

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 679 043**

51 Int. Cl.:

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2010 PCT/US2010/035060**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.11.2010 WO10132867**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2010 E 10775661 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2429585**

54 Título: **Inmunoterapia de vacuna**

30 Prioridad:

15.05.2009 US 178741 P

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

21.08.2018

73 Titular/es:

**IRX THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
654 Madison Avenue, Suite 1601
New York, NY 10065, US**

72 Inventor/es:

**HADDEN, JOHN W.;
SIGNORELLI, KATHY;
EGAN, JAMES y
NAYLOR, PAUL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 679 043 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

Inmunoterapia de vacuna.

Antecedentes de la invención

Campo de la técnica

- 5 La presente invención se refiere a inmunoterapia de vacuna. Más específicamente, la presente invención se refiere a las composiciones y usos de las mismas para obtener y potenciar una respuesta inmunitaria a al menos un antígeno codificado en un ácido nucleico en un vector vírico en pacientes que tienen cáncer u otros estados patológicos que producen antígeno.

Antecedentes de la técnica

- 10 Cada vez se ha vuelto más evidente que los cánceres humanos poseen antígenos que, si actúan sobre el sistema inmunitario del anfitrión, puede dar como resultado la regresión del tumor. Estos antígenos han sido definidos por enfoques inmunitarios serológicos celulares, que han conducido a la definición de epítopes tanto de células B como T (Sahin, 1997; Van der Eynde, 1997; Wang, 1999). Basándose en estos resultados, se ha convertido en un objetivo de los inmunoterapeutas del cáncer para inducir la regresión de los tumores. Sin embargo, históricamente, los
15 esfuerzos satisfactorios han sido esporádicos y generalmente de menor frecuencia y magnitud.

- Un problema fundamental en el esfuerzo de inmunizar a los pacientes con cáncer, es decir, contra los antígenos del tumor, es que el estado del portador del tumor está asociado con mecanismos inmunosupresores derivados del sistema inmunitario alterado tanto del tumor como del anfitrión (Kavanaugh, 1996), haciendo de ese modo difícil y hasta ahora imposible la inmunización sobre una base constante. La inmunosupresión o agotamiento implica una
20 capacidad reducida del sistema inmunitario para responder. Dicha supresión puede ser inducida por drogas, es decir, por tratamiento farmacológico, inducida por virus como, p. ej., en el SIDA, o inducida por un estado patológico como el cáncer. El sistema inmunitario en este estado es eficazmente desactivado. En el caso de un estado patológico como el cáncer, el cuerpo no puede protegerse contra antígenos tumorales, permitiendo así que un tumor crezca y que, posiblemente, se metastatice.

- 25 Se han desarrollado diversas estrategias de inmunización tumoral. Todas estas estrategias son complejas y se desvían significativamente de las estrategias convencionales de inmunización utilizadas en las enfermedades infecciosas (véase, p. ej., Weber, 2000). Una de estas estrategias de inmunización tumoral involucra a THERATOPE® (Biomira), un antígeno sialil-Tn polisacárido de mucina conjugado con hemocianina de lapa californiana (KLH) y administrado con adyuvante de micobacteria DETOX® y ciclofosfamida en dosis baja (MacLean,
30 1996). El uso de esta vacuna en pacientes con cáncer de mama y de ovario metastásicos ha producido respuestas clínicas importantes (es decir, mayor que 50 % de reducción tumoral) en sólo un pequeño porcentaje de pacientes.

- La terapia génica también se ha intentado usando construcciones víricas como vectores de expresión para genes que expresan antígenos tumorales. Por ejemplo, una construcción de virus de vacuna recombinante que codifica formas modificadas de las secuencias proteínicas E6 y E7 del virus del papiloma humano (HPV) se ha utilizado para
35 la inmunización de pacientes con cáncer de cuello uterino. La vacunación con esta construcción produjo respuestas clínicas discutibles (Borysiewickz, 1996). Véase, también, Sanda, 1999, en donde se usó una construcción de PSA (antígeno específico de la próstata)-vacuna recombinante como vacuna en pacientes con cáncer de próstata.

- Otro enfoque ha sido la terapia mediada con células dendríticas, p. ej., en donde las células dendríticas fueron pulsadas con fragmentos de oligopéptidos de los antígenos de membrana específicos de próstata (PSMA). Las
40 células dendríticas (con o sin los antígenos PSMA de cribado) se administraron luego a los pacientes con cáncer de próstata metastásico. Se obtuvieron respuestas clínicas importantes en solo un pequeño porcentaje de pacientes (Murphy, 1999; véase, también, Tjoa, 2000).

- Además, los tumores autólogos se han utilizado con ciclofosfamida en dosis bajas y BCG (Bacilo Calmette-Guerin) para inmunizar a pacientes con cáncer con melanoma maligno. Sin embargo, se divulgaron pocas respuestas
45 clínicas (Mastrangelo, 1996). Otra estrategia incluyó el uso de antígenos de MAGE con diversos adyuvantes de vacuna. Una vez más, esto ha producido pocas respuestas, si las hay, en pacientes con melanoma maligno (comunicado personal, Thierry Boon).

- Varias patentes de Doyle y col. (pat. de EE.UU. N.º 5.503.841; 5.800.810; 6.060.068; 5.643.565; y 5.100.664) divulgan procedimientos para mejorar la respuesta inmunitaria en pacientes que usan interleucina 2 (IL-2). Este
50 procedimiento se divulga para el uso en respuesta a enfermedades infecciosas y principalmente a las funciones que usan los antígenos conocidos por ser inmunogénicos. Se demostró una aplicabilidad limitada. Según lo divulgado antes, se sabe que el tratamiento del cáncer requiere diferentes enfoques. Hasta la fecha, el tratamiento con IL-2 ha mostrado mínimos resultados en dos cánceres, el melanoma de célula renal y el melanoma maligno (tasas de respuesta inferiores al 20 %). En general, se considera ineficaz en el cáncer de célula escamosa de cabeza y cuello,
55 y de cuello uterino, y en cáncer de próstata. Por ello, no está aprobado para estos usos.

Es importante contrastar las vacunas profilácticas que utilizan antígenos “clásicos” de estructura compleja y de altos pesos moleculares en pacientes sanos frente a las vacunas terapéuticas (en general, insatisfactorias) con antígenos tumorales o péptidos (en general, insatisfactorios) en pacientes inmunodeprimidos (en general, insatisfactorios). La primera es fácil y nuestras vacunas víricas actuales atestiguan su eficacia. La última es casi imposible de manera periódica a pesar de treinta años de intensos esfuerzos.

Las vacunas eficaces contra el cáncer requieren la estimulación de la inmunidad mediada por células, quizás incluso con preferencia a la producción de anticuerpos. Como se observó, a pesar de numerosos estudios con diversos antígenos, adyuvantes y construcciones de vacunas, los datos de las pruebas clínicas hasta la fecha han sido decepcionantes. Los episodios críticos para una respuesta inmunitaria anticancerosa mediada por células T son la presentación de antígeno a células T, principalmente en los ganglios linfáticos que drenan el sitio del tumor o la inmunización, seguida de la activación de las células T y la migración a los sitios periféricos. De hecho, la captación del antígeno por macrófagos de tejido, neutrófilos y/o células dendríticas, y la presentación de péptidos procesados en combinación con antígenos de MHC clase I y clase II a células T en el ganglio linfático son cruciales para una respuesta inmunitaria completa. La clave para una satisfactoria activación inmunitaria de células T es la generación del apropiado entorno de citocinas para impulsar la respuesta inmunitaria a una vacuna, tanto en el sitio de la inmunización como en los ganglios linfáticos de drenaje. El hecho de que el mecanismo de acción del sistema inmunitario hasta ahora no se haya entendido completamente impide que las vacunas contra el cáncer disponibles en la actualidad logren su máximo potencial.

La cinética de la respuesta inmunitaria incluye dos fases. La primera es el drenaje del antígeno y de las proteínas solubles hacia los ganglios linfáticos, donde se produce una activación inmunitaria inicial. Después de veinticuatro a cuarenta y ocho horas, las células presentadoras de antígeno (APC), más concretamente células dendríticas, emigran desde el sitio de inmunización a través de los conductos linfáticos que drenan al ganglio linfático, donde una segunda oleada de presentación de antígeno y se produce la activación. Más específicamente, las APC interaccionan en el ganglio linfático con células T cooperadoras precursoras a través del acoplamiento de receptores co-estimuladores, así como los receptores de células T para producir las células 1 cooperadoras T (Th1) y/o células 2 cooperadoras T (Th2). La proporción de estos subconjuntos controla el desarrollo posterior de respuestas inmunitarias ya sean mediadas por células o humorales (anticuerpos) (Th1 que tiene tendencia hacia DTH/citotoxicidad, mientras que Th2 tiene tendencia hacia la producción de anticuerpos). Después de la inducción de estas células T activadas, la respuesta inmunitaria desaparece, dejando predominantemente células T de memoria, que son capaces de responder tras la re-exposición a antígeno.

Los episodios críticos en esta vía están mediados por citocinas que inclinan la respuesta en la dirección de la inmunidad humoral o celular. Las citocinas producidas localmente, como IL-1, IL-2, IFN- γ , GM-CSF, IL-6, TNF- α , IL-12 e IL-8, están asociadas con el reclutamiento de células del sistema inmunitario, captación de antígenos, maduración de células dendríticas, amortiguación de la actividad de células T reguladoras, formación y proliferación de células T, y el desarrollo de células Th1 (Naylor, 2003). La interdependencia de la respuesta significa que la actividad de cualquier citocina dada depende de la aparición de episodios precursores de manera que la presencia simultánea de múltiples citocinas puede tener resultados diferentes tanto en el sitio de la inyección como en los ganglios linfáticos drenantes, dependiendo de la cinética de las respuestas de las células a diferentes citocinas.

El hecho de no obtener una respuesta inmunitaria suficiente con las vacunas tradicionales ha seguido siendo un desafío al desarrollo de vacunas. Por ello, los adyuvantes se han desarrollado para acelerar, mejorar y prolongar la respuesta inmunitaria a la vacunación y reducir la cantidad de antígeno necesario por dosis. Los adyuvantes se han utilizado durante casi 100 años. En 1916, por primera vez, Le Moignic y Pinoy reconocieron que la Salmonella typhimurium suspendida en aceite mineral mejoraban respuestas inmunitarias. En 1926, Ramon demostró que podría aumentarse una respuesta antitoxina mediante una gran gama de sustancias como agar, tapioca, lecitina, aceite de almidón, saponina, y migas de pan, y Glenny utilizó sal de aluminio para precipitar el toxoide contra la difteria que mejora la inmunogenicidad, lo cual ha llevado a los alumbres utilizados en la actualidad. En 1936, Thibaud y Richou determinaron que Quil A tenía propiedades adyuvantes. Quil A es una saponina de triterpenoides extraída de la corteza del árbol del jabón Quillaja saponaria Molina Sudamericana. En 1937, Freund también desarrolló adyuvantes a partir de emulsiones. Desde entonces se han hecho pequeños progresos. A medida que se empieza a comprender el sistema inmunológico como se ha descrito anteriormente, más progresos se están haciendo con los adyuvantes. Se han desarrollado varios adyuvantes para vacunas, incluidas vacunas contra el cáncer, pero todavía sólo el alumbre ha tenido realmente éxito en todo el mundo. El alumbre es un adyuvante Th2; sin embargo, también se desean los adyuvantes que proporcionan una respuesta Th1. Los adyuvantes son especialmente necesarios para los grupos poblacionales que no responden suficientemente a las vacunas convencionales debido a la respuesta inmunitaria alterada, como los ancianos o los pacientes inmunodeprimidos. Los adyuvantes tienen el potencial de superar la inmunotolerancia; sin embargo, ninguno ha tenido mucho éxito al hacerlo hasta la fecha. Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad de un adyuvante eficaz para varias enfermedades incluido el cáncer.

La presente invención utiliza el IRX-2 biológico derivado de célula primaria, también conocido previamente como una mezcla de citocinas natural (NCM), según lo divulgado en las patentes de los Estados Unidos 5.632.983 y 5.698.194, concedidas al solicitante, para inmunizar a pacientes y/o mejorar la inmunización con una vacuna contra el cáncer que comprende al menos un ácido nucleico que codifica al menos un antígeno. Más específicamente, se

- ha mostrado previamente en las patentes de los Estados Unidos N.º 5.698.194 que IRX-2 es más eficaz en fomentar el desarrollo y la función de las células de T en ratones envejecidos, inmunodeprimidos. Se demostró que IRX-2 disminuía la proporción de células T inmaduras y aumentaba la proporción de células T maduras en el timo. El IRX-2 incluía IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, G-CSF, e IL-3, IL-4, IL-7 en cantidades traça. Naylor y col. (2008) Journal of Urology, 179:45, describe los estudios preclínicos que utilizan IRX-2 para mejorar las respuestas inmunitarias a dos péptidos de antígeno de membrana específico de próstata. El documento US 2007/0025958 también describe composiciones y procedimientos de inmunoterapia usando IRX-2 para potenciar respuestas inmunitarias a antígenos de péptidos.
- Será evidente a partir de la divulgación detallada en el presente documento que las composiciones de citocinas descritas en el presente documento y sus usos son aplicables a la estimulación de una respuesta inmunitaria a cualquier antígeno de interés, p. ej., antígenos de cáncer o tumorales. Según lo detallado en el presente documento, la mezcla de citocinas actúa como un adyuvante preferiblemente para estimular la inmunidad de células T *in vivo*.
- Además, la presente invención está relacionada con la obtención de una respuesta inmunitaria a un antígeno codificado en un ácido nucleico en un vector vírico, que es procesado y presentado por APC (como las células dendríticas) *in vivo*.
- Como se describe en el presente documento, la presente invención es útil para desarrollar un procedimiento consistente y eficaz de inmunoterapia de vacuna, en donde las respuestas inmunitarias se obtienen en pacientes con cáncer, usando las composiciones de citocinas en combinación con antígenos codificados asociados a enfermedad endógena y/o exógena, incluidos antígenos tumorales y péptidos, así como con otros adyuvantes.
- 20 Sumario de la invención
- La presente invención contempla una composición que comprende un biológico derivado de células primarias que comprende interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), factor α de necrosis tumoral (TNF- α) y γ -interferón (IFN- γ), y una vacuna contra el cáncer que comprende al menos un ácido nucleico que codifica un antígeno en un vector vírico.
- 25 Se prevé que el vector vírico puede ser un retrovirus, adenovirus, o virus adeno-asociado (AAV), virus del herpes o virus de la viruela. En las realizaciones preferidas, el virus de la viruela puede ser un virus de vacuna, vacuna Ankara modificada (MA), NYVAC, viruela aviar, TROVAX, viruela de aves de corral o viruela del canario. En una realización particularmente preferida la viruela del canario puede ser ALVAC o ALVAC (2).
- 30 Se prevé que la composición puede incluir además un adyuvante independiente de receptor tipo peaje y/o un adyuvante dependiente de receptor tipo peaje.
- La presente invención permite la reversión de la inmunosupresión y la adquisición de inmunidad al cáncer, mediante el establecimiento de la administración de un biológico derivado de células primarias que incluye las citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α e IFN- γ , y una vacuna que comprende al menos un ácido nucleico que codifica al menos un antígeno, estimulando la producción de células T sin tratamiento previo, madurando las células dendríticas inmaduras y permitiendo la presentación por células dendríticas maduras del antígeno a las células T sin tratamiento previo, revirtiendo de ese modo la inmunosupresión y adquiriendo inmunidad al cáncer.
- 35 Se prevé que el biológico derivado de células primarias puede comprender 60-6.000 pcg/ml de IL-1, 600-60.000 pcg/ml de IL-2, 60-6.000 pcg/ml de IL-6, 6.000-600.000 pcg/ml de IL-8, 200-200.000 pcg/ml de TNF- α y 200-200.000 pcg/ml de IFN- γ .
- 40 La presente invención también proporciona una composición según se reivindica para uso en el tratamiento del cáncer.
- La presente invención proporciona además una composición que comprende un biológico derivado de células primarias que comprende IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α e IFN- γ , para su uso en un procedimiento de vacunación, comprendiendo dicho procedimiento administrar dicha composición y una vacuna que comprende al menos un ácido nucleico que codifica un antígeno en un vector vírico.
- 45 En una realización preferida, la vacuna es una vacuna contra el cáncer.
- Breve descripción de los dibujos
- Otras ventajas de la presente divulgación se comprenden fácilmente pues el mismo se entiende mejor por referencia a la siguiente descripción detallada cuando se considera conjuntamente con los dibujos adjuntos en donde:
- 50 La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra el tamaño de los ganglios linfáticos en controles normales, controles con cáncer o poblaciones con H&NSCC tratadas con IRX-2;
- La Figura 2A es un gráfico de barras que muestra el área de células T y la Figura 2B muestra la densidad en controles normales, controles con H&NSCC y los pacientes con H&NSCC tratados con IRX-2;

- La Figura 3A es un gráfico de barras que compara el área de las células B y la Figura 3B es un gráfico de barras que compara los folículos en los tres grupos de tratamiento;
- La Figura 4A muestra una comparación de otras células y la Figura 4B muestra una comparación de la histiocitosis sinusal (SH) en los tres grupos de tratamiento;
- 5 La Figura 5 es un gráfico que muestra un registro con ajuste de un ganglio de B&T (células B y células T) y un tumor de B&T;
- La Figura 6 es un gráfico que ilustra el porcentaje de supervivencia de los pacientes tratados a los cuarenta y ocho meses;
- 10 La Figura 7 es un gráfico que ilustra la supervivencia de las personas que responden bien al tratamiento de forma completa y parcial en comparación con las personas que no responden al tratamiento o lo hacen de forma insignificante;
- La Figura 8 es un gráfico que ilustra la relación del índice de patología frente a supervivencia;
- La Figura 9 es un gráfico que muestra la relación de infiltración de linfocitos frente a supervivencia;
- 15 La Figura 10 es un gráfico que ilustra el porcentaje de supervivencia (dosis respuesta) de pacientes tratados a los veinticuatro meses, en donde "x" equivale a aproximadamente 100 UI/ml de IL-2;
- La Figura 11A es un gráfico de barras que ilustra la acumulación de células dendríticas (DC) CD83+parcialmente maduras en los ganglios linfáticos de pacientes con cáncer de SH+;
- La Figura 11B es un gráfico de barras que muestra un aumento en el número de DC activadas CD86+ después del tratamiento con IRX-2 (IRX-2);
- 20 La Figura 12 es un gráfico que muestra que IRX-2 (IRX-2) induce la maduración de DC según se detectó por una expresión de CD83 aumentada en las DC;
- Las Figuras 13A-B representan el efecto de IRX-2 en la morfología de las DC derivadas de monocitos en las preparaciones de citocentrifugación. Las células tratadas con IRX-2 (Figura 13B) mostraron las características morfológicas de las DC maduras tal como proyecciones celulares y grandes núcleos con forma irregular;
- 25 La Figura 14 contiene histogramas que muestran la regulación a la baja del antígeno CD1a y la regulación al alza de la expresión de antígeno MHCII, CD86, CD40 y CD54 (ICAM-1) mediante células mononucleares de sangre periférica (PBMC) incubadas con IRX-2 (IRX-2). Estos cambios indican que el IRX-2 estimula la maduración de las DC.
- 30 La Figura 15 es un gráfico que muestra que el IRX-2 (IRX-2) reduce la actividad endocítica de las DC inmaduras, cuya actividad reducida es indicativa de la maduración de las DC.
- La Figura 16 es un gráfico que muestra que IRX-2 (IRX-2) realza la capacidad estimuladora de las células T de las DC, cuya mejora es indicativa de la maduración y activación de las DC;
- La Figura 17A es un gráfico de barras que muestra que IRX-2 (IRX-2) aumenta el número de DC que producen IL-12 intracelularmente. IL-12 es una citocina producida por las DC activadas maduras;
- 35 La Figura 17B es un gráfico de barras que muestra que IRX-2 (IRX-2) aumenta la cantidad total de IL-12 bioactiva segregada por las DC;
- La Figura 18 es un gráfico de barras que muestra que IRX-2 (IRX-2) disminuye la apoptosis mediada por VEGF en las DC, lo que indica un efecto protector de IRX-2 sobre la supervivencia de las DC;
- 40 La Figura 19A contiene dos gráficos de barras que representan el aumento en porcentaje de monocitos/macrófagos con tinción positiva para la combinación de marcadores de activación, CD86, HLA-DR, CD80 y CD40, después del tratamiento de las PBMC adherentes con IRX-2, según lo determinado por la citometría de flujo;
- La Figura 19B es una serie de gráficos de barras que representan el aumento de la intensidad media de fluorescencia (MFI) para los marcadores de activación, CD86, HLA-DR, CD80 y CD40, después del tratamiento de las PBMC adherentes con IRX-2, según lo determinado por citometría de flujo;
- 45 La Figura 19C muestra dos gráficos de barras que muestran el efecto de IRX-2 sobre CD40 y CD80 a partir de monocitos/macrófagos.
- La Figura 20 contiene gráficos de barras que demuestran que el IRX-2 de la invención activa monocitos/macrófagos, es decir, induce la expresión de marcadores de activación, CD86, HLA-DR, CD80 y CD40, en mayor grado que el TNF- α ;

La Figura 21 contiene gráficos de barras que demuestran que el IRX-2 de la invención activa los monocitos/macrófagos, es decir, induce los marcadores de activación, HLA-DR, CD86 y CD40, incluso en presencia de la citocina inmunosupresora IL-10. El IRX-2 es mejor en la activación de monocitos/macrófagos que los LPS, tanto en presencia como en ausencia de IL-10.

- 5 La Figura 22 es un gráfico de barras que demuestra que el IRX-2 de la invención estimula la producción de TNF- α a partir de monocitos/macrófagos activados y supera los efectos inmunosupresores de IL-10, el IRX-2 estimulaba la producción de TNF- α en mayor medida que LPS;

- 10 La Figura 23 es un diagrama que ilustra la respuesta DTH específica de péptido del antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) de ratones inmunizados con varios conjugados y adyuvantes, que incluyen el IRX-2 de la invención (IRX), en donde la respuesta se indica como hinchamiento en mm para ratones individuales (puntos) y para el promedio (barra), el adyuvante se indica en el eje x, sin tratamiento previo indica ratones no inmunizados, y los demás ratones están inmunizados con conjugados de péptidos Ovalbúmina-PSMA excepto cuando se indique (KLH);

- 15 La Figura 24A representa la respuesta inmunitaria mejorada DTH específica de péptido en ratones inmunizados con el IRX-2 de la invención (IRX-2) en combinación con un conjugado OVA-PSMA o KLH-PSMA y luego se desafió con los péptidos de PSMA (utilizados para generar el conjugado) en un ensayo de DTH: el aumento en hinchamiento para los ratones individuales está representado por los puntos de datos, siendo el aumento promedio del hinchamiento representado por las cajas sombreadas, y la Figura 24B representa la respuesta de la DTH al desafío con solamente el portador usado en la inmunización con conjugado;

- 20 La Figura 25 representa la influencia del tratamiento con ciclofosfamida en la respuesta de la DTH específica del péptido en ratones inmunizados con el conjugado OVA-PSMA y el IRX-2: el tratamiento con ciclofosfamida no tuvo ningún efecto sobre la respuesta de DTH;

- 25 La Figura 26 representa una comparación de los efectos de varios adyuvantes, que incluyen el IRX-2 de la invención (IRX), sobre la respuesta de la DTH específica de péptidos en ratones inmunizados con un conjugado de PSMA en combinación con los respectivos adyuvantes: el efecto adyuvante de IRX-2 era mayor que los otros adyuvantes probados, y ratones sin tratamiento previo, es decir, ratones no inmunizados, representan un control negativo;

- 30 La Figura 27A representa la respuesta de la DTH específica del péptido de ratones adultos frente a jóvenes inmunizados con un conjugado OVA-PSMA en combinación con IRX-2 (IRX) o alumbre como adyuvante: el IRX-2 de la invención estimulaba una mayor respuesta de DTH específica del péptido tanto en ratones adultos como jóvenes en comparación con el alumbre, y la Figura 27B representa la respuesta DTH específica del portador de ratones adultos frente a jóvenes inmunizados con un conjugado de PSMA en combinación bien con IRX-2 (IRX) o bien con alumbre como adyuvante: el IRX-2 de la invención restableció la respuesta de DTH específica del portador en los ratones adultos con la observada en los ratones jóvenes;

- 35 La Figura 28 representa la respuesta mejorada de las células T en forma de IFN- γ secretado por las células del bazo de ratones inmunizados con un conjugado KLH-PSMA y el IRX-2 de la invención (IRX-2), los resultados se expresan para ratones individuales (marcadores de puntos de datos), así como la respuesta promedio (barras sombreadas): todos los aumentos en IFN- γ secretado eran estadísticamente significativos comparados con los controles sin tratamiento previo;

- 40 Las Figuras 29A-C representan las respuestas de anticuerpos séricos observadas en ratones inmunizados con los conjugados PSMA en combinación con el IRX-2 de la invención en comparación con otros adyuvantes, es decir, alumbre y CpG, la Figura 29A representa la respuesta del anticuerpo sérico al portador OVA en ratones inmunizados con el conjugado OVA-PSMA e IRX-2 (IRX), Alumbre o CpG, los datos se presentan como media y desviación estándar de la media para 5-10 ratones por grupo, la Figura 29B representa la respuesta de anticuerpos séricos a los péptidos PSMA en ratones inmunizados con el conjugado OVA-PSMA e IRX-2 (IRX), alumbre o CpG, y la Figura 45 29C representa la respuesta de anticuerpos séricos a los péptidos PSMA en ratones inmunizados con el conjugado KLH-PSMA en combinación con IRX-2 (IRX), alumbre o PBS, los resultados fueron determinados por análisis de ELISA y se presentan como densidad óptica.

La Figura 30 representa la estabilización de los niveles de PSA durante un período de 6 meses en tres pacientes con cáncer de próstata tratados con el IRX-2 de la invención en combinación con antígenos de péptidos PSMA;

- 50 La Figura 31 es un gráfico de barras de respuestas de la DTH específica de péptidos de ratones inmunizados con PSMA irradiados que expresan células 3T3;

La Figura 32 es un gráfico de barras que muestra una DTH específica de péptidos en PSMA-KLH frente a sin portador;

- 55 La Figura 33A es un gráfico que muestra la respuesta creciente de IRX-2 al antígeno de una manera dependiente de la dosis, y la Figura 33B es un gráfico de barras del efecto de inyecciones adicionales de IRX-2 sobre la respuesta inmunitaria al antígeno;

La Figura 34 es un gráfico de barras que muestra el ensayo de la DTH de ratones inmunizados con péptido de PSMA inyectados con IRX-2 frente a otros adyuvantes;

La Figura 35 es un gráfico de barras de la producción de IFN- γ en respuesta al antígeno de péptido;

La Figura 36 es un gráfico de respuestas de anticuerpos séricos;

5 La Figura 37 es un gráfico de respuesta del anticuerpo sérico de IRX-2 frente a otros adyuvantes;

La Figura 38A es un gráfico del número de células T que producen IFN- γ en respuesta al antígeno de péptido; la Figura 38B es un gráfico que compara el número de células productoras de IFN- γ frente a la producción total de IFN- γ en respuesta al antígeno de péptido;

La Figura 39 es un gráfico de la cinética de la producción de IFN- γ en respuesta a la vacunación con péptido;

10 La Figura 40A es un gráfico de la producción de IFN- γ en respuesta a la dosis en respuesta a la vacunación con péptido; la Figura 40B es un gráfico del número de células que producen IFN- γ después de diversas administraciones de IRX-2;

15 La Figura 41A es un gráfico de la producción de IFN- γ después de la vacunación con IRX-2 frente a otros adyuvantes; la Figura 41B es un gráfico de respuesta de anticuerpos después de la vacunación con IRX-2 frente a otros adyuvantes;

La Figura 42A es un gráfico de crecimiento tumoral después de la inmunización previa con IRX-2 y una vacuna de células enteras; la Figura 42B es un gráfico de crecimiento tumoral después de la inmunización previa con IRX-2 y una vacuna de péptido-conjugado; la Figura 42C es un gráfico de crecimiento tumoral después de la inmunización previa con IRX-2 y el conjugado solo.

20 La Figura 43 es un gráfico de la producción del IFN- γ de las células T después de la vacunación con IRX-2 y otros adyuvantes;

La Figura 44 es un gráfico de células específicas del antígeno después de la vacunación con IRX-2 y otros adyuvantes;

La Figura 45 es un gráfico de citotoxicidad *in vivo* después de la vacunación con IRX-2 y otros adyuvantes;

25 La Figura 46 es un gráfico de respuesta de anticuerpos séricos después de la vacunación con una vacuna vírica e IRX-2;

La Figura 47 es un gráfico de las respuestas de IFN- γ de las células T después de la vacunación con una vacuna basada en virus e IRX-2;

30 La Figura 48 es un gráfico de las respuestas de IFN- γ de las células T después de la vacunación con una vacuna basada en virus que expresa TRICOM e IRX-2;

La Figura 49 es un gráfico de las respuestas de IFN- γ de las células T después de la vacunación con una vacuna basada en virus e IRX-2;

La Figura 50 es un gráfico de respuestas de IgM después de la vacunación con una vacuna basada en virus e IRX-2; y

35 La Figura 51 es un gráfico de respuestas de IgG₁ e IgG_{2A} después de la vacunación con una vacuna basada en virus e IRX-2.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención se refiere a composiciones y usos de las mismas para la vacunación y el tratamiento del cáncer, según se reivindica. Más específicamente, la invención se refiere a composiciones para provocar una respuesta inmunitaria a los antígenos asociados con un cáncer, en donde un biológico derivado de células primarias que comprende IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ , y TNF- α , así como una vacuna contra el cáncer que comprende al menos un ácido nucleico que codifica al menos un antígeno en un vector vírico mediante el establecimiento de la administración a un paciente de una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmunitaria al antígeno en el paciente. El biológico derivado de células primarias también se puede utilizar en combinación con otros adyuvantes como se describe en el presente documento.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, el término "adyuvante" indica una composición con la capacidad de mejorar la respuesta inmunitaria a un antígeno determinado. Tal capacidad se manifiesta por un aumento significativo en la protección mediada inmunitaria. Para ser eficaz, un adyuvante debe ser enviado al sitio o cerca del sitio del

antígeno. La mejora de la inmunidad se manifiesta típicamente por un aumento significativo (generalmente más de 10 veces) en el título del anticuerpo elevado para el antígeno y/o a la mejora de la inmunidad celular, que se puede medir por una prueba positiva de la piel, análisis de células T citotóxicas, análisis ELISPOT para IFN- γ o IL-2, o la infiltración de células T en el tumor. Las composiciones de citocinas de la presente invención son particularmente adecuadas para mejorar las respuestas inmunitarias mediadas por células T. Los efectos adyuvantes de las composiciones de citocinas de la invención incluyen la generación de células T sin tratamiento previo, la promoción de la diferenciación y la maduración de las células dendríticas, la estimulación de monocitos y macrófagos, y en el caso de los pacientes con cáncer, el aumento de la infiltración de linfocitos en los tumores, la fragmentación del tumor, la regresión del tumor y la reducción de la histiocitosis sinusal en los ganglios linfáticos.

