

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 637**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/18</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/20</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/39</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2012 PCT/US2012/020596**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2012 WO12096870**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2012 E 12701292 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017 EP 2663324**

54 Título: **Terapia de combinación para el tratamiento del cáncer de próstata**

30 Prioridad:  
**13.01.2011 US 201113005993**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.10.2017**

73 Titular/es:  
**ONCBIOMUNE LLC (100.0%)  
17050 Medical Center Drive Physicians Plaza II  
4th Floor  
Baton Rouge, Louisiana 70816, US**

72 Inventor/es:  
**HEAD, JONATHAN, F. y  
ELLIOTT, ROBERT, L.**

74 Agente/Representante:  
**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 637 637 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**

Terapia de combinación para el tratamiento del cáncer de próstata

**5 Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a métodos y composiciones que comprenden proteínas de superficie o excretadas purificadas para el tratamiento del cáncer.

**10 Estado de la técnica**

El Instituto Nacional contra el Cáncer de los EE.UU. estima que más de 10 millones de estadounidenses tienen antecedentes de cáncer. La Sociedad Estadounidense contra el Cáncer ha predicho que se harán más de 1,4 millones de nuevos diagnósticos de cáncer y más de medio millón de estadounidenses morirán de cáncer este año.

15 El cáncer es la segunda causa más común de muerte en los Estados Unidos, solo superado por las enfermedades cardíacas.

Dada la prevalencia de diversas formas de cáncer en los Estados Unidos, importantes investigaciones se centran en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento. Dependiendo del tipo de cáncer y de su fase, las formas actuales de tratamiento normalmente pueden incluir la cirugía, la radiación, la quimioterapia y/o tratamientos hormonales.

En los últimos años, los esfuerzos de investigación también se han centrado en el desarrollo de vacunas contra el cáncer. Dichas vacunas tienen por objeto o bien tratar cánceres existentes (es decir, vacunas terapéuticas) o bien prevenir el desarrollo del cáncer (es decir, vacunas profilácticas). Se diseñan vacunas terapéuticas para tratar cánceres mediante la estimulación del sistema inmunitario para reconocer y atacar las células cancerosas sin dañar las células no cancerosas. Se administran vacunas profilácticas a personas sanas para estimular su sistema inmunitario para atacar a los agentes que provocan cáncer tales como los virus que provocan cáncer.

30 En la actualidad, han sido autorizadas dos vacunas por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU. para prevenir las infecciones virales que pueden conducir al cáncer. Una es una vacuna que previene la infección por el virus de la hepatitis B, un virus asociado a algunas formas de cáncer de hígado; la segunda es una vacuna que previene la infección por dos tipos de virus del papiloma humano que en conjunto provocan el 70 por ciento de los casos de cáncer de cuello de útero.

35 El progreso en el desarrollo de vacunas terapéuticas contra el cáncer ha llegado más lentamente. Se han hecho esfuerzos para vacunar a pacientes con cáncer con células tumorales o antígenos asociados a tumores. Algunos de estos esfuerzos han tenido un éxito limitado. Un ejemplo de una clase de vacunas se publica en la Patente de los EE.UU. N.º 5.478.556, que describe la vacunación de pacientes con cáncer de mama con composiciones que comprenden una combinación de antígenos asociados al cáncer de mama autólogos o alógenos extraídos (TAA), obtenidos a partir de células de cáncer, interleucina-2 (IL-2) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).

45 Meidenbauer et al. (*Prostate*, vol. 43, n.º 2, 1 de mayo de 2000, páginas 88-100) describen la terapia del cáncer de próstata mediante la vacunación con una vacuna que contiene PSA en combinación con GM-CSF.

El documento WO2006/023598A2 desvela la vacunación para tratar o prevenir el cáncer de próstata mediante proteínas de fusión de péptidos inmunógenos derivados de PSA e IL-12 y GM-CSF adicionales.

50 El documento US2007/128159A1 describe el tratamiento del cáncer mediante el refuerzo del sistema inmunitario contra antígenos asociados a tumores tales como PSA mediante quimiocinas y citocinas adicionales, tales como IL-4 y GM-CSF.

**Objeto de la invención**

55 En un aspecto, se proporcionan composiciones que comprenden (i) una proteína de superficie o excretada purificada cualitativamente o cuantitativamente asociada a un tipo de cáncer; (ii) al menos una interleucina (IL); y (iii) al menos un factor estimulante de colonias (CSF), en las que la proteína se proporciona en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo al que se administra la composición, tal como se define en las reivindicaciones.

60 En otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar a un individuo que comprenden administrar a un individuo que tiene un tipo de cáncer, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición del aspecto anterior.

65 En otro aspecto, se proporcionan métodos para inducir una respuesta inmunoterápica en un individuo que comprende administrar a un individuo diagnosticado con un tipo de cáncer una cantidad terapéuticamente eficaz de

una composición del aspecto anterior (citado anteriormente), en los que la composición comprende la proteína de superficie o excretada purificada en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunoterápica en el individuo.

## 5 Descripción de las figuras

La Figura 1 es una curva de supervivencia global de Kaplan-Meier con pacientes que murieron de otras causas censuradas para el Ejemplo de Referencia 1.

## 10 Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona métodos y composiciones útiles para el tratamiento del cáncer. De este modo, de acuerdo con la presente divulgación, a un paciente que padece un tipo de cáncer se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una proteína de superficie o excretada purificada que se asocia cualitativamente o cuantitativamente a ese tipo de cáncer en combinación con adyuvantes que comprenden una interleucina (IL) y un factor estimulante de colonias (CSF), como se define en las reivindicaciones.

