	NA	ELISA: débil
			PROLIF: fuerte y sostenida
			ELISPOT: sin respuesta

1.3.2 Análisis de respuestas de anticuerpos frente a respuestas clínicas

5 Los títulos MEDIOS de anticuerpos contra 5T4 en todos los pacientes evaluables se compararon frente a las respuestas clínicas presentadas. El título medio de anticuerpos contra 5T4 se determinó durante 3 periodos de tiempo: (i) durante todos los puntos temporales después de TroVax, es decir, desde la semana 2 hasta la semana X+10 (o los últimos puntos de datos disponibles), (ii) durante todos los puntos temporales posteriores a TroVax que se producen durante el periodo de quimioterapia (semanas 4-19) y (iii) durante todo los puntos temporales posteriores a TroVax que se producen después de completarse la quimioterapia (semanas X+2 a X+10).

10 Tablas 5a-5c: Las tablas ilustran los títulos medios de anticuerpos contra 5T4 durante todo el periodo de control (semanas 2-X+10: tabla 5a), durante la quimioterapia (semanas 4-19; tabla 5b) y después de completarse la quimioterapia (semanas X a X+10; tabla 5c). Los títulos medios se clasificaron de MÁS BAJO a MÁS ALTO junto a la respuesta clínica atribuida a ese paciente en las semanas 14 y X+8.

15

Tabla 5a: Curso temporal completo

Títulos medios de 5T4 posteriores a TroVax frente a respuesta tumoral			
Paciente	Título	14 sem	X+8 sem
101	0,0	PR	PR
104	6,7	SD	PD
113	15,0	PD	PD
105	22,7	PR	SD
117	27,5	SD	0
116	31,7	PR	0
114	42,5	CR	0
103	66,7	PR	PR
102	154,2	CR	CR
107	326,7	PR	0
108	395,0	CR	CR

Tabla 5b: Durante quimioterapia

Títulos medios de 5T4 posteriores a TroVax durante quimioterapia frente a respuesta tumoral			
Paciente	Título	14 sem	X+8 sem
101	0,0	PR	PR
105	2,0	PR	SD
104	3,3	SD	PD
117	11,7	SD	0
103	20,0	PR	PR
116	21,7	PR	0
113	30,0	PD	PD
114	80,0	CR	0
102	250,0	CR	CR
108	333,3	CR	CR
107	360,0	PR	0

Tabla 5c: Posterior a quimioterapia

Títulos medios de 5T4 posteriores a TroVax posteriores a quimioterapia frente a respuesta tumoral			
Paciente	Título	14 sem	X+8 sem
101	0	PR	PR
113	0	PD	PD
114	2	CR	0
104	12	SD	PD
105	48	PR	SD
116	48	PR	0
117	52	SD	0
102	68	CR	CR

Títulos medios de 5T4 posteriores a TroVax posteriores a quimioterapia frente a respuesta tumoral			
Paciente	Título	14 sem	X+8 sem
103	136	PR	PR
107	352	PR	0
108	548	CR	CR

Puede observarse que pacientes con CR (y muchos con PR) están todos en la mitad inferior de las tablas, es decir, tienen mayores títulos medios de anticuerpos contra 5T4 que aquellos pacientes con SD o PD. En la tabla 14c, se presentan los títulos de 5T4 posteriores a quimioterapia junto con las respuestas tumorales en la semana X+8. Son excepcionales varias exploraciones TC X+8 sem, pero puede observarse que los pacientes con CR y PR se agrupan en la parte inferior de la tabla (es decir, tienen mayores títulos de Ab posteriores a quimioterapia). El paciente principal que no se ajusta a este patrón es el paciente 101 que no generó una respuesta de anticuerpos o respuesta proliferativa contra 5T4, pero mostró una fuerte respuesta ELISPOT a la proteína 5T4 posterior a quimioterapia y una respuesta moderada a un péptido de clase I.

### 1.3.3 Análisis de respuestas proliferativas frente a respuestas clínicas

Las respuestas MEDIAS proliferativas contra 5T4 (S.I.) en todos los pacientes evaluables se compararon frente a las respuestas clínicas presentada (algunas exploraciones TC son excepcionales). Las respuestas medias proliferativas se determinaron durante 3 periodos de tiempo (el curso temporal de control completo, durante quimioterapia y después de completarse la quimioterapia) y se tabulan en las tablas 6a-c.

Tablas 6a-6c: Las tablas ilustran las respuestas medias proliferativas contra 5T4 durante 3 periodos de tiempo diferentes: tabla 6a el periodo de control completo (semanas 2-X+10), tabla 6b durante quimioterapia (semanas 4-19) y tabla 6c después de completarse la quimioterapia (semanas X a X+10). Las respuestas medias proliferativas se clasifican de MÁS BAJA a MÁS ALTA junto a la respuesta clínica atribuida a ese paciente en las semanas 14 y X+8.

Tabla 6a: Curso temporal completo

S.I. medios de 5T4 posteriores a TroVax frente a respuesta tumoral			
Paciente	S.I.	14 sem	X+8 sem
104	2,73	SD	PD
103	3,52	PR	PR
108	4,05	CR	CR
145	5,16	PR	SD
102	5,67	CR	CR
101	6,51	PR	PR
116	8,34	PR	0
107	8,92	PR	0
117	9,64	SD	0
114	9,85	CR	0
113	9,87	PD	PD

Tabla 6b: Durante quimioterapia

S.I. medios de 5T4 posteriores a TroVax durante quimioterapia frente a respuesta tumoral			
Paciente	S.I.	14 sem	X+8 sem
104	0,79	SD	PD
105	1,74	PR	SD
114	2,34	CR	0
107	2,76	PR	0
103	3,28	PR	PR
108	3,63	CR	CR
116	4,91	PR	0
117	5,31	SD	0
113	5,55	PD	PD
102	7,35	CR	CR
101	9,20	PR	PR

Tabla 6c: Posterior a quimioterapia

S.I. medios de 5T4 posteriores a TroVax posteriores a quimioterapia frente a respuesta tumoral			
Paciente	S.I.	14 sem	X+8 sem
101	2,18	PR	PR
103	4,03	PR	PR

S.I. medios de 5T4 posteriores a TroVax posteriores a quimioterapia frente a respuesta tumoral			
Paciente	S.I.	14 sem	X+8 sem
102	4,73	CR	CR
108	5,30	CR	CR
104	5,49	SD	PD
105	9,98	PR	SD
116	14,20	PR	0
117	16,43	SD	0
113	16,79	PD	PD
107	17,84	PR	0
114	20,75	CR	0

Las respuestas proliferativas en este grupo de pacientes fueron bajas durante la quimioterapia en comparación con después de la quimioterapia (S.I. medios de 4,3 en comparación con 10,4). Además, la mayor respuesta media proliferativa se produjo en la semana X+10. Una potente respuesta proliferativa en este momento no influiría en las respuestas tumorales detectadas en la semana X+8, pero puede tener un efecto positivo sobre la supervivencia del paciente. Dichos cálculos se emprenderán según vayan estando disponibles los datos.

#### 1.3.4 Análisis de respuestas ELISPOT frente a respuestas clínicas

- 10 Las respuestas MEDIAS de ELISPOT de 5T4 (células específicas de antígeno por  $10^6$  PBMC) en todos los pacientes evaluables se compararon frente a las respuestas clínicas presentadas. Las respuestas ELISPOT medias se determinaron en puntos temporales seleccionados durante el curso temporal de control completo y se tabularon en las tablas 7a-c.
- 15 Tablas 7a-7c: Las tablas ilustran las respuestas medias de ELISPOT específicas de 5T4 (todos los antígenos proteicos y peptídicos de 5T4) durante el curso temporal completo (7a), durante la quimioterapia (7b) o después de completar la quimioterapia (7c). Las repuestas ELISPOT medias se clasificaron de MÁS BAJA a MÁS ALTA junto a la repuesta clínica atribuida a ese paciente en las semanas 14 y X+8.

Tabla 7a: Todos los antígenos 5T4, quimioterapia de curso temporal completo

ELISPOT TOTAL media de 5T4 posterior a TroVax frente a respuesta tumoral			
Paciente	ELISPOT	14 sem	X+8 sem
113	0	PD	PD
117	0	SD	0
103	8,9	PR	PR
104	12	SD	PD
116	13,8	PR	0
114	42,9	CR	0
107	49,3	PR	0
108	159,2	CR	CR
105	311,7	PR	SD
101	315,2	PR	PR
102	431,2	CR	CR

Tabla 7b: Todos los antígenos 5T4, durante

ELISPOT TOTAL media de 5T4 posterior a TroVax durante quimioterapia frente a respuesta tumoral			
Paciente	ELISPOT	14 sem	X+8 sem
103	0	PR	PR
113	0	PD	PD
117	0	SD	0
116	7,5	PR	0
104	28,4	SD	PD
114	49,4	CR	0
108	53	CR	CR
107	65	PR	0
101	83,3	PR	PR
102	477	CR	CR
105	500,8	PR	SD

Tabla 7c: Todos los antígenos 5T4, posterior a quimioterapia

ELISPOT TOTAL media de 5T4 posterior a TroVax posterior a quimioterapia frente a respuesta tumoral			
Paciente	ELISPOT	14 sem	X+8 sem
113	0	PD	PD
117	0	SD	0
104	2,6	SD	PD
103	4,4	PR	PR
116	20	PR	0
107	42,3	PR	0
114	48,8	CR	0
105	247,7	PR	SD
101	534	PR	PR
108	557,1	CR	CR
102	653,3	CR	CR

Se observa una agrupación de las respuestas clínicas positivas con altas respuestas ELISPOT medias. En particular, la magnitud de las respuestas a todos los antígenos 5T4 sobre todos los puntos temporales y durante el periodo posterior a quimioterapia se corresponde bien con las respuestas tumorales presentadas.

### 1.3.5 Análisis integrado de respuestas inmunológicas frente a clínicas

Se integraron las respuestas ELISPOT, de proliferación y de anticuerpos específicas de 5T4 y se compararon frente a las respuestas clínicas presentadas. Para conseguir esto, cada paciente evaluable simplemente se valoró respecto a la magnitud de la mayor respuesta inmunitaria detectada. Por ejemplo, el paciente con el mayor título medio de anticuerpos contra 5T4 a través del periodo de control seleccionado (es decir, todos los puntos temporales posteriores a TroVax, durante la quimioterapia, posterior a la quimioterapia) obtuvo un valor del 100 %, todos los demás pacientes se valoraron como un porcentaje de la respuesta más alta. Para integrar los ensayos, los valores por ensayo para cada paciente simplemente se añadieron. Dicho análisis no tiene en consideración la magnitud de las respuestas inmunitarias de los pacientes, pero da un "peso" igual a todos los ensayos. Las tablas 8a y b detallan la jerarquía de las respuestas inmunitarias integradas (anticuerpo + ELISPOT en la tabla 8a y anticuerpo + ELISPOT + proliferación en la tabla 8b) frente a las respuestas clínicas presentadas.

Tabla 8a: Análisis integrado de ensayos ELISPOT y de anticuerpos durante el curso temporal completo de inmunocontrol frente a las respuestas clínicas

Paciente	Respuesta tumoral		Título combinado + ELISPOT
	14 sem	X+8 sem	Valor
113	PD	PD	3,8
104	SD	PD	4,5
117	SD	0	7
116	PR	0	11,2
103	PR	PR	19,1
114	CR	0	20,7
101	PR	P R	73,1
105	PR	SD	78,1
107	PR	0	94,1
108	CR	CR	136,9
102	CR	CR	139

Tabla 8b: Análisis integrado de ensayos ELISPOT, de anticuerpos y de proliferación durante el curso temporal completo de inmunocontrol frente a las repuestas clínicas

Paciente	Respuesta tumoral		S.I. combinado + título + ELISPOT
	14 sem	X+8 sem	Valor
104	SD	PD	32,2
103	PR	PR	54,7
116	PR	0	98
113	PD	PD	103,8
117	SD	0	104,7
114	CR	0	120,5
105	PR	SD	130,4
101	PR	PR	139
108	CR	CR	177,9
107	PR	0	184,4
102	CR	CR	196,5

1.3.6 Comparaciones de respuestas inmunológicas y químicas: Conclusiones preliminares

Este análisis preliminar indica que algunas respuestas inmunitarias específicas de 5T4 de alta magnitud se agrupan con respuestas clínicas positivas. Dichas tendencias se analizan individualmente a continuación:

5

A. ELISA

Se asocian altos títulos de anticuerpos específicos de 5T4 más frecuentemente con respuestas completas y parciales que con enfermedad estable o progresiva. Esta observación es constante cuando las respuestas se analizan durante el curso temporal completo de control, durante y después de quimioterapia. Cuando se analizan las respuestas de anticuerpos después de quimioterapia, los altos títulos se agrupan con CR y PR en el punto temporal de la exploración TC de X+8 sem. La excepción principal de estas tendencias es el paciente 101 que no se seroconvirtió, pero generó una fuerte respuesta ELISPOT.