5 "Sistema adyuvante" como se usa en el presente documento indica la combinación de adyuvantes para trabajar juntos para obtener, de forma óptima, una formulación eficaz y segura, en la que cada parte de la vacuna, el antígeno y adyuvantes, trabajen juntos para producir una respuesta inmunitaria. Ejemplos de tales sistemas adyuvantes son vacunas formuladas ASO2, 3 y 4 elaboradas por Glaxo Smith Kline (GSK).

10 "Vacuna" como se usa en el presente documento, se refiere a una vacuna que incluye al menos un antígeno, y preferiblemente más de un antígeno, que se administra a un paciente para crear una respuesta inmunitaria y preferiblemente respuesta de células T a antígenos enviados. La vacuna puede incluir otros diversos componentes tales como una portadora u otras moléculas estimuladoras. Las vacunas pueden ser vacunas basadas en ADN, vacunas basadas en péptidos, o vacunas basadas en proteínas, codificadas en varios vectores o células víricas/bacterianas.

15 Como se usa en el presente documento, "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de biológico derivado de células primarias que es necesario para lograr el resultado deseado de la presente invención, a saber, producir una respuesta inmunitaria a un antígeno de una manera sinérgica. Un experto en la técnica puede determinar la cantidad eficaz del biológico derivado de células primarias que se debe dar a un paciente en particular.

20 "IRX-2", también conocido como "citopluricin", es un biológico natural derivado de células primarias, derivado de leucocitos, producido por glóbulos blancos (células mononucleares) humanos purificados, estimulados por fitohemaglutinina (PHA) y ciprofloxacina (CIPRO). Por definición, IRX-2 es un sistema adyuvante. Los componentes activos principales son interleucina 1 β (IL-1 β , también referido en el presente documento como IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), factor α de necrosis tumoral (TNF- α), y γ -interferón (IFN- γ). Preferiblemente, el IRX-2 usado en la presente invención incluye estas seis citocinas críticas. El IRX-2 también se ha referido previamente como "NCM", mezcla natural de citocinas, definida y expuesta en las patentes de los Estados Unidos N.º 6.977.072 y 7.153.499. Los términos IRX-2, biológico derivado de células primarias, y NCM se utilizan indistintamente en el presente documento.

25 En resumen, IRX-2 se prepara en la presencia continua de un antibiótico de 4-aminoquinolona y con la presencia continua o pulsada de un mitógeno, que en la realización preferida es PHA. Sin embargo, también se pueden utilizar otros mitógenos. El IRX-2 producido para la administración a los pacientes contiene una concentración de IL-1 β que varía de 60-6.000 pcg/ml, más preferiblemente, de 150-1.800 pcg/ml; una concentración de IL-2 que varía de 600-60.000 pcg/ml, más preferiblemente, de 3.000-12.000 pcg/ml, y las concentraciones de IFN- γ y de TNF- α que varía de 200-20.000 pcg/ml, más preferiblemente, de 1.000-4.000 pcg/ml.

30 IRX-2 puede contener también una concentración de IL-6 que varía de 60-6.000 pcg/ml, más preferiblemente, de 300-2.000 pcg/ml; una concentración de IL-8 que varía de 6.000-600.000 pcg/ml, más preferiblemente de 20.000-180.000 pcg/ml; una concentración de TNF- α que varía de 200-20.000 pcg/ml, más preferiblemente, de 1.000-4.000 pcg/ml. Se pueden utilizar citocinas recombinantes, naturales o pegiladas, o IRX-2 puede incluir una mezcla de citocinas recombinantes, naturales o pegiladas. IRX-2 puede contener solamente las citocinas anteriores; sin embargo, pueden incluirse otras citocinas. El IRX-2 de la presente invención puede incluir además otras citocinas recombinantes, naturales o pegiladas, tal como IL-7, IL-12, IL-15, GM-CSF (a una concentración que varía de 100-10.000 pcg/ml, más preferiblemente de 500-2.000 pcg/ml), y G-CSF. El procedimiento de elaborar IRX-2 se divulga en las patentes anteriormente citadas.

35 También abarcados por la presente invención están los derivados, fragmentos y péptidos relacionados con las citocinas divulgadas en el presente documento, donde tales derivados, fragmentos y péptidos conservan la actividad biológica de sus respectivas citocinas.

40 También se pueden administrar otros compuestos junto con IRX-2, como las composiciones para fomentar la inmunosupresión, tal como inhibidores químicos; fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE); cinc y sus combinaciones. El inhibidor químico puede ser cualquier agente quimioterapéutico que no sea inmunosupresor (usado preferiblemente en dosis bajas) y que tenga efectos inmunomoduladores para aumentar la inmunidad y/o una respuesta inmunitaria, p. ej., inhibiendo la inmunosupresión o mecanismos supresores en el cuerpo. Según una realización preferida, el inhibidor químico es un agente anti-neoplásico que incluye, pero no se limita a agentes alquilantes, antimetabolitos y antibióticos. El inhibidor químico puede también ser un agente inmunomodulador tal como talidomida. El inhibidor químico puede también estar en una sal u otra forma compleja. Preferiblemente, el inhibidor químico es el agente alquilante ciclofosfamida (CY). El AINE es preferiblemente indometacina (INDO), que

es a la vez un inhibidor Cox1 y CoxII. El AINE puede ser también ibuprofeno o inhibidores CoxII tal como celecoxib y rofecoxib, o combinaciones de los mismos. Los cuatro componentes utilizados juntos (es decir, inhibidor químico, AINE, biológico derivado de células primarias y cinc) son capaces de abordar el entorno supresor creado por la diana inmunitaria y restablecer la respuesta inmunitaria celular del paciente. Más específicamente, el inhibidor químico inhibe células reguladoras T; el AINE invierte la inmunosupresión local mediante prostaglandinas, el biológico derivado de células primarias activa las células dendríticas, estimula las células T y protege de apoptosis a las células T; y el zinc proporciona nutrientes clave para la función de células T como se muestra en la FIGURA 2. Esta acción combinada fomenta la respuesta inmunitaria a los antígenos tanto endógenos como exógenos.

Como se usa en el presente documento, el término "antígeno endógeno" indica un antígeno que se produce y se sitúa *in vivo*.

Como se usa en el presente documento, el término "antígeno exógeno" indica un antígeno que es producido, es decir, aislado o generado, *in vitro*.

Como se usa en el presente documento, el término "antígeno asociado al tumor" indica una proteína o péptido u otra molécula capaz de inducir una respuesta inmunitaria a un tumor. Esto puede incluir, pero no se limita a, péptidos PSMA, péptidos MAGE (Sahin, 1997; Wang, 1999), péptidos del virus Papiloma (E6 y E7), fragmentos de MAGE, NY ESO-1 u otros antígenos similares. Anteriormente, estos antígenos no se consideraban eficaces en el tratamiento de pacientes basados en su tamaño, es decir, se consideraban demasiado pequeños, o previamente se creía que carecían de propiedades inmunogénicas (es decir, se consideraban auto-antígenos).

Los péptidos largos sintéticos se definen como secuencias peptídicas entre 22 y 45 aminoácidos. Las vacunas de péptidos largos sintéticos ofrecen varias ventajas sobre las vacunas de secuencia peptídica mínima, que se explican a continuación. Uno de los factores clave en la eficacia de la vacuna es el contexto en el que los péptidos se presentan al sistema inmunitario. Los péptidos largos sintéticos no pueden unirse directamente a MHC clase I pero necesitan ser captados y procesados por células dendríticas y después presentados a las células T citotóxicas. Por el contrario, los péptidos mínimos de células T citotóxicas (8-10 aminoácidos), son fácilmente cargados de forma exógena en las moléculas MHC de clase I y pueden ser presentados tanto por APC (DC) profesional como por APC (células T y células B) no profesional *in vivo*. La presentación de los epítopes citotóxicos de péptido de células T en las células de B no activadas induce una respuesta citotóxica transitoria de células T que es seguida por una eliminación posterior de estas células T CD8+. La lenta liberación y larga duración de presentación a antígeno que es inducida por el adyuvante IFA, más de 100 días, en combinación con la presentación mínima de péptidos de células T citotóxicas en ganglios linfáticos no-inflamatorios por APC no profesional induce tolerancia de células T CD8+ y fratricidio cuando las células T CD8+ activadas por vacuna de péptido presentan el péptido mínimo de células T citotóxicas entre sí. En cambio, la carga de péptidos mínimos de unión de MHC clase I directamente sobre DC puede transformar un péptido tolerante de células T citotóxicas en un péptido que desencadena la expansión de una respuesta de células T citotóxicas protectoras del tumor. De forma similar, la extensión de la secuencia de péptidos de células T citotóxicas frente a un péptido sintético largo, que requiere el procesado profesional por las DC, tiene el mismo beneficio. Los péptidos sintéticos largos se procesan y presentan sobre todo por el APC profesional y por lo tanto estimulan las células T citotóxicas predominantemente dentro del fuerte entorno estimulador de la linfa de drenaje inflamada. Otra ventaja de las vacunas de péptidos sintéticos largos sobre las vacunas de péptidos mínimos de células T citotóxicas es la mayor duración de la presentación del epítipo *in vivo* al antígeno que drena el ganglio linfático, que es importante para la extensión clónica y para la producción del IFN- γ por células T efectoras. Esto mejoraba la presentación *in vivo* y la inducción simultánea de la expansión de células T por un epítipo de péptido sintético largo es particularmente evidente si el epítipo de células T citotóxicas al que se refiere presenta una unión más débil de MHC de clase I. Por lo tanto, la transformación de péptidos mínimos de células T citotóxicas en péptidos largos ofrece una alternativa a procedimientos tales como la modificación de péptidos mínimos de células T citotóxicas para aumentar la inmunogenicidad.

Ejemplos de péptidos largos sintéticos para HPV son los siguientes:

E61-32: MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHD;

E619-50: LPQLCTELQTTIHDIIILECVYCKQQLLRREVY;

E641-65: KQQLLRREVYDFAFRDLICIVYRDGN;

E655-80: RDLICIVYRDGNPYAVCDKCLKFYFSKI;

E671-95: DKCLKFYFSKISEYRHYCYSLYGTTL;

E685-109: HCYSLYGTTLQYQNKPLCDLLIR;

E691-120: YGTTLQYQNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEK;

E6109-140: RCINCQKPLCPEEKQRHLDKQRFHNIRGRWT;

E6127-158: DKKQRFHNRGRWTGRCMSCCRSSRTRRETQL;

E71-35: MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEE;

E722-56: LYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVT;

E743-77: GQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIR;

5 E764-98: TLRLCVQSTHVDIRTDLELLMGTGLGIVCPICSQKP.

Más específicamente, la presente invención se refiere a una composición que incluye un biológico derivado de células primarias (IRX-2) que tiene las citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α , e IFN- γ , y una vacuna contra el cáncer que comprende al menos un ácido nucleico que codifica al menos un antígeno en un vector vírico. El IRX-2 actúa como adyuvante solo o en combinación con otros adyuvantes, con el antígeno o antígenos codificados por la vacuna, es decir, estimula una respuesta inmunitaria con el antígeno. En otras palabras, IRX-2 actúa de una manera sinérgica con el antígeno exógeno para crear una mayor respuesta inmunitaria que la que se puede lograr administrando los antígenos exógenos solos. IRX-2 proporciona ventajas sobre los adyuvantes previos debido a su efecto de "activar" totalmente el sistema inmunitario de un paciente cuyo sistema inmunitario está de cualquier manera suprimido de su función completa. Sin revertir la supresión del sistema inmunitario, el antígeno no se puede presentar con eficacia para tratar el cáncer y otras enfermedades. El mecanismo por el cual IRX-2 "activa" el sistema inmunitario se describe más adelante.

La composición se puede utilizar para tratar muchos tipos diferentes de enfermedades como cánceres, como, pero no limitado a, carcinoma de célula escamosa de cabeza y cuello (H&NSCC), cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer del estómago, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de lengua, cáncer de faringe, cáncer de próstata y melanoma. Además, las composiciones y los procedimientos de la invención se pueden utilizar para tratar lesiones persistentes no cancerosas tales como lesiones infecciosas que producen un antígeno *in vivo*, p. ej., candidiasis cutánea o sistémica, verrugas venéreas asociadas con el virus del papiloma, o displasia de cuello uterino.

El IRX-2 es esencialmente como se describió anteriormente en la sección de las definiciones y, opcionalmente, puede incluir citocinas adicionales distintas de las seis citocinas críticas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α , e IFN- γ , y la composición puede incluir, además, opcionalmente, otros diversos compuestos que se administran en el régimen típico de IRX-2, es decir, un inhibidor químico, un AINE, y cinc también como se describió anteriormente.

La vacuna es cualquier vacuna que comprende al menos un ácido nucleico que codifica un antígeno en un vector vírico, que se usa para tratar el cáncer estimulando una respuesta inmunitaria a un antígeno particular e incluye, generalmente, al menos un antígeno comúnmente producido en ese tipo particular de cáncer.

Los antígenos comunes utilizados en las vacunas contra el cáncer incluyen AFP, alfa-actinina-4, ARTC1, BAGE, BCR-*abl*, B-RAF, CA 15-3, CA 19-9, CA-125, CASP-5, CASP-8, beta-catenina, antígeno carcinoembrionario, antígeno carcinoembrionario modificado, mucinas mutadas asociadas a carcinoma, *cdc27*, CDK4, CDKN2A, CEA, cromogranina A, COA-1, cinasa-4 dependiente de ciclina, proteína de fusión *dek-can*, EFTUD, factor 2 de elongación, receptor EGFRvIII del factor de crecimiento epidérmico, producto génico del virus de Epstein-Barr EBNA, ETA, proteína de fusión ETV6-AML1, FLT3-ITD, FN1, GAGE, gangliósidos, GPNMB, gp75/TRP-1, gp100, H1FT, HAGE, HERV-K-MEL, proteína HER2/*neu*, HIP-55, HIV-1, HIV-2, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, *cinesina 2*, KK-LC-1, KLK-4, KM-HN-1, KSA, LAGE, proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasa AS, MAGE, mamaglobina-A, MART-1/Melan A, MART-2, ME1, proteoglicano de melanoma, miosina clase I, MUC-1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NA-88, NCAM-180, neo-PAP, NFYC, NY-BR, NY-ESO-1, OA1, OGT, OS-9, p15, p21-*ras*, p53, p185 HER2/*neu*, E7 del virus del papiloma, E6 del virus del papiloma, proteína de fusión *pmi-RAR*alfa, PRDX5, PTPRK, PSA, PSMA, RAGE, K-*ras*, N-*ras*, RAB38, RBAF600, SAGE, SIRT2, SNRPD1, sp17, proteína de fusión SYT-SSX1, proteína de fusión SYT-SSX2, TA 90, TAG, factor antiapoptótico TGF- β 1, TGF- β RII, tiroglobulina, TRAG-3, triosa fosfato isomerasa, TRP2, TRP2-INT2, proteína tumoral D52, tirosinasa, WT1, fragmentos de los mismos, derivados de los mismos, y sus combinaciones. También se puede utilizar cualquier otro antígeno adecuado.

Los antígenos están codificados en un vector vírico, es decir, un vector de ácido nucleico. En este caso, el antígeno está codificado en material de ácido nucleico, como ADN o ARN. Los vectores víricos comunes usados para codificar el ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus del herpes, y virus de la viruela. Ejemplos de virus de la viruela incluyen la vacuna, la vacuna Ankara modificada (MA), NYVAC, virus de la viruela aviar, TROVAX, viruela de aves de corral y viruela del canario. Ejemplos específicos de viruela del canario incluyen ALVAC y ALVAC(2). Un experto en la técnica puede codificar los antígenos en el vector deseado.

La composición puede incluir también moléculas co-estimuladoras para estimular las células T. Las células T requieren dos señales diferentes para ser completamente activadas. La primera señal es específica de antígeno y viene del receptor de células T que interactúa con las moléculas MHC del péptido en la membrana de las células presentadoras de antígeno. La segunda señal, que es la señal co-estimuladora, es antígeno no específico y se logra

mediante la interacción entre moléculas co-estimuladoras expresadas en la membrana de las células presentadoras de antígeno y la célula T. Las moléculas co-estimuladoras se pueden encontrar de forma natural en el cuerpo; sin embargo, en un paciente inmunodeprimido, pueden administrarse moléculas adicionales. Ejemplos de moléculas co-estimuladoras incluyen abatacept, belatacept, CD28-SuperMAB, moléculas co-estimuladoras B7/CD28, moléculas co-estimuladoras de la superfamilia TNF, moléculas co-estimuladoras de la familia SLAM, así como otras.

La composición puede incluir también péptidos sintéticos largos como se ha descrito anteriormente. Esta combinación es un ejemplo de combinar una vacuna que tiene un mecanismo de acción novedoso con la composición de la presente invención para obtener una respuesta sinérgica debido al mecanismo combinado de acción de los dos componentes.

La composición también puede incluir compuestos para el bloqueo de mecanismos inmunitarios supresores o reguladores negativos, tales como anti-CTLA-4, anti-PD-1 o anti-PDL-1. La familia de receptores CTLA-4 (Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos), cuando se acoplaba, inhibe la activación de células T, promueve la detención del ciclo celular, y disminuía la producción de citocinas. Ésta es una función importante en un sistema inmunitario que funciona normalmente para prevenir respuestas inmunitarias excesivas. Sin embargo, se desea la inhibición del receptor CTLA-4 en un paciente inmunodeprimido para eliminar algo de la supresión y estimular la activación de células T.

La composición puede incluir además una molécula que elimina las Treg. Las Treg, o células T reguladoras, distinguen entre los auto-antígenos y los no auto-antígenos e inhiben activamente la activación inmunitaria. El agotamiento de las Treg puede reducir la supresión del sistema inmunitario en un paciente inmunodeprimido. Este agotamiento se puede lograr administrando una molécula que agote las Treg como, pero sin limitarse a, denileucina difitox (ONTAK®, Eisai Inc.).

La composición puede incluir antígenos asociados a la angiogénesis con el fin de prevenir o inhibir los procesos angiogénicos que ocurren cerca o dentro de los tumores. Los antígenos asociados a angiogénesis pueden incluir, pero no se limitan a, VEGF, receptor de VEGF, EGFR, bFGF, PDGF-B, PD-ECGF, los TGF que incluyen TGF- α , endoglin, proteínas Id, varias proteasas, óxido nítrico sintasa, aminopeptidasa, trombospondinas, k-ras, Wnt, cinasas dependientes de ciclina, microtúbulos, proteínas de choque térmico, factores de unión a heparina, sintasas, receptores de colágeno, integrinas y proteoglicanos NG2 de superficie.

La composición puede incluir además agentes potenciadores CD80, ICAM-1, y LFA-3, también conocido como TRICOM, para mejorar el efecto del biológico derivado de células primarias y de la vacuna contra el cáncer, así como otros componentes descritos anteriormente. Otras combinaciones de agentes potenciadores incluyen IL-12 y GM-CSF; IL-12, GM-CSF y TNF- α ; CD80 e IL-12; y CD86, GM-CSF e IL-12.

La presente divulgación también se refiere también a una composición que incluye el biológico derivado de células primarias según lo descrito anteriormente, que de por sí actúa como adyuvante, y al menos otro adyuvante para estimular el sistema inmunitario de un paciente. Los antígenos exógenos, como en las vacunas contra el cáncer y los demás componentes descritos anteriormente, también pueden incluirse en la composición. En otras palabras, la composición es una composición multi-adyuvante que realiza adicionalmente el efecto de los antígenos. Además, el biológico derivado de células primarias no sólo mejora el efecto de los antígenos descritos anteriormente, sino también el efecto de los adyuvantes, es decir, el biológico derivado de células primarias actúa de forma sinérgica con los adyuvantes.

Hay dos clases diferentes de adyuvantes: los independientes de receptor tipo peaje (TLR) y los dependientes de TLR. Los adyuvantes independientes de TLR actúan como sistemas de entrega y colaboran para concentrar los antígenos, dirigirlos a las células de presentación de antígenos, y localizar conjuntamente antígenos y potenciadores inmunitarios. Los adyuvantes dependientes de TLR estimulan directamente el sistema inmunitario a través de la activación de los TLR. La composición de la presente invención se puede utilizar con un adyuvante independiente de TLR, un adyuvante dependiente de TLR, o combinaciones de los mismos. El uso de cada tipo de adyuvante puede estimular diferentes partes del sistema inmunológico a la vez. Por ejemplo, un adyuvante independiente de TLR puede poner en circulación el antígeno y los adyuvantes dependientes del TLR hacia las APC para estimular la captación y estabilidad del antígeno, mientras que el adyuvante dependiente de TLR realiza directamente la inmunidad a través de la activación de la señalización de TLR y reduce la potencial toxicidad de la administración de adyuvantes dependientes de TLR por su cuenta. Además, el uso de múltiples adyuvantes dependientes de TLR puede dar como resultado un efecto sinérgico de los adyuvantes.

Los adyuvantes pueden ser, pero no se limitan a, los siguientes adyuvantes. Adyuvantes independientes de TLR: Alumbre (fosfato/hidróxido de aluminio) es una sal mineral con varias indicaciones. AS03 (GSK; escualeno (10,68 mg), DL-alfa-tocoferol (11,86 mg) y polisorbato 80 (4,85 mg) es una emulsión de aceite en agua que se utiliza para la gripe pandémica. MF59 (Novartis; 4-5 % p/v de escualeno, 0,5 % p/v de Tween 80, 0,5 % de Span 85, opcionalmente: cantidades variables de muramul tripéptido fosfatidil-etanolamina (MTP-PE)) es una emulsión de aceite en agua utilizada para la gripe. Provac (Biogen Idec; escualeno más pluronic L121) es una emulsión de aceite en agua. Montanide (Seppic SA; Bioven; Cancervax; oleato de mannida y aceite mineral) es una emulsión de agua en aceite que se utiliza en el tratamiento de la malaria y del cáncer. TiterMax (CytRx; escualeno mas CRL-8941) es

una emulsión de agua en aceite. Advax (Vaxine Pty; partículas nanocrystalinas de inulina) es un biopolímero que se utiliza en vacunas contra la Hepatitis B (profiláctica y terapéutica), gripe, ántrax, shigella, encefalitis japonesa, rabia, veneno de abeja, alergia, e inmunoterapia del cáncer. QS21 (Antigénicos; fracción de Quil A) es una composición de origen vegetal que se utiliza en el tratamiento del melanoma, la malaria, el VIH y la gripe. Quil A (Statens Serum Institute; fracción purificada de Quillaja Saponaria) es una composición de origen vegetal utilizada en varios tratamientos. ISCOM (CSL; Isconova; saponina mas esteroles mas, opcionalmente, fosfolípido) es una composición de origen vegetal que se utiliza en varios tratamientos que incluyen la gripe. Se utilizan liposomas (Crucell; Nasvax; esferas de fosfolípido sintético que consisten en lípido) en el tratamiento de varias enfermedades.

Adyuvantes dependientes de TLR: Ampligen (Hemisphere; regiones de desapareamiento que aparecen regularmente que contiene ARN de doble cadena configurado específicamente sintético) trabaja activando TLR3 y se utiliza como una vacuna contra la gripe pandémica. AS01 (GSK; MPL, liposomas y QS-21) trabaja activando con MPL TLR4, los liposomas proporcionan una entrega del antígeno realizada a las APC, QS-21 proporciona la mejora de la presentación del antígeno a la APC y la inducción de células T citotóxicas, y esto se utiliza como una vacuna contra la malaria y la tuberculosis. AS02 (GSK; MPL, emulsión de aceite en agua, y QS-21) trabaja activando con MPL TLR4, la emulsión de aceite en agua proporciona respuestas inflamatorias innatas, reclutamiento y activación de APC, mejora de la persistencia del antígeno en el sitio de la inyección, presentación a células inmunocompetentes, provocación de diversos patrones de citocinas, y el QS-21 proporciona la mejora de la presentación del antígeno a las APC y a la inducción de las células T citotóxicas, y esto se utiliza como vacuna contra la malaria, la tuberculosis, el HBV, y el HIV. AS04 (GSK; MPL, hidróxido de aluminio/fosfato de aluminio) trabaja activando con MPL TLR4, el alumbre proporciona un efecto de depósito, inflamación local, y aumento de la captación de antígeno por las APC, y esto se utiliza como una vacuna para HBV, HPV, HSV, RSV, y EBV. MPL RC-529 (Dynavax; MPL) trabaja activando TLR4 y se utiliza como vacuna contra el HBV. E6020 (Eisa/Sanofi Pasteur; dímero fosfolípido sintético) trabaja activando TLR4. La tecnología TLR (Vaxinnate; antígeno y flagelina) trabaja activando TLR5 y se utiliza en vacunas contra la gripe. PF-3512676 (CpG 7909) (Coley/Pfizer/Novartis; oligonucleótido sintético inmunomodulante) trabaja activando TLR9 y se utiliza en vacunas contra el HBV, la gripe, la malaria y el ántrax. ISS (Dynavax; secuencias cortas de ADN) trabaja activando TLR9 y se usa en vacunas contra el HBV y la gripe. IC31 (Intercell; péptido y oligonucleótido) trabaja activando TLR9, formación de un depósito en el sitio de la inyección, y la mejora de la captación del antígeno en las APC y se utiliza como vacuna contra la gripe, la tuberculosis, la malaria, la meningitis, la alergia, y los indicios de cáncer.

Debe entenderse también que las combinaciones de biológico derivado de células primarias y adyuvantes se pueden utilizar para otros indicios que los recomendados actualmente para los adyuvantes anteriores, y se pueden utilizar especialmente en indicios de cáncer como se describe en el presente documento. Así, la combinación de biológico derivado de células primarias y adyuvante se puede utilizar para mejorar el sistema inmunitario y tratar cualquiera de las enfermedades indicadas específicamente para los adyuvantes o para cualquier otra enfermedad descrita en el presente documento.

Además, la presente divulgación incluye el biológico derivado de células primarias y otro adyuvante según lo descrito anteriormente que tiene un diferente mecanismo de acción que el del biológico derivado de células primarias. El biológico derivado de células primarias actúa para "activar" eficazmente el sistema inmunitario madurando células dendríticas inmaduras, estimular la producción de células T sin tratamiento previo y presentar eficazmente el antígeno a las células T sin tratamiento previo. El mecanismo de acción se describe adicionalmente a continuación. Cuando se combina con un adyuvante que actúa en otra área del sistema inmunitario, el biológico derivado de células primarias y el adyuvante pueden producir una respuesta sinérgica en el sistema inmunitario estimulando múltiples áreas del sistema inmunitario a la vez.

La presente invención proporciona composiciones para uso en el tratamiento del cáncer, que comprende la composición descrita anteriormente que incluye el biológico derivado de células primarias que incluye las citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α , e IFN- γ , y una vacuna contra el cáncer que comprende al menos un ácido nucleico que codifica al menos un antígeno en un vector vírico. La composición es eficaz en el tratamiento del cáncer porque el biológico derivado de células primarias y los antígenos interactúan de manera sinérgica para presentar antígenos a las células T y activar el sistema inmunológico. En general, el biológico derivado de células primarias actúa para estimular la producción de células T sin tratamiento previo, madurar las células dendríticas inmaduras y permitir la presentación mediante las células dendríticas maduras resultantes de los antígenos exógenos en la vacuna contra el cáncer a las células T sin tratamiento previo. El mecanismo de acción se describe adicionalmente a continuación. En otras palabras, sin la acción del biológico derivado de células primarias, la vacuna contra el cáncer no sería tan eficaz en la generación de inmunidad al cáncer en el paciente porque el sistema inmunológico permanecería deprimido. El paso de la administración se puede alcanzar como se describe adicionalmente a continuación, y preferiblemente por inyección perilesional una vez al día.

Las células T en el paciente pueden también ser co-estimuladas administrando moléculas co-estimuladoras como se ha descrito anteriormente para generar las señales no específicas del antígeno a las células T. La inhibición de las células T puede estar restringida por la administración de anti-CTLA-4 como se ha descrito anteriormente con el fin de estimular adicionalmente las células T como se ha descrito anteriormente. Las Treg se pueden agotar administrando moléculas que agotan las Treg para reducir adicionalmente la supresión del sistema inmunitario como se ha descrito anteriormente. La inducción y el desarrollo continuado de los vasos sanguíneos en tumores se

pueden impedir administrando antígenos asociados a angiogénesis como se ha descrito anteriormente. Se pueden administrar agentes potenciadores que mejoran el efecto de los componentes de la composición como se ha descrito anteriormente.

5 Los usos médicos de la composición para tratar el cáncer pueden incluir adicionalmente la realización de una terapia tal como quimioterapia, radiación, terapia anti-angiogénica, y combinaciones de las mismas. Cada una de estas terapias es más eficaz cuando se realiza en combinación con la composición de la presente invención que cuando se realiza sola.

10 La presente divulgación también describe para un procedimiento de revertir la inmunosupresión y ganar inmunidad al cáncer administrando la composición descrita anteriormente que incluye cantidades sinérgicas del biológico derivado de células primarias que incluye citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α e IFN- γ , y una vacuna contra el cáncer que comprende al menos un ácido nucleico que codifica un antígeno, estimulando la producción de células T sin tratamiento previo, madurando las células dendríticas inmaduras, y permitiendo la presentación de células dendríticas maduras resultantes de los antígenos exógenos en la vacuna contra el cáncer a las células T sin tratamiento previo, revirtiendo con ello la inmunosupresión y adquiriendo inmunidad al cáncer. En otras palabras, el biológico derivado de células primarias y la vacuna contra el cáncer trabajan juntos con el fin de activar eficazmente el sistema inmunológico en el paciente inmunodeprimido y estimular la inmunidad al cáncer basado en los antígenos exógenos.