La divulgación se refiere adicionalmente a composiciones de vacunas contra el cáncer que comprenden una proteína de superficie o excretada purificada asociada cualitativamente o cuantitativamente a tipos particulares de cáncer en combinación con adyuvantes biológicos que comprenden una interleucina y un factor estimulante de colonias.

Sin quedar limitado por ningún mecanismo de acción, se cree que la composición actúa provocando la muerte de las células tumorales, inhibiendo el crecimiento o la reaparición tumoral, promoviendo la regresión del tumor y/o la inhibición de la metástasis, lo que conduce a un aumento en la tasa de supervivencia sin enfermedad y/o en la tasa de supervivencia global; o cualquier combinación de los mismos.

La interleucina es la interleucina-2 (IL-2) y el factor estimulante de colonias es el CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).

La respuesta inmunitaria de un paciente que recibe la vacuna puede medirse antes de la primera vacunación y luego puede medirse nuevamente después de la primera vacunación y, si se desea, después de cualquier vacunación posterior para determinar la extensión de la respuesta inmunitaria. El nivel de respuesta inmunitaria puede cuantificarse con el Ensayo de Blastogénesis de Linfocitos (LBA) (véase Elliott, R. et al, *Breast Cancer Research and Treatment* 30:299-304 (1994); incorporado en el presente documento por referencia). En este ensayo, las células mononucleares se cultivan en cultivo tisular durante siete días. Las células mononucleares se co-cultivan con antígeno tumoral en concentraciones variables. Se añade <sup>3</sup>H-timidina a los cultivos poco antes de la finalización. Después se calcula un índice de proliferación dividiendo la cantidad de captación de <sup>3</sup>H-timidina incorporada en las células mononucleares estimuladas por antígeno tumoral en cultivo mediante la captación de <sup>3</sup>H-timidina incorporada en las células mononucleares de control, que no se co-cultivaron con antígeno tumoral.

Como se usa en el presente documento, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del compuesto o la composición referenciados que desencadena la respuesta biológica o medicinal que se busca en un tejido, sistema, animal, individuo o ser humano por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro clínico, que incluye uno o más de los siguientes:

- (1) prevenir la enfermedad; por ejemplo, prevenir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que puede estar predispuesto a la enfermedad, afección o trastorno pero que aún no experimenta o presenta la patología o la sintomatología de la enfermedad;
- (2) inhibir la enfermedad; por ejemplo, inhibir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que experimenta o presenta la patología o la sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno; y
- (3) mejorar la enfermedad; por ejemplo, mejorar una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que experimenta o presenta la patología o la sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, invertir la patología y/o la sintomatología) tal como disminuyendo la gravedad de la enfermedad.

Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición puede medirse como una cantidad que aumenta la respuesta inmunitaria a antígenos tumorales en al menos un 50 %; o estabiliza o disminuye las proteínas marcadoras de tumores circulantes dando como resultado la inhibición de la progresión del cáncer.

Como se usan en el presente documento, los términos "tratamiento" y "tratar" significan (i) mejorar, inhibir o prevenir la patología referenciada, como se ha descrito anteriormente; o (ii) desencadenar el efecto biológico referenciado (por ejemplo, una reacción inmunoterápica puede dar como resultado un alivio o detención de la enfermedad que padece el paciente de interés). Más específicamente, el tratamiento puede incluir la inhibición del crecimiento o la reaparición tumoral, la regresión de un tumor y/o la inhibición de la formación de metástasis.

Como se usa en el presente documento, la referencia a "un" o "una" o "la" proteína o antígeno o adyuvante puede

referirse a uno o más de una proteína o antígeno o adyuvante.

5 Como se usa en el presente documento, una proteína de superficie o excretada que "se asocia cualitativamente o cuantitativamente a" un tipo de cáncer significa una proteína que o bien se encuentra normalmente solamente en la superficie de, o es excretada por, uno o más tipos particulares de cáncer o se encuentra en la superficie de, o es excretada por, células cancerosas más abundantemente que las células normales o no cancerosas. Dichas proteínas también son conocidas como proteínas marcadoras de tumores o antígenos asociados a tumores, y estos términos se usan indistintamente dentro de la solicitud. Estas proteínas pueden purificarse a partir de una preparación de células tumorales o pueden sintetizarse mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. 10 Adicionalmente, estas proteínas pueden prepararse como una mezcla con otras proteínas asociadas no tumorales o pueden prepararse en una preparación en la que son el único componente proteínico.

Los ejemplos de dichas proteínas o antígenos, y los tipos de cáncer a los que se asocian, incluyen los enumerados en la Tabla 1 a continuación:

15

<b>TABLA 1</b>	
<b>Cáncer</b>	<b>Proteínas y antígenos</b>
de próstata	PSA, fosfatasa ácida prostática (PAP), antígeno de membrana específico prostático (PSMA), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de cáncer (CA) 125
de mama	CA 15-3, CA 27.29, CEA, CA 125, receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PgR), receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (Her-2/neu), ácido siálico asociado a lípidos en plasma (LASA-P)
gastrointestinal	CEA, CA 19-9, $\alpha$ -feto proteína (AFP), CA 72-4, antígeno de tumor vesical (BTA), antígeno polipeptídico tisular (TPA)
de pulmón	CEA, AFP, enolasa específica de neuronas (NSE), cromogranina A, TPA, CA 72-4
de hígado	CEA, CA 19-9, AFP, CA 50
de páncreas	CEA, CA 19-9, AFP
de tiroides	CEA, calcitonina, tiroglobulina
de ovario	CA 125, AFP, LASA-P, CA 50, CA 72-4
melanoma	proteínas S-100 (S-100), antígeno asociado a tumor 90 (TA-90)
testicular	AFP, $\beta$ gonadotropina coriónica humana ( $\beta$ -hCG);
leucemia	$\beta$ -2 microglobulina, LASA-P
colorrectal	CEA, CA 19-9, LASA-P
de vejiga	BTA, proteína de matriz nuclear 22 (NMP 22), TPA
linfoma:	LASA-P
endometrial	ER, PgR
sistema nervioso	calcitonina, cromogranina A, NSE
embrionario	$\beta$ -hCG

Las composiciones pueden fabricarse a partir de proteínas marcadoras de tumores de superficie o excretadas, autólogas, alogénicas o recombinantes, aisladas y purificadas, o una combinación de las mismas. Se ha encontrado que estas composiciones son útiles como vacunas contra el cáncer cuando se administran en combinación con 20 dosis bajas de una interleucina y un CSF.