15 B. Proliferación

La magnitud de las respuestas proliferativas específicas de 5T4 no parece agruparse con respuestas tumorales positivas (CR y PR). Sin embargo, las respuestas proliferativas fueron mayores después de completarse la quimioterapia, produciéndose las mayores respuestas globales en la semana X+10, es decir, demasiado tarde para influir en las respuestas tumorales. Estas respuestas pueden reflejarse positivamente en la supervivencia.

C. ELISPOT

La magnitud de las respuestas ELISPOT específicas de 5T4 parecen agruparse con respuestas tumorales positivas. Esta tendencia es evidente cuando los datos de ELISPOT se analizan a través del curso temporal completo, durante la quimioterapia y después de completarse la quimioterapia.

D. Análisis integrado: ELISA + ELISPOT

Si se integran los datos tanto de ELISA como de ELISPOT y se tabula la magnitud de las respuestas combinadas junto a las respuestas clínicas, los valores mayores se agrupan más frecuentemente con respuestas tumorales positivas. Los pacientes clasificados como SD o PD en la semana 14 o la semana X+8 tienen los valores combinados más bajos.

35 E. Análisis integrado: ELISA + ELISPOT + proliferación

Si se integran los datos tanto de ELISA, de ELISPOT como de la proliferación y se tabula la magnitud de las respuestas combinadas junto a las respuestas clínicas, de nuevo los valores mayores se agrupan más frecuentemente con respuestas tumorales positivas.

40

2. TV2-IFL

2.1 Datos clínicos y de los pacientes de origen

Se reclutaron diecinueve pacientes en el ensayo TV2-FOLFOX de los que 12 llegaron a ser evaluables para la evaluación de las respuestas inmunológicas (tabla 9).

Tabla 9: Datos clínicos. Los 19 pacientes ITT se incluyen en la tabla. Los pacientes evaluables se indican por sombreado (datos de supervivencia actuales hasta la fecha). Clave: WD = retirada del paciente, por lo tanto, sin resultado disponible; N/A = sin datos

50

ID de Paciente	Vivo/Muerto	Respuesta tumoral		Suma de lesiones diana			Supervivencia (semanas desde la semana 0)
		X sem	X+14 sem	Selección	X sem	X+14 sem	
001	Muerto	N/A	WD	45	WD	WD	42
002	Vivo	CR	CR	59	0	0	101
003	Muerto	PR	PD	119	92	N/A	66
004	Muerto	WD	WD	135	WD	WD	9
005	Muerto	PR	PD	172	17	74	77
006	Muerto	N/A	N/A	360	WD	WD	11
007	Muerto	SD	PD	174	133	205	68
008	Muerto	WD	WD	180	WD	WD	3
009	Muerto	SD	PD	164	140	186	63
010	Vivo	PD	WD	36	56	WD	82
011	Vivo	WD	WD	38	WD	WD	0

ID de Paciente	Vivo/Muerto	Respuesta tumoral		Suma de lesiones diana			Supervivencia (semanas desde la semana 0)
		X sem	X+14 sem	Selección	X sem	X+14 sem	
012	Muerto	PR	PD	306	138		67
013	Muerto	PD	PD	68	WD	WD	58
014	Vivo	SD		114	N/A		74
015	Vivo	PR	PD	48	29	36	74
016	Vivo	PR	PD	175	117	149	74
017	Vivo	PR	PD	69	Resolver	30	71
018	Vivo	SD	PD	284	225	278	66
019	Vivo	PD	PD	279	254	WD	60

La fig. 3 muestra TV2-IFL: Dimensiones del tumor durante todo el curso temporal del ensayo clínico. La figura ilustra la suma de las lesiones tumorales diana en 3 puntos temporales: antes de la vacunación con TroVax (selección) y en las semanas X y X+14.

5 De los 11 conjuntos de datos de la exploración TC disponibles para los 12 pacientes evaluables, todos mostraron una disminución en la suma de las lesiones diana en el punto temporal de X sem. En la semana X+14, 5 pacientes (de las 7 exploraciones disponibles) tenían cargas tumorales diana que permanecían por debajo del nivel en que estaban en la selección.

10 2.2 Respuestas inmunológicas

2.2.1 Respuestas de anticuerpos

15 La tabla 10 detalla los títulos de anticuerpos específicos de 5T4 para cada paciente evaluable a través de todo el curso temporal de control en el ensayo TV2-IFL.

20 Tabla 10: Respuestas de anticuerpos específicas de 5T4. Los resultados se expresan como un título de anticuerpos específicos de 5T4 (la mayor dilución en suero a la que la muestra de ensayo tiene una D.O. media (490 nm)  $\geq 2$  veces la de la muestra de control negativo (suero humano normal; [NHS]) en cada punto temporal de muestreo. Los resultados tabulados en **negrita** y  $\geq 10$  representan respuestas de anticuerpos positivas. Los títulos medios se presentan para todos los pacientes en cada punto temporal y también en múltiples puntos temporales previos a la vacunación, durante la quimioterapia y después de la quimioterapia. Además, el aumento factorial en el título medio de anticuerpos en comparación con el punto temporal previo se muestra después de cada vacunación.

25

N.º de paciente	Título de anticuerpos específicos de 5T4 en puntos temporales (semanas) posterior a la inmunización principal														
	-2	0	-2	4	6	11	13	17	19	X+2	X+4	X+6	X+8	X+10	X+14
002	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
003	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	20	40	<10	<10	10	20	20	40
005	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
007	<10	<10	<10	160	80	10	10	<10	10	<10	20	40	20	10	<10
009	<10	<10	<10	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	10	10	160	80	WD
012	<10	<10	10	40	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	640	640	<10
014	<10	<10	<10	20	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	40	40
015	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	20	<10
016	<10	<10	<10	10	10	<10	<10	10	<10	<10	40	40	160	80	40
017	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	<10	80	80	40
018	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	<10	320	640	5120	1280	1280
019	<10	<10	10	20	10	<10	10	<10	10	<10	10	10	<10	20	<10
Título medio	<10	<10	1,7	21,7	7,5	0,8	4,2	1,7	8,3	<10	35	62,5	530	189,2	130,9
Factor $\uparrow$				13			5,3		4,9	?	?		8,5		
Título medio	<10			7,4						158,3					

30 Durante el curso temporal completo de inmunocontrol posterior a TroVax, se observó el título medio de anticuerpos específicos de 5T4. La mayoría de los pacientes se seroconvirtieron en la semana 4 (es decir, después de 2 vacunaciones con TroVax). Los títulos medios de anticuerpos en el ensayo IFL fueron muy bajos durante la quimioterapia (título medio de 7,4), disminuyeron después de completarse la quimioterapia (entre las semanas 19 y X+2) y aumentaron drásticamente después de completarse la quimioterapia (título medio de 158,3). Los aumentos en el título medio de anticuerpos se observaron después de cada una de las 6 vacunaciones.

2.2.2 Respuestas proliferativas

Las tablas 11a-b detallan las respuestas proliferativas específicas de antígeno para cada paciente evaluable a través del curso temporal completo de control. Se han analizado las respuestas a 5T4 (11a) y MVA (11b).

5 Tablas 11a y b: Sumario de las respuestas proliferativas de PBMC recuperadas de pacientes después de reestimulación *in vitro* con 5T4 (a) y MVA (b). Los resultados se expresan como un índice de estimulación (proliferación inducida por el medio en solitario ÷ por la proliferación inducida por el antígeno de ensayo) un índice de estimulación  $\geq 2$  (indicado por texto en negrita) se considera una respuesta positiva en ese punto temporal. Las  
10 respuestas proliferativas que son positivas (S.I.  $\geq 2$ ) y al menos 2 veces mayor que las respuestas previas a la inyección (semana -2 o 0) se indican por texto en rojo.

Tabla 11a: TV2-IFL: Respuestas proliferativas a 5T4

Paciente	Puntos temporales de muestreo (semanas)														
	-2	0	2	4	6	11	13	17	19	X+2	X+4	X+6	X+8	X+10	X+14
002	1,1	7,1	5,4	3,3	2,7	1	1	1,3	0,44	2,5	2,8	0,8	1,1	1,6	3,11
003	6,6	32,8	10,4	17,7	26,7	0,6	0,8	5,7	1,7	1,95	3,6	0,5	11,5	2,62	1,99
005	1	4,3	8,9	6,1	1	1,2	0,6	2,7	1,5	0,9	0,4	1,3	1,5	0,6	0,87
007	2,2	6,1	7,6	1,7	1,3	26,7	4,2	2,1	4,3	1,4	2,7	2,7	0,9	1,52	0,64
009	1,3	17,5	6,1	7,6	1,3	1,9	1,2	2,1	0,5	1,03	5,21	2,03	0,43	4,50	WD
012	2,2	2,2	2,2	3,1	3,9	1,5	1,7	2,1	1,55	19,83	22,47	39,70	2,24	14,13	19,64
014	4,2	1,7	17,7	2	2,6	2	1,2	4,2	2,88	16,58	4,99	5,65	6,04	1,31	10,13
015	2,3	2,8	7	5,6	4,5	0,5	0,76	1,81	0,73	17,08	3,96	5,02	1,76	2,10	3,94
016	1,9	1,3	7,6	8,6	0,9	2,7	4,6	1,9	0,92	28,86	3,35	8,41	8,57	3,12	7,73
017	3,5	8	2,1	0,6	0,9	2,1	3,5	1,27	0,82	6,38	11,30	2,45	4,91	4,71	1,27
018	0,6	3,3	1,3	2,9	1,3	0,97	0,82	1,14	1,93	12,65	9,65	5,61	5,72	2,80	1,60
019	0,6	2,3	1,58	1,31	2,72	25,08	10,83	18,67	N/A	0,74	4,01	12,83	1,17	3,00	2,59
S.I. medio	2,3	7,5	6,5	5	4,1	5,5	2,6	3,7	1,6	9,2	6,2	7,3	3,8	3,5	4,9
Factor ↑			0,9	0,8			0,5		0,4	5,8	0,7		0,5		
S.I. medio	4,9			3,8						5,8					

Tabla 11b: TV2-IFL: Respuestas proliferativas a MVA

Paciente	Puntos temporales de muestreo (semanas)																
	-2	0	2	4	6	11	13	17	19	X+2	X+4	X+6	X+8	X+10	X+14		
002	0,4	1,3	3,2	13,7	4,9	1,2	1,7	1,6	1,7	0,4	0,3	5,3	1,1	1	10,41		
003	1,1	1	10,6	14,8	12	1,8	3,1	0,7	0,4	2,2	29,1	20,4	35,3	52,67	8,60		
005	2,1	4,5	27	16,2	2	8,7	2,5	1,2	0,4	0,2	0,6	1,5	2,3	4,8	12,50		
007	1	1,7	70	72,6	6,3	5,8	6,5	1	0,9	1,9	8,6	9,2	42,72	54,25	38,90		
009	5,3	21	25,5	23	17,8	1,1	0,7	0,7	2,6	44,60	100,56	21,50	83,07	20,31	WD		
012	0,8	0,6	1,97	6,1	5,4	0,7	2,8	1,5	1,63	9,25	43,60	5,28	1,22	45,61	0,93		
014	1,1	0,7	11	0,5	0,8	0,2	1	0,89	15,92	16,49	32,54	24,99	69,54	2,01	7,97		
015	0,8	1	1	1,7	2,3	8,8	4,08	47,44	69,59	14,87	9,44	15,03	7,13	6,23	3,56		
016	1,3	1	2,5	0,6	0,3	1,4	6,3	2,53	15,19	21,58	6,58	12,96	46,31	4,45	11,84		
017	0,8	0,8	1,2	0,1	0,5	0,88	0,30	4,16	4,32	6,13	4,77	1,51	41,83	2,48	1,06		
018	0,6	2,1	17,7	38,2	14	7,76	3,85	15,01	3,33	3,15	45,89	14,03	25,55	4,78	11,18		
019	0,2	1	1,49	6,83	53,15	21,13	12,22	12,73	N/A	0,93	4,34	25,10	1,88	7,97	4,72		
S.I. medio	1,3	3,1	14,4	16,2	9,9	5	3,8	7,5	10,5	10,1	23,9	13,1	29,8	17,2	10,2		
Factor ↑			4,6	1,1			0,8		1,4	1	2,4		2,3				
S.I. medio	0,95			4						11,9							