20 Como en el procedimiento anterior, las células T en el paciente pueden también ser co-estimuladas administrando moléculas co-estimuladoras según lo descrito anteriormente para generar las señales no específicas del antígeno a las células T. La inhibición de las células T puede ser prohibida mediante la administración de anti-CTLA-4 como se ha descrito anteriormente con el fin de estimular adicionalmente las células T como se ha descrito anteriormente. Las Treg pueden agotarse administrando moléculas que agotan Treg para reducir adicionalmente la supresión del sistema inmunario según lo descrito anteriormente. La inducción y el desarrollo continuado de los vasos sanguíneos en tumores se pueden impedir administrando antígenos asociados a angiogénesis como se ha descrito anteriormente. Se pueden administrar agentes potenciadores que mejoran el efecto de los componentes de la composición como se ha descrito anteriormente.

25 El procedimiento de revertir la inmunosupresión y ganar inmunidad al cáncer puede incluir adicionalmente la realización de una terapia como la quimioterapia, la radiación, la terapia anti-angiogénica y las combinaciones de las mismas. Cada una de estas terapias es más eficaz cuando se realiza en combinación con la composición de la presente invención que cuando se realiza sola.

30 La presente divulgación también describe para un procedimiento de producir una respuesta inmunitaria a un antígeno exógeno en un paciente, administrar un adyuvante de un biológico derivado de células primarias que incluye las citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α e IFN- γ , y al menos un antígeno exógeno, en donde el antígeno exógeno no produce normalmente una respuesta inmunitaria y producir una respuesta inmunitaria en el paciente. Los antígenos exógenos pueden ser cualquiera de los descritos anteriormente que normalmente no producen una respuesta inmunitaria en un paciente. El ejemplo 12 muestra que el IRX-2 es eficaz para producir una respuesta inmunitaria con péptidos PSMA que, normalmente, no son eficaces. Este procedimiento puede ser adicionalmente combinado con cualquiera de los pasos o compuestos descritos anteriormente.

35 La presente divulgación describe un procedimiento para mejorar una respuesta inmunitaria en un paciente, al administrar el biológico derivado de células primarias que incluye las citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α e IFN- γ , en combinación con al menos un adyuvante. El biológico derivado de células primarias se ha descrito anteriormente. El adyuvante o adyuvantes puede ser un adyuvante independiente de TLR, un adyuvante dependiente de TLR, o combinaciones de los mismos. El procedimiento puede después incluir el paso de entregar y concentrar los antígenos, dirigir los antígenos a las células de presentación a antígeno, y localizar conjuntamente los antígenos y potenciadores inmunitarios al administrar un adyuvante independiente de TLR. El procedimiento puede incluir también el paso de estimular directamente el sistema inmunitario activando los TLR al administrar un adyuvante dependiente de TLR. Como se ha descrito anteriormente, el biológico derivado de células primarias actúa sinérgicamente con los otros adyuvantes para estimular más eficazmente el sistema inmunitario en respuesta a los antígenos. Preferiblemente, los antígenos exógenos se administran también, como se ha descrito anteriormente, como en la vacuna contra el cáncer. Este procedimiento se puede combinar además con cualquiera de los pasos o compuestos descritos anteriormente. El adyuvante puede tener un mecanismo de acción diferente al biológico derivado de células primarias como se ha descrito anteriormente.

40 La presente divulgación describe adicionalmente un procedimiento de aumentar la función de un sistema inmunitario administrando el biológico derivado de células primarias que incluye las citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α e IFN- γ , en combinación con al menos un adyuvante, en donde el adyuvante tiene un mecanismo de acción que es diferente del mecanismo de acción del biológico derivado de células primarias, y que aumenta la función de la respuesta inmunitaria. En otras palabras, el biológico derivado de células primarias y el adyuvante interactúan sinérgicamente para aumentar la función inmunitaria más allá de lo que resultaría del biológico derivado de células primarias o el adyuvante por separado porque cada componente está "activando" un área diferente del sistema inmunitario, para producir una mayor respuesta inmunitaria. Este procedimiento se puede combinar además con

cualquiera de los pasos o compuestos descritos anteriormente.

El mecanismo de acción de IRX-2

Como se ha definido anteriormente, el biológico derivado de células primarias de la invención actúa como un adyuvante, es decir, estimula o realza la respuesta inmunitaria de un paciente a un antígeno particular. Por otra parte, las composiciones IRX-2 y los procedimientos de la divulgación se adaptan particularmente para estimular respuestas inmunitarias mediadas por células T. Las respuestas inmunitarias promovidas por las composiciones y los procedimientos de la divulgación incluyen la inducción o generación de células T sin tratamiento previo, la diferenciación y la maduración de células dendríticas, permitiendo la presentación apropiada de antígeno a las células T (p. ej., en los ganglios linfáticos), y la activación de monocitos y macrófagos. Específicamente, en pacientes con cáncer, las respuestas inmunitarias promovidas por las composiciones y los procedimientos de la divulgación incluyen la infiltración del tumor por linfocitos, la fragmentación del tumor y la regresión, así como una reducción en histiocitosis sinusal (si está presente). Esencialmente, el biológico derivado de células primarias induce la producción inmunitaria y bloquea la destrucción inmunitaria. El mecanismo de la acción del biológico derivado de células primarias se describe más a posteriori en la solicitud de patente de los EE.UU. N.º 12/323.595 (US7993660) de los Solicitantes.

Más específicamente, las composiciones y procedimientos de la presente divulgación ayudan a superar la depresión/inmunosupresión en pacientes induciendo la producción de células T sin tratamiento previo. La expresión células T "sin tratamiento previo", como se definen en el presente documento, indica células T recién producidas, cuyas células T no se han expuesto al antígeno. Tales células T no son específicas, con todo son capaces de llegar a ser específicas tras la presentación del antígeno por una célula dendrítica madura que tiene antígeno, como los péptidos tumorales, expuestos en dicho lugar. Así, las composiciones y procedimientos de la divulgación reponen o generan nuevas células T (véanse los Ejemplos 2 y 8 de más adelante).

Además, particularmente en pacientes con cáncer con tumores, las presentes composiciones y procedimientos permiten la infiltración de linfocitos en los tumores con la fragmentación y regresión significativas del tumor. Véanse, p. ej., los Ejemplos 2-7 a continuación. Esta infiltración es importante para maximizar la respuesta clínica y para un mayor aumento de la tasa de supervivencia. Por ejemplo, linfocito:granulocito o infiltración de macrófagos de una relación 90:10 es óptima y la infiltración de células T y/o B es preferentemente difusa e intensa y no periférica. La reducción y fragmentación del tumor en muestras histológicas reflejan una buena respuesta inmunitaria y es indicativo de un efecto adyuvante mediante las composiciones de la invención.

Por otra parte, los cambios específicos del ganglio linfático también indican una respuesta inmunitaria eficaz, tal como ampliación del ganglio linfático, es decir, no solo la inversión de la reducción inducida del tamaño del tumor sino el aumento global de tamaño comparado con el tamaño normal del ganglio, así como el aumento de las áreas T y B. Además, los ganglios linfáticos de los pacientes con cáncer contienen a menudo una acumulación intrasinusal de histiocitos grandes, también denominada histiocitosis sinusal (SH). Se cree que la SH es la acumulación de células dendríticas inmaduras, que han ingerido y procesado antígenos tumorales, pero no pueden madurar y presentar estos péptidos tumorales a las células T sin tratamiento previo. Sin la presentación apropiada del antígeno a las células T, estas células T son incapaces de estimular las células efectoras Th1 y Th2, cuya estimulación conduce normalmente a la inmunidad mediada por células y mediada por anticuerpos, respectivamente, en el cuerpo. Como se indica en los Ejemplos 2-7 a continuación, las composiciones de citocinas y los procedimientos de esta divulgación redujeron la SH en los ganglios linfáticos de pacientes con cáncer y produjeron los diferentes cambios linfáticos descritos anteriormente, indicando de nuevo un efecto adyuvante de las composiciones de la invención.

Debido a que se sabe que las células dendríticas desempeñan un papel clave en la presentación del antígeno en la producción de una respuesta inmunitaria adecuada *in vivo*, un agente que tiene un efecto estimulador sobre la maduración de las células dendríticas actuará como un adyuvante en la obtención de una buena respuesta inmunitaria a un antígeno. Como se ha demostrado en el Ejemplo 9 a continuación, las composiciones de citocinas de la presente divulgación promueven la maduración de la célula dendrítica. Además, los datos del Ejemplo 2 demuestran que las composiciones de citocinas de la divulgación también desbloquean el defecto de la célula dendrítica que conduce a SH, es decir, al promover la maduración de las DC, y así específicamente, en pacientes con cáncer, las composiciones de la invención proporcionan múltiples efectos adyuvantes, es decir, en el desbloqueo de las DC en SH en los ganglios linfáticos y en fomentar la maduración de DC en general.

Las composiciones de citocinas de la invención también proporcionan un efecto adyuvante adicional actuando como potentes activadores de monocitos/macrófagos. Los monocitos son precursores tanto de DC como macrófagos en el cuerpo y, por lo tanto, un agente que promueve la activación de monocitos/macrófagos tiene un efecto adyuvante en las respuestas inmunitarias *in vivo*. Véase el Ejemplo 10 a continuación.

El biológico derivado de células primarias también bloquea la destrucción inmunitaria protegiendo las células T activadas de apoptosis. Uno de los mecanismos de escape del tumor implica la eliminación dirigida de las células T efectoras CD8+ a través de apoptosis mediada por microvesículas (MV) derivadas del tumor. Las MV inmunosupresoras se han encontrado en lesiones neoplásicas, sueros, ascitis y derrames pleurales obtenidos de

pacientes de cáncer y se han ligado a apoptosis y alteraciones del TCR en células T efectoras en estos pacientes. La eliminación conducida por MV de células T efectoras, que son necesarias para la defensa antitumoral de las anfitrionas, contribuye al escape del tumor y a la progresión del cáncer. Por lo tanto, la protección de las células efectoras antitumorales frente a alteraciones funcionales y muerte es un objetivo principal de la inmunoterapia. Los datos clínicos y experimentales muestran que ciertas citocinas, especialmente citocinas de la supervivencia que usan la cadena común del receptor γ , pueden proteger las células T activadas de muerte inducida por el tumor y mejorar su actividad anti-tumoral.

Más específicamente, hay varias maneras en las cuales el biológico derivado de células primarias protege las células T contra la apoptosis. La expresión de moléculas de señalización anti-apoptótica (es decir, JAK-3 y fósforo-Akt) es regulada al alza y la expresión de las moléculas pro-apoptótica (es decir, SOCS-2) es regulada a la baja. La activación de caspasas en linfocitos T CD8+ y CD4+ disminuye y aumenta la expresión cFLIP. La inhibición de la vía de supervivencia PI3K/Akt es contrarrestada por IRX-2. Las células T se protegen tanto contra la apoptosis extrínseca (apoptosis inducida por MV e inducida por FasL) y apoptosis mitocondrial intrínseca.

La protección contra la apoptosis extrínseca inducida por MV se logra adicionalmente impidiendo la regulación a la baja de JAK3, CD3- ζ , y STAT5; inhibir la desfosforilación de Akt-1/2; y mantener relaciones equilibradas de Bax/Bcl-2, Bax-Bcl-xL, y Bim/Mcl-1. La protección contra la apoptosis inducida por MV se logra también impidiendo la inducción de la actividad de la caspasa-3 y de la caspasa-7. Más específicamente, la inducción de la forma segmentada activa de la caspasa-3 se bloquea, al igual que la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial. La fragmentación de ADN nuclear se inhibe. La protección contra apoptosis intrínseca por el biológico derivado de células primarias se muestra por su protección de células T activadas contra la apoptosis inducida por estaurosporina.

De manera importante, las citocinas del biológico derivado de células primarias protegen las células T activadas contra apoptosis de una manera sinérgica. En otras palabras, la combinación de las citocinas en el biológico derivado de células primarias produce un mayor efecto del que se observa administrando citocinas individuales solas.

En vista de lo anterior, las composiciones de la presente invención estimulan el sistema inmunitario a través de efectos múltiples, que incluyen la maduración *in vivo* de células dendríticas que dan como resultado la presentación eficaz del antígeno de péptido, así como la activación de monocitos y macrófagos y la producción de células T no comprometidas sin tratamiento previo. La presentación apropiada del antígeno conduce a la expansión clónica de células T y B, creando inmunidad en el paciente. En el caso de los pacientes con cáncer, los efectos reseñados anteriormente dan como resultado la infiltración, p. ej., de linfocitos, en los tumores (p. ej., a través de la propagación hematológica) y la reducción y/o destrucción del tumor. El resultado, como se indica en los datos que se indican a continuación, aumenta la supervivencia debida a la memoria inmunológica (véase, p. ej., el Ejemplo 3 de más adelante).

Para cualquiera de las divulgaciones anteriores, se utilizan los siguientes detalles y/o protocolos de administración para el tratamiento:

Preferiblemente, la composición de citocinas de la presente divulgación se inyecta alrededor de los linfáticos que drenan en los ganglios linfáticos regionales hacia una lesión, tal como un tumor u otras lesiones persistentes que son tratadas. Más específicamente, las inyecciones perilinfáticas locales u otras inyecciones que son conocidas por los expertos en la técnica se administran para proporcionar la suficiente localización de la preparación de inmunoterapia. En el caso de cáncer de cabeza y cuello, las inyecciones se realizan en el cuello, pero se pueden aplicar en otros lugares según lo requerido por la enfermedad que se tratará. Tal tratamiento indujo regresiones clínicas en un alto porcentaje de los pacientes de cáncer de cabeza y cuello, que también mostraron la mayor supervivencia, sin reparación (Hadden, 1994; Meneses, 1998; Barrera, 2000; Whiteside, 1993). Por el contrario, la inyección intratumoral de interleucina-2 recombinante en pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Whiteside, y col. (Cancer Res., 53:5654-5662, 1993)) produjo un infiltrado de linfocitos de células T, pero sin respuestas clínicas significativas. De manera similar, la inyección peritumoral del Multikine (sitio Celsci en la Web) en combinación con la inyección perilinfática dio como resultado respuestas tumorales significativas (es decir, mayores del 50 % de reducción del tumor) en solo 11 pacientes, haciendo su tasa de respuesta menor del 10 %. Además, la inyección peritumoral e intratumoral se puede asociar con la progresión de la enfermedad, incluso en los pacientes que han tenido inicialmente una respuesta positiva al protocolo del citocinas, anulando su beneficio. La inyección peritumoral o intratumoral está de ese modo contraindicada.

Se prefiere un esquema de inyección de diez (10) días para la administración de las composiciones de la invención, pero se puede utilizar un protocolo de inyección de veinte (20) días. Las inyecciones bilaterales son eficaces. Cuando se ha producido una disección radical del cuello, la inyección contralateral es eficaz.

En el caso de que se utilice un antígeno exógeno, los antígenos sintéticos o extraídos proporcionados de forma exógena, como el antígeno tumoral y péptidos (véase Bellone, 1998), pueden administrarse en el ganglio linfático regional o distal pre-cebado o co-cebado, bien en una preparación separada o como parte de la composición de citocinas de la divulgación.

- La supresión endógena de las células T, que puede ser causada por, p. ej., cáncer u otras enfermedades inmunosupresoras, puede ser bloqueada por la administración conjunta de ciclofosfamida en dosis bajas (CY) y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) (es decir, en combinación con las composiciones de citocinas de la divulgación). El AINE es preferiblemente indometacina (INDO) pero también se pueden utilizar inhibidores de ibuprofeno o CoxII como celecoxib (CELEBREX®) o rofecoxib (VIOXX®) o combinaciones de los mismos. Los efectos secundarios de los AINE pueden tratarse agresivamente con inhibidores de protones y análogos de la prostaglandina E. Como agentes para ayudar a restaurar inmunidad de células T se pueden añadir también cinc y multivitaminas, pudiendo incluir la adición de selenio. Preferiblemente, la dosis de cinc es de 15 a 75 mg. Se puede administrar un multivitaminas estándar. El zinc puede ser un gluconato disponible.
- Las composiciones de citocinas se pueden administrar antes o después de la cirugía, radioterapia, quimioterapia o combinaciones de las mismas. Las composiciones de la invención se pueden administrar durante la reaparición de los tumores, es decir, durante un período en el que el crecimiento del tumor está ocurriendo otra vez después de un período en el que se pensaba que los tumores habían desaparecido o estaban en remisión.
- Las composiciones de citocinas se administran y se dosifican para promover una óptima inmunización, teniendo en cuenta el estado clínico del paciente individual, el sitio y el procedimiento de administración, el calendario de administración, la edad, el sexo, y el peso corporal del paciente. La "cantidad farmacéuticamente eficaz" para los fines del presente documento se determina así por las consideraciones que se conocen en la técnica. La cantidad debe ser eficaz para fomentar la inmunización, conducir, p. ej., a una reducción del tumor, a la fragmentación del tumor e infiltración de leucocitos, a un retardo en la reaparición o a una mejor tasa de supervivencia, o a la mejora o eliminación de los síntomas, que incluyen el aumento del recuento de células T.
- En los procedimientos de la presente divulgación, las composiciones de la presente divulgación se pueden administrar de varias maneras. Debe señalarse que las citocinas o antígenos exógenos utilizados en las composiciones de la divulgación se pueden administrar en sus formas estándares o como derivados farmacéuticamente aceptables y pueden administrarse solas o como ingredientes activos en combinación con portadores, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Además, las composiciones de la invención se pueden administrar de forma intra- o sub-cutánea, o de forma peri- o intra-linfática, de forma intraganglionar o intraesplénica o de forma intramuscular, intraperitoneal e intratorácica. El paciente que está siendo tratado es un animal de sangre caliente y, en particular, mamíferos, incluido el hombre. Los portadores, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables, así como los portadores de implante se refieren generalmente a cargas sólidas o líquidas inertes, no tóxicas, diluyentes o a material de encapsulamiento que no reacciona con los ingredientes activos de la invención.
- Las dosis pueden ser dosis individuales o múltiples dosis durante un período de varios días. Cuando se administran composiciones de la presente invención, se formulan generalmente en una forma inyectable de dosis unitaria (p. ej., solución, suspensión o emulsión). Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. El portador puede ser un medio disolvente o dispersante que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, o aceites vegetales.
- La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. Los vehículos no acuosos como el aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de girasol o aceite y ésteres de cacahuete, como el miristato de isopropilo, también pueden utilizarse como sistemas disolventes para las composiciones de la invención. Además, se pueden añadir diversos aditivos que mejoran la estabilidad, esterilidad e isotonicidad de las composiciones, incluidos los conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de los microorganismos puede asegurarse por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. En muchos casos, es deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico, y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser producida por el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Según la presente invención, sin embargo, cualquier vehículo, diluyente o aditivo utilizado tendría que ser compatible con las citocinas o antígenos exógenos de la invención.
- Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando las citocinas o los antígenos exógenos utilizados en la práctica de la presente invención en la cantidad requerida del disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes, según se desee.
- Una formulación farmacológica de la presente invención se puede administrar al paciente en una formulación inyectable que contenga cualquier portador compatible, tal como varios vehículos, aditivos y diluyentes; o las citocinas y/o los antígenos exógenos utilizados en la presente invención se pueden administrar de forma parenteral al paciente en la forma de implantes subcutáneos de liberación lenta o sistemas de entrega dirigidos tal como anticuerpos monoclonales, entrega vectorizada, iontoforética, matrices poliméricas, liposomas y microesferas. Ejemplos de sistemas de entrega útiles en la presente invención incluyen los divulgados en las patentes de EE.UU.

N.º 5.225.182; 5.169.383; 5.167.616; 4.959.217; 4.925.678; 4.487.603; 4.486.194; 4.447.233; 4.447.224; 4.439.196; y 4.475.196. Otros muchos implantes, sistemas de entrega y módulos son muy conocidos por los expertos en la técnica.

5 Debe ser evidente que las composiciones son útiles para el tratamiento de enfermedades productoras de antígenos tal como el cáncer, enfermedades infecciosas o lesiones persistentes, como se ha comentado anteriormente. Las composiciones promueven inmunización contra los antígenos producidos por estas enfermedades mediante la estimulación de respuestas inmunitarias en pacientes *in vivo*, cuyas respuestas inmunitarias ayudan a aliviar o eliminar los síntomas y efectos de la enfermedad en el paciente.

10 La discusión anterior proporciona una base objetiva para el uso de la presente invención. Las composiciones de la invención para su uso en los servicios divulgados en el presente documento se pueden demostrar mediante los ejemplos siguientes no limitantes y las figuras que se adjuntan.

15 Los ejemplos expuestos a continuación describen la preparación de IRX-2, una mezcla de citocinas según esta invención, los datos de las pruebas clínicas que demuestran el uso de IRX-2 como un adyuvante con los antígenos endógenos del tumor para estimular respuestas inmunitarias en pacientes con cáncer, así como experimentos en ratones y seres humanos que demuestran que el uso de mezcla de citocinas de la invención con antígenos exógenos estimulan respuestas inmunitarias *in vivo*.

Más específicamente, el Ejemplo 1 siguiente describe la producción de IRX-2, una composición de citocinas según la presente divulgación. La producción de IRX-2 se divulga en su totalidad en las patentes de los Estados Unidos N.º 5.632.983 y 5.698.194.

20 El Ejemplo 2 siguiente divulga datos de pruebas clínicas en donde los pacientes con H&N SCC tratados con IRX-2 (en combinación con dosis bajas de ciclofosfamida (CY), indometacina (INDO) y cinc) mostraron respuestas clínicas y patológicas significativas, que incluyen cambios ganglionares que indican la inmunización (p. ej., aumenta el tamaño de los ganglios y disminuye la histiocitosis sinusal), infiltración tumoral con linfocitos, y reducción y fragmentación tumoral. Los Ejemplos 4-7 se refieren a pacientes con cáncer adicional, es decir, con linfoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, y carcinoma de célula escamosa del pene (asociado al virus del papiloma humano), todos ellos tratados con el IRX-2 y que mostraban respuestas clínicas significativas al tratamiento. El Ejemplo 3 proporciona datos sobre el aumento de la supervivencia (de hasta 2 años) de los pacientes con cáncer de estos estudios.

30 Como se ha demostrado en el Ejemplo 2, el tratamiento con IRX-2 también produjo considerables aumentos en el recuento de linfocitos T en pacientes linfocitopénicos T y un aumento correspondiente en células T sin tratamiento previo (células T recién producidas no expuestas a antígeno). Además, según lo indicado por los datos del Ejemplo 8 siguiente, los aumentos en células T observadas en estos estudios eran específicamente debidos al tratamiento con la composición de citocinas de la divulgación. Más específicamente, el Ejemplo 8 proporciona datos del tratamiento de los pacientes linfocitopénicos con cáncer H&N SCC con solo IRX-2 (sin la administración de acompañamiento de CY y/o de INDO), en donde se obtuvieron aumentos significativos en recuentos de linfocitos totales, así como en poblaciones subconjuntos específicas de células T CD3+ y CD4+.

40 De manera similar, los datos del Ejemplo 9 demuestran que IRX-2 promueve la diferenciación y maduración de células dendríticas, medidas por criterios morfológicos, fenotípicos y funcionales. Como se indicó anteriormente, las células dendríticas (DC) se sabe que desempeñan un papel crítico en la inmunización de los pacientes a los antígenos, es decir, en la presentación del antígeno a la célula T apropiada. Más específicamente, el Ejemplo 9 demuestra que el IRX-2 promueve cambios morfológicos en las DC indicativos de maduración. También se demostró que IRX-2 regulaba a la baja la expresión del antígeno CD1a en la superficie de la célula DC, regulaba al alza la expresión del antígeno CD83 y MHC II en la superficie de la célula DC, y aumentaba la expresión de las moléculas co-estimuladoras y de adherencia de las células T, p. ej., CD86, CD40 y CD54 (ICAM-1), en la superficie de células DC. Además, se demostró que IRX-2 regulaba a la baja la actividad endocítica de las DC (que es consistente con la maduración de las DC), para mejorar la actividad estimuladora de células T de las DC (como se demuestra por una mayor actividad MLR) y aumentar la producción de IL-12 a partir de las DC, siendo IL-12 de por sí un factor esencial en la diferenciación de las células T cooperadoras CD4+ (en células Th1) sin tratamiento previo y la activación y proliferación de componentes celulares y fagocíticos del sistema inmunitario. Finalmente, se demostró que IRX-2 reducía la apoptosis inducida por VEGF de las DC. Este efecto anti-apoptótico de IRX-2 puede desempeñar un papel crucial en el mantenimiento de la supervivencia de las DC maduras dentro de un contexto tumoral, permitiendo la presentación y activación prolongadas del antígeno de los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno tumoral.

55 Los datos del Ejemplo 10 siguiente demuestran adicionalmente que IRX-2 es un potente activador de monocitos y macrófagos. Por ejemplo, IRX-2 aumenta significativamente los marcadores de activación de los monocitos/macrófagos, es decir, HLA-DR, CD86, CD40 y CD80. Además, se demostró que el IRX-2 era un activador más potente de monocitos/macrófagos que TNF- α o LPS y el IRX-2 podía continuar activando las células incluso en presencia de la citocina IL-10 inmunosupresora.

5 El Ejemplo 11 siguiente demuestra la capacidad de IRX-2 de provocar respuestas inmunitarias, es decir, en la forma de respuestas de la DTH, así como respuestas de anticuerpos, en ratones después de la administración de la composición de citocinas en combinación con conjugados de antígeno exógeno del péptido de membrana específico de próstata (PSMA). El IRX-2 era también eficaz en estimular respuestas de la DTH a los péptidos de PSMA no conjugados en seres humanos con cáncer de próstata avanzado.

El Ejemplo 12 siguiente demuestra adicionalmente la eficacia de IRX-2 en combinación con el antígeno exógeno PSMA. Además, IRX-2 se administró en combinación con un PSMA irradiado que expresaba la vacuna basada en células o una vacuna conjugada de péptido sintético y podía mejorar las respuestas inmunitarias de células T *in vivo* a estos antígenos.

10 El Ejemplo 13 siguiente demuestra la eficacia de IRX-2 en combinación con péptidos y el adyuvante incompleto de Freund en mejorar las respuestas inmunitarias de células T *in vivo* a estos antígenos. Los resultados de los experimentos demuestran que el IRX-2 se puede combinar con eficacia con las vacunas contra el cáncer de multi-antígenos, así como las vacunas basadas en células.

15 El Ejemplo 14 siguiente demuestra adicionalmente la eficacia de IRX-2 en combinación con otros adyuvantes que incluyen CpG, Poli I:C, IFN- γ y el adyuvante incompleto de Freund. Además, IRX-2, en combinación con estos otros adyuvantes, podía mejorar respuestas de células T específicas del antígeno *in vivo* y la actividad citotóxica de las células T específicas del antígeno. IRX-2, cuando se incluía como parte de una vacuna que incluía CpG, Poli I:C, IFN- γ y el adyuvante incompleto de Freund era eficaz cuando se da como solo disparo en potenciar las respuestas específicas del antígeno de la célula de T.

20 El Ejemplo 15 siguiente demuestra la eficacia de IRX-2 en el aumento de las respuestas de células B y células T en combinación con una vacuna basada en virus. Además, IRX-2 realza las respuestas de las células B y de las células T cuando se utilizaba en combinación con una vacuna basada en virus que expresa la tríada TRICOM de moléculas co-estimuladoras.

Ejemplos

25 Todos los pasos relacionados con el cultivo celular se realizan en condiciones estériles. Los procedimientos generales de inmunología celular no descritos en el presente documento se realizan como se describe en las referencias generales para técnicas de inmunología celular como Mishell y Shiigi (Selected Methods in Cellular Immunology, 1981) y son bien conocidas por los expertos en la técnica.

Ejemplo 1

30 Preparación de biológico derivado de células primarias (IRX-2)

El procedimiento de elaborar el biológico derivado de células primarias se describe, en general, en la solicitud de patente provisional de EE.UU. N.º 61/044674. Las células mononucleares (MNC) se purifican para retirar las células contaminantes cargando leucocitos sobre el medio de separación de linfocitos (LSM) y centrifugando el medio para obtener MNC purificados con un sistema automatizado de procesado y lavado de células. Las MNC se almacenan después durante la noche en una bolsa de FEP de almacenaje de linfocitos. Una mezcla de inducción de las MNC se estimula con un mitógeno, preferiblemente fitohemaglutinina (PHA), y ciprofloxacina en un dispositivo desechable de cultivo celular y un biológico derivado de células primarias se produce a partir de MNC. El mitógeno se retira de la mezcla de inducción por filtración y modo de filtración de flujo tangencial, y después la mezcla de inducción se incubaba. La mezcla de inducción se clarifica filtrando para obtener un sobrenadante de biológico derivado de células primarias. Por último, se elimina el sobrenadante biológico derivado de células primarias del ADN y agentes accidentales mediante la aplicación de la cromatografía de intercambio aniónico y filtración de 15 nanómetros y, opcionalmente, la desactivación posterior por ultravioleta C (UVC). El producto final puede entonces ser vializado y almacenado para la futura administración a un paciente.

Ejemplo 2

45 Las inyecciones perilinfáticas locales en el cuello con IRX-2, además del tratamiento con dosis bajas de CY (de 300 mg/m²), INDO (25 mg por vía oral tres veces al día), y cinc (65 mg de cinc elemental como sulfato por vía oral una vez al día) han inducido regresiones clínicas en un alto porcentaje de pacientes con cáncer de cabeza y cuello de células escamosas (H&NSCC) (Hadden, 1994; Meneses, 1998; Barrera, 2000; Hadden, 2003; Meneses, 2003) con evidencia de mayor supervivencia, sin reaparición. En general, la inclusión de respuestas menores (25 %-50 %), la contracción tumoral y la reducción del tumor en especímenes patológicos, más del 90 % respondieron y la mayoría tuvo una reducción del tumor superior al 50 %.

Se especula con que estas respuestas eran mediadas por regresión inmunitaria dado que se observó que ambos linfocitos B y T se infiltraban en los tumores. La terapia no estaba asociada con una toxicidad significativa. El tratamiento de los pacientes con cáncer linfocitopénico con la combinación de IRX-2 ha dado lugar a la movilización de linfocitos marcados; cuando se analizaron, estos pacientes mostraron aumentos en las células T positivas CD45RA (es decir, células T sin tratamiento previo (véase la siguiente Tabla I)). Además, la inyección intratumoral o

peritumoral de IRX-2 en pacientes con H&NSCC dio lugar a revertir la regresión del tumor inducida por inmunoterapia o a la progresión del tumor. El tumor no es, por ello, el sitio de la inmunización. En lugar de eso, el análisis de los ganglios linfáticos regionales reveló que el ganglio linfático regional es el sitio de inmunización para los antígenos de tumores propuestos (Meneses, 2003; véanse las Figuras 1-5). Ningunos de estos pacientes tratados con IRX-2 desarrollaron la metástasis que se habría esperado en el 15 % de los pacientes clínicamente y hasta el 50 % patológicamente. Estos resultados indican que se ha inducido inmunidad sistémica en lugar de la inmunidad simplemente local. Los pacientes fueron previamente examinados con una prueba cutánea a 0,1 ml de IRX-2 antes del tratamiento y más del 90 % de aquellos con una prueba cutánea positiva (>0,3 mm a las 24 horas) tuvieron respuestas clínicas y patológicas robustas. Los pacientes con pruebas cutáneas negativas tenían débil o ninguna respuesta. Así, las pruebas cutáneas seleccionan a las personas con buena respuesta al tratamiento.