La composición de la invención comprende -IL-2 y GM-CSF.

25 El uso de antígenos aislados y purificados para el tipo particular de cáncer que se ha de tratar proporciona más especificidad y elimina la variabilidad presente en las composiciones de vacuna de la técnica anterior. Además, la preparación de la presente vacuna no requiere tejido del paciente y, por tanto, cada paciente en el cuadro clínico inicial o después de la cirugía es un candidato para la vacuna terapéutica. Sin embargo, si se desea, puede usarse tejido de un paciente para fabricar la presente vacuna. El uso de antígenos aislados y purificados también permite que las composiciones de vacuna sean producidas en masa. 30

Como se usa en el presente documento, el término "purificado" significa que la entidad referenciada tiene una pureza de más de aproximadamente el 50 % en peso total. Es decir, en ciertas realizaciones, cada uno de los antígenos aislados y purificados utilizados en el presente documento, independientemente, tiene una pureza de más de aproximadamente el 50 % en peso total; o más de aproximadamente el 60 % en peso; o aproximadamente el 70 % en peso; o aproximadamente el 80 % en peso; o aproximadamente el 85 % en peso; o aproximadamente el 90 % en peso; o aproximadamente el 95 % en peso; o aproximadamente el 98 % en peso; o aproximadamente el 99 % en peso. 35

El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento significa +/- el 10 % del valor de referencia.

Las composiciones pueden administrarse a pacientes que padecen tumores sólidos, ascitis maligna o cánceres hematopoyéticos para inhibir el crecimiento o la reparación tumoral o para inhibir la formación de metástasis. Las composiciones también pueden administrarse a pacientes que padecen leucemia o linfoma.

Las composiciones de vacuna se fabrican usando proteínas marcadoras de tumores. Las proteínas marcadoras de tumores aisladas y purificadas deseadas están disponibles en el mercado. Las fuentes de muchos de los antígenos enumerados anteriormente incluyen Fitzgerald Industries International, Concord, MA, y Sigma-Aldrich Co, Dallas, TX. Se conocen y hay disponibles otras fuentes comerciales para los expertos en la materia. Si cualquier antígeno particular no está disponible en el mercado, puede sintetizarse en una instalación de cGMP (buenas prácticas de fabricación actuales, por sus siglas en inglés) de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la materia.

Cada una de las proteínas marcadoras de tumores está presente independientemente en cantidades que varían normalmente de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1000 µg por 100 µl de composición de vacuna, o de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 250 µg por 100 µl de composición, o de aproximadamente 25 a aproximadamente 100 µg por 100 µl de composición, o de aproximadamente 50 µg por 100 µl de composición, o de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 µg por 100 µl, como se define en las reivindicaciones. Si un antígeno particular no está disponible fácilmente o no está disponible fácilmente a un coste razonable, pueden usarse con buen efecto cantidades más pequeñas dentro de los intervalos anteriores, tal como dentro del intervalo de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 µg por 100 µl.

Algunas proteínas marcadoras de tumores se comercializan sobre la base de unidades internacionales (UI), en lugar de µg. En un caso de este tipo, el antígeno se proporciona normalmente en una cantidad dentro del intervalo de 1 UI a aproximadamente 10.000 UI por 100 µl de composición de vacuna; o de aproximadamente 20 a aproximadamente 5.000 UI, por 100 µl de composición; o de aproximadamente 500 UI a aproximadamente 1500 UI por 100 µl de composición o aproximadamente 1000 UI por 100 µl de composición.

Por ejemplo, se proporciona PSA a una concentración de aproximadamente 50 µg por 100 µl de composición.

La vacuna, también comprende CEA; este antígeno se proporciona a una concentración de aproximadamente 2 µg por 100 µl de composición. Se incluye proteína CA 125 en la vacuna; normalmente se comercializa en forma de UI y se proporciona a una concentración de aproximadamente 1000 UI, por 100 µl de composición.

Pueden incluirse CA 15-3 y/o CA 27.29, cada una a una concentración de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 250 µg por 100 µl de composición.

Generalmente, la cantidad de un antígeno particular utilizado en la vacuna permanece aproximadamente igual si el antígeno es el único antígeno proporcionado en la vacuna o si es uno de varios antígenos proporcionados en la composición de vacuna. Por tanto, en el ejemplo de vacuna contra el cáncer de próstata proporcionado en el párrafo anterior, si la composición comprende uno de los antígenos indicados o una combinación de dos, tres, cuatro o cinco antígenos, cada antígeno se proporciona en una cantidad dentro de las directrices establecidas anteriormente. La presencia de antígenos adicionales puede aumentar la probabilidad de una respuesta inmunitaria eficaz en el paciente.

De acuerdo con la presente invención, el antígeno o antígenos purificados se combinan físicamente con pequeñas cantidades de una combinación de una interleucina y CSF. También se describe una realización en la que la solución de antígeno y los adyuvantes (por ejemplo, la interleucina y el CSF) se administran por separado, pero los antígenos y adyuvantes deben administrarse en el mismo sitio, juntos tan cerca en el tiempo como sea posible y con no más de 2 horas de separación. Normalmente, cada componente de la vacuna se presentó en forma de una solución fisiológicamente aceptable y después se combinan cantidades deseadas de cada solución para fabricar la composición de vacuna final.