Las respuestas medias proliferativas a 5T4 y MVA muestran diferencias tanto en la magnitud como en la longevidad de la respuesta. Cada antígeno se abordará a su vez:

A. 5T4

5 Globalmente, la respuesta media proliferativa a 5T4 no mostró aumento después de la vacunación con TroVax en comparación con antes de la inyección (ambas tienen un S.I. medio de 4,9). Por lo tanto, al nivel de población y a través de TODOS los puntos temporales, los pacientes IFL no muestran aumento en la respuesta media proliferativa a 5T4 después de vacunación con TroVax. Sin embargo, en puntos temporales específicos las respuestas están elevadas en pacientes individuales. Las respuestas se elevaron después de completarse la quimioterapia (S.I. de 5,8 después de quimioterapia frente a 3,8 durante quimioterapia) y este diferencial fue mucho más marcado entre las semanas 19 y X+2, es decir, entre el último punto temporal en que la mayoría de pacientes aún estaba recibiendo quimioterapia y el primer punto temporal después de completarse la quimioterapia. Esta observación era inesperada porque los pacientes no recibieron una vacunación en este periodo, su última vacunación tuvo lugar en la semana 17. Los pacientes IFL mostraron un aumento de 6 veces en las respuestas medias proliferativas entre las semanas 19 y X+2 (S.I. de 1,6 frente a 9,2 respectivamente) que fue el mayor aumento factorial observado, que es mayor que después de cualquiera de las 6 vacunaciones.

B. MVA

20 La respuesta media proliferativa a MVA fue 6 veces mayor después de la vacunación con TroVax en comparación con antes de la inyección (S.I. medio de 13,2 en comparación con 2,2 respectivamente). La respuesta proliferativa específica de MVA fue mayor después de completarse la quimioterapia que durante la quimioterapia que fue similar al patrón observado para 5T4. Sin embargo, a diferencia de 5T4, no hubo diferencia en la respuesta proliferativa detectada en las semanas 19 y X+2 (S.I medios de 10,5 frente a 10,1 respectivamente).

2.3 Comparaciones de respuestas inmunológicas y clínicas

2.3.1 Sumario de respuestas inmunológicas a través de todos los ensayos

Tabla 12: Sumario de las respuestas inmunitarias observadas en todos los pacientes evaluables

ID de paciente	Respuesta tumoral		Sumario de respuestas inmunológicas
	X sem	X+14 sem	
002	CR	CR	ELISA: sin respuesta de Ab contra 5T4 detectada PROLIF: sin respuesta cf selección ELISPOT: respuesta débil en un único punto temporal al péptido n.º 77
003	PR	PD	ELISA: respuesta de Ab débil durante y después de quimioterapia PROLIF: sin respuesta cf selección ELISPOT: muy débil a 5T4 y la combinación n.º 8 en la semana X+8 solamente
005	PR	PD	ELISA: sin respuesta de Ab contra 5T4 detectada PROLIF: respuesta débil y transitoria cf selección ELISPOT: respuestas fuertes antes y después de Cx a múltiples péptidos
007	SD	PD	ELISA: respuesta de Ab débil antes de Cx, moderada después de Cx PROLIF: respuesta débil pero transitoria cf selección ELISPOT: muy fuerte a la proteína 5T4 solamente. Después de Cx
009	SD	PD	ELISA: respuesta de Ab débil antes de Cx, moderada después de Cx PROLIF: sin respuesta cf selección ELISPOT: muy fuerte a péptidos de clase I antes y después de Cx
012	PR	PD	ELISA: respuesta de Ab débil antes de Cx, fuerte después de Cx PROLIF: respuesta fuerte pero solamente después de quimioterapia ELISPOT: muy fuerte a múltiples péptidos antes y después de Cx
014	SD		ELISA: respuesta de Ab débil antes de Cx, moderada después de Cx PROLIF: respuesta fuerte antes y después de quimioterapia ELISPOT: sin repuestas
015	PR	PD	ELISA: sin respuesta de Ab antes y durante de Cx, moderada después de Cx PROLIF: respuesta fuerte pero transitoria antes y después de quimioterapia ELISPOT: muy débil a un péptido de clase II en un punto temporal
016	PR	PD	ELISA: respuesta de Ab débil antes de Cx, moderada después de Cx PROLIF: respuesta fuerte antes, durante pero principalmente después de Cx ELISPOT: respuesta débil al péptido de clase II n.º 41
017	PR	PD	ELISA: sin respuesta de Ab antes y durante Cx, moderada después de Cx PROLIF: sin respuesta cf selección

ID de paciente	Respuesta tumoral		Sumario de respuestas inmunológicas
	X sem	X+14 sem	
018	SD	PD	ELISPOT: muy débil a la combinación de péptidos n.º 13 en un punto temporal
			ELISA: sin respuesta de Ab antes de Cx, muy fuerte después de Cx
			PROLIF: fuerte respuesta transitoria después de Cx
			ELISPOT: muy fuerte y sostenida a las combinaciones de clase I 1, 5 y 20
019	PD	PD	ELISA: respuesta de Ab muy débil todo el tiempo
			PROLIF: respuesta fuerte durante y después de Cx
			ELISPOT: muy débil en un único punto temporal

2.3.2 Análisis de respuestas de anticuerpos frente a respuestas clínicas

5 Los títulos MEDIOS de anticuerpos contra 5T4 en todos los pacientes evaluables se compararon frente a las respuestas clínicas presentadas (algunas exploraciones TC son excepcionales). Los títulos medios de anticuerpos contra 5T4 se determinaron durante 3 periodos de tiempo: (i) durante todos los puntos temporales después de TroVax, es decir, desde la semana 2 hasta la semana X+10 (o el último punto de datos disponible), (ii) durante todos los puntos temporales después de TroVax que se producen durante el periodo de quimioterapia (semanas 4-19) y (iii) durante todos los puntos temporales después de TroVax que se producen después de completarse la quimioterapia (semanas X+2 a X+14). Las tablas 13a-13c clasifican los títulos medios de anticuerpo contra las respuestas clínicas respectivas presentadas en ese paciente.

15 Tablas 13a-13c: Las tablas ilustran los títulos medios de anticuerpos contra 5T4 durante el periodo de control completo (semanas 2-X+14; tabla 13a), durante quimioterapia (semanas 4-19; tabla 13b) y después de completarse la quimioterapia (semanas X a X+14; tabla 13c). Los títulos medios se clasificaron de MÁS BAJO a MÁS ALTO junto a la respuesta clínica atribuida a ese paciente en las semanas X y X+14.

Tabla 13a: Curso temporal completo

Títulos medios de 5T4 posteriores a TroVax frente a respuesta tumoral			
Paciente	Título	X sem	X+14 sem
2	0,0	CR	CR
5	0,0	PR	PD
15	7,7	PR	PD
19	7,7	PD	PD
3	13,1	PR	PD
14	13,8	SD	
17	16,9	PR	PD
9	22,5	SD	PD
7	27,7	SD	PD
16	29,2	PR	PD
12	102,3	PR	PD
18	667,7	SD	PD

Tabla 13b: Durante quimioterapia

Títulos medios de 5T4 posteriores a TroVax durante quimioterapia frente a respuesta tumoral			
Paciente	Título	X sem	X+14 sem
2	0,0	CR	CR
5	0,0	PR	PD
15	0,0	PR	PD
17	0,0	PR	PD
9	1,7	SD	PD
14	3,3	SD	
16	3,3	PR	PD
12	6,7	PR	PD
18	6,7	SD	PD
19	8,3	PD	PD
3	13,3	PR	PD
7	45,0	SD	PD

Tabla 13c: Posterior a quimioterapia

Títulos medios de 5T4 posteriores a TroVax posteriores a quimioterapia frente a respuesta tumoral			
Paciente	Título	X sem	X+14 sem
2	0,0	CR	CR

Títulos medios de 5T4 posteriores a TroVax posteriores a quimioterapia frente a respuesta tumoral			
Paciente	Título	X sem	X+14 sem
5	0,0	PR	PD
19	6,7	PD	PD
3	15,0	PR	PD
7	15,0	SD	PD
15	16,7	PR	PD
14	26,7	SD	
17	36,7	PR	PD
9	52,0	SD	PD
16	60,0	PR	PD
12	213,3	PR	PD
18	1440,0	SD	PD

Las respuestas de anticuerpos en este grupo de paciente fueron muy bajas durante la quimioterapia en comparación con después de la quimioterapia (títulos medios de 7 en comparación con 158). Además, el mayor título medio de anticuerpos se produjo en la semana X+8. Una potente respuesta de anticuerpos en este momento puede no influir sobre las respuestas tumorales detectadas en la semana X+14, pero puede tener un efecto positivo sobre la supervivencia del paciente.

5

2.3.3 Análisis de respuestas proliferativas frente a respuestas clínicas

10 Las respuestas MEDIAS 1 (S.I.) en todos los pacientes evaluables se compararon frente a las respuestas clínicas presentadas (algunas exploraciones TC son excepcionales). Las respuestas medias proliferativas se determinaron durante 3 periodos temporales (el curso temporal de control completo, durante quimioterapia y después de completarse la quimioterapia) y se tabulan en las tablas 14a-c.

15 Tablas 14a-14c: Las tablas ilustran las respuestas medias proliferativas a 5T4 durante 3 diferentes periodos de tiempo: tabla 14a el periodo de control completo (semanas 2-X+14), tabla 14b durante quimioterapia (semanas 4-19) y tabla 14c después de completarse la quimioterapia (semanas X a X+14). Las respuestas medias proliferativas se clasifican de MÁS BAJA a MÁS ALTA junto a la respuesta clínica atribuida a ese paciente en las semanas X y X+14.

Tabla 14a: Curso temporal completo

S.I. medio de 5T4 posterior a TroVax frente a respuesta tumoral			
Paciente	S.I.	X sem	X+14 sem
2	2,08	CR	CR
5	2,12	PR	PD
9	2,83	SD	PD
17	3,25	PR	PD
18	3,72	SD	PD
15	4,21	PR	PD
7	4,44	SD	PD
14	5,94	SD	
3	6,60	PR	PD
16	6,71	PR	PD
19	7,04	PD	PD
12	10,31	PR	PD

Tabla 14b: Durante quimioterapia

S.I. medio de 5T4 posterior a TroVax durante quimioterapia frente a respuesta tumoral			
Paciente	S.I.	X sem	X+14 sem
18	1,51	SD	PD
17	1,53	PR	PD
2	1,62	CR	CR
5	2,18	PR	PD
12	2,31	PR	PD
15	2,32	PR	PD
9	2,43	SD	PD
14	2,48	SD	
16	3,27	PR	PD
7	6,72	SD	PD
3	8,87	PR	PD
19	11,72	PD	PD

Tabla 14c: Posterior a quimioterapia

S.I. medio de 5T4 posterior a TroVax posteriores a quimioterapia frente a respuesta tumoral			
Paciente	S.I.	X sem	X+14 sem
5	0,93	PR	PD
7	1,64	SD	PD
2	1,99	CR	CR
9	2,64	SD	PD
3	3,69	PR	PD
19	4,06	PD	PD
17	5,17	PR	PD
15	5,64	PR	PD
18	6,34	SD	PD
14	7,45	SD	
16	10,01	PR	PD
12	19,67	PR	PD

2.3.4 Análisis de respuestas ELISPOT frente a respuestas clínicas

- 5 Las respuestas ELISPOT MEDIAS de 5T4 (células específicas de antígeno por  $10^6$  PBMC) en todos los pacientes evaluables se compararon frente a las respuestas clínicas presentadas (algunas exploraciones TC son excepcionales). Las respuestas ELISPOT medias se determinaron en puntos temporales seleccionados durante el curso temporal de control completo y se tabulan en las tablas 15a-c.
- 10 Tabla 15a-15c: Las tablas ilustran las respuestas ELISPOT medias de 5T4 durante el curso temporal completo (15a), durante quimioterapia (15b) o después de quimioterapia (15c). Las respuestas ELISPOT medias se clasifican de MÁS BAJA a MÁS ALTA junto a la respuesta clínica atribuida a ese paciente en las semanas X y X+14.