Los principales aumentos se observaron en los recuentos de linfocitos T (CD3) 752→1.020 en estos pacientes linfocitopénicos T (recuento de células T de 752 frente a 1.600 (normal)). Lo importante es que hubo un aumento correspondiente en células T positivas "sin tratamiento previo" CD45RA (532→782). Como se mencionó anteriormente, en general no se piensa que estos aumentos aparezcan en adultos particularmente con una terapia farmacológica como IRX-2. Presumiblemente, estas células son recién llegados del timo y podrían ser consideradas una mayor nueva capacidad para responder a nuevos antígenos como antígenos tumorales. Las células positivas CD45RA preexistentes no respondieron a los antígenos tumorales y pueden haber sido incapaces de hacerlo debido a la inmunosupresión inducida por el tumor (anergia).

Tabla I: Tratamiento de pacientes linfocitopénicos con H&NSCC con IRX-2. Aumentos de células T sin tratamiento previo en sangre (número/mm)

PACIENTE N.º	MARCADOR DE CÉLULAS T SIN TRATAMIENTO PREVIO			MARCADOR DE CÉLULAS PAN T		
	PRE	POST	AUMENTO	PRE	POST	AUMENTO
1	479	778	+299	704	1.171	+467
2	938	1.309	+371	1.364	1.249	-115
3	98	139	+41	146	178	+32
4	341	438	+97	655	590	-65
5	567	652	+97	453	643	+190
6	658	1.058	+400	1.118	1.714	+569
7	642	1.101	+459	822	1.601	+779
MEDIA	532	782	+250	752	1.020	+269

La documentación (Hadden JW, Int'l J Immunopharmacol 11/12:629-644, 1997; Hadden JW, Int'l J Immunopharmacol 21:79-101, 1999) indica que para SCC y adenocarcinomas, los dos principales tipos de cáncer, los ganglios linfáticos regionales reflejan anomalías relacionadas con el tumor, que incluyen histiocitosis sinusal, agotamiento linfoide y, a menudo, la presencia de linfocitos asociados al tumor capaces de reaccionar con células tumorales (IL-2). Con metástasis, aparecen el agotamiento linfoide y la función deprimida. Un análisis no publicado de ganglios linfáticos de cuello uterino no implicados en 10 pacientes con H&NSCC mostraron reducción en el tamaño medio del ganglio linfático y un aumento en la histiocitosis sinusal asociada a H&NSCC (véanse los controles de las Figuras 1-4A y B de la presente solicitud).

Después del tratamiento con un ciclo del protocolo IRX-2 (Hadden, 1994; Meneses, 1998; Barrera, 2000), los ganglios linfáticos de cuello uterino no implicados mostraron los cambios indicados en las Figuras 1-4. En comparación con los ganglios linfáticos regionales de pacientes con H&NSCC no tratados con IRX-2, estos ganglios mostraron significativos aumentos de tamaño, área de células T y densidad, y disminuciones de histiocitosis sinusal y congestión. Los ganglios linfáticos de los pacientes tratados estaban todos estimulados y eran mayores que los ganglios de control con mayores áreas de las células T y densidades. Estos ganglios eran así no sólo restaurados a

la normalidad, sino que mostraron evidencia de predominio de células T, un positivo conocido que guarda relación con la supervivencia en H&NSCC (Hadden, 1997).

Lo importante es que, cuando los cambios en los ganglios linfáticos relacionados con áreas de células B y T se correlacionaron con los cambios en sus tumores que reflejan la infiltración de células T y B, se obtuvo un alto grado de correlación para las células T ($p < 0,01$) y las células de B ($< 0,01$) y presencia linfocítica global ($p < 0,001$) (Figura 5). A su vez, estos cambios se correlacionaron con la reducción del tumor por criterios patológicos y clínicos. Estos hallazgos indican que las reacciones del tumor están directa y positivamente correlacionadas con los cambios en los ganglios linfáticos y que la reacción del tumor refleja los cambios en los ganglios linfáticos como variable dependiente. Estos hallazgos, junto con el conocimiento acerca de cómo trabaja el sistema inmunológico en general (Roitt, 1989) y siguiente transfección tumoral con un gene de citocinas (Maass, 1995), indican que el protocolo IRX-2 inmuniza a estos pacientes contra antígenos tumorales endógenos a nivel de los ganglios linfáticos. Previamente, no se han presentado pruebas de los cambios en los ganglios linfáticos que reflejen inmunización con antígenos tumorales autólogos. Esto confirma que esta composición puede inducir inmunización con antígenos tumorales previamente ineficaces o poco eficaces en un efecto para producir la regresión de la metástasis a distancia.

15 Ejemplo 3

Análisis adicionales de los datos clínicos, patológicos y de supervivencia del estudio de las pruebas clínicas antes mencionadas ofrecen más ideas sobre la naturaleza de las composiciones en lo que se refiere a la inmunización de pacientes con cáncer con sus propios antígenos tumorales autólogos y la regresión inmunitaria resultante de sus tumores. La Figura 6 muestra que el tratamiento con el protocolo IRX-2 está asociado con un aumento de la supervivencia en 48 meses ($p < 0,01$). La Figura 7 muestra que las respuestas clínicas positivas se correlacionan con la supervivencia, es decir, los pacientes con respuestas completas (CR) o respuestas parciales (PR) (> 50 % de reducción tumoral) tienen una mejor supervivencia que aquellos con respuestas menores (MR) (< 50 %, pero reducción tumoral > 25 %) o ninguna respuesta (NR) (< 25 %) ($p < 0,01$). La Figura 8 muestra que los pacientes con respuestas patológicas más fuertes (índice de 6-9) tienen una mejor supervivencia que aquellos con respuestas patológicas más débiles (< 6) ($p < 0,02$). La Figura 9 muestra que la infiltración linfocítica en el tumor como una sola variable predice la supervivencia ($p < 0,01$). La prueba de la ji al cuadrado de la relación de la respuesta clínica a la respuesta patológica muestra una relación muy significativa ($p < 0,01$) que indica que los dos se correlacionan entre sí, así como con la supervivencia, proporcionando de ese modo una triangulación estadística de los datos que interrelacionan las respuestas clínicas, parámetros de regresión inmunitaria y supervivencia. Nunca se han demostrado tales relaciones en la inmunoterapia de un cáncer humano.

Por último, la Figura 10 presenta una curva de respuesta a la dosis para el IRX-2 de la presente divulgación, que relaciona la dosis con la supervivencia global a los veinticuatro meses. El tratamiento con IRX-2 tiene un impacto óptimo sobre la supervivencia de aproximadamente 100-233 unidades internacionales de equivalencia de IL-2.

Ejemplo 4

35 Dos pacientes con linfoma de cabeza y cuello se trataron según el protocolo que se describió anteriormente. Se siguió el siguiente esquema.

Antes del tratamiento, los pacientes se sometieron a pruebas cutáneas con IRX-2 de 0,1 ml inyectados por vía subcutánea en el antebrazo, la región se marcó, y 24 horas después, se leyó la prueba. La prueba se consideraba positiva si la inducción y el eritema eran iguales o superiores a 3 mm.

40 Caso 1:

El paciente era un varón de 23 años que presentaba antecedentes de una presencia de tres meses de un tumor en la región submaxilar izquierda, sin otros síntomas. En la sala de urgencias, se encontró que tenía adenopatía linfática del triángulo submaxilar izquierdo de aproximadamente 6,5 cm de diámetro de consistencia dura, parcialmente fijada a niveles profundos. El resto del examen físico era normal. La biopsia incisional mostró el linfoma de Hodgkin. La lesión era ECIIA escalonada. Se administró un tratamiento de un ciclo de IRX-2, obteniendo una respuesta menor, ya que la adenopatía se redujo en tamaño en 1 cm de diámetro. El informe de la biopsia obtenido después del tratamiento con IRX-2 mostró que el 60 % de la lesión mostraba una infiltración linfocítica normal, y el resto de la neoplasia (40 %) mostraba necrosis. No se encontraron células tumorales viables.

Después de esto, el paciente recibió tratamiento de radiación en el cuello de 3.600 rad. El paciente estaba libre de la enfermedad a los dos años.

Caso 2

El paciente es un varón de 82 años que presentaba un historial dos meses de una masa tumoral dolorosa a mitad del cuello, así como una pérdida de peso de 10 kg. En el examen físico, el paciente se presentó con un tumor en la amígdala palatina derecha, que se agrandaba hasta aproximadamente 4 x 3 cm, con una úlcera en el centro de la amígdala. En el cuello, un ganglio linfático submaxilar derecho medía aproximadamente 2 x 2 cm y una masa del ganglio linfático a niveles II y III de aproximadamente 5 x 5 cm. El resto del examen era normal. La biopsia incisional

de la amígdala y uno de los ganglios linfáticos del cuello mostraron un linfoma no hodgkiniano definido mixto, de grado intermedio.

5 El paciente se sometió a dos ciclos de IRX-2 al final de los cuales se observó una reducción de 1 cm en el diámetro de la amígdala y adenopatía del cuello. El informe patológico posterior al tratamiento con IRX-2 mostró 20 % de tumor vivo, 30 % de fragmentación y necrosis tumoral, y 50 % de infiltración normal de linfocitos.

El paciente recibió quimioterapia (CHOP) durante 6 ciclos y luego radioterapia (RT) externa a una dosis total de 4.600 rad. Reapareció a los ocho meses después de la RT con adenomegalia a nivel occipital. El paciente murió tres meses después con evidencia de enfermedad en el cuello.

Ejemplo 5

10 Diez pacientes con cáncer de cuello uterino en etapa temprana no tratado, estadificados clínicamente IB1, IB2 e IIA, fueron tratados con inyecciones perilinfáticas locales de IRX-2 (10 inyecciones diarias) seguidas de histerectomía radical el día 21. Un día antes de comenzar el tratamiento con IRX-2, los pacientes recibieron una sola dosis IV de CY de 300 mg/m. Se administraron por vía oral INDO o ibuprofeno y sulfato de zinc desde el día 1 al 21. Se evaluaron la respuesta clínica y patológica, la toxicidad y la supervivencia libre de la enfermedad.

15 Todos los pacientes completaron el tratamiento con IRX-2 y fueron evaluados en cuanto a su respuesta y toxicidad. La respuesta clínica se observó en el 50 % de los pacientes (3 respuestas parciales (PR), 2 respuestas menores (MR) (reducción >25 %<50 %)). Siete pacientes fueron sometidos a cirugía. Patológicamente, en cinco casos se encontró reducción tumoral asociada con la fragmentación tumoral. Había un patrón heterogéneo de tipos de células que se infiltran en el tumor, que incluía linfocitos, células plasmáticas, neutrófilos, macrófagos y eosinófilos. El
20 tratamiento era bien tolerado excepto por dolor leve y algo de sangrado durante la inyección e intolerancia gástrica a INDO. A los 24 meses de seguimiento, nueve pacientes estaban libres de la enfermedad.

Este estudio muestra que el tratamiento con IRX-2 induce la respuesta tumoral mediada por el sistema inmunitario en el carcinoma de cuello uterino en etapa temprana no tratado.

Ejemplo 6

25 Dos pacientes con metástasis hepática de carcinoma hepatocelular primario se trataron con IRX-2 intraesplénico (1 o 3 inyecciones). El protocolo era como se describió anteriormente para los casos de H&NSCC, de cuello uterino o de linfoma. Un paciente con carcinoma hepatocelular avanzado tuvo una respuesta parcial confirmada por tomografía. El otro tenía una respuesta parcial confirmada por cirugía. El examen histológico mostró una disminución, fragmentación e infiltración linfoide del tumor.

30 Ejemplo 7

Cuatro pacientes con carcinoma de célula escamosa del pene (asociado al virus del papiloma humano) se trataron con el protocolo IRX-2 como se describió anteriormente; los cuatro tenían respuestas parciales clínicamente y los especímenes quirúrgicos mostraron una disminución y fragmentación del tumor y características de infiltración linfoide de los pacientes con cáncer H&NSCC.

35 Ejemplo 8

Corrección por IRX-2 de linfocitopenia T

40 El objetivo del siguiente experimento era evaluar el efecto de un tratamiento de 10 inyecciones diarias de IRX-2 que contenía las seis citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ y TNF- α (115 unidades de equivalencia de IL-2/día) en recuentos de linfocitos (LC) de pacientes linfocitopénicos. Estos pacientes se habían recuperado de cirugías y radioterapia previas del cáncer de cabeza y cuello, y tenían linfocitopenia persistente con recuentos medios de 441 células/mm³. Los niveles normales de LC son 2.000 células/mm³. Los pacientes estaban libres de cáncer en el momento del tratamiento. Los LC se obtuvieron en el día 0 y el día 13. Los linfocitos T (CD3+) y los subconjuntos de células T (CD4+ o CD8+) se evaluaron mediante citofluorometría. La Tabla II presenta los datos de cinco pacientes con buena respuesta al tratamiento. Se observaron aumentos significativos de los LC, para las células T CD3+ y
45 CD4+.

Tabla II

Número del paciente	TLC*	CD3*	CD4*	CD8*
1	100	83	28	40
2	136	62	52	55

Número del paciente	TLC*	CD3*	CD4*	CD8*
3	100	63	24	3
4	100	74	331	-20
5	100	166	173	-16
Media ± SEM	107 ± 7	90 ± 19	122 ± 59	12 ± 15

*Cambios en el número de células por mm desde el día 0 al día 13.

Estos cambios se comparan favorablemente con los alcanzados por dosis mucho más altas de interleucina 2 pegilada (3×10^6 unidades de IL-2 recombinante) en pacientes con SIDA linfocitopénicos (T. Merigan, comunicado personal) pero con menos toxicidad. Son menores a las alcanzadas con infusiones de 8 días de $>10 \times 10^6$ unidades/día de IL-2 en pacientes con SIDA; sin embargo, este último requirió grandes gastos, inconvenientes y tenía una toxicidad significativa (Kovaks, 1997). Estos resultados con IRX-2 se obtuvieron en ausencia de INDO y CY y, por ello, muestran que el efecto del régimen sobre LC es el de la composición de IRX-2 de la divulgación.

Ejemplo 9

10 IRX-2 estimula la maduración y activación de células dendríticas:

En experimentos previos, se aislaron ganglios linfáticos de cinco pacientes H&NSCC tratados con IRX-2 y cinco pacientes de control con H&NSCC no tratados y se analizaron los constituyentes celulares mediante citometría de flujo usando un panel de marcadores de superficie celular para células dendríticas (es decir, CD83+, CD86+, y CD68+). Como se indicó anteriormente, la histiocitosis sinusal es una patología de los ganglios linfáticos que se observa en algunos pacientes con cáncer que se caracteriza por la acumulación en los ganglios linfáticos de histiocitos grandes que representan células dendríticas inmaduras. Como se demuestra en la Figura 11A, los pacientes con SH (SH+) tienen una acumulación de las DC CD68+, CD83+, CD86- en sus ganglios linfáticos, mientras que aquellos sin SH perceptible tienen pocas células CD83+. Sin embargo, el tratamiento con IRX-2 dio como resultado un aumento de cinco veces en el número de las DC CD86+ (simultáneo con CD68+, CD83+) en comparación con controles de cáncer no tratado, lo que indica una conversión a un fenotipo DC "activado". Los controles son pacientes con H&NSCC no tratado en comparación con pacientes con cáncer tratado con IRX-2 (véase la Figura 11B).

Dado que la histiocitosis sinusal representa una acumulación de las DC parcialmente maduras que supuestamente llevan péptidos tumorales endógenos, la maduración y activación completas con expresión del receptor coestimulador CD86 refleja el uso del IRX-2 de la presente divulgación para corregir este defecto en la maduración y permitir la presentación eficaz del antígeno a las células T. El IRX-2 de la presente divulgación invierte, por ello, la histiocitosis sinusal y conduce a la inmunización eficaz de las células T sin tratamiento previo.

Los datos descritos anteriormente y los datos posteriores contenidos en Meneses et al. (2003) mostraron que el tratamiento de pacientes con H&NSCC utilizando IRX-2 perilinfático, dosis bajas de CY e INDO revertía la histiocitosis sinusal a menudo evidente en los ganglios linfáticos de este y otros cánceres. Sin embargo, a partir de estos datos no era evidente cuál de los agentes anteriores, IRX-2, CY y/o INDO, corregía este defecto.

Los siguientes datos presentan evidencia de que IRX-2 que contiene las seis citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ y TNF- α induce la maduración y activación de DC en ausencia de CY y/o INDO. El IRX-2 utilizado en estos experimentos contiene las seis citocinas enumeradas anteriormente o como se muestra en la Tabla III a continuación. Para los fines de estos experimentos, las concentraciones de IRX-2 se expresan como la concentración de la TNF- α contenida en IRX-2. La concentración de citocina en IRX-2, incluido TNF- α , se midió mediante ELISA y la pureza de TNF- α recombinante es $>95\%$. Para todos los experimentos, excepto las titulaciones, se usó IRX-2 a una concentración de 1 ng/ml.

Tabla III: Niveles de citocinas en la formulación de IRX-2 Lote 041304 (ng/ml)

IL-1 β	IL-2	IFN- γ	TNF- α	IL-8	IL-6	IL-10	G-CSF	GM-CSF
0,3	4,2	2,2	1,0	25,2	0,7	0,03	0,06	0,4

El medio utilizado era RPMI 1640, complementado con 2 mM de L-glutamina, 50 μ g/ml de estreptomina, 50 U/ml

de penicilina y 10 % de FBS (todos los reactivos adquiridos en Cellgro, Herndon, VA). GM-CSF, TNF- α y VEGF165 se compraron de Peprotech (Rocky Hill, NJ). X-VIVO 10 se adquirió de BioWhittaker (Walkersville, MD). LPS se adquirió de Sigma (St. Louis, MO). Todos los reactivos se analizaron para determinar la contaminación por endotoxina con la prueba sensible de lisado de amebocitos de Limulus (ensayo LAL; BioWhittaker) según las instrucciones del fabricante y resultaron negativos. Se descubrió que todas las soluciones contenían menos de 0,06 EU/ml, el límite de detección más bajo. Además, todos los artículos de plástico estaban exentos de pirógenos.

Las PBMC usadas en estos experimentos se obtuvieron a partir de 30 ml de capa leucocitaria de donantes sanos enriquecida en leucocitos mediante centrifugación con centrifugación Ficoll-Hypaque (Cellgro, Herndon, VA), y se recuperó la fracción de ligera densidad de la interfaz 42,5-50 %. Las células se volvieron a suspender en medio de cultivo y se dejaron adherir a placas de 6 pocillos (Costar, Cambridge, MA). Después de 2 horas a 37 °C, las células no adherentes se eliminaron mediante lavado y células adherentes (~90 % de células CD14+, es decir, monocitos) se cultivaron en 3 ml de medio complementado con 50 ng/ml de GM-CSF (500 U/ml) y 50 ng/ml de IL-4 (500 U/ml).

Para el análisis de marcadores de superficie, se usaron los siguientes mAb conjugados con fluorocromos (todos de BD Pharmingen, San Diego, CA): CD86-PE, CD80-FITC, CD54-APC, CD83-PE, HLA-DR-FITC, CD1a-APC, CD40-FITC y el análisis inmunofenotípico con controles de isotipo apropiados, se realizó usando FACS. Las células ($0,25 \times 10^6$) se lavaron en PBS complementado con 2 % de FBS y 0,1 % de NaN_3 (tampón de lavado FACS) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con mAb conjugados con APC, PE o FITC o con el mAb emparejado con el isotipo correspondiente. El exceso de mAb se eliminó mediante lavado en tampón de lavado FACS. Los resultados se expresaron como intensidad media de fluorescencia o porcentaje de células que expresaban el antígeno especificado. El análisis de fluorescencia se realizó en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, Rockville, MD) después de la adquisición de 10.000 episodios y se analizó con el software CellQuest de BD Biosciences (Rockville, MD).

Como se demuestra en la Figura 12, la composición de IRX-2 de la divulgación aumentó el número de las DC que llevan el antígeno CD83, un marcador clave de la maduración de las DC. Más específicamente, se cultivaron PBMC adherentes durante 7 días en presencia de GM-CSF e IL-4 como se ha descrito anteriormente y luego se estimularon con cantidades crecientes ya sea de TNF- α recombinante (PeproTech) o de IRX-2. Después de 48 horas, las células se lavaron y se analizaron para determinar la expresión de CD83 por citometría de flujo. La Figura 12 indica que IRX-2 es activo para inducir la maduración de las DC, como se evidencia por un aumento en las células CD83+. Además, IRX-2 era más activo en la inducción de la maduración de las DC que una dosis equivalente de TNF- α solo. Los datos en la Figura 12 se representan como la media de 5 experimentos individuales \pm SEM ($p < 0,0001$, mediante ANOVA).

Estos datos indican que IRX-2 promueve la maduración de las DC y lo hace de una manera que no puede explicarse por ninguna citocina aislada contenida en la mezcla de IRX-2 que se sabe que actúa sobre la maduración de las DC. Por ejemplo, la diferenciación normal *in vitro* de PBMC requiere la presencia de 100-500 U/ml de GM-CSF (aproximadamente 10-50 ng/ml) y 500-1.000 U/ml de IL-4 (50-100 ng/ml). Esto genera una población de células comprometidas con el linaje de las DC, pero en un estado relativamente inmaduro (expresión baja/moderada de CD86, CD40, HLA-DR, nula para CD83). El IRX-2 no diluido tiene cantidades indetectables de IL-4 y contiene concentraciones 10 a 50 veces menores de GM-CSF (aproximadamente 1,1 ng/ml) que las que se requieren para la diferenciación *in vitro* de las DC. Por ello, las citocinas individuales de IL-4 y GM-CSF en el IRX-2 no pueden dar cuenta de las células CD83+ producidas en los cultivos de la Figura 12.

El TNF- α puede inducir tales células, pero a concentraciones muy superiores a las contenidas en el IRX-2 de la divulgación (véase la Figura 12). Por ejemplo, después del compromiso inicial con el linaje de células dendríticas (mediante varios días de GM-CSF + IL-4 *in vitro*), la adición posterior de una "señal de peligro" como la derivada de un patógeno (por ejemplo, LPS) induce un fenotipo de célula dendrítica completamente madura que incluye una expresión alta/fuerte de CD86, CD40, HLA-DR y la presencia de CD83. El TNF- α en el intervalo de 20-50 ng/ml puede imitar en gran medida dicha señal de peligro derivada del patógeno, dando como resultado una regulación al alza de los mismos marcadores. Sin embargo, la mezcla de IRX-2 no diluida tiene solo 2,8 ng/ml de TNF- α de promedio, muy por debajo de las concentraciones de TNF- α requeridas para la completa maduración de las DC. Por ello, los resultados representados en la Figura 12 muestran claramente que, a las concentraciones equivalentes de TNF- α utilizadas en este experimento, la inducción del marcador CD83 por IRX-2 no puede deberse únicamente a la presencia del TNF- α en la mezcla IRX-2.

Dado que se sabe que las DC experimentan cambios morfológicos distintos a medida que progresan desde células inmaduras a maduras, las DC inmaduras se trataron con IRX-2 para determinar si el tratamiento con IRX-2 cambiaba la morfología de las células. Más específicamente, se cultivaron PBMC adherentes en presencia de GM-CSF (500 U/ml) e IL-4 (500 U/ml) durante 4 días como se ha descrito anteriormente (cuyo tratamiento se sabe que produce DC inmaduras) y luego se trataron con IRX-2 o se dejaron sin tratamiento, como controles. Después de 3 días, las células se visualizaron mediante tinción y microscopía Wright. Como se muestra en la Figura 13, las células tratadas con IRX-2 (Figura 13B) presentaron proyecciones celulares características y motilidad de las DC maduras, y extendieron y retrajeron continuamente sus procesos y velos celulares. Estas células tenían grandes núcleos con forma irregular, numerosas vesículas, relativamente pocos gránulos citoplasmáticos, y proyecciones celulares

perceptibles y abundantes en comparación con los controles no tratados (Figura 13A). Por ello, el tratamiento con IRX-2 dio como resultado DC que poseían una típica morfología de DC maduras.

Además, se sabe que la transición prototípica de las DC desde inmaduras a maduras da como resultado aumentos y disminuciones bien caracterizados en ciertos antígenos de la superficie celular. Por ejemplo, las DC inmaduras expresan altos niveles de CD1a, y después de encontrarse con estímulos tales como citocinas o productos bacterianos, este marcador es regulado a la baja. Por ello, para determinar si el tratamiento con IRX-2 daba como resultado la ganancia o pérdida de marcadores de superficie celular asociados con la activación y maduración de DC, se cultivaron PBMC (monocitos) adherentes tratados con GM-CSF e IL-4 (como se describió anteriormente) durante 7 días y luego se incubaron durante 48 horas con o sin IRX-2. La expresión de CD1a, HLA-DR, CD86, CD40 y CD54 se examinó mediante citometría de flujo y se expresó como intensidad media de fluorescencia.

Como se demuestra por los histogramas de la Figura 14, el tratamiento con IRX-2 de las DC inmaduras (indicado por líneas continuas en los histogramas) dio como resultado la regulación a la baja de la expresión de CD1a (147 frente a 62) así como la regulación al alza de la expresión de MHCII (455 frente a 662). Además, el tratamiento con IRX-2 condujo a un aumento en el tamaño de las células y una disminución en la granularidad (datos no mostrados). Los controles no tratados se indican mediante líneas discontinuas en cada histograma. Los valores medios para las DC no tratadas se muestran en la esquina superior izquierda de los paneles; los valores respectivos para las DC tratadas con IRX-2 se muestran en la esquina superior derecha. Los histogramas que se muestran son de un experimento representativo y los valores representan los resultados medios de al menos 10 experimentos individuales (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,002$, *** = $p < 0,00005$, prueba t de Student pareada). Tal como se indica adicionalmente en la Figura 14, el tratamiento con IRX-2 mejoraba la expresión de moléculas superficiales coestimuladoras CD86 (también conocido como B7-2) (193 frente a 390), CD40 (46 frente a 75) y CD54 (también conocido como molécula de adhesión intercelular 1 o ICAM-1) (1.840 frente a 3.779). Todos estos cambios en la expresión del marcador de superficie indican que el IRX-2 es un potente efector de la activación de las DC.

Según su papel como células presentadoras de antígeno, las DC inmaduras tienen una alta actividad endocítica y captan activamente antígenos. Tras la maduración, esta actividad se regula a la baja, con lo cual la DC se involucra en el procesamiento y presentación del antígeno. En condiciones fisiológicas, la regulación a la baja de la endocitosis de APC se asocia con un aumento en los complejos péptido/MHC en la superficie que conduce a una estimulación mejorada de las células T. Para probar la influencia de IRX-2 en la endocitosis, las DC se incubaron con cantidades crecientes de IRX-2 y se determinó la capacidad de internalizar FITC-dextrano. Más específicamente, los PBMC (monocitos) adherentes se trataron con GM-CSF e IL-4 (como se describió anteriormente) durante cuatro días y luego se estimularon con TNF- α (a 1 $\mu\text{g/ml}$) o con concentraciones crecientes de IRX-2 (IRX-2) hasta el equivalente de 1 ng/ml de TNF- α . Después de 18 horas, las células se incubaron con FITC-dextrano (Sigma, St. Louis, MO), que se añadió hasta una concentración final de 1 mg/ml . Las células se cultivaron durante 30 minutos a 37°C. Después de la incubación, las células se lavaron cuatro veces con PBS enfriado con hielo y se analizaron mediante citometría de flujo como se describió anteriormente.

Como se muestra en la Figura 15, las DC inmaduras incubadas con IRX-2 (círculos en negro) regularon a la baja la endocitosis de una manera dependiente de la dosis. El tratamiento con TNF- α (círculos en blanco) a la dosis correspondiente encontrada en el IRX-2 tenía mínimos efectos. El tratamiento de DC inmaduras con mayores cantidades de TNF- α (10-25 ng/ml) dio como resultado la regulación a la baja de la actividad endocítica como se esperaba (datos no mostrados). Los datos de la Figura 15 se muestran como el porcentaje de intensidad media de la fluorescencia de las DC estimuladas frente a las no estimuladas y son la media de 4 experimentos independientes \pm SEM ($p < 0,00001$, mediante ANOVA). Estos experimentos indican que el IRX-2 de la divulgación regula a la baja la actividad endocítica de las DC, una indicación de la maduración de las DC.

A continuación, se evaluó la capacidad de IRX-2 para mejorar la capacidad estimuladora de las células T de las DC. Las DC activadas y maduras son potentes estimuladores de las células T sin tratamiento previo. Para demostrar que el tratamiento con IRX-2 se tradujo en efectos funcionales, así como en los cambios fenotípicos y morfológicos reseñados anteriormente, se evaluó la influencia de IRX-2 en la capacidad estimuladora de las células T de las DC en un ensayo de proliferación de la reacción de linfocitos mixtos (MLR).

Más específicamente, los PBMC (monocitos) adherentes se trataron primero con GM-CSF e IL-4 (como se ha descrito anteriormente) durante siete días y luego se estimularon con o sin IRX-2. Después de 48 horas, las DC tratadas con IRX-2 o no tratadas se recogieron y ensayaron en una MLR de la siguiente manera: las DC purificadas se cultivaron conjuntamente con 1×10^5 células T de un donante no relacionado en proporciones de DC:células T de 1:5, 1:10, 1:30 y 1:100. Se prepararon células T alogénicas pasando PBMC purificadas de capas leucocitarias mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque sobre una columna de lana de nailon. Los ensayos se realizaron por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Nada de IRX-2 estaba presente durante el ensayo de MLR. Después de 5 días de cultivo conjunto de células DC-T, los pocillos se pulsaron durante 18 horas con BrDU. La incorporación de BrDU se midió usando un ensayo colorimétrico de incorporación de BrDU (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN).