Las interleucinas existentes incluyen IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-13, IL-14 e IL-15. De acuerdo con la presente invención, la interleucina es IL-2.

Los factores estimulantes de colonias existentes incluyen CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), CSF de granulocitos (G-CSF) y CSF de macrófagos (M-CSF). De acuerdo con la presente invención, el factor estimulante de colonias es GM-CSF.

Pueden usarse una única interleucina y un único factor estimulante de colonias en las composiciones del presente documento o una combinación de dos o más interleucinas y/o factores estimulantes de colonias. Aunque la eficacia de cada tipo de citocina es muy limitada si se administra sola, se ha descubierto que la administración de ambos una interleucina y un CSF en combinación con los antígenos marcadores de tumores tiene un efecto sinérgico.

De acuerdo con la presente invención, una combinación de citocinas es GM-CSF e IL-2. La IL-2 promueve la

inmunidad de linfocitos T citotóxicos; el GM-CSF promueve el procesamiento de células dendríticas.

La composición comprende aproximadamente 20.000 U (aproximadamente 1,2 µg) de la interleucina por 100 µl de composición y aproximadamente 16,7 µg del CSF por 100 µl de composición.

5 Normalmente, cada citocina se suministra en forma de un polvo liofilizado y se combina con un vehículo líquido fisiológicamente aceptable y se diluye en serie si es necesario para alcanzar la concentración final deseada en 100 µl. La IL-2, por ejemplo, puede obtenerse con el nombre Proleukin® de Chiron Corporation, Emeryville, CA, en forma de un polvo liofilizado,  $22 \times 10^6$  UI (1,3 mg)/vial. Si, por ejemplo, se combina con 1,1 ml de agua estéril y después se diluye en serie 1:10, 1:10 (1:100 final), su concentración final es de 20.000 UI (1,18 µg) en 100 µl. De forma similar, el GM-CSF puede obtenerse con el nombre Leukine® de Berlex Laboratories, Montville, NJ, en forma de un polvo liofilizado, 250 µg/vial. Si, por ejemplo, se combina con 1,5 ml de agua estéril, se obtendrá una concentración final de 16,7 µg por 100 µl.

15 Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para las composiciones en el presente documento se refieren a los vehículos fluidos que pueden inyectarse en un hospedador sin efectos adversos significativos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, agua estéril, solución salina, glucosa y tampones o soluciones acuosas fisiológicamente aceptables, incluyendo solución salina o solución salina tamponada con fosfato. Los vehículos pueden incluir agentes auxiliares que incluyen, pero no se limitan a, diluyentes, estabilizantes (es decir, azúcares y aminoácidos), conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes tamponantes del pH, aditivos potenciadores de la viscosidad, colores y similares. Por ejemplo, los vehículos adecuados para las proteínas marcadoras de tumores y los adyuvantes incluyen tampones o soluciones acuosas fisiológicamente aceptables, que incluyen agua estéril, solución salina, solución salina tamponada con fosfato o solución salina tamponada de Hank (HBSS).

25 Las cantidades apropiadas de los antígenos o adyuvantes se mezclan con el vehículo seleccionado. Todos los componentes de la vacuna pueden proporcionarse juntos en un solo vehículo, pero si se desea, pueden proporcionarse uno o más componentes en un vehículo separado y administrarse en combinación con los otros componentes.

30 En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para el tratamiento del cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una proteína de superficie o excretada purificada que se asocia cualitativamente o cuantitativamente al tipo de cáncer en combinación con adyuvantes biológicos que comprenden una interleucina (IL) y un factor estimulante de colonias (CSF).

35 La vacuna puede administrarse mediante inyección. En otra realización, la vacuna se administra por vía subcuticular, pero también puede administrarse por vía intramuscular, por vía subcutánea o por vía intraperitoneal. La vacuna normalmente se administra en dosis de aproximadamente 0,3 ml a aproximadamente 1 ml, o de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 0,7 ml, o de aproximadamente 0,5 ml, por dosis. Aunque una sola dosis de la vacuna puede ser útil, muchas veces es deseable administrar de aproximadamente 3 a aproximadamente 12 dosis de la vacuna y o de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 dosis. Si se administra más de una dosis, las dosis normalmente tienen al menos 7 días de separación. Por ejemplo, las dosis normalmente pueden administrarse con de aproximadamente 7 a aproximadamente 90 días de separación. Por ejemplo, una posología útil es administrar tres dosis de la vacuna a intervalos semanales, después administrar otras tres dosis a intervalos de cuatro semanas después de eso (es decir, la vacuna se administra en las semanas 0, 1, 2, 6, 10 y 14). Si se desea, pueden administrarse vacunas de refuerzo mensuales o bimensuales durante un máximo de aproximadamente un año después de la terapia de inmunización inicial. Las vacunas de refuerzo pueden alternarse con las vacunas de refuerzo de interleucina, tal como, pero no limitada a, IL-2, para reforzar los linfocitos citotóxicos naturales del paciente.

50 La inmunidad de linfocitos T y B de un paciente que recibe una vacuna de acuerdo con la presente divulgación puede controlarse usando un ensayo de blastogénesis de linfocitos (véase Elliott, R. et al., *Breast Cancer Research and Treatment* 30:299-304 (1994); incorporado en el presente documento por referencia) antes de comenzar la administración de la vacuna y, luego, durante y después de la posología de la vacuna. Un aumento en el índice de proliferación demuestra un aumento de la respuesta inmunitaria a los antígenos celulares y de proteínas mediante el proceso de vacunación. Un paciente que recibe una vacuna de acuerdo con la presente divulgación también puede controlarse con un ensayo que mide proteínas marcadoras de tumores circulantes. Una disminución en las proteínas marcadoras de tumores circulantes es un marcador sustituto para un aumento de la respuesta inmunitaria.