Tabla 15a: Todos los antígenos 5T4, curso temporal completo

ELISPOT TOTAL media de 5T4 posterior a TroVax frente a respuesta tumoral			
Paciente	ELISPOT	X sem	X+14 sem
2	47,5	CR	CR
3	6,7	PR	PD
5	91,6	PR	PD
7	33,5	SD	PD
9	371,8	SD	PD
12	99,2	PR	PD
14	0	SD	
15	7,2	PR	PD
16	33,5	PR	PD
17	5,7	PR	PD
18	165,6	SD	PD
19	4,1	PD	PD

Tabla 15b: Todo los antígenos 5T4, durante quimioterapia

ELISPOT medio de 5T4 posterior a TroVax DURANTE quimioterapia frente a respuesta tumoral			
Paciente	ELISPOT	X sem	X+14 sem
3	0	PR	PD
7	0	SD	PD
16	0	PR	PD
17	0	PR	PD
14	0	SD	
19	13,6	PD	PD
15	14,4	PR	PD
12	26,3	PR	PD
18	79,7	SD	PD
5	91,7	PR	PD
2	113,25	CR	CR
9	264,4	SD	PD

Tabla 15c: Todo los antígenos 5T4, posterior a quimioterapia

ELISPOT medio de 5T4 posterior a TroVax POSTERIOR a quimioterapia frente a respuesta tumoral			
Paciente	ELISPOT	X sem	X+14 sem
15	0	PR	PD

ELISPOT medio de 5T4 posterior a TroVax POSTERIOR a quimioterapia frente a respuesta tumoral			
Paciente	ELISPOT	X sem	X+14 sem
19	0	PD	PD
14	0	SD	
3	8,9	PR	PD
17	13,3	PR	PD
2	26,5	CR	CR
7	50,3	SD	PD
16	55,8	PR	PD
5	91,6	PR	PD
12	189,3	PR	PD
18	236,1	SD	PD
9	425,4	SD	PD

El análisis de las respuestas ELISPOT de 5T4, mostró una mejor agrupación de altas respuestas de 5T4 con respuestas clínicas beneficiosas que el mismo cálculo usando la proliferación como una variable.

5 2.3.5 Análisis integrado de repuestas inmunológicas frente a clínicas

Las respuestas de ELISPOT, proliferación y de anticuerpos específicas de 5T4 se integraron y compararon frente a las respuestas clínicas presentadas. Para conseguir esto, cada paciente evaluable simplemente se valoró respecto a la magnitud de la mayor respuesta inmunitaria detectada. Por ejemplo, el paciente con el mayor título medio de anticuerpos contra 5T4 a través del periodo de control seleccionado (es decir todos los puntos temporales después de TroVax, durante la quimioterapia, después de la quimioterapia) se le dio un valor del 100 %, todos los demás pacientes se valoraron como un porcentaje de la respuesta máxima. Para integrar los ensayos, los valores por ensayo para cada paciente simplemente se añadieron. Dicho análisis no tiene en consideración la magnitud de las respuestas inmunitarias de los pacientes, sino que da un "peso" igual a todos los ensayos. Las tablas 16a y b detallan la jerarquía de las respuestas inmunológicas integradas (anticuerpo + ELISPOT en la tabla 16a y anticuerpo + ELISPOT + proliferación en la tabla 16b) frente a las respuestas clínicas presentadas

Tabla 16a: Análisis integrado de ensayos ELISPOT + anticuerpos durante el curso temporal de inmunocontrol completo frente a las respuestas clínicas

Respuesta tumoral			
Paciente	X sem	X+14 sem	Valor combinado de título + ELISPOT
14	SD		2
19	PD	PD	2
15	PR	PD	3
3	PR	PD	4
17	PR	PD	5
2	CR	CR	13
7	SD	PD	13
16	PR	PD	13
5	PR	PD	25
12	PR	PD	42
9	SD	PD	103
18	SD	PD	145

Tabla 16b: Análisis integrado de ensayos ELISPOT, de anticuerpos y de proliferación durante el curso temporal de inmunocontrol completo frente a las respuestas clínicas

Respuesta tumoral			
Paciente	X sem	X+14 sem	Valor combinado de S.I. + título + ELISPOT
2	CR	CR	33
17	PR	PD	37
15	PR	PD	44
5	PR	PD	46
7	SD	PD	56
14	SD		60
3	PR	PD	68
19	PD	PD	70
16	PR	PD	78
9	SD	PD	130
12	PR	PD	142
18	SD	PD	181

Las fuertes respuestas inmunitarias en el ensayo IFL se produjeron principalmente después de completarse la quimioterapia. Por lo tanto, es poco probable que la respuesta inmunitaria tenga un impacto beneficioso sobre el tumor en la exploración TC de la semana X y posiblemente tampoco incluso en la X+14.

5 3. Una comparación de las respuestas inmunitarias que se producen en los ensayos FOLFOX e IFL

3.1 Respuestas de anticuerpos

10 Durante el curso temporal de inmunocontrol completo, los títulos medios de anticuerpos específicos de 5T4 (hasta la fecha) fueron similares para ambos ensayos, 76 para TV2-IFL y 100 para TV2-FOLFOX (tabla 17). Sin embargo, la cinética de las respuestas de anticuerpos fue diferente para cada ensayo. En el ensayo IFL, las respuestas de anticuerpos fueron muy bajas durante la quimioterapia (un título medio de 7 entre las semanas 4 y 19) pero aumentaron drásticamente (>20 veces) después de completarse la quimioterapia (un título medio de 158 entre las semanas X+2 y X+14). En contraste, los títulos medios de anticuerpos en el ensayo FOLFOX fueron altas durante la quimioterapia (título medio de 103) y aumentaron moderadamente después de completarse la quimioterapia (título medio de 115). En ambos ensayos, los títulos medios de anticuerpos disminuyeron entre las semanas 19 y X+2. Se observaron aumentos en el título de anticuerpos después de las 6 vacunaciones en ambos ensayos.

20 Tabla 17: Una comparación de las respuestas de anticuerpos específicos de 5T4 entre los ensayos TV2-IFL y FOLFOX

Medición de respuestas de anticuerpos específicos de 5T4	Respuesta media	
	FOLFOX (n=11)	IFL (n=12)
Respuesta media de Ab contra 5T4 (antes de TroVax)	<10	<10
Respuesta media de Ab contra 5T4 (todos los puntos temporales)	100	76,1
Respuesta media de Ab contra 5T4 (durante quimioterapia)	102,6	7,4
Respuesta media de Ab contra 5T4 (después de quimioterapia)	115,1	158,3

3.1.1 Análisis estadístico de respuestas de anticuerpos específicas de 5T4 detectadas en los ensayos de TV2-IFL y FOLFOX

25 Se emprendió un análisis estadístico de los datos en una base "por ensayo" usando Wilcoxon. Los resultados son los siguientes:

(a) Respuesta durante quimioterapia (semanas 2 a 19)

IFL: valor medio (título) = 0,44 (<10)  
 30 FOLFOX: valor medio (título) = 1,73 (17)  
 Diferencia entre los grupos P = 0,011 (P <2 %)  
 Conclusión: Hay una diferencia significativa en los títulos de anticuerpos detectados en los grupos IFL y FOLFOX durante el periodo en que los pacientes reciben quimioterapia

(b) Respuesta después de quimioterapia (semanas X+2 a X+10)

IFL: valor medio (título) = 1,85 (18)  
 35 FOLFOX: valor medio (título) = 2,29 (24)  
 Diferencia entre los grupos P = 0,53 (NS)  
 Conclusión: No hay diferencia significativa en los títulos de anticuerpos detectados en los grupos IFL y FOLFOX durante el periodo después de completarse la quimioterapia

(c) Cambio de durante a después de la quimioterapia (semanas 2 - 19 frente a X+2 - X+10)

IFL: valor medio (título) durante = 0,44 (<10) después = 1,85 (18) cambio = 1,41(x2,7) P = 0,020 (P <2 %)  
 40 FOLFOX: valor medio (título) durante = 1,73 (17) después = 2,29 (24) cambio = 0,56 (x1,5) P = 0,16 (NS)  
 Conclusión: Hay una diferencia significativa en los títulos de anticuerpos detectados en el grupo IFL durante la quimioterapia en comparación con después de la quimioterapia. En contraste, no hay diferencia significativa en el grupo FOLFOX.

(d) Cambio de la semana 19 a la semana X+2

IFL:  
 50 valor medio (título) semana 19 = 0,67 (<10)  
 valor medio (título) semana X+2 = 0,00 (<10)  
 cambio = -0,67 (x0,62) P = 0,13 (NS)

55

FOLFOX:

- 5 valor medio (título) semana 19 = 2,27 (24)
- valor medio (título) semana X+2 = 0,36 (<10)
- cambio = -1,91 (x0,27) P = 0,016 (P <2 %)
- diferencia entre los grupos P = 0,10 (NS)

10 Conclusión: Entre las semanas 19 y X+2 no hay diferencia significativa en los títulos de anticuerpos detectados en el grupo IFL, aunque una disminución significativa en los títulos FOLFOX.

### 3.2 Respuestas proliferativas

15 Las respuestas proliferativas específicas de 5T4 fueron de mayor magnitud en el ensayo FOLFOX en comparación con el ensayo IFL (tabla 18). En ambos ensayos, las respuestas proliferativas fueron de mayor magnitud después de completarse la quimioterapia. El diferencial fue más profundo entre las semanas 19 y X+2 como se ilustra se las figuras 3a-b. Sin embargo, dichas diferencias no fueron evidentes cuando se analizaron las respuestas a MVA o TT (figuras 3c-3f).

20 Tabla 18: Una comparación de las respuestas proliferativas específicas de 5T4 entre los ensayos TV2-IFL y FOLFOX

Medición de la respuesta inmunitaria específica de 5T4	Respuesta media	
	FOLFOX (n=11)	IFL (n=12)
Respuesta media proliferativa a 5T4 (antes de TroVax)	3,6	4,9
Respuesta media proliferativa a 5T4 (todos los puntos temporales)	6,8	4,9
Respuesta media proliferativa a 5T4 (durante quimioterapia)	4,3	3,8
Respuesta media proliferativa a 5T4 (después de quimioterapia)	10,5	5,8

25 La fig. 4a muestra las respuestas a 5T4 en TV2-IFL, la fig. 4b muestra las respuestas a 5T4 en TV2-FOLFOX, la fig. 4c muestra las respuestas a MVA en TV2-IFL, la fig. 4d muestra las respuestas a MVA en TV2-FOLFOX, la fig. 4e muestra las respuestas a TT en TV2-IFL y la fig. 4f muestra las respuestas a TT en TV2-FOLFOX.

#### 3.2.1 Análisis estadístico de respuestas proliferativas específicas de 5T4 detectadas en ensayos TV2-IFL y FOLFOX

30 Se emprendió un análisis estadístico (Wilcoxon) para evaluar la significación de las respuestas inmunitaria específicas de antígeno detectadas en ensayos TV2-FOLFOX e IFL.