Como se muestra en la Figura 16, las DC expuestas a IRX-2 (cuadrados en negro) dos días antes del cultivo conjunto eran más potentes para inducir una respuesta de proliferación de células T que las DC no tratadas (círculos

en blanco), confirmando que las DC tratadas con IRX-2 son funcionalmente competentes. Los datos de la Figura 16 se expresan como índice de estimulación que se define como $((\text{d.o. de DC estimuladas con células T} - \text{d.o. de DC solas}) / (\text{d.o. de células T en reposo})) \pm \text{SEM}$ y son el resultado medio de 4 experimentos individuales ($p < 0,05$, mediante ANOVA).

5 Es importante señalar que no había IRX-2 en los cultivo conjuntos y que el aumento observado en la estimulación de las células T se debía a los efectos estimuladoras de IRX-2 en las DC, en lugar de a un efecto directo del IRX-2 en las células T. Así, el IRX-2 de la divulgación mejora la actividad estimuladora de las células T de las DC, como se muestra por la mayor proliferación en reacciones alogénicas de MLR. Además, anteriormente se demostró que IRX-2 aumentaba la expresión de ICAM-1 (CD54). Se ha demostrado que este ligando accesorio de la superficie celular está implicado en la señalización a través de LFA-1 y da como resultado un sesgo hacia un fenotipo Th1 (Rogers, 2000). En un contexto oncológico, la consecuencia funcional de estos efectos es que las DC tratadas con IRX-2 polarizarían la respuesta de las células T hacia un fenotipo Th1 y favorecerían la activación de la actividad CTL específica de tumor, promoviendo así el rechazo tumoral.

15 Nuestros datos también demuestran que IRX-2 estimula la producción de IL-12 a partir de DC. IL-12 es una potente citocina polarizante de Th1 secretada por las DC en respuesta a los patógenos durante la infección. Sin embargo, una de las funciones más importantes de las DC en la mediación del rechazo tumoral es estimular eficaz y eficientemente las respuestas de células T antitumorales sesgadas por Th1 y una de las citocinas críticas para dirigir esta respuesta es la IL-12. La IL-12 es producida por DC activadas y es un factor esencial involucrado en la diferenciación de las células T cooperadoras CD4+ sin tratamiento previo en células Th1. Las células Th1 secretan IFN- γ e IL-2 y estas citocinas junto con IL-12 median en la activación y proliferación de los componentes celulares y fagocíticos del sistema inmunitario, tal como los linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL).

20 Para determinar si IRX-2 puede inducir la producción de IL-12 en las DC, los monocitos cultivados con GM-CSF/IL-4 fueron estimulados con IRX-2 durante 18 horas y ensayados para la producción intracelular de IL-12 p70. Más específicamente, se cultivaron PBMC adherentes durante 4 días en GM-CSF e IL-4 (como se describió anteriormente) y luego se trataron con o sin IRX-2 o LPS durante 18 horas. Se añadió Brefeldin A (BFA; 10 $\mu\text{g/ml}$; Sigma, St. Louis, MO) durante las últimas 4 horas para acumular la mayor parte de la citocina en el complejo de Golgi. Las células se fijaron y permeabilizaron usando Fix y Perm (Caltag, Burlingame, CA), según las instrucciones del fabricante, y luego se marcaron con mAb marcado con FITC contra IL-12 p70 (BD Pharmingen, San Diego, CA) o el control de isotipo apropiado (BD Pharmingen, San Diego, CA). Las células se analizaron por citometría de flujo.

25 Como se muestra en la Figura 17A, IRX-2 aumentó el porcentaje de DC que producen IL-12 desde 4,5 % positivo a 22,5 % de promedio. LPS, un estimulador de la producción de IL-12 en las DC, se utilizó como control positivo y dio niveles similares de inducción en relación con IRX-2 ($27\% \pm 11$). Los datos de la Figura 17A son la media de 4 experimentos independientes y se expresan como el porcentaje de células que tiñen positivamente para IL-12 $\pm \text{SEM}$ ($p < 0,05$, prueba t de Student). Para confirmar que la producción intracelular aumentada de IL-12 correspondía a una secreción aumentada de IL-12 bioactiva, se midió la concentración de IL-12 bioactiva en el sobrenadante de las DC tratadas con IRX-2 (cultivadas inicialmente durante 4 días con GM-CSF e IL-4, como se describió anteriormente, e incubadas con IRX-2 durante 48 horas) usando un kit ELISA comercial (R & D Systems, Minneapolis, MN) que detecta el heterodímero p70 bioactivo. Por ello, como se muestra en la Figura 17B, 48 horas después de la exposición a IRX-2, los sobrenadantes de DC contenían significativamente más IL-12 bioactiva que las DC tratadas con el control. Los datos de la Figura 17B son medias ($\pm \text{SEM}$) de 6 experimentos independientes ($p < 0,05$, prueba t de Student).

30 Por último, nuestros datos indicaban que IRX-2 reduce la apoptosis inducida por VEGF en las DC. El VEGF es un inhibidor de la maduración de DC y se ha demostrado que aumenta los niveles de apoptosis en la maduración de DC. Para determinar si IRX-2 era capaz de mitigar los efectos de VEGF, las DC se trataron con VEGF con o sin IRX-2 y el nivel de apoptosis se determinó por unión de FITC-Anexina V. Más específicamente, los PBMC adherentes se trataron con GM-CSF e IL-4 durante 7 días y luego se incubaron en presencia o ausencia de VEGF (100 ng/ml) con o sin IRX-2 (1:3) durante 2 días adicionales. Las células se recogieron y se lavaron 2 veces en PBS enfriado con hielo y se volvieron a suspender en tampón de unión a Anexina (BD Pharmingen, San Diego, CA). FITC-Anexina V (BD Pharmingen, San Diego, CA) y yoduro de propidio se añadieron y las células se incubaron a 40 C durante 30 minutos. Las células se analizaron por citometría de flujo.

35 Como se muestra en la Figura 18, los niveles de apoptosis aumentaron en las células tratadas con VEGF en comparación con los controles; sin embargo, IRX-2 reducía el nivel de apoptosis en células tratadas con VEGF. Los datos de la Figura 18 son el resultado de 4 experimentos independientes y se expresan como el porcentaje de células que se tiñen positivamente para FITC-Anexina V ($\pm \text{SEM}$). Los datos sugieren que, además de su capacidad estimuladora, el IRX-2 también tiene un efecto protector en DC maduras. Además, la función y el número de DC defectuosas pueden ser mediadas en parte por la expresión aberrante de VEGF por el tumor (Gabrilovich, 1996b, Saito, 1999, Takahashi, 2004). Se demostró que la producción de VEGF por los tumores es un indicador de mal pronóstico en varios cánceres incluidos H&NSCC, cáncer de pulmón, cáncer gástrico y osteosarcoma (Gallo, 2001; Kaya, 2000; Miyake, 1992; Saito, 1998; Smith, 2000). Los datos contenidos en el presente documento indican que IRX-2 puede revertir la apoptosis mediada por VEGF de las DC, promoviendo así la supervivencia de DC maduras dentro de un entorno tumoral y permitiendo la presentación y la activación prolongadas del antígeno de linfocitos T

citotóxicos específicos del antígeno tumoral.

Estudios previos con DC han empleado mezclas de citocinas naturales tales como medios acondicionados con monocitos (MCM) o mezclas de citocinas inflamatorias recombinantes que contienen TNF- α , IL-1 β , IL-6 y PGE2 para madurar las DC para uso en vacunas contra el cáncer basadas en DC generadas *ex vivo* (Romani, 1996; Bender, 1996; Sorg, 2003). Una diferencia crítica entre IRX-2 y las mezclas de citocinas utilizadas en otros estudios es que el nivel de citocinas utilizado en este estudio era 10-100 veces menor, lo que sugiere un sinergismo significativo entre los componentes de citocina únicos de IRX-2. Además, existen problemas significativos relacionados con el uso de DC maduras por estas otras mezclas. Por ejemplo, las DC maduras en presencia de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y PGE2 tienen una baja o ausente producción de IL-12 y, si se activan indebidamente, pueden ser tolerogénicas (Steinman, 2002; Langenkamp, 2000). Además, existe la preocupación de que las DC completamente maduras generadas *ex vivo* podrían "agotarse" y no poder cebar de forma eficiente una respuesta de células T eficaz (Kalinski, 2001). Los bajos niveles de respuestas clínicas observadas en pacientes tratados con DC maduras por el procedimiento *ex vivo* presta apoyo a estos problemas (Hottl, 2002; Schuler-Thurner, 2002; Thurner, 1999).

La evidencia presentada en el presente documento confirma que IRX-2 es un potente activador de células dendríticas. Este dato combinado con los conocidos efectos de IRX-2 sobre las células T (Hadden, 1995b) sugiere que IRX-2 es capaz de superar los defectos de APC y células T encontrados en pacientes con cáncer y proporciona una explicación mecanicista de los resultados clínicos satisfactorios observados en las pruebas clínicas de los Solicitantes. Mientras que las DC son ahora reconocidas como piezas clave en la inmunoterapia dirigida al cáncer, es cada vez más evidente que manipular elementos individuales del sistema inmunitario de forma individual, p. ej., estrategias de vacunación de células T específicas del tumor o la reintroducción de DC pulsadas con antígeno del tumor, no está consiguiendo producir mejoras clínicas significativas en los pacientes (Ridgway, 2003; Rosenberg, 2004). Un plan de tratamiento más beneficioso puede ser mejorar simultáneamente las actividades de varios tipos de células de coordinación, p. ej., células T y DC, que permiten reforzar las interacciones y una mayor probabilidad de que las cascadas funcionales se perpetúen en lugar de que se bloqueen por las diversas estrategias inmunosupresoras del tumor. En este contexto, el IRX-2 de la divulgación puede estar actuando para estimular tanto las DC endógenas cargadas con antígeno del tumor como las células T citotóxicas específicas del antígeno del tumor, dando como resultado una respuesta inmunitaria eficaz y un rechazo del tumor. Tomados en conjunto, estos resultados indican que la composición de citocinas de la presente divulgación puede ser una herramienta clínica poderosa para provocar una respuesta inmunitaria contra antígenos tumorales endógenos o podría usarse junto con antígenos tumorales añadidos de forma exógena en un contexto de vacuna contra el cáncer.

Ejemplo 10

IRX-2 estimula la activación de monocitos/macrófagos

El IRX-2 de la divulgación que contiene las citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ y TNF- α es también un potente activador de monocitos/macrófagos. Más específicamente, se cultivaron PBMC adherentes (~90 % de monocitos) durante la noche en medio X-VIVO 10 (BioWhittaker Bioproducts), se estimularon durante 24 horas con IRX-2 (a una concentración final de 1:3) y se ensayaron para la expresión de varios marcadores de activación típicamente encontrados en macrófagos activados por citometría de flujo. Como control, las células se incubaron durante 24 horas en medios que carecen de IRX-2. Como se demuestra en la Figura 19, el tratamiento de las células con IRX-2 frente a citocinas sin la adición produjo un aumento estadístico en el porcentaje de células teñidas positivamente (Figura 19A) y un aumento en el índice de fluorescencia media (MFI) (Figura 19B) para HLA-CR, CD86, CD40 y CD80, todos los marcadores de activación de monocitos/macrófagos ($p < .03$). Los datos que se muestran en la Figura 19 representan el valor medio \pm SEM a partir de tres experimentos/donantes independientes.

Además, se encontró que el IRX-2 de la divulgación activa los monocitos en un grado mayor que el TNF- α . Más específicamente, los PBMC adherentes se estimularon con IRX-2 (IRX-2) (a una concentración final de 1:3, aproximadamente 1 ng/ml de TNF- α) o con TNF- α (10 ng/ml) y se ensayaron para la expresión de marcadores de activación por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 20, IRX-2 indujo una expresión estadísticamente mayor de HLA-DR, CD86, CD40 y CD80 que TNF- α ($p < .03$). Los datos mostrados en la Figura 20 representan el valor medio \pm SEM de tres experimentos/donantes independientes.

De forma similar, los estudios realizados usando LPS en dosis moderadas (activadoras pero no máximas) también indicaron que IRX-2 era una señal de activación comparativamente más fuerte. Más específicamente, se estimularon PBMC adherentes en ausencia o presencia de IL-10 (5 ng/ml) con IRX-2 (IRX-2) (a una concentración final de 1:3) o con LPS (10 ng/ml) y se ensayó para la expresión de marcadores de activación por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 21, el IRX-2 causó un aumento mayor en la expresión de los marcadores de maduración de monocitos/macrófagos HLA-DR, CD86 y CD40 que el LPS. Además, en presencia de citocina inmunosupresora, IL-10, el IRX-2 todavía podía estimular los monocitos, mientras que el LPS no lo hacía ($p < .02$). Los datos que se muestran en la Figura 21 representan el valor medio \pm SEM de tres experimentos/donantes independientes.

Finalmente, se sabe que los monocitos secretan TNF- α en respuesta a señales de activación, cuya secreción está asociada con la actividad de destrucción no específica de los monocitos/macrófagos. Los datos mostrados en la Figura 22 demuestran que el IRX-2 de la divulgación estimula la producción de TNF- α a partir de monocitos y supera

los efectos inmunosupresores de IL-10. Más específicamente, se estimularon PBMC adherentes en ausencia o presencia de IL-10 (5 ng/ml) con IRX-2 (IRX-2) (a una concentración final de 1:3) o con LPS (10 ng/ml) y se ensayaron para la producción de TNF- α mediante tinción intracelular y citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 22, IRX-2 causó un mayor aumento en la producción de TNF- α que el LPS o los controles. En presencia de IL-10, el IRX-2 todavía podía estimular los monocitos para producir TNF- α , mientras que el LPS ya no podía hacerlo ($p < 0,05$). Los datos que se muestran en la Figura 22 representan el valor medio \pm SEM de cinco experimentos/donantes independientes.

Ejemplo 11

Los experimentos detallados a continuación demuestran la capacidad de la composición de IRX-2 de la divulgación para actuar en combinación con antígenos exógenos para provocar una respuesta inmunitaria realizada (tanto celular como basada en anticuerpos) contra el antígeno en ratones.

Administración de antígenos tumorales exógenos

Ratones:

El procedimiento era inmunizar ratones con péptidos de antígeno de la membrana específica de la próstata (PSMA) basados en epítopes de las células T mencionadas de PSMA (LLH y ALF) (100 $\mu\text{g}@$) se conjugaron con ovoalbúmina (OVA) o hemocianina de lapa californiana (KLH). Los intentos previos con péptidos no conjugados aislados no tuvieron éxito en ratones. Se administró IRX-2 (0,1 ml) como una única inmunización con ambos antígenos conjugados, precedida de dosis bajas de CY (400 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) y se siguió con 9 inyecciones diarias de IRX-2 (0,1 ml) sin antígenos, mientras que CpG, alumbre, o los adyuvantes de RIBI-Corixa fueron una sola inmunización primaria con el conjugado de OVA. A cada grupo de ratones se administraron dos inmunizaciones de refuerzo (conjugado más adyuvante como anteriormente) los días 21 y 28. La reacción de la DTH con los péptidos de las células T se midió 9 días después del refuerzo final y se tomó suero en el sacrificio los días 15-21.

La Figura 23 muestra los resultados de la DTH para el ensayo cutáneo de ratones, usando los péptidos individuales ALF y LLH (10 $\mu\text{g}@$), es decir, sin conjugado, como exposición al antígeno. Como se indica en la Figura, el IRX-2 induce respuestas de la DTH significativas a los antígenos después de la inmunización con ambos conjugados y también cuando se administran con alumbre para el conjugado de OVA. Alumbre, RIBI-Corixa y CpG mostraron una actividad insignificante.

Resultados de anticuerpos en suero:

Se diluyó el suero como se indicó y se añadió a los pocillos de una microplaca recubierta con péptido (ALF o LLH) o con ovoalbúmina. Los resultados se expresan como la DO media a 405 para 5 grupos de ratones. Los datos se presentan en la Tabla IV a continuación.

Más específicamente, los ratones inmunizados con el conjugado KLH en combinación con IRX-2 fueron negativos para anticuerpos de ovoalbúmina, pero positivos para los péptidos. Los ratones inmunizados con los conjugados de OVA e IRX-2 fueron positivos para anticuerpos tanto para OVA como para los péptidos, mientras que los inmunizados con el conjugado de OVA + CpG fueron positivos solo para OVA. Estos resultados indican que IRX-2 actúa como un adyuvante para mejorar la capacidad de los péptidos de PSMA conjugados para estimular tanto las respuestas de la DTH como de IgG específicas de los péptidos, mientras que otros adyuvantes como alumbre, RIBI-Corixa y CpG son inactivos o poco activos.

Tabla IV A: IgG sérica con péptido ALF

Dilución

IRX-2	OVA-PSMA IRX-2	KLH-PSMA-IRX-2	OVA-PSMA-CpG
1/200	0,929	0,692	0,241
1/400	0,989	0,518	0,208
1/800	0,695	0,351	0,144
1/1.600	0,309	0,191	0,120

Tabla IV B: IgG sérica con péptido LLH

1/200	0,950	0,720	0,277
-------	-------	-------	-------

1/400	1,013	0,502	0,200
1/800	0,607	0,327	0,157
1/1.600	0,316	0,201	0,125

Tabla IV C: IgG sérica con ovoalbúmina

1/500	0,920	0,269	1,050
1/1.500	0,632	0,185	0,955
1/3.000	0,457	0,146	0,813
1/6.000	0,259	0,104	0,537

Se realizaron experimentos adicionales para confirmar los resultados anteriores y demostrar que la composición de IRX-2 de la divulgación mejora las respuestas inmunitarias específicas de células T en ratones tanto jóvenes como adultos. En los experimentos descritos a continuación, se usaron los siguientes procedimientos y materiales:

5 Reactivos:

10 Péptidos de antígeno de membrana específico de próstata (Péptido 1: Leu-Leu-His-Glu-Thr-Asp-Ser-Ala-Val; Péptido 2: Ala-Leu-Phe-Asp-Ile-Glu-Ser-Lys-Val) fueron sintetizados por BioSynthesis Inc. (Lewisville, Tx). La ovoalbúmina y la ciclofosfamida se obtuvieron de Sigma y KLH de Pierce Biochemicals. El sistema adyuvante RIBI (R-700), también denominado RAS, se adquirió de Corixa y el alumbre (40 mg/ml cada uno de hidróxido de aluminio y de hidróxido de magnesio) se adquirió de Pierce Chemicals. RAS consistía en lípido monofosforil A (0,5 mg) y trehalosa dicorinomicolato sintético (0,5 mg), y 44 µl de escualeno y Tween-80. Los oligonucleótidos CpG (secuencia específica de ratón) fueron sintetizados por Biosynthesis. La secuencia CpG era TCCATGACGTTCCCTGACGTT y era el derivado fosfotionato. La bioactividad de CpG en el ratón se confirmó midiendo la proliferación de células de bazo de ratón y la producción de TNF-α mediante células adherentes de ratón (datos no mostrados).

15 El IRX-2 (también referido aquí como IRX-2) es una mezcla definida de citocinas producidas durante un período de 24 horas después de la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana mediante PHA y ciprofloxacina. El PHA se elimina antes de recoger el sobrenadante que contiene las citocinas. Se incluyen dos pasos de eliminación de virus en el procesamiento posterior (intercambio de iones y nanofiltración dual). La prueba rigurosa de control de calidad (QC) que incluye tanto el bioensayo como la determinación por ELISA de los niveles de citocinas asegura la consistencia del IRX-2 (IRX-2). El ensayo de seguridad con respecto a la esterilidad, ADN, micoplasma, endotoxina y ensayo de virus para CMV y EBV también son parte del proceso. Se usaron varios lotes de IRX-2 en el transcurso de estos estudios. El nivel de varias citocinas contenidas en los lotes de IRX-2 (IRX-2) se enumera en la Tabla V a continuación. En la tabla, * representa el nivel medio de citocinas para los 5 lotes de IRX-2 utilizados en estos estudios y ** representa los niveles no medidos en todos los lotes, pero solo para el lote más reciente. Las citocinas adicionales presentes en los intervalos de pg/ml incluyen G-CSF, IL-12 e IL-10. No están presentes las citocinas típicas de desviación de Th2 tal como IL-3, IL-4, IL-5, IL-7 e IFN-α. Cuando se probaron dos lotes en el mismo experimento, siempre fueron de similar actividad (datos no mostrados).

Tabla V: Niveles de citocinas en IRX-2

Citocinas (pg/ml)	Media* (n=5)
IL-2	4,72
IL-1	0,45
IFN-γ	1,28
TNF-α	1,5
IL-8**	53,5

Citocinas (pg/ml)	Media* (n=5)
IL-6**	1,1
GM-CSF**	0,58

Conjugación de péptidos de antígenos:

Los péptidos 1 y 2 descritos anteriormente se conjugaron con una molécula portadora tal como portadoras de ovoalbúmina o de KLH como se ha descrito anteriormente. Ambos péptidos se conjugaron con cada portadora, es decir, como un único agente. Por ejemplo, el conjugado OVA-PSMA o el conjugado KLH-PSMA usado en estos estudios contenían ambos péptidos vinculados a la molécula portadora. Los péptidos se conjugaron con las respectivas portadoras usando el procedimiento de carbodiimida (ODC; kit 77502 de Pierce EDC, Rockford, IL). En los primeros estudios, se utilizó glutaraldehído (Sigma, St. Louis, Mo) pero no hubo diferencias en la inmunogenicidad entre los dos procedimientos (datos no mostrados), por lo que el acoplamiento de carbodiimida se eligió para estudios posteriores como el procedimiento más controlado. La conjugación se caracterizó midiendo la DO a 280 y 215 en fracciones de una columna de purificación de Sephadex. El máximo de DO a 280 de las columnas representa el conjugado de ovoalbúmina o de KLH y se recogió como el conjugado. La dosificación se basó en la concentración de portadora recuperada de la columna. La monitorización de la de 215 mostró un máximo en la cola que representa los péptidos libres y proporcionó la confirmación de que estaba presente un exceso de péptido durante el procedimiento de conjugación.

Inmunización

Se adquirieron ratones Balb/c de Charles River o de Harlan y estuvieron bajo el cuidado de las Instalaciones para animales del Cold Spring Harbor (CSHL). Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité ALAC de CSHL. En varios experimentos, se inyectó ciclofosfamida (400 o 2.000 µg/100 µl, IP) tres días antes del tratamiento con IRX-2. Estudios posteriores demostraron que la ciclofosfamida no tenía un efecto estadísticamente significativo sobre la mejora del IRX-2 (IRX-2) de la respuesta en ratones (datos no mostrados). Las inmunizaciones se realizaron de la siguiente manera: 200 µl/ratón que contenían 100 µg de PSMA conjugado con 100 µl de adyuvante, p. ej., IRX-2 o alumbre, o se inyectó PBS subcutáneamente en la base de la cola para proporcionar un rápido drenaje a los ganglios linfáticos regionales. Nueve inyecciones adicionales de IRX-2 (100 µl = 6-8 UI de equivalencia de IL-2) siempre siguieron a la inmunización primaria (en los días 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11 y 12). A diferencia de alumbre o RIBI, incluso las inyecciones repetidas de IRX-2 (IRX-2) en el mismo sitio no dieron como resultado una inflamación significativa en el sitio (observación no publicada). Se realizaron dos inmunizaciones de refuerzo con conjugado más adyuvante (en los días 14 y 28) antes de evaluar la actividad de DTH. No se administró IRX-2 adicional en las inmunizaciones de refuerzo.

En los estudios adyuvantes comparativos en ratones jóvenes, el RAS (R-700 = MPL + TDM en escualeno/Tween 80) se reconstituyó con 1 ml de PBS (según el protocolo recomendado) y luego se mezcló con 1 ml de conjugado (1 mg/ml). El alumbre se mezcló 1:1 con antígeno. Los oligonucleótidos CpG se mezclaron con el conjugado según los protocolos publicados para ratones (100 µg de conjugado con 20 µg de CpG por ratón).

Ensayo de DTH:

El desafío con antígeno *in vivo* para el ensayo de la DTH era con una mezcla de los dos péptidos de PSMA (sin portadora) (100 µg en 20 µl) o con portadora solo (ovoalbúmina o KLH) (50-100 µg en 20 µl). Los ratones recibieron inyecciones subcutáneas del antígeno de prueba en el cojinete plantar izquierdo y PBS en el cojinete plantar derecho 9 días después de la inmunización de refuerzo. Después de 24 horas, se midieron los espesores de los cojinetes plantares de las patas derecha e izquierda usando un calibre de lectura digital (Preisser DIGI-MET Modelo 18314, Stofiting Co., Wooddale, IL). La respuesta de hinchamiento se calculó restando el espesor del cojinete plantar derecho (línea de referencia) del espesor del cojinete plantar izquierdo (respuesta experimental). Los datos se expresaron como hinchamiento individual de los ratones así como media ± desviación estándar de la media. El análisis estadístico era a través de la prueba t de Student o ANOVA.

Producción y medición de citocinas inducida por antígenos/mitógenos:

Para estos estudios, los bazo se recogieron 14-21 días después de la inmunización de refuerzo y se aislaron mediante dispersión a través de una malla de alambre. Las células adherentes se obtuvieron tomando células del bazo y dejándolas adherirse al plástico durante 90 minutos. Las células adherentes aisladas se agruparon antes de la adición a los cultivos para proporcionar células presentadoras de antígeno adicionales. Aproximadamente 6×10^5 linfocitos por pocillo se complementaron con 2×10^4 células adherentes.

La liberación de citocinas de la activación de linfocitos inducida por antígeno o mitógeno se midió en sobrenadantes utilizando reactivos de ELISA Duo-Sets de R y D Systems (Minn., MN). El día óptimo para recoger los sobrenadantes de las células estimuladas con antígeno era el día 6 (para IFN- γ), mientras que la producción de IL-2 estimulada por PHA era óptima el día 3 (datos no mostrados).

5 Anticuerpos séricos con ovoalbúmina y péptidos:

El suero en el sacrificio se congeló para uso posterior en ensayos de ELISA. Las placas de ELISA (Immunolon-4, Nunc, Dinamarca) se recubrieron con el antígeno de interés (ovoalbúmina, KLH, péptidos conjugados o individuales) durante la noche. Diluciones de suero se añadieron a los pozos bloqueados y lavados y se incubaron durante la noche. Se añadieron secuencialmente biotina anti-ratón y biotina-fosfatasa alcalina (Southern BioTech, Birmingham, AL) y después de la adición de sustrato pNPP, la DO se midió y registró frente a la dilución del suero.

10 Los resultados de estos estudios como se detalla a continuación demuestran que el IRX-2 de la divulgación estimula las respuestas inmunitarias específicas de antígeno del tumor en ratones tanto jóvenes como adultos *in vivo*. Más específicamente, en los experimentos descritos a continuación, se utilizó el ensayo de la DTH (hipersensibilidad de tipo retardado) *in vivo* como un indicador de la activación de las células T. La respuesta de la DTH a antígenos de

15 cáncer se correlaciona bien con la eliminación de tumor en modelos animales y pruebas clínicas, y proporciona así una correlación *in vivo* útil de respuestas inmunitarias de células T (véanse, por ejemplo, Stuart, 1987; Sweat, 1998). Como se demuestra por los presentes experimentos, la composición de IRX-2 de la divulgación actúa como un adyuvante con antígenos tumorales específicos de próstata en la estimulación de respuestas inmunitarias de células T en ratones jóvenes *in vivo*. Además, los presentes experimentos demuestran que IRX-2 no solo aumenta la

20 respuesta inmunitaria a péptidos de células T en ratones jóvenes sino que también restablece las respuestas inmunitarias de células T en ratones adultos con alteración de las células T. Así, en los experimentos detallados a continuación, los ratones adultos se usaron como un modelo de disfunción inmunitaria, una disminución relacionada con la edad en la función inmunitaria que aparece tanto en ratones como en hombres. Además, se cree que esta disfunción inmunitaria es una de las principales razones del aumento de la incidencia del cáncer que aparece con el

25 aumento de la edad en los humanos.

Mejora con IRX-2 de la respuesta de la DTH específica de péptido en ratones jóvenes:

Se inmunizaron ratones jóvenes con IRX-2 (o PBS como control negativo) en combinación con un conjugado OVA-PSMA o KLH-PSMA como se describió anteriormente (p. ej., 200 μ l/ratón, que contiene 100 μ g de conjugado con 100 μ l de IRX-2 o PBS). Las inmunizaciones se administraron como inyecciones subcutáneas en la base de la cola para proporcionar un drenaje rápido a un ganglio linfático regional. Los ratones se enfrentaron posteriormente en un ensayo de la DTH como se ha descrito anteriormente, usando los péptidos de PSMA (Figura 24A) o la portadora usada en las respectivas inmunizaciones conjugadas (Figura 24B) como el antígeno de desafío.

30 Como se demuestra en la Figura 24A, la inmunización de ratones jóvenes (6-8 semanas de edad) con IRX-2 (IRX-2) en combinación con un conjugado OVA-PSMA o KLH-PSMA mejoraba la respuesta de DTH específica del péptido, independientemente de la portadora. Cuando los péptidos se administraron conjuntamente con IRX-2 pero sin conjugación, no se midió ninguna respuesta de la DTH específica de péptido (datos no mostrados). La respuesta de DTH a las portadoras (ovoalbúmina o KLH) era más fuerte que para el péptido, y la administración con IRX-2 no mejoraba la actividad de la DTH (Figura 24B). La adición de alumbre a la inmunización del conjugado péptido-IRX-2 no modificó la respuesta positiva de la DTH específica del péptido (datos no mostrados).

40 Los estudios iniciales usaron IRX-2 (IRX-2) en combinación con un pretratamiento único con ciclofosfamida tres días antes de la inmunización. Más específicamente, se inmunizaron ratones con el conjugado OVA-PSMA e IRX-2 (IRX-2) con o sin la administración de ciclofosfamida (400 μ g/ratón o 2 mg/ratón) 3 días antes de la inmunización primaria. Después de dos refuerzos (en los días 14 y 28), se realizó un ensayo de DTH como se describió anteriormente.

45 Como se muestra en la Figura 25, el pretratamiento con ciclofosfamida no se requirió para la respuesta específica del péptido y no se usó en experimentos posteriores. Además, este experimento confirmaba que el tratamiento con IRX-2 en combinación con el conjugado del péptido mejoraba la respuesta de DTH específica del péptido en una extensión significativamente mayor ($p < 0,05$) que el uso de alumbre o PBS, independientemente de si los ratones eran tratados previamente con ciclofosfamida o no. Los resultados de este ensayo se expresaron como hinchamiento promedio (barras en la Figura 25) y como hinchamiento para ratones individuales (puntos de datos con forma de diamante en la Figura 25). Además, todos los resultados de estos estudios con ratones utilizaron 9 días de inyecciones adicionales de IRX-2 (IRX-2) después de la inmunización primaria, aunque 4 tratamientos adicionales no eran estadísticamente diferentes de los 9 (datos no mostrados).