60 Las vacunas del presente documento son útiles para el tratamiento de cualquier tipo de cáncer sólido, incluyendo los cánceres de próstata, de mama, de pulmón, de colon, de recto, de útero (incluyendo de cuello del útero y de endometrio), de ovario, de cavidad oral, de vejiga, de páncreas, de estómago, de hígado, de riñón, de piel, de testículos y de tejido linfóide. También pueden usarse para tratar la ascitis maligna y tumores hematopoyéticos, incluyendo leucemias y linfomas. Se seleccionan proteínas marcadoras de tumores apropiadas y la vacuna se prepara usando las cantidades generales de los componentes de la vacuna como se ha expuesto anteriormente.

En una realización, se proporcionan composiciones que son útiles como una vacuna contra el cáncer de próstata que comprenden al menos una proteína de superficie o excretada purificada asociada cualitativamente o cuantitativamente al cáncer de próstata combinada con una combinación de adyuvantes biológicos, en las que los adyuvantes consisten esencialmente en una interleucina y un factor estimulante de colonias. En una realización, al menos una proteína de superficie o excretada purificada comprende PSA purificado, opcionalmente en combinación con una o más de otras proteínas purificadas asociadas al cáncer de próstata. En una realización relacionada, se proporciona un método para el tratamiento de una persona con cáncer de próstata, que comprende inmunizar la persona con una composición que comprende PSA purificado, opcionalmente en combinación con una o más de otras proteínas purificadas asociadas al cáncer de próstata y adyuvantes biológicos que comprende una interleucina y un factor estimulante de colonias. En una realización adicional relacionada, se proporciona un método para provocar en un ser humano con cáncer de próstata una respuesta inmunoterápica, en el que la respuesta inmunoterápica da como resultado una disminución del PSA circulante y la destrucción de las células tumorales, mediante la inmunización de la persona con una composición que comprende PSA purificado, opcionalmente en combinación con otras proteínas purificadas asociadas al cáncer de próstata y adyuvantes biológicos, en el que los adyuvantes consisten esencialmente en una interleucina y un factor estimulante de colonias. Las inmunizaciones pueden realizarse una sola vez o pueden repetirse. La inmunización se diseña para aumentar la respuesta inmunoterápica a los antígenos/proteínas tumorales en un mínimo de aproximadamente el 50 % por encima de la inmunidad basal, disminuir el PSA circulante, y da como resultado la destrucción de células tumorales, el aumento de la supervivencia sin progresión y de la supervivencia global.

También se describen composiciones útiles como una vacuna contra el cáncer de mama, que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de proteínas de superficie o excretadas purificadas asociadas cualitativamente o cuantitativamente al cáncer de mama. Dichas composiciones pueden incluir CA 15-3, CA 125 o CEA, o una combinación de los mismos, junto con la combinación anterior de adyuvantes biológicos. En una realización relacionada, se proporciona un método para tratar a una persona con cáncer de mama que comprende la inmunización de la persona con una composición que comprende CA 15-3, CA 125 y CEA purificados, opcionalmente en combinación con una o más de otras proteínas purificadas asociadas al cáncer de mama y adyuvantes biológicos que comprenden una interleucina y un factor estimulante de colonias. Las inmunizaciones pueden realizarse una vez o pueden repetirse. La inmunización se diseña para aumentar la respuesta inmunoterápica a los antígenos/proteínas tumorales en un mínimo de aproximadamente el 50 % por encima de la inmunidad basal, disminuir los antígenos tumorales circulantes, y da como resultado la destrucción de células tumorales, el aumento de la supervivencia sin progresión y de la supervivencia global.

También se describen composiciones que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de proteínas purificadas asociadas cualitativamente o cuantitativamente al cáncer del sistema gastrointestinal, de pulmón, de hígado, de páncreas, de tiroides, de ovarios, de testículos, del sistema colorrectal, de vejiga o del sistema nervioso, o melanoma, leucemia o linfoma, y la administración de estas composiciones a personas que padecen dicho cáncer para desencadenar una respuesta inmunitaria al cáncer.

La divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes.

## Ejemplos

### Ejemplo de referencia 1

Se realizó un estudio retrospectivo para determinar la relación entre la respuesta inmunitaria y la supervivencia global. La respuesta inmunitaria se midió con el LBA, como se ha analizado anteriormente.

El estudio se realizó en pacientes con cáncer de mama en fase temprana con inmunidad deprimida que habían recibido una vacuna contra el cáncer de mama en el contexto adyuvante. Los pacientes se sometieron a ensayo para determinar respuestas inmunitarias contra células autólogas, células alogénicas y antígenos de proteína. Los pacientes con inmunidad deprimida, una relación de menos de 1,5 (determinada por análisis del punto de corte del conjunto de datos (Head, et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, 1993; 690: 340-342) del presente ensayo LBA modificado) en el LBA, se vacunaron con un mínimo de seis vacunas que contenían células de cáncer de mama autólogas, células de cáncer de mama alogénicas (células MCF-7), antígeno CA 15-3, antígeno CA 125, antígeno CEA y adyuvantes biológicos (IL-2 y GM-CSF). Se realizó un segundo LBA de 2 a 4 semanas después de la 6ª vacunación. El seguimiento se hizo durante hasta 10 años. La figura 1 es la curva de supervivencia global de Kaplan-Meier en pacientes que murieron de otras causas censuradas. La supervivencia global de Kaplan Meier calculada (es decir, el porcentaje de supervivencia a lo largo de un periodo de tiempo continuo) para los pacientes a los 10 años es del 59 % en los pacientes deprimidos con tratamiento convencional y una supervivencia del 95 % para los pacientes con inmunidad a sus propios antígenos asociados a tumores en un LBA en el cuadro clínico inicial con tratamiento convencional (controles históricos para el estudio). Se vacunaron pacientes con inmunidad deprimida que carecían de inmunidad a sus propios antígenos tumorales en el cuadro clínico inicial como se ha indicado anteriormente, y esto condujo a un aumento en la supervivencia global del 59 % al 79 % a los 10 años. Los grupos se emparejaron bien por edad, estado menopáusico, tamaño del tumor, estado ganglionar, estadio de la enfermedad, estado del receptor de estrógeno, estado del receptor de progesterona y terapia antihormonal.