(a) cambiar las respuestas proliferativas desde la medida inicial hasta después de la vacunación (semanas -2 y 0 frente a semanas 2 a semana X+14 (IFL) o semana X+10 (FOLFOX))

- 35 **5T4**
- IFL: log medio (S.I.) basal = 1,05 (2,9) post-v = 1,02 (2,8) cambio = -0,03 (x0,97) P = 0,96 (NS)
- FOLFOX: log medio (S.I.) basal = 0,69 (2,0) post-v = 1,25 (3,5) cambio = 0,56 (x1,8) P = 0,10 (NS)

**MVA**

- 40 IFL: log medio (S.I.) basal = 0,17 (1,2) post-v = 1,62 (5,1) cambio = 1,45 (x4,3) P = 0,002 (P <0,5 %)
- FOLFOX: log medio (S.I.) basal = 0,18 (1,2) post-v = 2,37 (10) cambio = 2,19 (x8,9) P = 0,002 (P <0,5 %)

**TT**

- 45 IFL: log medio (S.I.) basal = 0,90 (2,5) post-v = 1,06 (2,9) cambio = 0,17 (x1,2) P = 0,52 (NS)
- FOLFOX: log medio (S.I.) basal = 1,42 (4,1) post-v = 1,50 (4,5) cambio = 0,08 (x1,1) P = 1,00 (NS)
- Conclusión: Las respuestas proliferativas a 5T4 y TT no muestran cambio significativo desde la medida inicial hasta después de la vacunación con TroVax. Sin embargo, las respuestas a MVA muestran un aumento significativo.

(b) cambio en las respuestas proliferativas desde la medida inicial a durante la quimioterapia (semanas -2 y 0 frente a semanas 4 a semana 19)

- 50 **5T4**
- IFL: log medio (S.I.) basal = 1,05 (2,9) durante = 0,76 (2,2) cambio = -0,29 (x0,75) P = 0,11 (NS)
- FOLFOX: log medio (S.I.) basal = 0,69 (2,0) durante = 0,94 (2,6) cambio = 0,25 (x1,3) P = 0,64 (NS)

**MVA**

- 55 IFL: log medio (S.I.) basal = 0,17 (1,2) durante = 1,17 (3,2) cambio = 1,00 (x2,7) P = 0,03 (P <5 %)
- FOLFOX: log medio (S.I.) basal = 0,18 (1,2) durante = 1,99 (7,3) cambio = 1,81 (x6,1) P = 0,003 (P <0,5 %)

**TT**

- IFL: log medio (S.I.) basal = 0,90 (2,5) durante = 0,98 (2,7) cambio = 0,09 (x1,1) P = 0,79 (NS)
- FOLFOX: log medio (S.I.) basal = 1,42 (4,1) durante = 1,47 (4,3) cambio = 0,04 (x1,04) P = 0,89 (NS)

Conclusión: Las respuestas proliferativas a 5T4 y TT no muestran cambio significativo desde la medida inicial hasta los puntos temporales posteriores a la vacunación con TroVax que se producen durante quimioterapia. Sin embargo, las respuestas a MVA muestran un aumento significativo.

5 (c) cambio en las respuestas proliferativas desde la medida inicial hasta después de la quimioterapia (semanas -2 y 0 frente a semanas 2 a semana X+14 (IFL) o semana X+10 (FOLFOX))

5T4

IFL: log medio (S.I.) basal = 1,05 (2,9) después = 1,18 (3,3) cambio = 0,13 (x1,1) P = 0,79 (NS)

FOLFOX: log medio (S.I.) basal = 0,69 (2,0) después = 1,82 (6,2) cambio = 1,13 (x3,1) P = 0,04 (P <5 %)

10 MVA

IFL: log medio (S.I.) basal = 0,17 (1,2) después = 2,05 (7,8) cambio = 1,88 (x6,6) P = 0,001 (P <0,2 %)

FOLFOX: log medio (S.I.) basal = 0,18 (1,2) después = 2,84 (17) cambio = 2,66 (x14) P = 0,003 (P <0,5 %)

TT

IFL: log medio (S.I.) basal = 0,90 (2,5) después = 1,16 (3,2) cambio = 0,27 (x1,3) P = 0,27 (NS)

15 FOLFOX: log medio (S.I.) basal = 1,42 (4,1) después = 1,58 (4,9) cambio = 0,16 (x1,2) P = 0,90 (NS)

Conclusión: Las respuestas proliferativas a 5T4 (IFL solamente) y TT no muestran cambio significativo desde la medida inicial hasta los puntos temporales posteriores a la vacunación con TroVax que se producen después de completarse la quimioterapia. Sin embargo, las respuestas a MVA y 5T4 (FOLFOX solamente) muestran un aumento significativo.

20

(d) cambio en las respuestas proliferativas entre las semanas 19 y X+2

5T4

IFL: log medio (S.I.) semana 19 = 0,33 (1,4) semana X+2 = 1,49 (4,4) cambio = 1,16 (x3,2) P = 0,04 (P <5 %)

FOLFOX: log medio (S.I.) semana 19 = 0,75 (2,1) semana X+2 = 1,64 (5,2) cambio = 0,89 (x2,4) P = 0,04 (P <5 %)

25

MVA

IFL: log medio (S.I.) semana 19 = 1,24 (3,5) semana X+2 = 1,37 (3,9) cambio = 0,13 (x1,1) P = 0,68 (NS)

FOLFOX: log medio (S.I.) semana 19 = 2,02 (7,5) semana X+2 = 2,33 (10) cambio = 0,31 (x1,4) P = 0,64 (NS)

TT

IFL: log medio (S.I.) semana 19 = 1,42 (4,1) semana X+2 = 1,13 (3,1) cambio = -0,29 (x0,75) P = 0,34 (NS)

30

FOLFOX: log medio (S.I.) semana 19 = 1,48 (4,4) semana X+2 = 1,47 (4,3) cambio = -0,02 (x0,98) P = 0,90 (NS)

Conclusión: Las respuestas proliferativas a MVA y TT no muestran cambio significativo desde la semana 19 a X+2. Sin embargo, las respuestas a 5T4 muestran un aumento significativo.

35 Sumario

Las respuestas de anticuerpos en el grupo IFL se suprimen por el régimen quimioterapéutico en comparación con el grupo FOLFOX. Sin embargo, en ambos grupos puede observarse un efecto de refuerzo en muchos pacientes después de la 5.<sup>a</sup> y 6.<sup>a</sup> vacunación - esto se observó de forma poco frecuente en el ensayo TV1 previo. De hecho, los títulos medios de anticuerpos contra 5T4 se reforzaron después de cada una de las 6 vacunaciones en los ensayos tanto IFL como FOLFOX.

40

A nivel celular, las respuestas medias proliferativas tanto a 5T4 como a TT no mostraron aumento significativo después de la vacunación con TroVax en comparación con los niveles basales. Sin embargo, las respuestas medias proliferativas detectadas después de completarse la quimioterapia estaban significativamente elevadas en comparación con la medida inicial en el ensayo FOLFOX. El aumento en las respuestas proliferativas a 5T4 entre las semanas 19 y X+2 es intrigante. Las respuestas a 5T4, pero no a MVA o TT se potenciaron significativamente entre estos dos puntos temporales a pesar del hecho de que no se produjeron vacunaciones dentro de este periodo (aproximadamente 8 semanas). Un análisis de los niveles de células T reguladoras en la periferia puede proporcionar un conocimiento adicional de esta observación.

50

#### 4. Células T reguladoras

Un subconjunto de células T se mencionó originalmente como células T supresoras en la década de 1970 debido a su capacidad de inducir tolerancia y ahora se describen como células T reguladoras (Gershon y Kondo, 1970. *Immunology* 18:723-737; Gershon 1975. *Transplant Rev.* 26:170-185; Taams y Akbar, 2005. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 293:115-131). Las células T reguladoras (Tr) desempeñan una función esencial en la inducción y mantenimiento de la tolerancia tanto a antígenos foráneos como a autoantígenos. Se han descrito diferentes tipos de células reguladoras/supresoras, incluyendo células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, células TH3 que producen TGF-β, células Tr1 que producen IL10 y células T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (para revisiones véase, Levings y Roncarolo, 2005. *CTMI.* 292:303-326; Huehn, Siegmund y Hamann, 2005. *CITR* 293: 89-114; Faria y Weiner, 2005 *Immunol. Rev.* 206:232-259; Weiner, 2001 *Immunol. Rev.* 182:207-214; Weiner *et al.*, 2001. *Microbes Infect.* 3: 947-954; Roncarolo *et al.*, 2001 *Immunol. Rev.* 182: 68-79).

60

4.1. Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>: Introducción

Estas células T reguladoras pueden detectarse en sangre periférica humana y son capaces de suprimir las células T vecinas de una manera no específica de antígeno y dependiente de contacto. Estas Treg se caracterizan por la expresión de altos niveles constitutivos de la cadena- $\alpha$  (CD25) de receptor de IL2 y a menudo se mencionan como Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi+</sup>. También expresan altos niveles de factor de transcripción intracelular FoxP3 y otros receptores celulares incluyendo CTLA-4, GITR (miembro 18 de la superfamilia de TGFR inducido por glucocorticoides), CD45RO, CD45RB, ICOS y neuropilina 1. En contraste con las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> murinas, los equivalentes humanos no expresan altos niveles de la integrina CD103. Como todos los marcadores que pueden usarse para identificar células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pueden expresarse por otros subconjuntos de células T, aunque en diversos niveles y combinaciones, no hay un único marcador que defina una célula Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

El mecanismo o mecanismos moleculares precisos por los cuales las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ejercen su función supresora sigue estando sin definir, pero requiere el contacto celular y no depende de las propias Treg que secretan citoquinas (Takahashi *et al.*, 1998 *Int. Immunol.* 10:1969-1980; Thorton y Shevach 1998. *J. Exp. Med.* 188:287-296). Las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pueden ejercer sus efectos supresores sobre células T, células B, células dendríticas, células NK (Shimizu *et al.*, 1999. *J. Immunol.* 163: 5211-5218), neutrófilos, monocitos y macrófagos (Maloy *et al.*, 2003. *J. Exp. Med.* 197: 111-119; Taams *et al.*, 2005. *Hum. Immunol.* 66: 222-230).

Las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pueden inhibir la inducción y las actividades efectoras tanto de CD4<sup>+</sup> como de CD8<sup>+</sup> (para una revisión véase, Boehmer 2005. *Nat. Immunol.*6:338-344). Los modos de acción de estas Treg parecen variar y pueden incluir el control de la secreción de citoquinas (por ejemplo, IL2 e IFN $\gamma$ ) desde las células T efectoras, la supresión de la eliminación citolítica por células T CD8<sup>+</sup> (Chen *et al.*, PNAS 102:419-424), la interferencia con la señalización del receptor, la eliminación de células T efectoras por un mecanismo dependiente de perforina (Piccirillo y Shevach, 2004. *Semin. Immunol.* 16:81-88) y la inducción de células T secretoras de IL10 y TGF- $\beta$  (Jonuleit *et al.*, 2002 *J. Exp. Med.* 196:255-260). Algunas de las células posteriores parecen ser Treg Tr1 (Levings *et al.*, 2002 *Int. Arch. Allergy Immunol.* 129: 262-276) lo que sugiere que las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> promueven la diferenciación de otras Treg.

Las actividades de las células B también pueden regularse por Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Se ha descubierto que estas Treg suprimen la maduración de respuestas de autoanticuerpos (Fields *et al.*, 2005 *J. Immunol.* 175:4255-4264), la activación y secreción de anticuerpos de las células B (Sakaguchi *et al.*, 1995. *J. Immunol.* 155:1151-1164; Bystry *et al.*, 2001. *Nat. Immunol.* 2:1126-1132). También se ha informado de la eliminación de células B implicadas en la presentación de antígenos por Treg a través de interacciones de Fas/FasL (Janssens *et al.*, 2003 *J. Immunol.* 171:4604-4612).