55 Además, la capacidad de IRX-2 para estimular una respuesta inmunitaria específica del péptido a los conjugados de PSMA se comparó con la de otros tres adyuvantes: alumbre, el Sistema Adyuvante RIBI (o RAS) y CpG. Más específicamente, los ratones se inmunizaron con el conjugado OVA-péptido en combinación con estos diferentes adyuvantes. Después de dos refuerzos (en los días 14 y 28), se realizó un ensayo de DTH como se describió anteriormente (en el día 9 después del refuerzo). Los resultados de este estudio se indican en la Figura 26 y se expresan como el hinchamiento medio (barras) y como el hinchamiento para ratones individuales (puntos de datos

con forma de diamante).

5 Como se representa en la Figura 26, el efecto adyuvante de IRX-2 (IRX-2) era mayor que los de los otros adyuvantes ensayados ($p < 0,001$). Aunque todos los adyuvantes mejoraban la respuesta a la proteína portadora en comparación con los ratones sin tratamiento previo (datos no mostrados), solo IRX-2 (IRX-2) mejoraba la respuesta inmunitaria específica del péptido del tumor.

Mejora con IRX-2 de la respuesta inmunitaria específica del péptido en el envejecimiento de ratones

10 En primer lugar, se confirmó que la respuesta inmunitaria de las células T en ratones adultos (>18 meses de edad) era deficiente en comparación con la respuesta en ratones jóvenes (8-16 semanas de edad) demostrando que las células de bazo de los ratones adultos estimuladas con mitógeno (PHA) se alteraban con respecto a la secreción de dos citocinas de células T primarias, IL-2 e IFN- γ , en comparación con la respuesta de ratones jóvenes (IL-2: 285 frente a 75 pg/ml e IFN- γ : 1.535 frente a 128 pg/ml).

15 Luego se ensayó la respuesta DTH en ratones adultos frente a jóvenes que habían sido inmunizados con conjugados de PSMA y con IRX-2 o alumbre como adyuvante, seguido de desafío con antígeno utilizando el ensayo DTH descrito anteriormente. Más específicamente, se inmunizaron ratones adultos (18-20 meses al inicio del estudio) y ratones jóvenes (6-8 semanas al inicio del estudio) con el conjugado de PSMA, OVA-PSMA, en combinación con IRX-2 o alumbre como adyuvante, como se describió anteriormente. A continuación, los ratones se desafiaron con antígeno según el ensayo de DTH descrito anteriormente.

20 Como se indica en la Figura 27A, IRX-2 (IRX-2) restableció la actividad inmunitaria de ratones adultos a la de ratones jóvenes con respecto a la respuesta DTH específica de péptido. Los resultados se expresan como la diferencia en el hinchamiento entre una pata inyectada con PBS y una pata inyectada con antígeno para la media de 9-15 ratones por grupo. El hinchamiento promedio para los grupos de adultos y jóvenes tratados con IRX-2 no era estadísticamente diferente con respecto a la respuesta específica del péptido. Sin embargo, las respuestas de DTH tanto de los grupos IRX-2-jóvenes como de los IRX-2-adultos fueron significativamente mayores que las observadas en los ratones tratados con alumbre (* $p < 0,005$, prueba t de Student).

25 Con respecto a la respuesta de DTH específica de la portadora OVA, la Figura 27B demuestra que los ratones adultos eran deficientes en comparación con los ratones jóvenes para esta respuesta ($p < 0,05$) pero el tratamiento IRX-2 restableció la respuesta de DTH específica de ovoalbúmina en el ratón adulto (Figura 27B). La respuesta de los ratones jóvenes a la ovoalbúmina era óptima en alumbre y, por lo tanto, no mejoraba con IRX-2.

30 Estos experimentos demostraron el efecto adyuvante de la composición de IRX-2 de la divulgación en la estimulación de respuestas inmunitarias de células T de antígeno antitumoral específico en ratones tanto adultos como jóvenes *in vivo*. De hecho, el IRX-2 de la divulgación proporcionó una mayor respuesta inmunitaria de células T específicas de antígeno tumoral en comparación con otros adyuvantes ensayados.

35 Se llevaron a cabo experimentos adicionales, como se describe a continuación, para medir el efecto del tratamiento con IRX-2 sobre la producción de la citocina de células T, IFN- γ , cuya producción es otro indicador de estimulación inmunitaria.

Efecto de IRX-2 en la respuesta *ex vivo* de las células T del bazo

40 De este modo, el efecto adyuvante del tratamiento con IRX-2 en ratones inmunizados con IRX-2 y un conjugado de PSMA se determinó midiendo la secreción de IFN- γ por células de bazo de los ratones inmunizados. Más específicamente, las células del bazo de ratones inmunizados con el conjugado KLH-PSMA (como se describió anteriormente) e IRX-2 (IRX-2) se recogieron e incubaron *ex vivo* con el conjugado (KLH-PSMA), el portador (KLH) o los péptidos (PSMA). Los sobrenadantes de las células del bazo se recogieron después de 6 días de cultivo y se midió la secreción de IFN- γ como se describe en la sección anterior de procedimientos y materiales. Como se muestra en la Figura 28, la respuesta de las células T, en forma de producción de IFN- γ (en pg/ml), era mayor para los tres antígenos en los ratones inmunizados con el conjugado e IRX-2 en comparación con los ratones no tratados previamente.

Efecto de los adyuvantes en el título de anticuerpos en suero

50 Además, se realizaron experimentos para determinar si el tratamiento con IRX-2 tenía un efecto adyuvante sobre la producción de anticuerpos *in vivo*. Más específicamente, se inmunizaron ratones con los conjugados de PSMA como se describió anteriormente y los siguientes adyuvantes: IRX-2, alumbre o CpG. PBS se usó como un control negativo para el adyuvante. El suero de los ratones se obtuvo en el sacrificio, o 15 días después de la tercera inmunización (datos representados en la Figura 29A y B) o a los 8 y 15 días después del tercer refuerzo (datos de la Figura 29C)). El suero se ensayó para detectar anticuerpos mediante ELISA y los resultados se expresaron como dilución frente a densidad óptica (Figura 29A y B) o como densidad óptica a la dilución óptima, 1/400 (Figura 29C).

55 Se midieron los títulos de anticuerpos en suero para la portadora (ya sea ovoalbúmina o KLH) e indicaron que IRX-2 (IRX-2), alumbre y CpG indujeron títulos similares a la ovoalbúmina, siendo la respuesta: CpG>alumbre>IRX-2 (IRX-

2) (Figura 29A y datos no mostrados). Los ratones inmunizados con el conjugado KLH, como se predijo, no generaban títulos para la ovoalbúmina, lo que confirma la especificidad del ensayo ELISA (véase, por ejemplo, la Figura 29A). Sin embargo, en cuanto a la respuesta de anticuerpos específicos de péptidos como se representa en la Figura 29B, el IRX-2 en combinación con el conjugado del péptido OVA-PSMA indujo anticuerpos en suero para ambos péptidos, en contraste con alumbre y CpG. Los datos en la Figura 29B son para el péptido ALF con una $p < 0,05$ por ANOVA para IRX-2 frente a alumbre y CpG. Se midieron respuestas similares para el péptido LLH (datos no mostrados). Como se representa en la Figura 29C, cuando se usó KLH en el conjugado como portadora para los péptidos, IRX-2 (IRX-2) indujo una respuesta del anticuerpo del péptido mayor que ningún adyuvante (PBS) o alumbre ($p < 0,001$ para IRX-2 frente a alumbre y PBS). Los marcadores en la Figura 29C indican ratones individuales. La respuesta del anticuerpo se midió en una placa de ELISA revestida con ambos péptidos en el procedimiento de ensayo como se ha descrito anteriormente.

Los estudios descritos anteriormente indican que el IRX-2 de la divulgación mejora la respuesta de DTH específica del péptido de células T *in vivo* y la respuesta de células T de células de bazo *ex vivo* en un modelo prototipo de vacuna de péptido de próstata. La naturaleza crítica de la mezcla de citocinas (en oposición a la actividad de solo unas pocas) se confirma por la observación de que las preparaciones realizadas a partir de cultivos celulares que carecen de monocitos y, por lo tanto, deficientes en citocinas derivadas de monocitos no lograron mejorar la respuesta de DTH específica del péptido o la respuesta de células T *in vitro* de las células del bazo. La naturaleza novedosa del IRX-2 se demostró adicionalmente comparándola con otros adyuvantes seleccionados para representar diversos mecanismos de acción. Por ejemplo, CpG es un agonista de TLR para APC y es representativo de adyuvantes activadores de TLR, mientras que el sistema RAS es representativo de adyuvantes con componentes de aceite y bacterianos, y es una alternativa más segura al adyuvante de Freund en modelos de ratón. El alumbre es el adyuvante utilizado en la mayoría de las vacunas aprobadas por la FDA. En los presentes estudios, el IRX-2 mejoraba la respuesta de DTH específica del péptido, pero alumbre, CpG y RAS no lo hicieron. Además, la mejora con IRX-2 de la respuesta de DTH específica del péptido de las células T *in vivo* se correlacionó con una respuesta de células T mejorada por células del bazo *ex vivo* como se define por la secreción específica de antígeno de IFN- γ . Por último, aunque todos los adyuvantes mejoraban la respuesta del anticuerpo a la portadora (en comparación con PBS), solo el IRX-2 mejoraba la respuesta del anticuerpo a los péptidos conjugados con la portadora.

El mecanismo o mecanismos a través de los cuales las citocinas en IRX-2 actúan para mejorar la respuesta inmunitaria específica del péptido según se define por el ensayo de DTH es el más complejo probablemente ya que el reclutamiento, involucramiento, proliferación, activación, maduración y migración de las APC y reclutamiento, proliferación, diferenciación y maduración de las células T están todas influenciadas por las citocinas. Sin embargo, se cree que la naturaleza específica del péptido de la respuesta DTH observada en estos estudios es el resultado de la influencia de IRX-2 en la presentación del antígeno, así como la posterior proliferación y migración de células T a la periferia. También se cree que las citocinas del IRX-2 cambian la tolerancia de las DC o el equilibrio regulador de T hacia la activación de la respuesta a epítopes de células T. IRX-2 puede también estar mejorando los epítopes cooperadores de células T en la portadora proporcionando estimulación adicional del desarrollo de una respuesta inmunitaria eficaz de las células T. Como se demuestra en el presente documento (véanse los Ejemplos 9 y 10), el IRX-2 de la divulgación estimula la maduración y activación de las células dendríticas, lo que promueve la presentación del antígeno y la secreción de IL-12 (por las células dendríticas), siendo IL-12 una potente citocina polarizante Th1. El IRX-2 también es un potente activador de monocitos y macrófagos.

El IRX-2 tiene efectos adicionales sobre las células T basados en la influencia conocida de las citocinas presentes en el IRX-2. Como se muestra en los Ejemplos 2 y 8 anteriores, el IRX-2 de la divulgación aumenta los recuentos de linfocitos T en pacientes linfocitopénicos, incluida la producción de células T sin tratamiento previo. Además, se sabe que la IL-1 (presente en el IRX-2) es un quimioatrayente para linfocitos, así como un estimulador de la producción de otras citocinas. Las actividades conocidas incluyen un aumento en la proliferación y activación de las células T en reposo al inducir la secreción de IL-2 y, más importante aún, la actividad de IRX-2, la regulación al alza del receptor de IL-2. Además, el TNF- α (también presente en IRX-2) mejora la actividad de IL-1 como hacen otras citocinas tal como IL-8 y los CSF. IL-8 actúa también como un quimioatrayente para múltiples células, incluidas las células T, basófilos y neutrófilos. La IL-2 actúa mejorando la proliferación de las células activadas no solo estimulando a través del receptor, sino también regulando al alza los receptores de IL-2 adicionales, así como los receptores de citocinas adicionales. De este modo, las citocinas de las composiciones de IRX-2 de la divulgación son pleotrópicas, que influyen en los monocitos, las células dendríticas y las células T.

El sitio de actividad para las citocinas, presente en niveles fisiológicos en el IRX-2 de la divulgación, es local e incluye tanto el sitio de inyección como también los ganglios linfáticos asociados con el sitio de inyección. Como el IRX-2 se puede administrar diariamente, se pueden mantener niveles locales elevados de todas las citocinas. La naturaleza específica del péptido de la respuesta de DTH usando el IRX-2 de la divulgación como un adyuvante aboga por el uso del IRX-2 en futuras vacunas de células T.

Además, los presentes estudios indican que el IRX-2 de la divulgación corrige un déficit de citocinas de células T en ratones envejecidos. Es importante tener en cuenta que el cáncer aparece con mayor frecuencia en individuos más adultos que se sabe que tienen un sistema inmunitario en declive. Además, muchas de las terapias actuales para tumores (irradiación y quimioterapia) pueden ser por sí mismas inmunodepresoras, lo que reduce aún más la competencia inmunitaria del paciente. Así, una vacuna contra el cáncer para muchos pacientes puede beneficiarse

de un agente con el potencial de restablecer la inmunodeficiencia asociada con el envejecimiento, los tratamientos contra el cáncer y los mecanismos de defensa contra el cáncer. Teniendo en cuenta este posible obstáculo para el uso de una vacuna en los ancianos, se evaluó IRX-2 en los presentes estudios para conocer la eficacia en el envejecimiento, así como en los ratones inmunocompetentes jóvenes. En primer lugar, se determinó que las células del bazo de los ratones adultos eran deficientes en la producción de citocinas tanto de IL-2 como de IFN- γ cuando se comparaba con los ratones jóvenes. La respuesta de DTH también se vio alterada con respecto a la ovoalbúmina. La composición de IRX-2 de la divulgación no solo era capaz de restablecer la débil respuesta a la portadora, sino que también era eficaz en restablecer la respuesta específica del péptido a niveles similares a la de los ratones jóvenes.

El protocolo para el uso de IRX-2 en un modelo de vacuna se basa en estudios clínicos de fase I/II usando el IRX-2 (IRX-2) en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, y la cinética conocida de la respuesta inmunitaria (véase, p. ej., Meneses, 2003; Hillman, 1995). En las pruebas clínicas, tomar como diana el ganglio linfático de drenaje del tumor combinado con una inyección previa de baja dosis de ciclofosfamida y una administración de 10 días con IRX-2 (IRX-2) da como resultado la mejora de la infiltración linfocítica del tumor, la fragmentación de la arquitectura del tumor y la reducción del tamaño del tumor (véanse los Ejemplos 2-7 anteriores). Como se describió anteriormente, en el modelo de vacuna en ratones, los estudios iniciales utilizaron una inyección previa con ciclofosfamida, pero estudios posteriores confirmaron que esto no era necesario en ratones sanos que no portan tumor (Figura 25). Además, la administración diaria de IRX-2 después de la inmunización primaria (durante 4-9 días) parece ser importante porque asegura que el sitio de la inyección y, posteriormente, los ganglios linfáticos de drenaje tienen suficientes niveles de citocinas para la estimulación óptima de la respuesta inmunitaria de células T durante la activación al período de transición de la memoria. Dado que los niveles de las citocinas son bajos, no hay respuesta inflamatoria manifiesta en el sitio de la inyección. Esto contrasta tanto con el alumbre como con el Sistema Adyuvante RIBI, donde se observaron hinchamiento e inflamación en el sitio de la inyección (observación no publicada).

La vacuna propuesta de portadora-péptido descrita en el presente documento tiene un compromiso clínico significativo como vacuna terapéutica basada en los datos informados de los estudios de Fase I/II usando los péptidos de PSMA sin conjugación con una portadora (Toja, 2000; O'Hagan, 2001; Katsuyuki, 2000 y Naylor, 1991). Los dos péptidos son epítopes de células T basados tanto en modelos informáticos como en la respuesta de linfocitos de pacientes con cáncer de próstata. Cuando los pacientes fueron tratados con péptidos solos o con células dendríticas pulsadas con péptido, se observaron respuestas mejoradas clínicas y de células T en las pruebas de Fase I/II. Sin embargo, en las pruebas de fase I, los péptidos sin un adyuvante eran menos eficaces que las células dendríticas pulsadas con péptido. Dada la respuesta mejorada específica del péptido, observada cuando se administró IRX-2 con el conjugado del péptido y la seguridad de los conjugados de KLH en una amplia variedad de pruebas clínicas, las pruebas clínicas con los péptidos e IRX-2 (IRX-2) están garantizadas.

Los estudios presentados en el presente documento que usan un modelo de ratón de vacuna de péptido contra el cáncer y los datos clínicos humanos que muestran una respuesta antitumoral enérgica a antígenos endógenos que usan el IRX-2 de la divulgación, apoyan el uso de la composición de IRX-2 de la divulgación en una vacuna tumoral para la generación de una respuesta inmunitaria suficiente para mediar en la destrucción específica del tumor. Además, dado que IRX-2 actúa para mejorar las respuestas de células T específicas en ratones jóvenes y adultos, IRX-2 es un candidato para la inclusión en cualquier vacuna contra el cáncer, especialmente para pacientes de edad avanzada con cáncer, que tiene como objetivo la mejora de respuestas inmunitarias de las células T.

Humanos:

Tres pacientes con cáncer de próstata avanzado recibieron péptidos de ALF y LLH no conjugados (100 μg @) con IRX-2 (1 ml-100 unidades de equivalencia de IL-2) precedidos por bajas dosis de CY (300 mg/m²) y a diario INDO (25 mg tres veces al día) más 9 inyecciones adicionales de IRX-2 (1 ml). El día 15, se administró un refuerzo de IRX-2 mas péptidos. Un paciente adicional (n.º 4) recibió péptidos conjugados con OVA en este régimen. Las reacciones de hipersensibilidad retardada (DTH) se midieron con IRX-2 (0,1 ml), ALF o LLH (10 μg) mediante una prueba cutánea intradérmica leída a las 24 horas en centímetros de eritema y en duración. Los resultados se presentan en la Tabla VI.

Tabla VI: DTH con péptidos de PSMA e IRX-2

	Momento 0	1 mes
IRX-2	1) 0	0,5
	2) 1,0	1,0
	3) 0,5	1,0

ES 2 679 043 T3

	Momento 0	1 mes
	4) 0,3	0,3
Péptido ALF	1) 0	0,5
	2) 0	0,1
	3) 1,0	1,0
	4) 0	0,4
Péptido LHH	1) 0	0,5
	2) 0	0,3
	3) 1,5	2,0
	4) 0	0,5

Estos datos indican que el régimen con IRX-2 es eficaz para inducir reacciones de DTH a péptidos de PSMA, no conjugados y conjugados, en humanos con cáncer de próstata avanzado. Este resultado es diferente de los resultados de la mayoría de los intentos anteriores que han fracasado con péptidos aislados.

5 Otros experimentos demostraron la capacidad del IRX-2 de la divulgación para actuar como un adyuvante con antígenos de péptidos de PSMA, dando como resultado la estabilización de la enfermedad. Más específicamente, tres varones positivos para HLA-A2 con cáncer de próstata avanzado se trataron con IRX-2 (IRX-2) (115 unidades de equivalencia de IL-2) y los dos péptidos de PSMA descritos anteriormente (100 µg cada uno). La inmunización inicial era mediante inyección en el cuello, seguida de nueve inyecciones de IRX-2 (IRX-2) (mas dosis bajas de ciclofosfamida, indometacina y zinc como en el protocolo del Ejemplo 2 anterior), y luego seguidas de cinco refuerzos mensuales de IRX-2 más los dos péptidos.

10 La Tabla VII resume brevemente la historia clínica (Hx) y las respuestas a la terapia (Rx). Los tres pacientes habían recibido prostatectomía y orquiectomía unos 4 a 10 años antes (además de otros medicamentos) y habían recaído. Todos se encontraban en una fase de duplicación del aumento de PSA que variaba entre 4 y unos estimados 6 meses. Dos tenían síntomas de dolor óseo. La inmunización con IRX-2 mas péptidos y el seguimiento con inyecciones de refuerzo no indujeron síntomas.

15 Los dos pacientes con dolor óseo tuvieron un alivio del dolor. Los tres pacientes se mantuvieron estables clínicamente (excepto el paciente n.º 2 que sufrió una fractura de fémur con un agravamiento temporal). Los tres desarrollaron reactividad dérmica temporal a las pruebas cutáneas con los péptidos de PSMA aislados (A y B; 10 µg cada uno). Los tres mostraron un aumento de la reactividad para pruebas cutáneas con IRX-2 o PHA. Estos resultados indican que el IRX-2 de la divulgación inmunizaba estos pacientes con los péptidos de PSMA y estabilizaba la enfermedad durante el período de inmunización y refuerzo. Véase también la Figura 30, que representa la estabilización de los niveles del antígeno PSA en estos tres pacientes durante un período de seis meses. El paciente adicional n.º 4 descrito anteriormente mostró estabilización de PSA temporal y clínica, pero la información clínica está incompleta. Otro paciente adicional con una reaparición temprana del nivel de PSA (7) mostraba reversión hasta un nivel normal que ha persistido durante dos años de seguimiento sin terapia adicional (una respuesta completa).

Tabla VII

	Próstata Rx	PSA Hx	IRX-4 Rx	Respuesta clínica
Paciente 1	Prostatectomía 1999 Orquiectomía 2002 Metástasis ósea	aumento 2x en los últimos 6 meses (est.) Último PSA 24	2003	PSA estable en 5 meses; 29 al final Prueba cutánea de IRX-2 0,4 1,0cm Péptido A 0 → 0,2 cm Péptido B 0 → 0,1 cm Estable clínicamente en 6 meses
Paciente 2	Prostatectomía 1998 Orquiectomía 1998 Anti-andrógenos 1999	aumento 4x en los últimos 12 meses Último PSA 160	2003	PSA estable en 7 meses; 131 al final Prueba cutánea de IRX-2 1,0 1,0cm Péptido A 0 → 0,2 cm Péptido B 0 → 1,0 cm Dolor disminuido Estable clínicamente en 6 meses
Paciente 3	Prostatectomía 1993 Orquiectomía 1993	15x en los últimos 20 meses 2x en los últimos 4 meses Último PSA 35	2003	PSA estable en 7 meses; 44 al final Prueba cutánea de IRX-2 0,0 0,5 cm Péptido A 0 → 0,5 cm Péptido B 0 → 0,5 cm Dolor disminuido Estable clínicamente en 6 meses

Ejemplo 12

5 En el siguiente estudio, se demostró que IRX-2 amplifica la respuesta de células T a dos péptidos específicos de células T a partir del antígeno de membrana específico de próstata (PSMA). IRX-2 mejoraba la respuesta de "DTH" de hipersensibilidad de tipo retardada específica del péptido PSMA de ratones inmunizados con células 3T3 irradiadas que expresan PSMA (vacuna basada en células) así como a una vacuna conjugada de péptido-portadora. Esto contrastaba con adyuvantes tales como alumbre, Sistema Adyuvante RIBI (RAS®, RIBI ImmunoChem Research, Inc.) y CpG que no eran activos en la generación de respuestas de células T a los péptidos de PSMA. La actividad *in vivo* específica de células T se confirmó demostrando aumentos específicos del péptido en la secreción de IFN- γ por células de bazo recogidas de ratones inmunizados. IRX-2 en contraste con otros adyuvantes también mejoraba las respuestas de las células B a los péptidos.

Materiales y procedimientos

Reactivos y células

15 Péptidos de antígeno de membrana específicos de próstata (Péptido 1 = Leu-Leu-His-Glu-Thr-Asp-Ser-Ala-Val (SEQ ID NO: 1); Péptido 2 = Ala-Leu-Phe-Asp-Ile-Glu-Ser-Lys-Val (SEQ ID NO: 2)) fueron sintetizados por Biosynthesis Inc. (Lewisville, TX). Ovoalbúmina, ciclofosfamida y sistema adyuvante RIBI (RAS; R-700) se adquirió de Sigma (St Louis, MO). KLH y alumbre (40 mg/ml cada uno de hidróxido de aluminio y de hidróxido de magnesio) eran de Pierce Biotechnology (Rockford, IL). El RAS consistió en lípido monofosforil A (MPL; 0,5 mg) y Trehalosa Dimicolato sintético (TDM; 0,5 mg) y 44 μ l de escualeno y Tween-80. Los oligonucleótidos CpG (secuencia específica de ratón)

se sintetizaron por BioSynthesis (Lewisville, TX). La secuencia de CpG era TCCATGACGTTCTGACGTT (SEQ ID NO: 3) y era el derivado fosfotionato. La bioactividad de CpG en el ratón se confirmó midiendo la proliferación de células de bazo de ratón y la producción de TNF- α mediante células adherentes de ratón (datos no mostrados).

- 5 Se cultivaron células NIH 3T3 que se transfectaron de manera estable con un inserto de PSMA con MEM complementado con 10% de FBS. La expresión del inserto se confirmó demostrando resistencia a geneticina y expresión de PSMA mediante inmunohistoquímica y citometría de flujo. Las células se irradiaron con 800 Gy usando una fuente de Cesio y se congelaron a -20 C hasta su uso como una vacuna basada en células.

- 10 IRX-2 es un biológico derivado de células primarias que consiste en múltiples citocinas activas como se describió anteriormente. La dosificación de IRX-2 se basó en el contenido de IL-2. Cuando se analizaron dos lotes con contenido equivalente de IL-2 en el mismo experimento, siempre tuvieron la misma actividad (datos no mostrados). Se usaron varios lotes de IRX-2 en el transcurso de estos estudios. Los niveles medios de las citocinas que mejoran el potencial inmunitario en los lotes de IRX-2 utilizados en estos estudios fueron IL-2 (5,5 ng/ml), IL-1 (0,5 ng/ml), IFN- γ (1,5 ng/ml), TNF- α (2,7 ng/ml), IL-6 (1 ng/ml) e IL-8 (46,2 ng/ml).

Conjugación

- 15 Los péptidos se conjugaron con ovoalbúmina o KLH usando el procedimiento de la carbodiimida (ODC; kit 77502 de Pierce EDC, Rockford, IL). La conjugación se caracterizó midiendo la densidad óptica a 280 nm y 215 nm en fracciones de una columna de purificación de Sephadex. El máximo a 280 nm de las columnas identifica a la portadora y se recolectó como el conjugado. El control de la densidad óptica a 215 nm mostró un máximo residual que representa los péptidos libres y proporcionó la confirmación de que estaba presente un exceso de péptido durante el procedimiento de conjugación. La dosificación se basó en la concentración de portadora recuperada de la columna.

Inmunización

- 25 Se adquirieron ratones hembra Balb/c (6-8 semanas de edad) de Charles River Laboratories (Wilmington, MA) o de Harlan Laboratories (Indianápolis, IN) y se mantuvieron bajo el cuidado de la Instalación para animales del Cold Spring Harbor Laboratory (CSHL) (certificado de aseguramiento del bienestar de los animales número A3280-01). Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité ALAC de la CSHL. Las inmunizaciones (200 μ l/ratón conteniendo 100 μ g de conjugado con 100 μ l de adyuvante o PBS) se administraron por vía subcutánea en la base de la cola para proporcionar un drenaje rápido a los ganglios linfáticos regionales. Nueve inyecciones adicionales de IRX-2 siguieron a la inmunización primaria (Días 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11 y 12). A diferencia de alumbre o RIBI, donde una sola inyección causaba inflamación en el sitio, las inyecciones repetidas de IRX-2 en el mismo sitio no provocaron ninguna inflamación significativa en el sitio (observación no publicada). Se realizaron inmunizaciones de refuerzo con conjugado más adyuvante (Días 14 y 28) antes de evaluar la actividad de DTH. No se administraron inyecciones diarias adicionales de IRX-2 después de las inmunizaciones de refuerzo. Cuando se usaron células irradiadas como vacuna, las células se suspendieron en PBS o IRX-2 y se inyectaron por vía subcutánea usando dosis entre 10^3 y 10^5 células/ratón. El calendario de inmunización era idéntico al utilizado para la vacuna de conjugado del péptido.

- 40 En los estudios adyuvantes comparativos en ratones, el RAS (R 700 = MPL + TDM en escualeno/Tween 80) se reconstituyó con 1 ml de PBS (según el protocolo recomendado) y luego se mezcló con 1 ml de conjugado (1 mg/ml). El alumbre se mezcló 1:1 con antígeno. Los oligonucleótidos CpG se mezclaron con el conjugado del péptido siguiendo los protocolos publicados para ratones (100 μ g de conjugado con 20 μ g de CpG por ratón).

Ensayo de DTH

- 45 El desafío al antígeno *in vivo* para el ensayo de DTH se evaluó 9 días después de la inmunización de refuerzo. Los ratones recibieron inyecciones subcutáneas del antígeno de desafío en el cojinete plantar izquierdo y PBS en el cojinete plantar derecho. El antígeno de desafío era péptido (100 μ g en 20 μ l) o portadora (ovoalbúmina o KLH) (50 μ g en 20 μ l). Después de 24 horas, se midieron los grosores del cojinete plantar derecho e izquierdo usando un calibre de lectura digital (Preisser DIGI-MET Modelo 18314, Stofiting Co, Wooddale, IL). La respuesta del hinchamiento se calculó restando el grosor del cojinete plantar derecho (línea de referencia) del grosor del cojinete plantar izquierdo (respuesta experimental). Los datos se expresan como media \pm desviación estándar de la media. El análisis estadístico se realizó a través de la prueba t de Student.

- 50 Ensayo de IFN- γ estimulado por antígenos

- 55 Se recogieron los bazos 7-14 días después de la segunda inmunización de refuerzo y se aislaron dispersándolos a través de un tamiz de malla de alambre. Las células adherentes se obtuvieron tomando células del bazo y dejándolas adherirse al plástico durante 90 minutos. Las células adherentes aisladas se añadieron a los cultivos para proporcionar células presentadoras de antígeno adicionales (6×10^5 linfocitos por pocillo se complementaron con 2×10^4 células adherentes). La liberación de IFN- γ por activación de linfocitos inducida por antígeno se midió en los sobrenadantes cosechados el día seis usando reactivos ELISA Duo-Sets de R&D Systems (Minneapolis, MN).

Anticuerpos séricos con portadora y péptidos

Se obtuvo suero entre los días 7 y 21 después de la tercera inmunización de refuerzo y se congeló para uso posterior en ensayos ELISA. Las placas de ELISA (Immunolon-4, Nunc, Dinamarca) se recubrieron con el antígeno de interés (ovoalbúmina, KLH, conjugado o péptidos) durante la noche. Se añadieron diluciones de suero a los pozos bloqueados y lavados, y se incubaron durante la noche. IgG anti-ratón marcada con biotina y avidina-fosfatasa alcalina (Southern BioTech, Birmingham, AL) se añadieron secuencialmente y después de la adición de sustrato de pNPP, se midió la DO y se representó gráficamente frente a la dilución de suero.