Este estudio muestra que los pacientes con inmunidad deprimida tienen una supervivencia global más baja y un mal pronóstico a largo plazo cuando se comparan con pacientes con inmunidad normal y, adicionalmente, que la mejora de la respuesta inmunitaria a través de la vacunación mejora la supervivencia global.

5 Además, se sabe en general en la técnica que un aumento de la respuesta inmunitaria se correlaciona con el aumento de la supervivencia global. Por ejemplo, Hsueh et al. (*J. Clin. Oncol.*, 1 de diciembre de 2002; 20(23): 4549-54), incorporado en el presente documento por referencia, indica que "la supervivencia después de la inmunoterapia con vacunas se correlacionó significativamente con la respuesta inmunitaria DTH (hipersensibilidad de tipo retardado, por sus siglas en inglés) a la vacuna pero no con un antígeno de control..." (pág. 4553, primer párrafo del análisis). Además, Galon et al. (*Science*, 29 de septiembre de 2006; 313:1960-1964), incorporado en el presente documento por referencia, informó que el "... el tiempo hasta la reaparición y la supervivencia global se rigen en gran parte por el estado de la respuesta inmunitaria adaptativa local" (pág. 1963, último párrafo).

15 Por tanto, a la vez se sabe en la técnica y se demuestra por los datos de la Figura 1, que una respuesta inmunitaria mejorada se correlaciona con la supervivencia global en pacientes con cáncer.

### Ejemplo 1 Preparación de la composición de PSA

Una composición de acuerdo con la presente divulgación se fabricó de acuerdo con el siguiente procedimiento:

20 1. Un mg de PSA (Fitzgerald Industries International, Concord, MA, n.º del catálogo 30-AP15E) se diluyó en 2,0 ml de agua estéril USP. La solución se esterilizó por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros. Se congelaron partes alícuotas estériles de 100 µl a -80 °C hasta que se necesitaron.

25 2. Se diluyeron 500 µg de CEA (Fitzgerald Industries International, Concord, MA, n.º del catálogo 30-AC30) en 25 ml de agua estéril USP y la solución resultante se esterilizó por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros. Se congelaron partes alícuotas estériles de 100 µl a -80 °C hasta que se necesitaron.

30 3. Se diluyeron 20.000 unidades de CA 125 (Fitzgerald Industries International, Concord, MA, n.º del catálogo 30-AC11) en 2,0 ml de agua estéril USP y la solución resultante se esterilizó por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros. Se congelaron partes alícuotas estériles de 100 µl a -80 °C hasta que se necesitaron.

35 4. Se reconstituyeron 22 millones de unidades de IL-2 (Proleukin, Chiron Corporation, Emeryville, CA) en 1,1 ml de agua estéril USP, después se diluyeron 1:10 con agua estéril USP. La solución resultante se diluyó 1:10 de nuevo para proporcionar una concentración final de 20.000 unidades por 100 µl. Se congelaron partes alícuotas estériles de 100 µl a -80 °C hasta que se necesitaron.

5. Un vial de 250 µg de GM-CSF (Berlex Laboratories, Montville, NJ) se reconstituyó con 1,5 ml de agua estéril USP para proporcionar una concentración final de 16,7 µg en 100 µl. La solución se refrigeró a 4 °C.

6. Para preparar una dosis de la vacuna, se llevaron a temperatura ambiente partes alícuotas congeladas de los siguientes: 100 µl de cada uno de los tres antígenos (PSA, CEA y CA 125) y 100 µl de cada uno de los dos adyuvantes (IL-2 y GM-CSF). Después, se introdujeron 100 µl de cada componente en una jeringuilla de 1 ml con una aguja de calibre 26 de una pulgada. El volumen total final fue de 0,5 ml.

40 Cada dosis de vacuna contenía 50 µg de PSA; 2 µg CEA; 1000 UI de CA 125; 20.000 unidades de IL-2; y 16,7 µg de GM-CSF.

### Ejemplo 2

45 A trece pacientes con cáncer de próstata confirmado por biopsia se les administró subcuticularmente a las 0, 1, 2, 6, 10 y 14 semanas un curso inicial de 6 vacunaciones, conteniendo cada dosis PSA, CEA, CA 125, IL-2 y GM-CSF, preparadas como en el Ejemplo 1. Se determinó el nivel de PSA sérico de cada paciente antes de que se iniciara la primera vacuna. Durante el periodo de vacunación, los pacientes no recibieron ninguna otra terapia simultánea (es decir, cirugía, hormonas, radiación, semillas radiactivas o quimioterapia).

50

El protocolo de tratamiento se diseñó de acuerdo con el esquema contenido en Gehan (véase Gehan, E., *J. Chron. Dis.* 13(4), 346-353 (1961); incorporado en el presente documento por referencia) para determinar las tasas de respuesta mínimas para los fármacos oncológicos en ensayos clínicos de fase I/II de un solo grupo. Brevemente, el método de Gehan calculó el tamaño mínimo de muestra requerido sin ninguna respuesta para finalizar el estudio porque no se alcanzará una tasa de respuesta mínima predeterminada (normalmente del 15 al 20 %). El nivel de confianza se fijó en el 95 % y, de este modo, el estudio se finalizaría antes de tiempo si había una confianza del 95 % de que la tasa de respuesta era menor que la tasa de respuesta objetivo del 15 al 20 %. Por tanto, si 14 pacientes para la tasa de respuesta del 20 % o 19 pacientes para la tasa de respuesta del 15 % se tratan sin ninguna respuesta, entonces el fármaco es inactivo. Si un paciente responde, entonces es necesario tratar más pacientes para determinar una tasa de respuesta precisa.