Las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pueden administrar sus efectos supresores sobre células vecinas regulando las acciones de las células presentadoras de antígeno. Las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pueden limitar la capacidad estimuladora de las APC regulando negativamente la expresión en la superficie celular de las moléculas coestimuladoras tales como CD80 y CD86 y/o evitando la madurez (Cederborn *et al.*, 2000. *Eur. J. Immunol.* 30:1538-1543; Grundstorm *et al.*, 2003. *J. Immunol.* 170:5008-5017; Taams *et al.*, 2005. *Hum. Immunol.* 66:222-230; Misra *et al.*, 2004. *J. Immunol.* 172:4676-4680). En otro estudio, las Treg suprimían la maduración de DC mieloides, tanto bloqueando la regulación positiva de las moléculas coestimuladoras como inhibiendo la secreción de citoquinas, que produjo una escasa capacidad de presentación de antígeno (Hout *et al.*, 2006. *J. Immunol.* 176:5293-5298). Sin embargo, las DC plasmocitoides, que favorecen el desarrollo de TH2, eran insensibles a las acciones de las Treg. También se ha descrito la escasa presentación de antígeno por los monocitos (Taams *et al.*, 2005. *Hum. Immunol.* 66:222-230) y las DC derivadas de monocitos dirigida en presencia de Treg (Misra *et al.*, 2004. *J. Immunol.* 172:4676-4680). Las Treg también pueden ejercer un mecanismo de retroalimentación negativo sobre las respuestas de tipo TH1 inducidas por DC maduras, amortiguando de ese modo el desarrollo de respuestas TH1 (Oldenhove *et al.*, 2003. *J. Exp. Med.* 198:259-266). Además, las Treg pueden regular la capacidad de las DC de secretar indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), una enzima que cataboliza la reducción del aminoácido esencial triptófano y potencia la producción de quinurenina que inhibe la proliferación de células T y promueve la apoptosis preferente de las células T activadas (Terness *et al.*, 2002. *J. Exp. Med.* 196:447-457). Niveles altos de IDO provocan la privación en células T de triptófano y la posterior apoptosis (Fallarino *et al.*, 2003. *Nat. Immunol.* 4:1206-1212). También se ha demostrado que las Treg restringen el contacto entre las DC y las células auxiliares CD4<sup>+</sup> (Tand y Krummel, 2006. *Curr. Opin. Immun.* 18: 496-502).

Las evidencias sugieren que las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> surgen del timo y pueden diferenciarse a partir de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en la periferia (para una revisión véase, Siegmund y Hamann, 2005. *CTMI* 293:89-114; Taams y Akbar, 2005 *CTMI* 293: 115-131; Akbar *et al.*, 2003 *Immunology* 109:319-325; Bluestone y Abbas, 2003). La expresión de FoxP3 es crítica para el desarrollo y la función de la Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (para una revisión véase, Nomura y Sakaguchi, 2005. *CTMI* 293:287-302). Además, numerosos estudios demuestran que se requiere una diversidad de interacciones entre las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y las APC para el desarrollo y la función de las Treg (Rutella y Lemoli, 2004. *Immunol. Lett.* 94:11-26; Zheng *et al.*, 2004 *J.I.* 173:2428; Herman *et al.*, 2004. *J. Exp. Med.* 199:1479; Min *et al.*, 2003. *J. Immunol.* 170:1304-1312; Kumanogoh *et al.*, 2001. *J.I.* 166:353; Salomom *et al.*, 2000). Por ejemplo, las Treg no logran desarrollarse en ratones que carecen de interacciones de CD28/B7. Sin embargo, las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> también pueden afectar a la diferenciación de las DC (Min *et al.*, 2003. *J. Immunol.* 170:1304-1312).

Se cree que el repertorio de antígenos de las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> es tan amplio como el de las células T vírgenes, posibilitando el reconocimiento de una amplia serie de autoantígenos y también antígenos no propios, permitiendo por tanto el control de diversas respuestas inmunitarias. Para ejercer su capacidad supresora, se requiere la activación de su TCR. Sin embargo, una vez activadas pueden suprimir el antígeno de forma no específica (Jonuleit *et al.*, 1999. *J. Immunol.* 193:1285; Thornton y Shevach, 2000. *J. Immunol.* 164: 183-190; Leving, Sangregorio y Roncarolo, 2001 *J. Exp. Med.* 193:1295; Yamagiwa *et al.*, 2001 *J. Immunol.* 166:7282). Después de la estimulación mediada por TCR, las mismas Treg suprimían la activación de las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> vírgenes activadas por aloantígenos y mitógenos (Levings, 2001). Las evidencias también sugieren que se requiere antígeno periférico para el desarrollo, mantenimiento o expansión de algunas Treg (Mastellar, Tang y Bluestone 2006. *Semin. Immunol.* 18:103-110).

4.2. Análisis de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en PBMC de pacientes TV2

Se estimaron los niveles de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> tiñendo las PBMC con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25, sincronizando las células CD4<sup>+</sup> y estableciendo un cuadrante estricto para incluir solamente las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi+</sup> como lectura positiva. Se usó el mismo cuadrante para evaluar a todos los pacientes. Se muestra un ejemplo de tinción en la figura 5.

También se realizó tinción intracelular para confirmar que estas células expresaban el factor de transcripción FoxP3 (figura 6).

En la bibliografía, generalmente está aceptado que los niveles de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> están representados como un porcentaje de la población total de células T CD4<sup>+</sup>. Aunque hay algo de debate, las células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> representan hasta un 2 a un 10 % como máximo de las células T CD4<sup>+</sup> presentes en la sangre periférica de individuos sanos (Maloy y Powrie 2001. *Nat. Immunol.* 2:816-822; Sakaguchi *et al.*, 2001. *Immunol. Rev.* 182: 18-32; Gavin y Rudensky, 2003. *Curr. Opin. Immunol.* 15:690-696; Piccirillo y Shevach, 2004. *Seim. Immunol.* 16:81-88 Mastellar, Tang y Bluestone 2006. *Semin. Immunol.* 18:103-110).

Los datos para los pacientes TV-IFL y FOLFOX se tabulan en la tabla 1. Los pacientes parecían comprender niveles normales de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (hasta un 2-10 %) dentro de sus células T CD4<sup>+</sup> de sangre periférica antes de la quimioterapia.

Tabla 19: Porcentaje de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en la población total de células T CD4<sup>+</sup>  
Las medias para la fase del ensayo se calculan como el promedio de cada punto temporal individual.

N.º de paciente	Puntos temporales (semanas)														
	-2	0	2	4	6	11	13	17	19	X+2	X+4	X+6	X+8	X+10	X+14
TV2-002	0,99			1,22		0,66		0,60		0,77					0,87
TV2-003	1,20		0,64			0,67			0,54	0,43					2,29
TV2-012	0,67			0,53		0,29			0,27	0,34				0,99	
TV2-014		2,10		2,16					0,98	1,84					2,27
TV2-016	1,34			2,41		0,59			1,06	0,95					1,61
TV2-018	0,87			1,27		0,55			0,14	0,37					0,63
TV2-019		3,68		3,80			3,06		2,90	1,98					3,09
Media de IFL	1,01	2,89	0,64	1,90		0,55	3,06	0,60	0,98	0,95				0,99	1,79
Media de IFL durante la fase de ensayo	1,55		1,72		0,95				1,32						
TV2-101		2,63			1,90		1,25		1,62	1,73			2,85		
TV2-104	1,43			0,81			0,69		1,02	0,75			0,85		
TV2-107		2,44		1,85		2,26			2,75	2,41		3,33			
TV2-108					2,38	0,86	1,59		1,37	2,44			1,46		
TV2-113		3,27		2,54		1,31		2,59		2,17			2,33		
TV2-117			4,40				3,01		3,62	4,04		5,02		5,69	
Media de FOLFOX	1,43	2,78	4,40	1,73	2,14	1,48	1,64	2,59	2,08	2,26		4,18	1,87	5,69	
Media de FOLFOX durante la fase de ensayo	2,44		2,40		1,88				2,70						
	Antes del ensayo		Antes de quimioterapia		Quimioterapia				Después de quimioterapia						

Tanto el tratamiento de IFL como de FOLFOX produjo la reducción de Treg

Para los pacientes IFL (n=7) las Treg disminuyeron durante la quimioterapia en el intervalo de un 15-83 % en comparación con los puntos temporales antes de la quimioterapia. Para los pacientes FOLFOX (n=5), el intervalo observado fue de 31-52 % (nota: el paciente TV2-108 se excluyó ya que no había punto temporal examinado antes de la quimioterapia).

Después de la quimioterapia, los niveles de Treg aumentaron en comparación con la fase de quimioterapia, lo que sugiere que los efectos tanto de IFL como de FOLFOX son transitorios. En algunos pacientes, los niveles de Treg volvieron a los niveles previos al ensayo.

Las medias del porcentaje de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en las poblaciones CD4<sup>+</sup> durante diversas fases del ensayo se han representado en la figura 3. En general, el grupo de pacientes TV2-FOLFOX presentó niveles mayores de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que el grupo de pacientes TV2-IFL investigados. Aunque los niveles de Treg fueron mayores en los pacientes TV2-FOLFOX (pero dentro del intervalo esperado para individuos sanos), que en los pacientes TV2-IFL, los cambios medios que se observaron durante todo el ensayo en esta población de células son similares para ambos ensayos. Las Treg disminuyeron durante la quimioterapia en aproximadamente un 30 % en comparación con la fase previa al ensayo. Después de la quimioterapia, los niveles de estas células aumentaron, pero permanecieron dentro del intervalo normal esperado de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

El análisis estadístico de los datos reveló que el porcentaje de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en la población de células T CD4<sup>+</sup> disminuía significativamente durante la quimioterapia en comparación con antes de la quimioterapia en ambos ensayos. La media geométrica de Treg disminuyó de 1,36 antes de la quimioterapia hasta 0,68 durante el tratamiento con IFL (p=0,001). La media geométrica de Treg disminuyó de 2,31 antes de la quimioterapia a 1,75 durante el tratamiento con FOLFOX (p=0,0093).

Sin embargo, los niveles de Treg después de la quimioterapia no eran significativamente diferentes a los de antes de la quimioterapia. La media geométrica de las Treg después de la quimioterapia fue 1,06 (p=0,2629) y 2,17 (p=0,4923) para los ensayos IFL y FOLFOX, respectivamente. Estos datos implican que después de la reducción de las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> durante el tratamiento con IFL y FOLFOX, los niveles de Treg pueden aumentar. Medidos por este estudio, los niveles de Treg se recuperaban en los pacientes IFL y FOLFOX en 14 y 10 semanas después de la quimioterapia, respectivamente.

#### 4.3. Conclusiones

- Tanto el tratamiento con IFL como el tratamiento con FOLFOX producían una reducción de las Treg.
- Aunque los niveles son ligeramente mayores en el grupo FOLFOX de pacientes, en el grupo IFL el porcentaje de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en la población total de células T CD4<sup>+</sup> disminuía en un 30 % durante la quimioterapia en ambos ensayos TV2.

#### 4.4. Exposición

Los pacientes con una gama de tipos diferentes de cáncer han demostrado un aumento en las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en sangre periférica, ganglios linfáticos, fluido ascítico tumoral y tejido tumoral (para una revisión véase, Nomura y Sakaguchi, 2005 Curr. Top. Microbiol. Immunol. 293:287). También se ha demostrado que la carga tumoral creciente está asociada con un aumento en la población de Treg (Liyanage *et al.*, 2002. J. Immunol. 169:2756-2761; Woo *et al.*, 2001. Cancer Res. 61:4766-4772). En este estudio de pacientes TV2, las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> parecían estar presentes en la sangre periférica de la mayoría de los pacientes dentro del intervalo normal esperado (hasta un 2-10 % de la sangre periférica total). Sin embargo, este estudio no aborda la probabilidad de que las Treg hayan aumentado en las cercanías del tumor o tumores en estos pacientes, suprimiendo localmente la capacidad de otras células inmunitarias de iniciar o sostener una respuesta contra uno o más antígenos asociados a tumor o autoantígenos expresados inapropiadamente.

Ambas quimioterapias IFL y FOLFOX produjeron una disminución (30 %) en el porcentaje de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de la población total de células CD4<sup>+</sup> en sangre periferia cuando se medían una semana después de una dosis de quimioterapia. Se han descrito otros varios tratamientos de quimioterapia donde se observaron niveles disminuidos de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en sangre periférica humana incluyendo ciclofosfamida (Ghirighelli *et al.*, 2004; Eur. J. Immunol. 34: 336-344; Lutsiak *et al.*, 2005. Blood 105:2862-2868), GOLF (gemcitabina [GEM], oxaliplatino, LF y FU; Correale *et al.*, 2005. J. Clin. Oncol. 23:147-162) y temozolomida (Su *et al.*, 2004. J. Clin. Oncol. 4:610-616). ONTAK (conjugado de toxina diftérica con IL2 recombinante DAB389IL-2) también ha demostrado reducir las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de las PBMC humanas y permite que DC transfectadas con ARN sensilicen/refuercen las respuestas inmunitarias (Dannull *et al.*, 2005 J. Clin. Invest. 115: 3623-3633).