5

Resultados

IRX-2 aumenta la respuesta inmunitaria a una vacuna basada en células enteras

Se usaron células 3T3 transfectadas con PSMA para inmunizar ratones y confirmar el procesamiento y la presentación de los péptidos de PSMA. La respuesta inmunitaria a los péptidos se evaluó mediante el ensayo de Hipersensibilidad de Tipo Retardado (DTH). Como se muestra en la Figura 31, las células que expresaban PSMA irradiadas generaron una respuesta de DTH en ratones cuando se desafiaron con los dos péptidos de PSMA. Los ratones se vacunaron con dosis de células 3T3 irradiadas que expresan PSMA e IRX-2 (azul) o sin adyuvante (PBS, magenta) y la respuesta de DTH después del desafío al péptido se midió 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo. Los resultados se expresan como media (\pm SEM) para los grupos de 5-15 ratones. El aumento en el hinchamiento de los cojinetes plantares era una función de la dosis de células irradiadas y se administró IRX-2 en comparación con los ratones sin adyuvante (PBS). La determinación de la diferencia estadística entre el IRX y los grupos sin adyuvante (PBS) se evaluó mediante la prueba t de Student. La significancia de dos colas era $p < 0,001$ para 10^4 y 10^5 células/ratón y la significancia de una cola era $p < 0,05$ para 10^3 . La respuesta se relacionó con la dosis y se mejoraba cuando la vacuna se administró con IRX-2 en comparación con la de sin adyuvante.

10

15

20

Mejora con IRX-2 de la DTH específica del péptido en ratones inmunizados con el conjugado de PSMA: Dosificación de conjugado y de IRX-2

Los ratones se inmunizaron con dosis variables de los péptidos solos o péptidos conjugados con la portadora hemocianina de lapa californiana (KLH) con y sin IRX-2. La respuesta de las células T después del desafío con péptido o conjugado se evaluó para definir la dosis óptima de antígeno. Hubo una respuesta dependiente de la dosis para la respuesta de la DTH específica del péptido, pero la respuesta a la portadora no se vio influenciada por la dosis del conjugado (Figura 32). La Figura 32 presenta la respuesta de DTH de los ratones inmunizados con el péptido (lado izquierdo) o KLH (portador, lado derecho). La respuesta se expresa como la media \pm SEM para 5-10 ratones por grupo. No adyuvante indica que la respuesta se midió en ratones inmunizados con la dosis óptima de conjugado y PBS. La respuesta del péptido estaba relacionada con la dosis, pero la respuesta al portador no lo estaba. Las diferencias de no adyuvante para la respuesta específica del péptido a las dosis de conjugado de PSMA-KLH de 100 μ g y 25 μ g eran significativamente diferentes de las de no adyuvante de $p < 0,05$ para la prueba t de Student. La dosis más alta de conjugado probado sin adyuvante no era activa en el ensayo específico del péptido en comparación con la respuesta de KLH, que era similar a la respuesta con IRX-2. Cuando los péptidos sin conjugación se administraron conjuntamente con IRX-2, no se observó respuesta de DTH específica del péptido (datos no mostrados).

25

30

35

IRX-2 aumenta la respuesta al antígeno en una forma dependiente de la dosis

Se evaluó la dosis de IRX-2 requerida para generar la respuesta óptima de DTH específica del péptido (Figuras 33A y 33B). Los ratones se inmunizaron con la vacuna conjugada óptima (100 μ g/ratón) y varias dosis de IRX-2. Dado que IRX-2 contiene múltiples citocinas, la dosis de IRX-2 se representa gráficamente como la concentración de IL-2 en IRX-2 por ratón. La concentración de IL-2 está representada por dos mediciones inter-convertibles (UI = unidades internacionales o pg/ml basadas en un patrón recombinante puro). La respuesta del péptido específico de las células T se evaluó mediante el ensayo de DTH y se representa como el aumento del hinchamiento (\pm desviación estándar de la media) debido al desafío del péptido. La diferencia entre la respuesta para las dosis óptimas (entre 200 y 800 pg/ratón, 4-16 UI/ratón) era estadísticamente significativa ($p < 0,05$ mediante la prueba de la t de Student) de no IRX-2 (0), así como la dosis más baja (70 pg/ml) y la dosis más alta (2.100 pg/ml) analizadas en el ensayo. La dosificación de IRX-2 se definió mediante los niveles de IL-2 medidos por ELISA. Las dosis entre 200 y 800 pg de equivalentes de IL-2 por ratón eran eficaces para mejorar la respuesta de las células T en el ensayo de DTH.

40

45

50

Inyecciones múltiples de IRX-2 mejoran la respuesta inmunitaria al antígeno

Con respecto a la mejora de la DTH específica del péptido eran similares 4 o 9 inyecciones adicionales de IRX-2, pero una única administración sin inyecciones posteriores del IRX-2 en solitario no mejoraba la respuesta específica de las células T al antígeno (Figuras 33A y 33B y los datos no se muestran).

55

IRX-2 es superior a otros adyuvantes en la mediación de una respuesta de células T al antígeno

Tres adyuvantes con diferentes mecanismos de acción se seleccionaron para comparar con IRX-2. Alumbre (el

adyuvante utilizado en la mayoría de las vacunas aprobadas por la FDA), Sistema Adyuvante Ribi (representante de adyuvantes con aceite y componentes bacterianos) y CpG (representante de los adyuvantes que activan receptores de tipo peaje (TLR)) se administraron según los protocolos publicados. La mejora con IRX-2 de la respuesta específica del péptido a células T era superior a los adyuvantes Alumbre, Ribi® o CpG (Figura 34). Los ratones se inmunizaron con el conjugado del péptido de PSMA y los adyuvantes indicados. Después de dos refuerzos (Día 14 y Día 28), el ensayo de DTH se realizó 9 días después del refuerzo final. Los resultados se expresan como el aumento promedio en hinchamiento para el péptido inyectado frente a la pata de control (\pm SEM). La respuesta de IRX-2 era mayor que todas las demás a $p < 0,001$ (prueba de la t de Student).

IRX-2 aumenta la producción de IFN- γ en respuesta al antígeno del péptido

Los ratones se inmunizaron con varias dosis del conjugado KLH-PSMA e IRX-2. Las células del bazo de ratones inmunizados se evaluaron *ex vivo* para la respuesta a la estimulación por los péptidos midiendo la secreción de IFN- γ . IRX-2 aumentó la secreción específica del péptido del IFN- γ por las células del bazo y la respuesta era dependiente de la dosis con respecto a la concentración del conjugado utilizada para la inmunización y la mejora era significativamente diferente de los ratones tratados sin adyuvante ((PBS) Figura 35). Se midió el IFN- γ en los sobrenadantes después de 6 días de cultivo y los resultados se expresaron como promedio (\pm SEM) para los ratones a una dosis dada de la vacuna conjugada. Los aumentos para el conjugado de 25 y 100 μ g fueron estadísticamente significativos ($P < 0,05$) frente al control sin adyuvante (PBS). Para fines comparativos, el panel inferior representa la respuesta de la DTH específica del péptido para dosis similares de conjugado.

IRX-2 mejora la respuesta de anticuerpos al antígeno del péptido

Los ratones inmunizados con la vacuna basada en células irradiadas muestran anticuerpos séricos para los péptidos y la respuesta de anticuerpos de ratones inmunizados se mejoraba mediante IRX-2 en dosis menores de la vacuna (Figura 36). Anticuerpos séricos específicos del péptido de ratones inmunizados con vacuna de células irradiadas. Las respuestas de anticuerpos en suero se midieron como densidad óptica a diluciones de suero usando un anticuerpo específico de IgG de ratón en el ensayo de ELISA como se describe en los procedimientos. Los ratones inmunizados con la vacuna más el IRX-2 tienen una respuesta mejorada específica del péptido cuando la dosis de la vacuna era subóptima sin adyuvante. La respuesta era también significativamente diferente con IRX-2 para diluciones menores del suero a dosis mayores de la vacuna. Cuando se evaluó la vacuna conjugada con péptido KLH, IRX-2 también mejoraba la respuesta específica del péptido en comparación tanto con el alumbre como sin adyuvante (datos no mostrados).

IRX-2 es superior a otros adyuvantes en la estimulación de una respuesta de anticuerpos a péptidos conjugados

El IRX-2 administrado con conjugados de péptido-ovoalbúmina dio como resultado anticuerpos con los péptidos, mientras que ni CpG ni alumbre administrados con el conjugado dieron como resultado anticuerpos con los péptidos (Figura 37). Los datos son para el péptido con la secuencia que comienza con ALF y la significancia era $p < 0,05$ por ANOVA para IRX-2 frente a alumbre y CpG. Estos resultados son consistentes con el estudio de comparación de adyuvantes de células T donde solo IRX-2 administrado con la vacuna conjugada dio como resultado una respuesta de DTH específica del péptido (véase la Figura 34 para comparación).

Ejemplo 13

En el siguiente estudio, se demostró que IRX-2 amplifica la respuesta de células T a un epítipo de PSMA dominante de ratón en una vacuna que incluye adyuvante incompleto de Freund. IRX-2 mejoraba la respuesta de IFN- γ específica del péptido de PSMA de ratones inmunizados con un péptido de PSMA en adyuvante incompleto de Freund. La actividad *in vivo* específica de células T se confirmó demostrando los aumentos totales en la secreción de IFN- γ específica de péptido por células del bazo recogidas de ratones inmunizados, así como el número de células T específicas del antígeno. IRX-2 en contraste con otros adyuvantes también mejoraba las respuestas de las células B a los péptidos.

45 Materiales y procedimientos

Reactivos y células

El péptido NFT utilizado en estos estudios era sintetizado por Biosynthesis Inc (Lewisville Tx). La secuencia del péptido NFT era NFTQIPHLAGTEQNF que es de proteína humana. El PSMA de ratón tiene una secuencia similar (NFTRTPHLAGTQNNF) pero la no identidad indicada por los aminoácidos que no están en negrita significa que estos estudios no están diseñados específicamente para demostrar la ruptura de la tolerancia. El péptido de inmunización de control negativo para estos estudios era un epítipo de gripe clase II para ratones C57b1/6 (NGSLQCRICI). La ovoalbúmina, el Adyuvante incompleto de Freund (IFA) y el adyuvante de combinación (MPL + TDM en escualeno/Tween 80, también llamado Sistema Adyuvante Ribi o Sistema Adyuvante Sigma Número de Catálogo S6322) se adquirieron de Sigma (St Louis, MO). El adyuvante de combinación consistió en lípido monofosforil A (MPL; 0,5 mg) y Trehalosa Dimicolato sintético (TDM; 0,5 mg), y 44 μ l de escualeno y 200 μ l de Tween-80 en un volumen final de 1 ml de PBS (es decir, aceite en agua). El adyuvante incompleto de Freund consiste en aceite de parafina combinado con monooleato de mannida (0,85 ml de aceite de parafina y 0,15 ml de

monooleato de mannida). El adyuvante se seleccionó porque está disponible comercialmente y es similar al adyuvante completo de Freund, pero sin toxicidad.

Inmunización

5 Ratonas hembra Balb/c (6-8 semanas de edad) se adquirieron de Charles River Laboratories (Wilmington, MA) o de Harlan Laboratories (Indianápolis, IN) y se mantuvieron bajo el cuidado de la Instalación de Animales del Cold Spring Harbor Laboratory (CSHL) (Certificado de Aseguramiento del Bienestar Animal número A3280-01). Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité ALAC del CSHL. Las inmunizaciones (200 ul/ratón que contienen típicamente 100 ug de antígeno con 100 ul de adyuvante, PBS o medio X-Vivo 10) se administraron por vía subcutánea en la base de la cola para proporcionar un drenaje rápido hacia los ganglios linfáticos regionales. 10 Excepto donde se indicara lo contrario, nueve inyecciones adicionales de IRX-2 también en la base de la cola siguieron a la inmunización primaria (designada como Día 0), por lo que IRX-2 sin antígeno se administró los días 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10 y 11. Los ratones que no recibieron el IRX-2 recibieron PBS o medio X-Vivo 10 los días 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10 y 11, para controlar el posible estrés en la manipulación de los ratones. Tanto PBS como X-Vivo, cuando se administraron con antígeno, no fueron estimuladores en comparación con IRX-2. En el texto y las figuras, los ratones que reciben antígeno más PBS o X-Vivo se conocen como ratones "control" o sin adyuvante. La dosificación se define basada en los niveles de IL-2 en IRX-2 y, a menos que se indique lo contrario, era de 700 pg/ratón (15 U/ratón). Se administraron inmunizaciones de refuerzo con antígeno más adyuvante el día 14 y para el ensayo de la DTH se repitió el 28. No se administraron inyecciones diarias adicionales de IRX-2 después de las inmunizaciones de refuerzo. Cuando se usaron células irradiadas como vacuna, las células se suspendieron en PBS o IRX-2 y se inyectaron por vía subcutánea usando dosis entre 10^3 y 10^6 células/ratón. 20

El IFA se mezcló como 1 parte de péptido (1 mg/ml), 1 parte de IFA y 1 parte de IRX-2 o PBS/X-VIVO. Después de emulsionar por paso a través de un conector luer-lock hembra:hembra que conecta dos jeringas, cada ratón recibió 300 ul por vía subcutánea. El adyuvante de combinación (MPL + TDM en escualeno/Tween 80 se reconstituyó con 2 ml de PBS (según el protocolo recomendado) y luego se mezcló con 2 ml de conjugado (1 mg/ml) y 2 ml de IRX-2 o de control. El adyuvante de combinación se mezcló con IRX-2 mediante agitación vorticial y cada ratón recibió 300 ul por vía subcutánea para dar cuenta del volumen adicional de IFA. 25

Ensayo de IFN- γ estimulado por antígenos

Se recogieron nódulos linfáticos y bazo en los momentos indicados (3-24 días después de la primera inmunización de refuerzo) y se aislaron las células dispersándolas a través de un tamiz de malla de alambre. Los glóbulos rojos en los bazo se lisaron usando tampón de lisado de cloruro de amonio (Quality Biological Inc, Gaithersburg, MD)). Las células adherentes para la adición a los cultivos de células de los ganglios linfáticos se obtuvieron sometiendo en placas las células del bazo y dejándolas adherirse al plástico durante 90 minutos. Las células adherentes aisladas se añadieron a los cultivos para proporcionar células presentadoras de antígeno adicionales (se complementaron $2-6 \times 10^5$ linfocitos por pocillo con $2-4 \times 10^4$ células adherentes). La liberación de IFN- γ por activación de linfocitos inducida por antígeno se midió en los sobrenadantes recogidos el día seis usando reactivos ELISA Duo-Sets de R&D Systems (Mineápolis, MN). 30 35

Ensayo ELISpot (ensayo de puntos de inmuoadsorción ligada a enzimas)

Las células se sometieron en placas a 2×10^5 linfocitos por pocillo para células del bazo o 3×10^5 linfocitos por pocillo para células de los ganglios linfáticos. Las placas ELISpot (Millipore, Billerica, MA) se recubrieron con anticuerpo de captura (MAB-18 de MabTech (Mariemont, OH) en PBS durante la noche. Las placas se lavaron, se añadieron el antígeno y las células, y luego se incubaron durante 18 horas a 37 °C. Los pocillos se lavaron a fondo con PBS para eliminar las células y se añadió un segundo anticuerpo biotinilado (MabTech) para una incubación adicional de 18 h. Las placas se desarrollaron usando sustrato secuencial de biotina-AP y DAB. Las placas se leyeron utilizando un microscopio con software de conversión digital de ZellNet (Fort Lee, Nueva Jersey) 40

45 Resultados

Inmunización de péptido de células T en IFA para definir la actividad de IRX-2

Las respuestas de las células T a los epítopes dominantes de péptidos de los antígenos proteicos se evalúan típicamente administrando los péptidos en Adyuvante Incompleto de Freund (IFA). El IFA es eficaz como resultado de su efecto de depósito y su potencial para generar reacciones inflamatorias en el sitio. Los ratones inmunizados con el péptido NFT dominante en IFA, montaron una respuesta inmunitaria que se mejoraba mediante el tratamiento con IRX-2 según se midió mediante el ensayo ELISpot para ganglios linfáticos y células del bazo (Figura 38A). El péptido sin IFA con o sin IRX-2 no era significativamente diferente de los ratones sin tratamiento previo (datos no mostrados). La Figura 38B confirma que el aumento inducido por IRX-2 en la respuesta ELISpot a células del bazo también se reflejó en el ensayo de secreción de IFN- γ . Las Figuras 39A y 39B presentan el desarrollo temporal de la respuesta de células T tal como se define mediante el ensayo ELISpot de células recogidas de ratones a lo largo del tiempo después de la inmunización de refuerzo. IRX-2 aumenta la respuesta inmunitaria en comparación con el control solo de antígeno en el ganglio linfático en todos los puntos temporales. En las células del bazo, la respuesta se mejoraba solo en los días 17-19. El ensayo ELISpot con NFT en IFA también se usó para medir la dosificación 50 55

5 óptima de IRX-2. Como se muestra en la Figura 40A, la dosis óptima de IRX-2 era de 700 pg de equivalentes de IL-2/ratón administrados diariamente durante 10 días. Usando la dosis óptima, se encontró que tanto 9 como 4 dosis adicionales de IRX-2 eran similares (figura 40B). Una única administración de IRX-2 no es suficiente para mejorar la respuesta de células T (figura 40B). Se obtuvieron resultados similares usando conjugados de péptidos como el inmunógeno en los ensayos ELISpot y DTH (datos no mostrados).

IRX-2 mejora preferentemente las respuestas de las células T

10 Se comparó IRX-2 con un adyuvante de combinación comercialmente disponible (MPL + TDM + escualeno + Tween 80) usando conjugados de péptido NFT y se evaluó midiendo la respuesta de células T a NFT y la respuesta de células B a ovoalbúmina o KLH, que fueron utilizados como portadoras. El adyuvante basado en MPL + TDM está disponible comercialmente de SIGMA y es similar al adyuvante RIBI previamente disponible de RIBI Adjuvant Company y posteriormente vendido por Sigma Chemical Company. Se considera que el adyuvante es el ejemplo prototípico de un adyuvante fuerte, ya que es equivalente al adyuvante de Freund clásico pero sin los efectos secundarios tóxicos. El título de anticuerpos para KLH a la dosis de 100 ug/ml utilizada con el conjugado no aumentaba con el adyuvante debido a la potente actividad de KLH (datos no mostrados). Para estos estudios, la respuesta a la ovoalbúmina se usó para evaluar la actividad de las células B de los adyuvantes. El aumento en la respuesta de células T para el conjugado de NFT el día 3 después de la inmunización de refuerzo era positivo para IRX-2 y el adyuvante de combinación (figura 41A) aunque IRX-2 era superior al adyuvante de combinación. Por el contrario, IRX-2 mejoraba la respuesta de células B, pero no era tan eficaz como el adyuvante de combinación con respecto a los títulos de anticuerpos en suero (figura 41B).

20 Estudios profilácticos de vacunas tumorales

25 Estudios previos demostraron que los ratones inmunizados con una dosis más alta de células 3T3 irradiadas que expresan hPSMA (P-3T3) que las utilizadas en nuestros estudios estaban protegidos frente al desafío tumoral con células RENCA que expresan PSMA (P-RENCA) en comparación con ratones inmunizados con células 3T3 que contienen solo el neo-vector. Se confirmaron y ampliaron estos estudios utilizando células 3T3 que expresan hPSMA con o sin tratamiento con IRX-2 y posteriormente se desafiaron con células P-RENCA. Como se informó anteriormente, los ratones que se inmunizaron con una alta dosis de células ($>10^6$ células/ratón) estaban completamente protegidos incluso sin adyuvante (datos no mostrados). Los ratones inmunizados con una dosis inferior de 10^5 células/ratón tuvieron un retraso en el crecimiento tumoral y el IRX-2 mejoraba la protección (figura 42). Hubo una mejor supervivencia con IRX-2, pero solo unos pocos ratones no desarrollaron tumores en el grupo IRX-2. Para evaluar si el epítipo dominante era protector, los ratones se inmunizaron con el conjugado NFT-KLH (con o sin IRX-2). Se inmunizó un conjunto de ratones control solo con KLH (con o sin IRX-2). Como se muestra en la figura 42A-C, los ratones inmunizados con NFT-KLH mas IRX-2 tuvieron un retraso temprano en el crecimiento del tumor en comparación con los otros tres grupos (NFT-KLH sin adyuvante o KLH con o sin IRX-2). Ninguno de los ratones rechazó completamente el tumor y la protección temprana definida por el crecimiento del tumor, no se tradujo en una mayor supervivencia.

IRX-2 es superior a otros adyuvantes en un sistema de vacuna conjugada con péptido

40 Ratones de 8-10 semanas de edad (5-8 por grupo) se inmunizaron con el conjugado NFT-KLH y con IRX-2, un adyuvante de combinación lípido monofosforil A (MPL) + trehalosa dicornimicolato (TDM) en escualeno/Tween 8 o control. La respuesta ELISpot específica de NFT se midió usando células de ganglios linfáticos obtenidas 3 días después de la inmunización de refuerzo. Como se muestra en la figura 43, era superior a la vacuna de MPL y TDM en la mejora de respuestas de células T específicas de antígeno *in vivo*, como se midió mediante células secretoras de IFN- γ . Los datos se expresan como el aumento en ELISpots específicos de NFT (media \pm SEM).

Ejemplo 14

45 El desarrollo de vacunas de subunidades que consisten en antígenos definidos derivados de organismos infecciosos o tumores se ha visto obstaculizado en gran medida por la falta de adyuvantes de células T CD8 eficaces e inductores de Th1. Estas respuestas colaboran para mediar en la inmunidad eficaz mediada por células, lo que da como resultado la eliminación de células anfitrionas infectadas o malignas. De hecho, la mayoría de las vacunas que se utilizan actualmente consisten todavía en organismos vivos atenuados, que pueden ser difíciles de preparar y tienen potenciales problemas de seguridad y de almacenamiento. Adyuvantes tales como aceite mineral, micobacterias y alumbre se necesitan con frecuencia para amplificar la inmunidad adquirida. Se considera que el más eficaz es generalmente CFA, que solo se puede usar en animales y puede causar una inflamación dañina de la piel. Estos estudios descritos a continuación demuestran que el IRX-2 añadido a una vacuna multi-adyuvante que consiste en adyuvantes dependientes, e independientes, de TLR induce niveles extremadamente altos de inmunidad en células T específicas de antígeno.

55 El siguiente ejemplo demuestra que IRX-2 mejora las vacunas de péptidos en combinación con otros adyuvantes que funcionan con mecanismos tanto dependientes como independientes de TLR. Además, IRX-2 mejoraba el número de células T específicas de antígeno *in vivo* después de la vacunación con una vacuna multicomponente así como la actividad citotóxica de las células T específicas de antígeno.

Materiales y procedimientos

Combinaciones de adyuvantes y procedimientos de vacunación

5 Ratones C57BL/6 o BALB/c (Harlan) se inmunizaron por vía intradérmica (i.d.) con combinaciones de los siguientes reactivos en PBS (por ratón): péptido OVA257-264 (SIINFEKL) (100 µg; ProImmune), IFN-γ (100 ng, Peprotech), emulsión de lípido monofosforil A (MPL) mas trehalosa 6,6'-dimicolato (TDM) (adyuvante Ribí, utilizado según las instrucciones del fabricante; Sigma-Aldrich), CpG 1826 (25 µg; VH Bio), poli-inosínico: ácido policitídílico (poli I:C; 50 µg; Sigma-Aldrich), MPL (50 µg; InvivoGen), los volúmenes de vacuna final fueron 200 µl (100 µl/flanco); las vacunas se calentaron a 37 °C y se agitaron enérgicamente antes de la inyección. Los ratones se cebaron el día 0 y se reforzaron en los días 9-11 con las mismas dosis de Ag/adyuvante a menos que se indicara lo contrario. Los adyuvantes combinados que contienen MPL más TDM, un agonista de TLR adicional, IFN-γ, y o péptido de clase II anti-CD40, o proteína completa se denominan adyuvante combinado para la activación sinérgica de la inmunidad celular (CASAC). Se extrajeron muestras de sangre para análisis pentámero en los días 19 a 21 a menos que se indicara lo contrario. Los ensayos de CTL *in vivo* se realizaron en los días 20-22, a menos que se indicara lo contrario.

15 Ensayos de citotoxicidad *in vivo*

Los esplenocitos de ratones C57BL/6 no cebados se pulsaron con 10 µg/ml de péptido antigénico en cultivo durante 1 h. Estas células se lavaron luego dos veces en PBS y se marcaron con CFSE 0,3 µM durante 10 minutos. Las células de control se cultivaron en un medio por separado y marcadas con CFSE 3 µM. Las células control y diana (10^7 cada una) se mezclaron y se transfirieron por vía intravenosa en receptores inmunizados o de control. Dieciocho horas más tarde se recogieron los bazos y se analizaron con CFSE mediante citometría de flujo. Los números de células diana (CFSEbajo) frente a control (CFSEalto) recuperadas se usaron para calcular el porcentaje de muerte con la siguiente fórmula: muerte (%) = $1 - [(n.^{\circ} \text{ de dianas} / n.^{\circ} \text{ de células de control en animales inmunizados}) / (n.^{\circ} \text{ de dianas} / n.^{\circ} \text{ de células de control en el animal de control})] \times 100$.

Resultados

25 IRX-2 tiene un efecto sinérgico con otros adyuvantes en vacunas de péptidos

Como se muestra en la figura 44, IRX-2 en combinación con una preparación multi-adyuvante (CpG, poli I:C, IFN-γ en emulsión de aceite) es superior a la combinación de adyuvantes en solitario en la creación de células T específicas de antígeno. El porcentaje de células T específicas de antígeno después de la vacunación como se muestra en la figura 44A se incrementaba cuando a la vacuna se añadía IRX-2. Además, el número de moléculas MHC específicas de antígeno por célula T se incrementaba cuando se añadía IRX-2 a la vacuna como se muestra en la Figura 44B.

IRX-2 aumenta la citotoxicidad de las células T específicas de antígeno cuando se añade a una vacuna de péptidos que contiene adyuvantes dependientes e independientes de TLR.

35 Como se muestra en la figura 45, IRX-2 en combinación con una preparación multi-adyuvante (CpG, poli I:C, IFN-γ en emulsión de aceite) es superior a la combinación de adyuvante en solitario en la mejora de la actividad citotóxica de las células T específicas de antígeno que se crearon mediante la vacunación con la vacuna. Además, se mostró en la Figura 45 que cuando se añadía IRX-2 a la vacuna multi-adyuvante solo se necesitaba una única inyección.

Ejemplo 15

40 Mejora con IRX-2 de la respuesta inmunitaria a la ovoalbúmina expresada por un vector vírico de la viruela del canario (ALVAC)

El siguiente ejemplo demuestra la capacidad de IRX-2 para mejorar las respuestas de las células T a un antígeno expresado en una vacuna basada en virus. Además, se demostró que IRX-2 mejoraba las respuestas de las células T a una base vírica que se mejoraba aún más con TRICOM, una tríada de moléculas estimuladoras.

45 OVA-ALVAC es un virus de la viruela del canario que se ha "modificado por ingeniería genética" para expresar la proteína ovoalbúmina. Una supuesta ventaja de la construcción es que el virus debe generar una "respuesta inflamatoria" que elimina la necesidad de un adyuvante de TLR. OVA-ALVAC infecta todas las células en el sitio, incluidas las células (DC) presentadoras de antígeno que contemplan la presentación del antígeno procesado sin un requisito de presentación cruzada. Los ganglios linfáticos que drenan el sitio reciben tanto la ovoalbúmina secretada por las células infectadas como las DC que han migrado desde el sitio de la inflamación. La APC que ingresa al ganglio es la principal impulsora de las células T (T cooperadoras y T citotóxica) y la ovoalbúmina que drena desde el sitio al ganglio es necesaria para generar las células productoras de Anticuerpos. Dos diferentes construcciones que expresan ovoalbúmina estaban disponibles para la evaluación: OVA-ALVAC y OVA-TriCom-ALVAC. La construcción de TriCom se modificó por ingeniería genética para expresar LFA-1, ICAM-1 y B7.1 además de la ovoalbúmina. Se supone que estas tres proteínas mejoran la respuesta inmunitaria al contemplar una sobreexpresión de importantes proteínas coestimuladoras.

55

Materiales y procedimientos

El modelo para evaluar la respuesta inmunitaria era la inmunización primaria seguida de una inmunización de refuerzo el día 14. IRX-2 se administró con las construcciones ALVAC en ambos días. Se administró IRX-2 adicional durante 9 días después de la inmunización primaria. Los ratones fueron sacrificados o se les extrajo sangre en los días indicados en las figuras que se adjuntan en este informe. Se usaron tres dosis de OVA-ALVAC en el estudio (3×10^7 (dosis estándar), 3×10^6 , 3×10^5 ufp por ratón). Dos dosis de OVA-TriCom-A ALVAC- también se evaluaron en el estudio (3×10^6 (dosis estándar) y 3×10^5 ufp por ratón). La respuesta de células T en los ganglios linfáticos y en los bazo se midió mediante ELISpot usando el epítipo dominante de ratón (SIINFEKL). La respuesta de las células B se midió por ELISA usando placas revestidas con ovoalbúmina y suero de ratones inmunizados.

5

10 Resultados

IRX-2 aumenta la respuesta de anticuerpos después de la vacunación con una vacuna basada en virus.

Como se muestra en la Figura 46, la respuesta de anticuerpos después de la vacunación con una vacuna vírica se mejoraba mediante la adición de IRX-2. IRX-2 aumentó consistentemente la respuesta de células T específicas del péptido en comparación con el control en todos los puntos temporales.

15

IRX-2 aumenta la respuesta de células T después de la vacunación con una vacuna basada en virus.

Como se muestra en la figura 47, IRX-2 mejoraba la respuesta de células T específicas de antígeno después de la vacunación con una vacuna basada en virus.

IRX-2 mejora las respuestas de las células T después de la vacunación con una vacuna basada en virus que expresa TRICOM.

20

IRX-2 mejoraba las respuestas de las células T al hielo inmunizadas con las dosis más bajas de la construcción OVA-TriCom-ALVAC. La respuesta de las células T era dependiente de la dosis ya que la dosis más baja de OVA-TriCom-ALVAC daba una menor respuesta de las células T. Como se muestra en la figura 48, IRX-2 mejoraba la respuesta de las células T en comparación con el control para ratones inmunizados con 3×10^5 ufp por ratón pero no ratones inmunizados con una dosis más alta de OVA-TriCom-ALVAC (3×10^6 ufp por ratón).