60

Los resultados de la administración de la vacuna contra el cáncer de próstata se proporcionan en la Tabla 2 a continuación:

65

DIAGNÓSTICO	PSA ANTES DE LA VACUNA	PSA DESPUÉS DE 6 VACUNAS	PSA DESPUÉS DE 12 VACUNAS	ÚLTIMO PSA (meses)
Cáncer de próstata	4,10	2,40	2,50	3,50 (80)
Cáncer de próstata	1,40	0,60	0,66	0,90 (92)
Cáncer de próstata	6,80	6,40	solo 6 vacunas	---
Cáncer de próstata	4,90	2,80	2,40	2,97 (42)
Cáncer de próstata	6,20	5,80	1,90	2,20 (65)
Cáncer de próstata	4,20	3,50	4,40	3,90 (18)
Cáncer de próstata	14,60	5,50	6,50	7,7 (49)
Cáncer de próstata	7,6	13,70	solo 4 vacunas	---
Cáncer de próstata	4,00	4,93	implantes de semillas	---
Cáncer de próstata	8,95	10,60	17,19	Zoladex, semillas
Cáncer de próstata	7,20	5,41	7,30	6,00 (28)
Cáncer de próstata	4,55	7,02	4,17	10,80 (21)
Cáncer de próstata	5,40	10,40	Lupron	---

El nivel de PSA del paciente n.º 8 pasó de 7,6 a 13,7 después de la cuarta vacunación y se retiró del estudio para buscar otra terapia. El nivel de PSA sérico de cada uno de los 12 pacientes de cáncer de próstata restantes se determinó 3-4 semanas después de la 6ª vacunación. Como se muestra en la Tabla 2, hubo una disminución en el nivel de PSA sérico en 8 de los 12 pacientes después de la 6ª vacunación.

Un paciente (paciente n.º 3), cuyo PSA había caído de 6,8 a 6,4 y que previamente había recibido radioterapia (el único paciente tratado anteriormente), eligió retirarse del estudio al final de este periodo de vacunación inicial y se sometió a una prostatectomía radical. Dos pacientes con PSA en aumento después de 6 vacunas eligieron tener una terapia convencional adicional (uno paciente recibió implantes de semillas y el otro Lupron). Nueve de los 13 pacientes originales recibieron 3 dosis adicionales de la vacuna alternadas con dosis de IL-2 (11 millones de unidades) para estimular sus linfocitos citolíticos naturales durante los 6 meses siguientes a las vacunaciones iniciales. Uno de estos pacientes con un PSA en aumento eligió tomar Zoladex e implantes de semillas. Se siguieron ocho pacientes durante 18-92 meses (la variación en el seguimiento se debe a la fecha de la vacunación inicial de cada paciente (los pacientes se incluyeron en el ensayo en diferentes momentos) y los pacientes que se pierdan durante el seguimiento). El valor de PSA medio para estos 8 pacientes fue inicialmente de 5,9; disminuyó a 4,1 después de las 6 vacunas iniciales, disminuyó aún más a 3,7 después de las 12 vacunas y fue de 4,7 después de un tiempo medio de seguimiento de 49 meses (mediana de 45,5 meses).

Un paciente, cuyo PSA disminuyó de 4,1 a un normal 2,4 ng/ml después de la vacunación, se volvió a biopsiar después de 18 y 30 meses sin que se encontrara cáncer y permaneció sin enfermedad y estable durante más de 10 años. Otros dos pacientes también se volvieron a biopsiar posteriormente al proceso de vacunación: uno no tenía ninguna enfermedad en la muestra de biopsia a los 24 meses y el otro tenía una disminución muy significativa en el porcentaje de muestra de biopsia que contenía células cancerosas (del 55 % al 1 %) a los 16 meses.

La vacuna contra el cáncer de próstata, descrita anteriormente, tuvo respuestas inmunitarias (como se demuestra por el PSA sérico disminuido en 8 de 12 pacientes (67 %) después de seis vacunas y 6 de 9 pacientes (67 %) después de 12 vacunas. De los 13 pacientes originales que se inscribieron en el ensayo, 7 pacientes (54 %) tuvieron niveles de PSA inferiores que en el cuadro clínico inicial después de una mediana de 45,5 meses (intervalo de 18 a 80 meses) de seguimiento, lo que es indicativo de que no hay ninguna progresión bioquímica de su enfermedad (ningún aumento de la cantidad de PSA sérico). Estas tasas de respuesta, según se miden por disminuciones de la concentración sérica del marcador tumoral biológico PSA, se estiman en un 50 % o mejor y, por tanto, reflejan una tasa de respuesta muy significativa, de acuerdo con el protocolo de Gehan. Existe un ligero aumento en el PSA de muchos de los pacientes de cáncer de próstata con el tiempo, y esto señala la necesidad de vacunas de refuerzo después de las 12 vacunas iniciales.