En este estudio de pacientes TV2, la disminución en las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> observada en la sangre periférica podría reflejar una pérdida debido a apoptosis/muerte celular, o un cambio en la localización mediante el cual las Treg de

sangre periférica se han reclutado a tejidos o ganglios linfáticos. Como estas células administran sus efectos supresores a través del contacto celular, deben migrar a los sitios apropiados. Dentro de los tejidos linfoides secundarios, las Treg deben estar presentes para suprimir la sensibilización de las respuestas inmunitarias y las respuestas de memoria. Dentro de los sitios inflamatorios, las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> deben migrar para impedir potencialmente una diversidad de posibles reacciones inmunitarias.

De forma más importante, la pérdida de la función de las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> puede ser el factor crucial en lugar de la pérdida de cantidades absolutas de Treg, para que tengan la capacidad de iniciar o sostener las respuestas inmunitarias contra autoantígenos y antígenos asociados a tumores (Coulie y Connerotte, 2005. *Curr. Opin. Immunol.* 17:320-325). El mecanismo por el cual la ciclofosfamida (CY) es capaz de potenciar las respuestas inmunitarias afectando a las Treg se ha dilucidado recientemente (Lutsiak *et al.*, 2005. *Blood* 105:2862-2868). No solamente disminuyen las cantidades de Treg, CY inhibe su capacidad supresora aumentando la apoptosis, disminuyendo la proliferación homeostática. CY también altera la expresión génica y regula negativamente GITR y FoxP3. Los efectos de CY sobre las Treg son transitorias, por lo cual las cantidades absolutas de Treg vuelven a los niveles previos al tratamiento 10 días después de la exposición a CY. La disminución transitoria de las Treg puede ser esencial para una inmunoterapia satisfactoria, manteniendo al mismo tiempo alguna defensa contra la autoinmunidad. También sería interesante determinar si IFL y FOLFOX afectan a la función de las Treg de modos similares o diferentes.

Los inhibidores de moléculas implicadas en la diferenciación, maduración y mantenimiento de las células Treg, tales como FoxP3, pueden explotarse para potenciar las respuestas inmunitarias contra un antígeno tumoral. Los inhibidores de FoxP3 incluyen el tratamiento antisentido de su ARNm (Veldman *et al.*, 2006. *J. Immunol.* 176:3215-3222) y factores que alteran su transcripción a través del factor de transcripción NFAT, tal como ciclosporina A (Mantel *et al.*, 2006 *J. Immunol.* 3593-360). Las interacciones de la proteína FoxP3 con los genes diana también implica NFAT (Wu *et al.*, 2006. *Cell* 126:375-387). La dopamina también ha demostrado inhibir la actividad supresora de Treg (Kipnis *et al.* 2004 *J. Neurosci.* 24:6133-6143).

Aunque la eliminación de las células Treg potencie las respuestas inmunitarias tumorales, la ausencia completa de células Treg no es suficiente para tratar tumores establecidos que expresan autoantígenos (Antony y Restifo, 2002. *J. Immunother.* 25:202; Antony *et al.*, 2005. *J. Immunol* 174:2591-2601). Esto sugiere que la regresión tumoral implica de forma ideal una disminución en las Treg combinada con la generación de células T efectoras. Por tanto, las estrategias que combinan la vacunación con un factor que causa la pérdida de Treg y/o la función de Treg pueden ser ideales para la inmunoterapia de tumores.

El estudio de PBMC congeladas de pacientes TV2 midió solamente un tipo de célula T reguladora, Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Se observó una disminución del 30 % durante la quimioterapia en ambos ensayos. Las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi+</sup> pueden originarse en el timo (Treg naturales) o en la periferia (Treg adaptativas; Bluestone y Abbas, 2003). No existen evidencias que sugieran que las Treg que suprimen las respuestas inmunitarias contra los autoantígenos se generen solamente en el timo o solamente en la periferia. La destrucción de las Treg derivadas del timo puede reducir una disminución de las Treg durante unas pocas semanas antes de que puedan regenerarse a partir de los precursores apropiados de médula ósea.

Apéndice Uno: Demográfica de los pacientes

TV2-FOLFOX

Número de sujeto	Edad (años al entrar en el ensayo)	Género	Raza
101	68	Hombre	Blanca
102	65	Hombre	Blanca
103	65	Hombre	Blanca
104	59	Mujer	Blanca
105	56	Hombre	Blanca
106	54	Mujer	Blanca
107	67	Hombre	Blanca
108	59	Hombre	Blanca
109	66	Hombre	Negra
110	55	Hombre	Blanca
111	65	Mujer	Blanca
112	72	Mujer	Blanca
113	47	Hombre	Asiática
114	56	Mujer	Blanca
115	62	Hombre	Blanca
116	49	Mujer	Blanca
117	51	Hombre	Blanca

ES 2 626 261 T3

TV2-IFL

Número de sujeto	Edad (años al entrar en el ensayo)	Género	Raza
001	60	Mujer	Blanca
002	65	Hombre	Blanca
003	66	Hombre	Blanca
004	55	Hombre	Negra
005	58	Hombre	Blanca
006	66	Hombre	Blanca
007	62	Mujer	Blanca
008	68	Mujer	Blanca
009	64	Mujer	Blanca
010	49	Mujer	Blanca
011	66	Hombre	Blanca
012	64	Hombre	Blanca
013	65	Mujer	Blanca
014	73	Hombre	Blanca
015	46	Hombre	Blanca
016	63	Hombre	Blanca
017	62	Hombre	Blanca
018	61	Hombre	Blanca
019	62	Hombre	Blanca

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un antígeno asociado a tumores 5T4 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer, en el que dicho tratamiento o prevención comprende administrar a un sujeto, de forma secuencial o por separado, un agente o agentes quimioterapéuticos y el antígeno asociado a tumores 5T4, en el que el antígeno asociado a tumores 5T4 se administra cuando el sujeto tiene un recuento reducido de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de al menos un 15 % inferior al recuento de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> determinado antes de administrar el agente quimioterapéutico.
- 10 2. Uso de un agente o agentes quimioterapéuticos en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer, en el que dicho tratamiento o prevención comprende administrar a un sujeto, de forma secuencial o por separado, un agente o agentes quimioterapéuticos y el antígeno asociado a tumores 5T4, en el que el antígeno asociado a tumores 5T4 se administra a un recuento reducido de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de al menos un 15 % inferior que el recuento de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> determinado antes de administrar el agente quimioterapéutico.
- 15 3. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el antígeno asociado a tumores 5T4 se administra como parte de un vector vírico.
- 20 4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el antígeno asociado a tumores 5T4 se proporciona por un vector vírico derivado del virus *vaccinia* modificado de Ankara (MVA) que se ha modificado para que exprese el antígeno asociado a tumores 5T4.
- 25 5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente o agentes quimioterapéuticos se seleccionan de irinotecán, fluorouracilo, leucovorina y oxaliplatino.
- 30 6. Antígeno asociado a tumores 5T4 para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer, en el que dicho tratamiento o prevención comprende administrar a un sujeto, de forma secuencial o por separado, un agente o agentes quimioterapéuticos y el antígeno asociado a tumores 5T4, en el que el antígeno asociado a tumores 5T4 se administra cuando el sujeto tiene un recuento reducido de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de al menos un 15 % inferior al recuento de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> determinado antes de administrar el agente quimioterapéutico.
- 35 7. El antígeno asociado a tumores 5T4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el antígeno asociado a tumores 5T4 se presenta por un vector de expresión vírico.
- 40 8. El antígeno asociado a tumores 5T4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el antígeno asociado a tumores 5T4 se proporciona por un vector vírico derivado del virus de *vaccinia* modificado de Ankara (MVA) que se ha modificado para que exprese el antígeno asociado a tumores 5T4.
- 45 9. El antígeno asociado a tumores 5T4 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el agente o agentes quimioterapéuticos se seleccionan de irinotecán, fluorouracilo, leucovorina y oxaliplatino.
- 50 10. Un agente o agentes quimioterapéuticos para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer, en el que dicho tratamiento o prevención comprende administrar a un sujeto, de forma secuencial o por separado, el agente o agentes quimioterapéuticos y el antígeno asociado a tumores 5T4, en el que el antígeno asociado a tumores 5T4 se administra a un recuento reducido de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de al menos un 15 % inferior al recuento de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> determinado antes de administrar el agente quimioterapéutico.
- 55 11. El agente o agentes quimioterapéuticos para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el antígeno asociado a tumores 5T4 se administra como parte de un vector vírico.
- 60 12. El agente o agentes quimioterapéuticos para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el antígeno asociado a tumores 5T4 se proporciona por un vector vírico derivado del virus *vaccinia* modificado de Ankara (MVA) que se ha modificado para que exprese el antígeno asociado a tumores 5T4.
- 65 13. El agente o agentes quimioterapéuticos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el agente o agentes quimioterapéuticos se seleccionan de irinotecán, fluorouracilo, leucovorina y oxaliplatino.
14. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el antígeno asociado a tumores 5T4 se suministra hasta 6 semanas después de la administración del agente o agentes quimioterapéuticos.
15. El antígeno asociado a tumores 5T4 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que el antígeno asociado a tumores 5T4 se suministra hasta 6 semanas después de la administración del agente o agentes quimioterapéuticos.

16. El agente o agentes quimioterapéuticos para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que el antígeno asociado a tumores 5T4 se suministra hasta 6 semanas después de la administración del agente o agentes quimioterapéuticos.

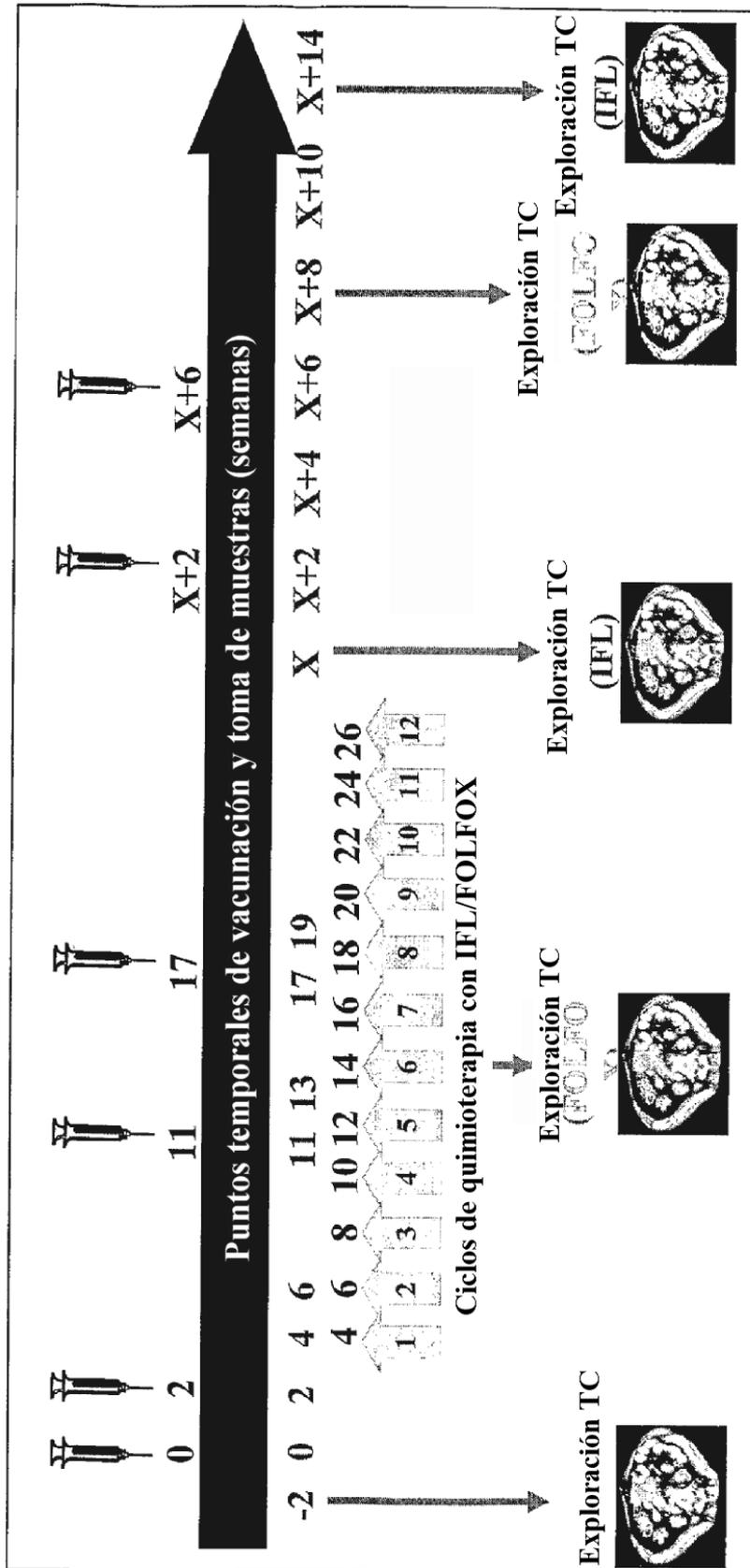


Figura 1

Figura 2

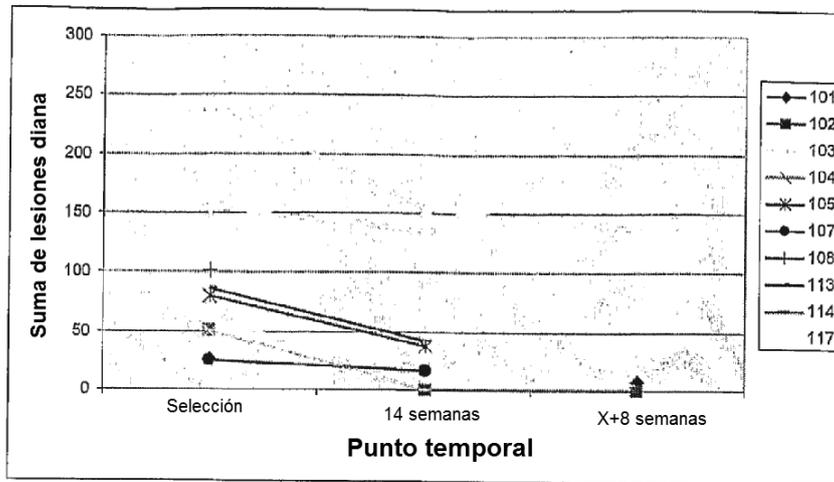


Figura 3

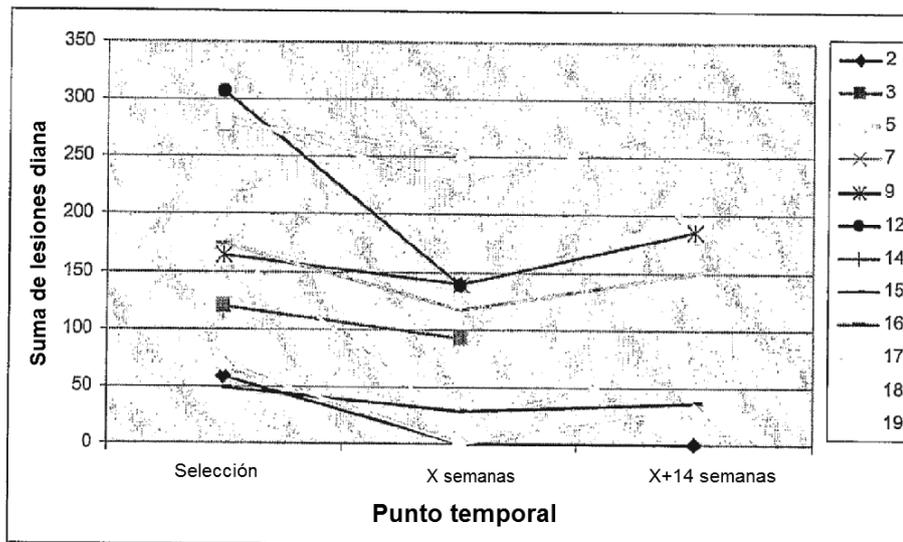


Fig 4a: Respuestas a 5T4 en TV2-IFL

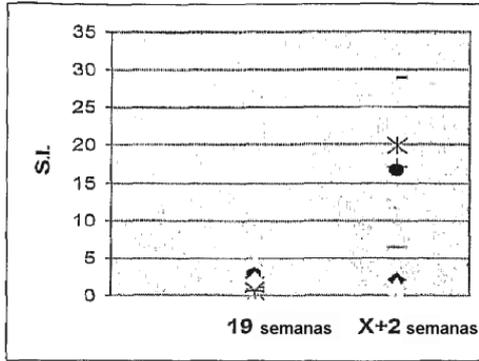


Fig. 4b: Respuestas a 5T4 en TV2-FOLFOX

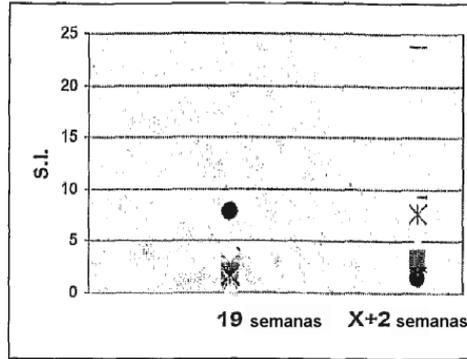


Fig. 4c: Respuestas a MVA en TV2-IFL

4

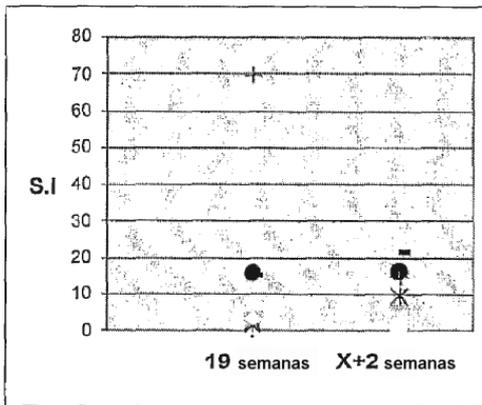


Fig. 4c: Respuestas a MVA en TV2-FOLFOX

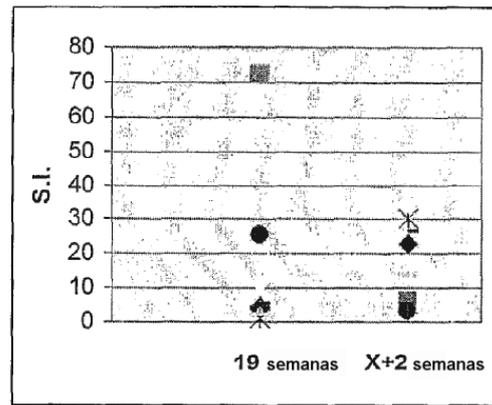


Fig. 4e: Respuestas a TT en TV2-IFL

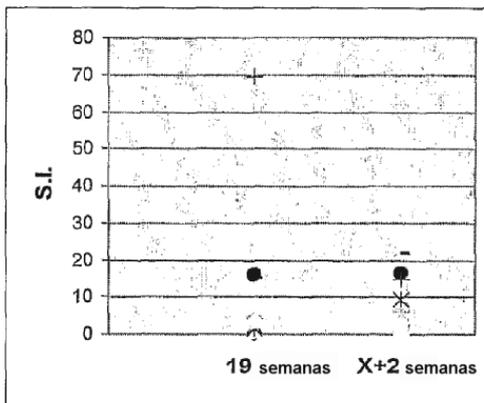


Fig. 4f: Respuestas a TT en TV2-FOLFOX

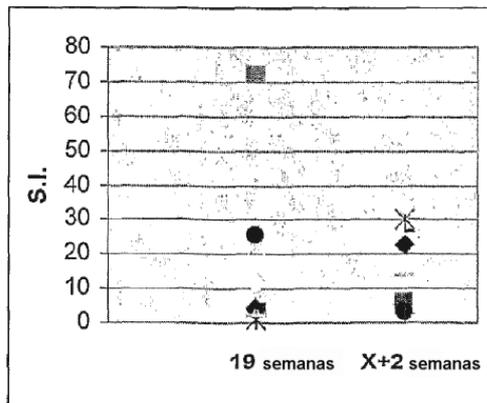


Figura 5

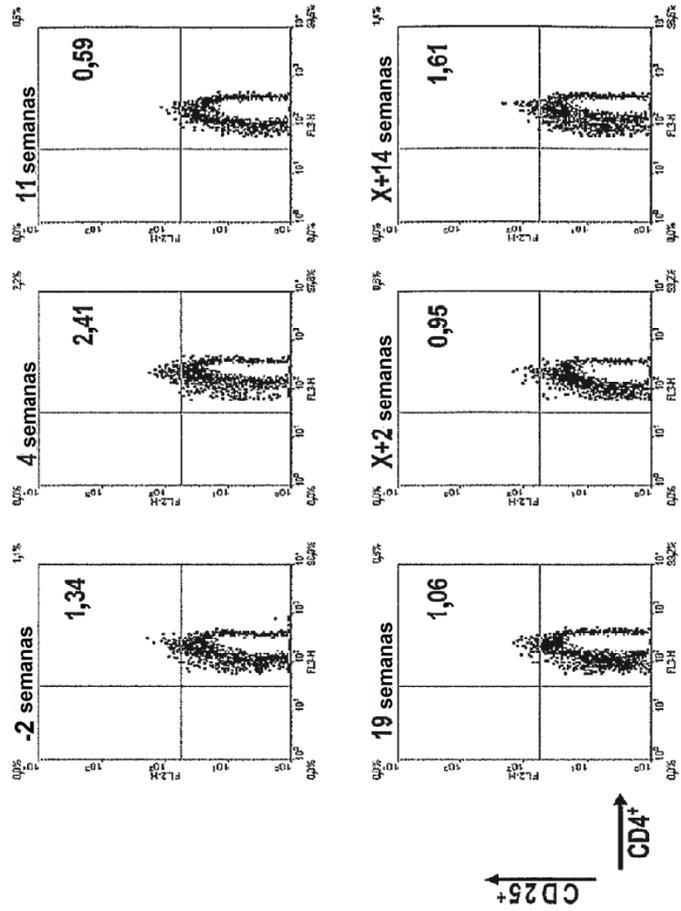


Figura 6

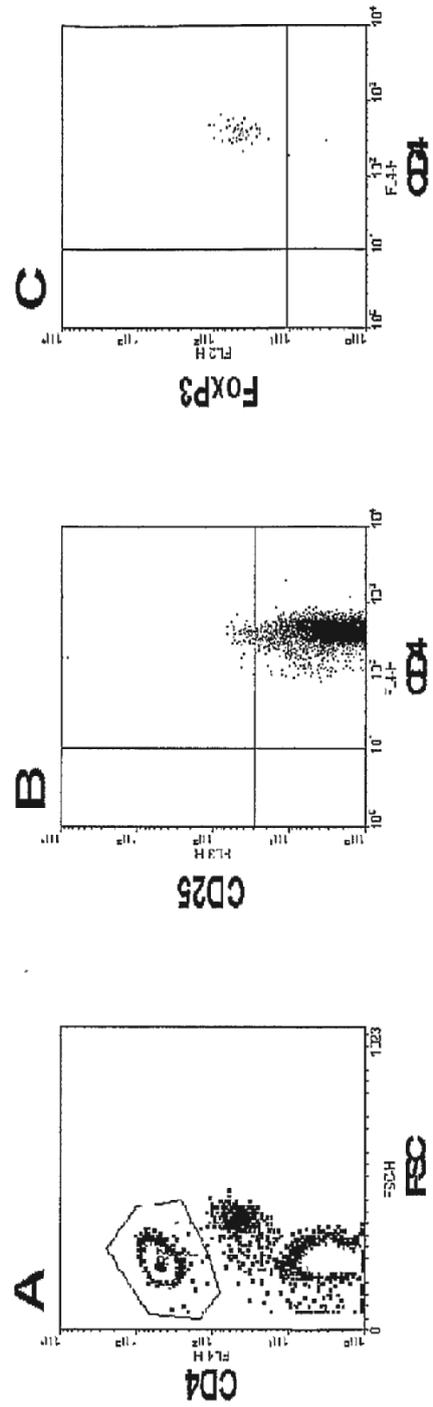


Figura 7