### Ejemplo 3

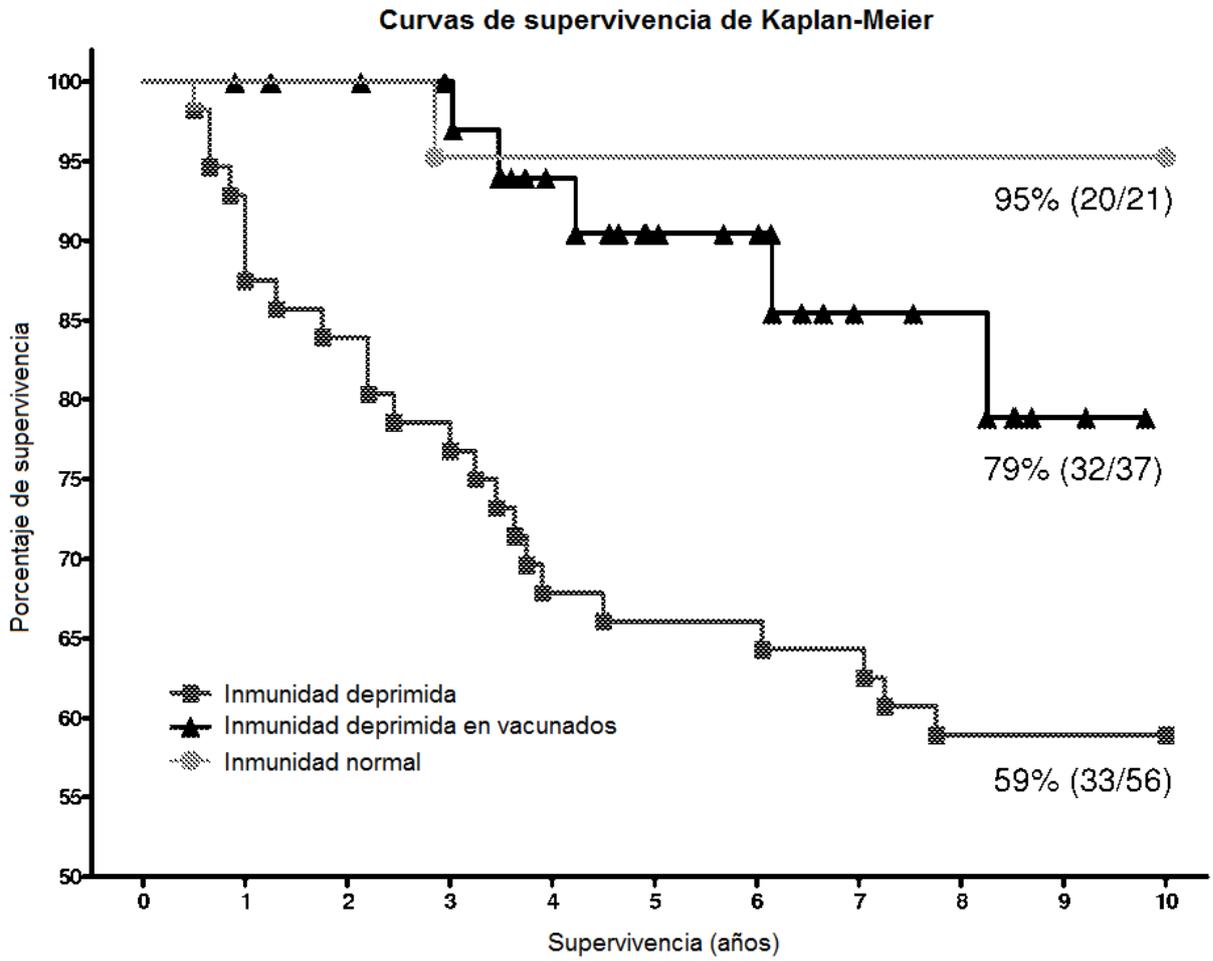
Las vacunas proporcionadas en el presente documento también se usan para tratar pacientes con otras formas de cáncer. Se fabrican composiciones de vacuna usando los siguientes componentes siguiendo el procedimiento general del Ejemplo 1, como se muestra en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.**

<b>Cáncer</b>	<b>Marcador 1</b>	<b>Marcador 2</b>	<b>Marcador 3</b>	<b>IL</b>	<b>CSF</b>
<b>de mama</b>	50 µg de CEA	50 µg de CA 15-3	1000 UI de CA 125	20.000 unidades de IL-2	16,7 µg de GM-CSF
<b>gastrointestinal</b>	50 µg de CEA	50 µg de CA 19-9	50 µg de alfa fetoproteína	20.000 unidades de IL-2	16,7 µg de GM-CSF
<b>de hígado</b>	50 µg de CEA	50 µg de CA 19-9	50 µg de alfa fetoproteína	20.000 unidades de IL-2	16,7 µg de GM-CSF
<b>de páncreas</b>	50 µg de CEA	50 µg de CA 19-9	50 µg de alfa fetoproteína	20.000 unidades de IL-2	16,7 µg de GM-CSF
<b>de ovario</b>	1000 UI de CA 125	50 µg de alfa fetoproteína		20.000 unidades de IL-2	16,7 µg de GM-CSF
<b>colorrectal</b>	50 µg de CEA	50 µg de CA 19-9		20 000 unidades de IL-2	16,7 µg de GM-CSF

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende aproximadamente 50 µg de antígeno prostático específico (PSA), aproximadamente 2 µg de CEA, aproximadamente 1000 UI de CA 125, aproximadamente 20.000 unidades de IL-2 y aproximadamente 16,7 µg de GM-CSF, por 100 µl de la composición.  
5
2. La composición de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
3. La composición de la reivindicación 2, en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un tampón o una solución acuosa fisiológicamente aceptables.  
10
4. La composición de la reivindicación 2, en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende agua estéril, solución salina, solución salina tamponada con fosfato o solución salina tamponada de Hank (HBSS).
5. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en un método para tratar el cáncer de próstata.  
15
6. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en un método para inducir una respuesta inmunoterápica en un individuo que tiene cáncer de próstata.  
20



**Figura 1**