25

IRX-2 Mejora la expansión de células T de memoria específicas de antígeno después de la vacunación con una vacuna basada en virus

Como se muestra en la figura 49, IRX-2 mejoraba las células T con memoria positiva para el péptido en comparación con el control. Tanto los ratones inmunizados con 10^6 ufp como con 10^5 ufp tuvieron una respuesta más fuerte cuando se incluyó IRX-2 en la vacuna. La diferencia entre la respuesta primaria y la respuesta de expansión para la dosis más alta de vacuna puede deberse a que la respuesta primaria mide las células T activas mientras que la respuesta de expansión se concentra en las células de memoria.

30

IRX-2 mejora las respuestas de anticuerpos IgM después de la vacunación con una vacuna basada en virus.

Como se muestra en la Figura 50, IRX-2 mejora la respuesta para el anticuerpo IgM específico de ovoalbúmina en todo momento y las dosis de OVA-ALVAC.

35

IRX-2 mejora las respuestas de anticuerpos IgG₁ e IgG2_A después de la vacunación con una vacuna basada en virus

Como se muestra en la figura 51, la respuesta de IgG₁ y la respuesta de IgG2_A fueron mayores en ratones inmunizados con IRX-2 en comparación con el control cuando se representaron gráficamente como dilución de suero frente a DO.

Discusión

40

Los resultados de este estudio apuntan a IRX-2 como una terapia poderosa que puede usarse para iniciar una respuesta inmunitaria celular contra antígenos tumorales administrados de forma exógena en una vacuna contra el cáncer o contra una enfermedad infecciosa. El IRX-2 administrado con una vacuna basada en células irradiadas que expresan PSMA o una vacuna conjugada de péptido sintético era capaz de mejorar las respuestas inmunitarias de células T *in vivo* a estos antígenos. La naturaleza novedosa de la actividad de IRX-2 se confirmó comparando IRX-2 con otros adyuvantes, que se seleccionaron para representar diversos mecanismos de acción. Alumbre se evaluó porque es un adyuvante aprobado por la FDA ampliamente utilizado, CpG porque es un agonista de TLR que se dirige a las células presentadoras de antígenos y el Sistema Adyuvante RIBI (RAS) porque contiene múltiples actividades adyuvantes y es una alternativa más segura que el adyuvante de Freund en modelos murinos. IRX-2 mejoraba la respuesta de DTH específica del péptido a la vacuna conjugada, pero alumbre, CpG o RAS no lo hicieron. La mejora con IRX-2 de la respuesta de DTH específica del péptido de células T *in vivo* iba acompañada por respuestas de células T mejoradas de células del bazo *ex vivo* a antígeno específico medidas por la secreción de IFN- γ . Estos resultados también ponen en paralelo la respuesta de anticuerpos con los péptidos. Si bien todos los adyuvantes mejoraban la respuesta de anticuerpos así como la respuesta de DTH al portador de las proteínas (en

45

50

5 comparación con PBS), solo IRX-2 mejoraba la respuesta de anticuerpos con los péptidos que estaban conjugados con la portadora. IRX-2 también mejoraba la respuesta de anticuerpos específicos del péptido cuando se usaron células irradiadas que expresan PSMA como el inmunógeno. Estas observaciones son importantes porque existe una homología del 80 % entre la proteína humana y la de ratón y muestra que la tolerancia a los péptidos se puede superar mediante IRX-2 en comparación con otros adyuvantes.

10 Los estudios informados aquí proporcionan datos preclínicos importantes que muestran que IRX-2 mejora las respuestas inmunitarias de las células T frente a antígenos exógenos y pueden usarse en combinación con múltiples tipos de antígenos en vacunas terapéuticas contra el cáncer. La naturaleza única de la respuesta específica del péptido de las células T tanto a la célula irradiada como a la vacuna conjugada es el resultado del modo de acción de múltiples dianas del IRX-2 y la sinergia entre las citocinas. IRX-2 proporciona una plataforma adyuvante de células T que da como resultado una vacuna con actividades múltiples que incluyen no solo una mayor presentación de antígenos sino también la estimulación de la diferenciación, proliferación y migración posteriores de las células T a la periferia. Las citocinas también cambian la tolerancia de las DC o el equilibrio de las células T reguladoras hacia la activación de la respuesta a epítopes de células T y mejoran la producción de células T de memoria. El IRX-2
15 también mejora los epítopes de células T cooperadoras en la portadora o en las células irradiadas que proporcionan la estimulación adicional del desarrollo de una respuesta eficaz de las células T.

ES 2 679 043 T3

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Péptido largo sintético para HPV

5 <400> 4

Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro
1 5 10 15

Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp
20 25 30

<210> 5

< 211> 32

< 212> PRT

10 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Péptido largo sintético para HPV

<400> 5

Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile
1 5 10 15

Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr
20 25 30

15 <210> 6

< 211> 25

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

20 < 223> Péptido largo sintético para HPV

<400> 6

Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp
1 5 10 15

Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn
20 25

<210> 7

< 211> 26

25 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Péptido largo sintético para HPV

<400> 7

ES 2 679 043 T3

Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys
 1 5 10 15

Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile
 20 25

<210> 8

< 211> 25

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Péptido largo sintético para HPV

<400> 8

Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr
 1 5 10 15

Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu
 20 25

10 <210> 9

< 211> 24

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

15 < 223> Péptido largo sintético para HPV

<400> 9

His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn
 1 5 10 15

Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile
 20

<210> 10

< 211> 32

20 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Péptido largo sintético para HPV

<400> 10

Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu
 1 5 10 15

25 Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys
 20 25 30

<210> 11

< 211> 32

ES 2 679 043 T3

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Péptido largo sintético para HPV

5 <400> 11

Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg
1 5 10 15

His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr
20 25 30

<210> 12

< 211> 32

< 212> PRT

10 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Péptido largo sintético para HPV

<400> 12

Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg
1 5 10 15

Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
20 25 30

15 <210> 13

< 211> 35

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

20 < 223> Péptido largo sintético para HPV

<400> 13

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
20 25 30

Glu Glu Glu
35

<210> 14

< 211> 35

25 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 679 043 T3

< 223> Péptido largo sintético para HPV

<400> 14

Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu
1 5 10 15

Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn
20 25 30

Ile Val Thr
35

5 <210> 15

< 211> 35

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

10 < 223> Péptido largo sintético para HPV

<400> 15

Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys
1 5 10 15

Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val
20 25 30

Asp Ile Arg
35

<210> 16

< 211> 35

15 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Péptido largo sintético para HPV

<400> 16

Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu
1 5 10 15

Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser
20 25 30

Gln Lys Pro
35

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende un biológico derivado de células primarias que comprende interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), factor α de necrosis tumoral (TNF- α) y γ -interferón (IFN- γ), y una vacuna contra el cáncer que comprende al menos un ácido nucleico que codifica un antígeno en un vector vírico.
2. Una composición según la reivindicación 1, en donde el vector vírico es un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado (AAV), virus del herpes o virus de la viruela.
3. Una composición según la reivindicación 2, en donde el virus de la viruela es una vacuna, vacuna modificada Ankara (MA), NYVAC, viruela aviar, TROVAX, viruela de aves de corral o viruela del canario.
- 10 4. Una composición según la reivindicación 3, en donde la viruela del canario es ALVAC o ALVAC(2).
5. Una composición según la reivindicación 1, que incluye adicionalmente un adyuvante independiente del receptor tipo peaje y/o un adyuvante dependiente del receptor tipo peaje.
- 15 6. Una composición según la reivindicación 1, en donde el biológico derivado de células primarias comprende 60-6.000 pcg/ml de IL-1, 600-60.000 pcg/ml de IL-2, 60-6.000 pcg/ml de IL-6, 6.000-600.000 pcg/ml de IL-8, 200-200.000 pcg/ml de TNF- α y 200-200.000 pcg/ml de IFN- γ .
7. La composición de la reivindicación 1, para uso en el tratamiento del cáncer.
8. Una composición que comprende un biológico derivado de células primarias que comprende IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α e IFN- γ , para uso en un procedimiento de vacunación, comprendiendo dicho procedimiento administrar dicha composición y una vacuna que comprende al menos un ácido nucleico que codifica un antígeno en un vector vírico.
- 20 9. Una composición para uso según la reivindicación 8, en donde la vacuna es una vacuna contra el cáncer.

Tamaño del Ganglio

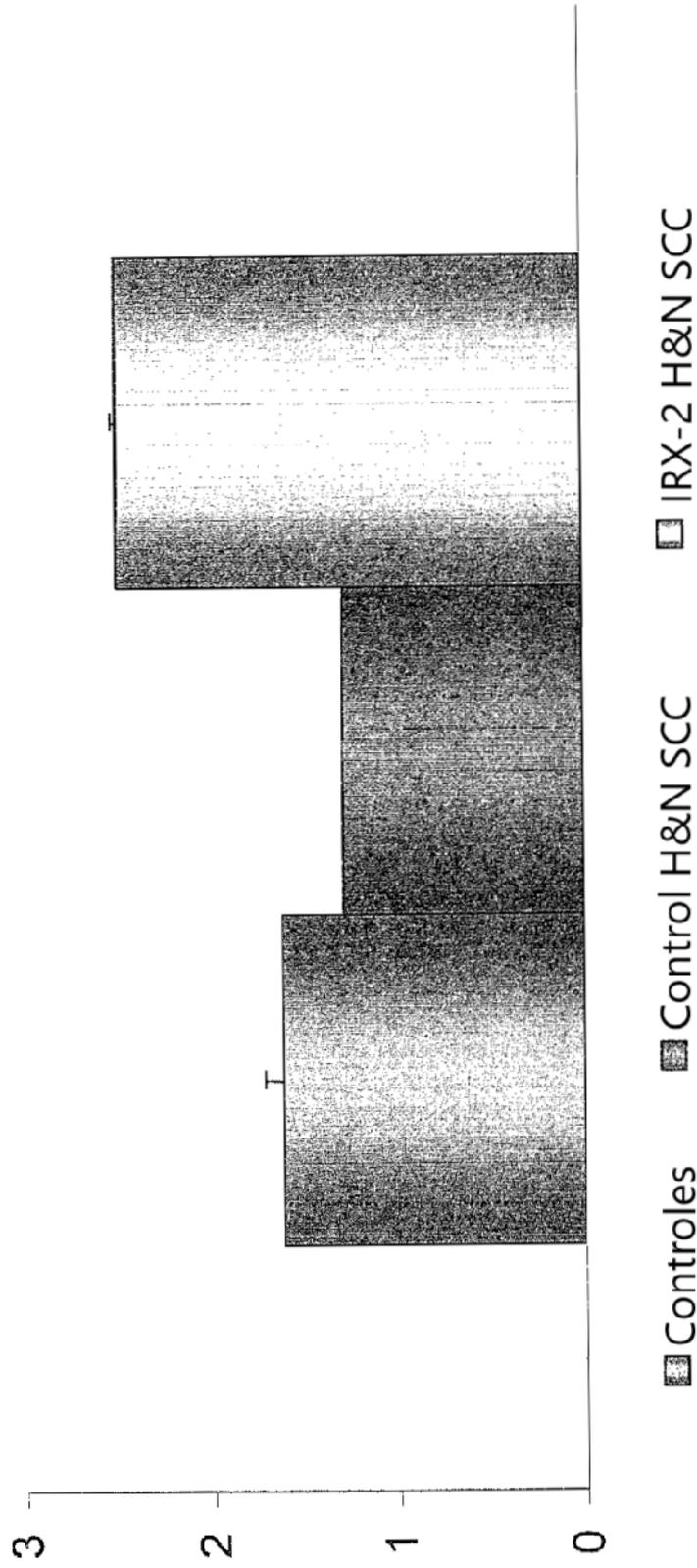


Figura 1

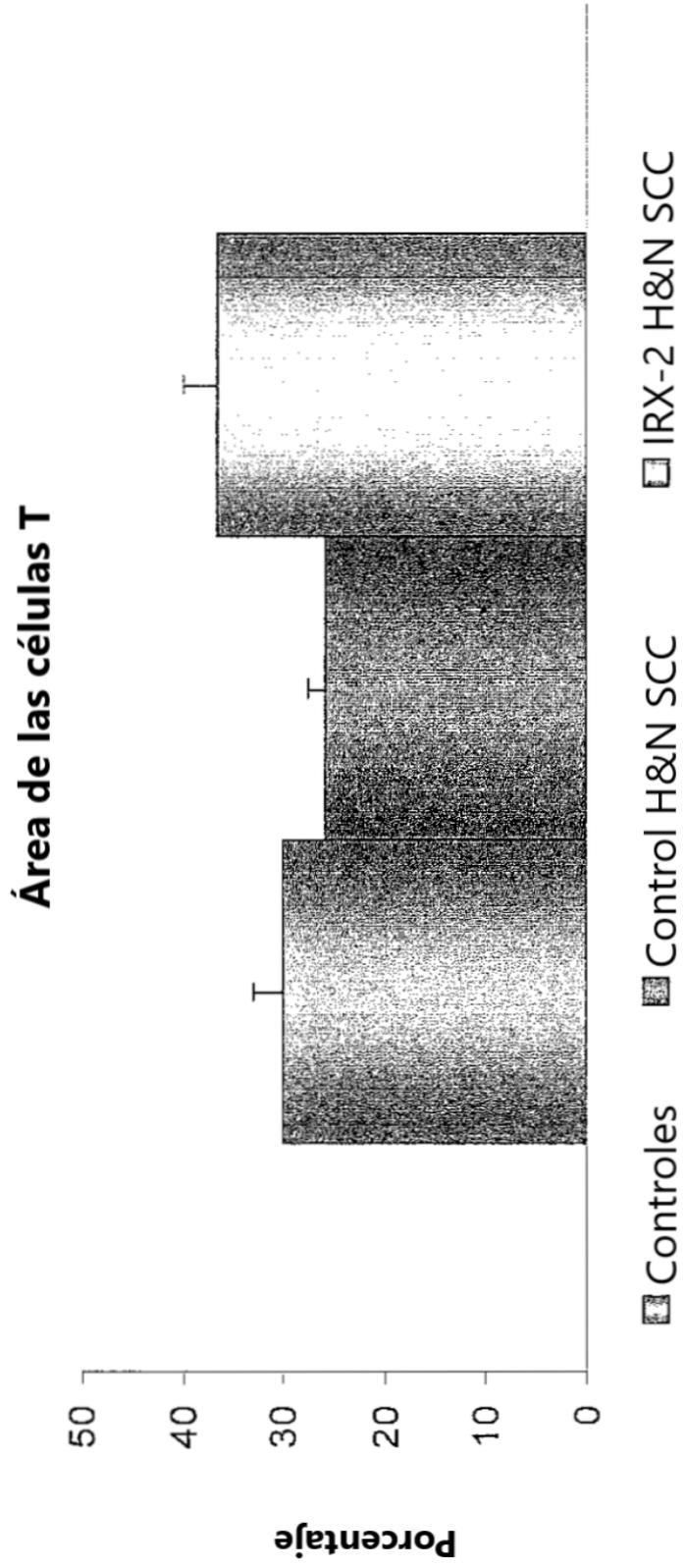


Figura 2A

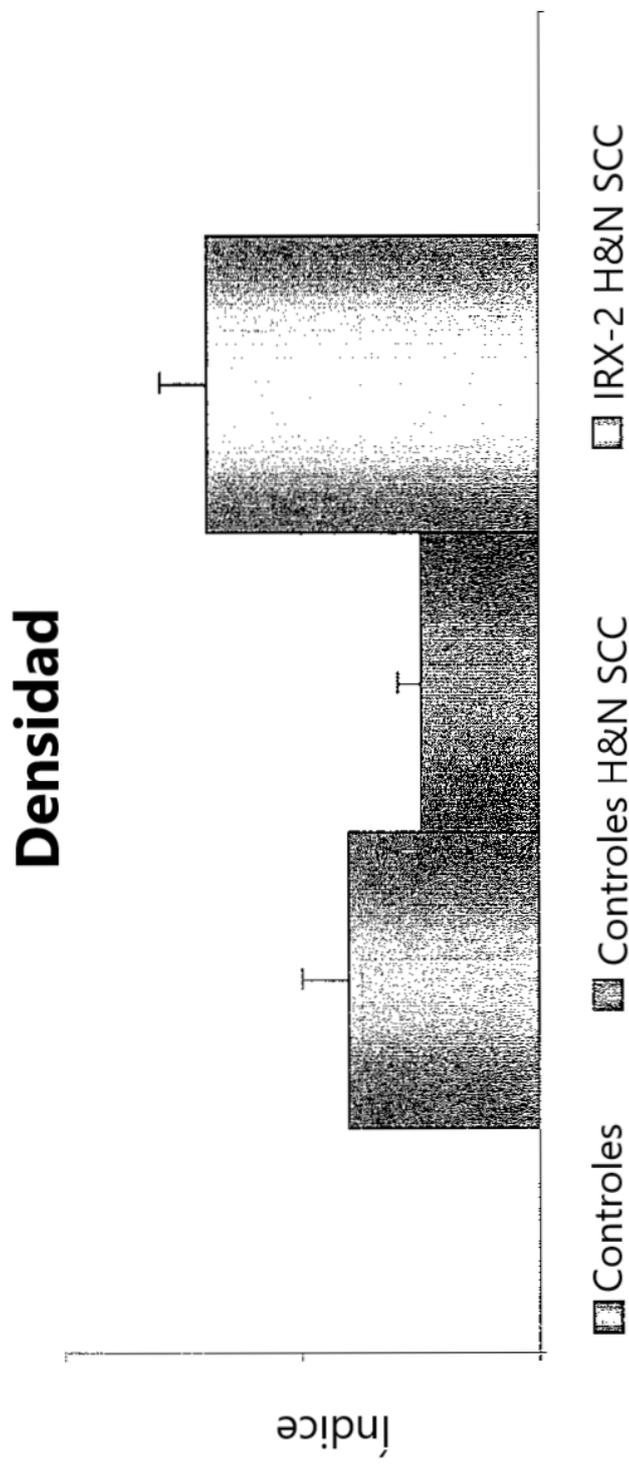


Figura 2B

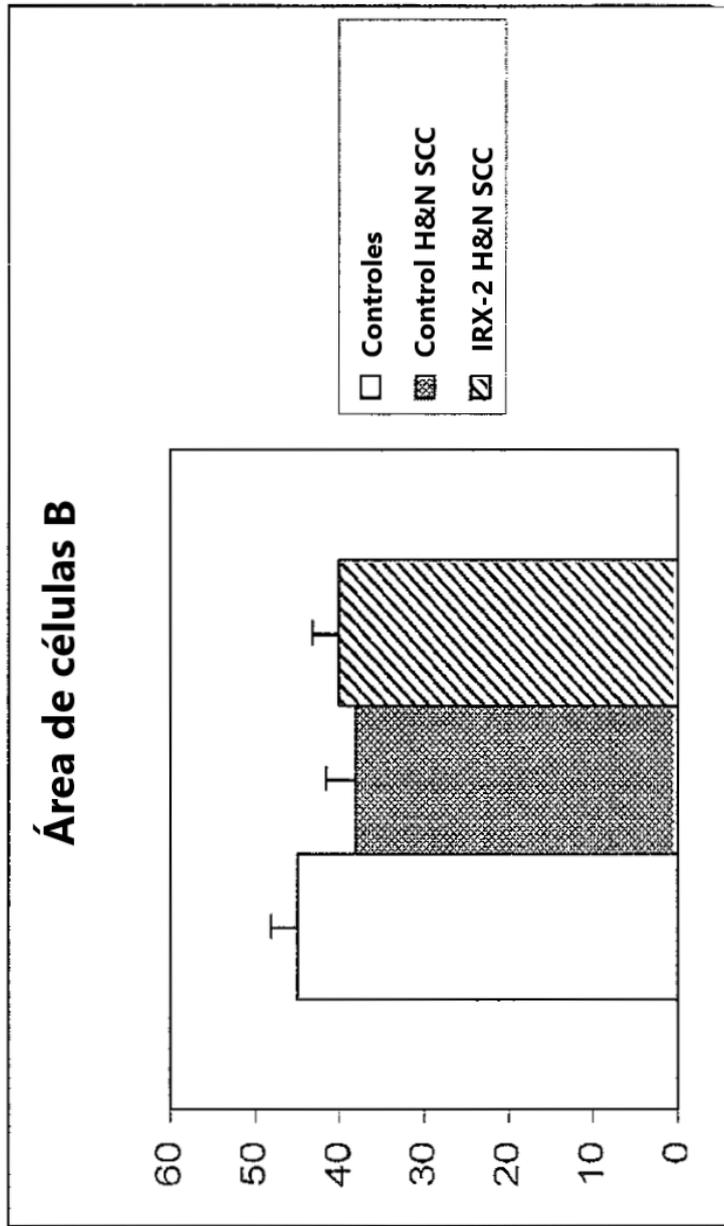


Figura 3A

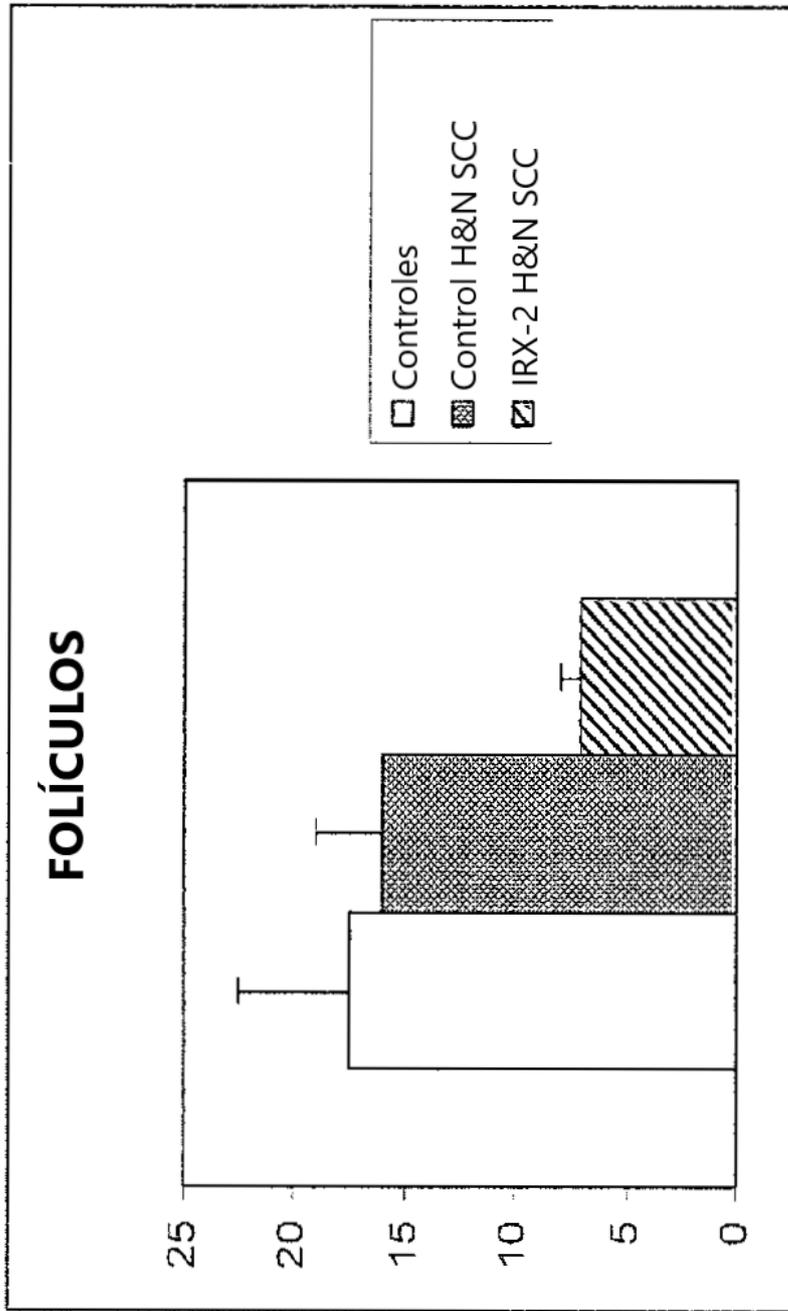


Figura 3B

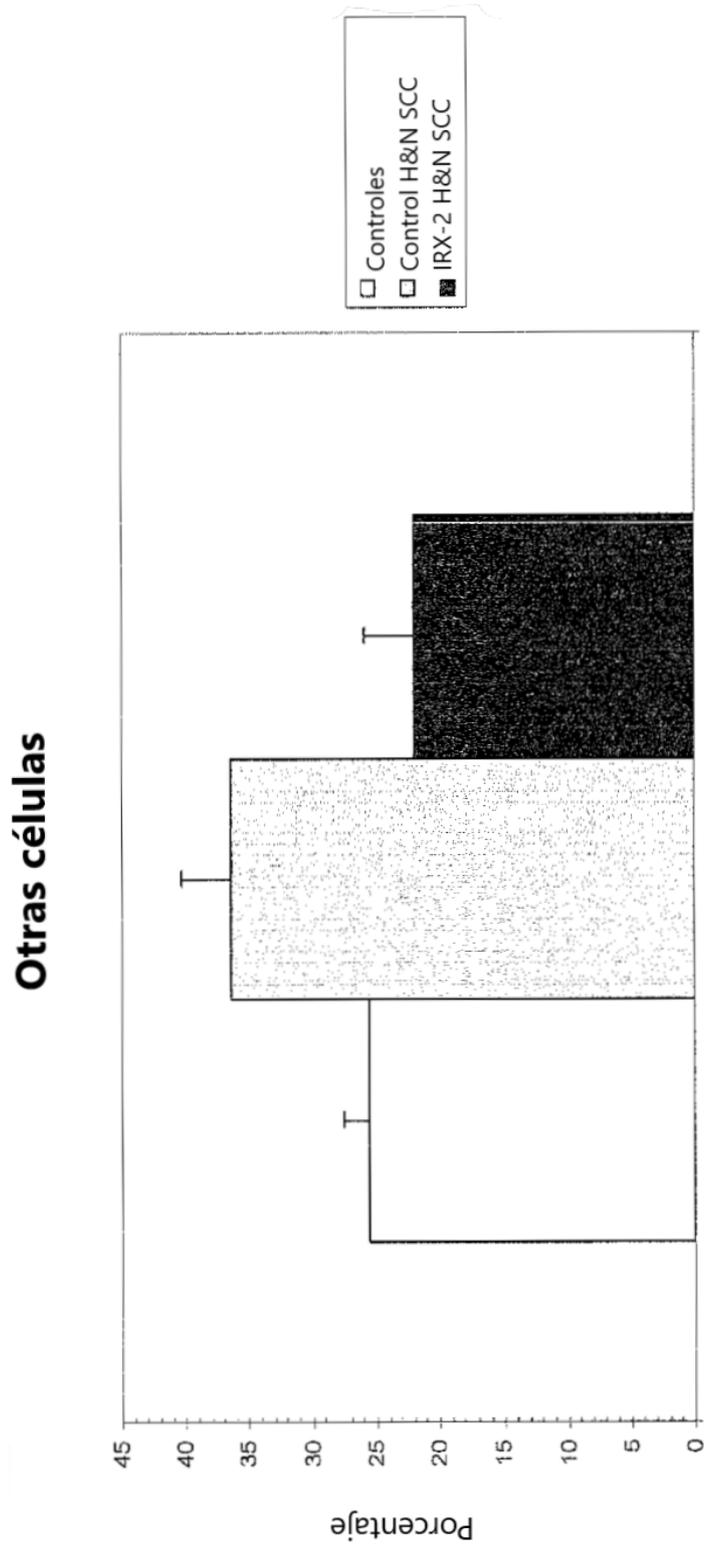


Figura 4A

Histiocytosis Sinusal

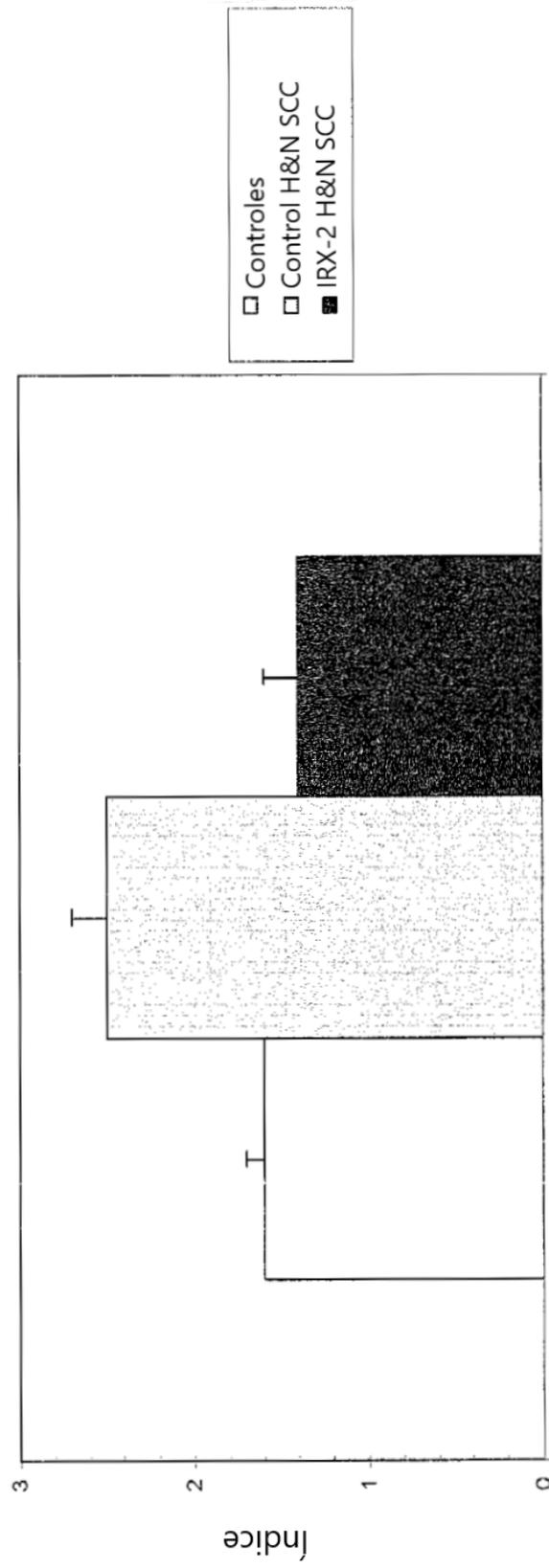


Figura 4B

REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL AJUSTE LINEAL PARA GANGLIO B Y T

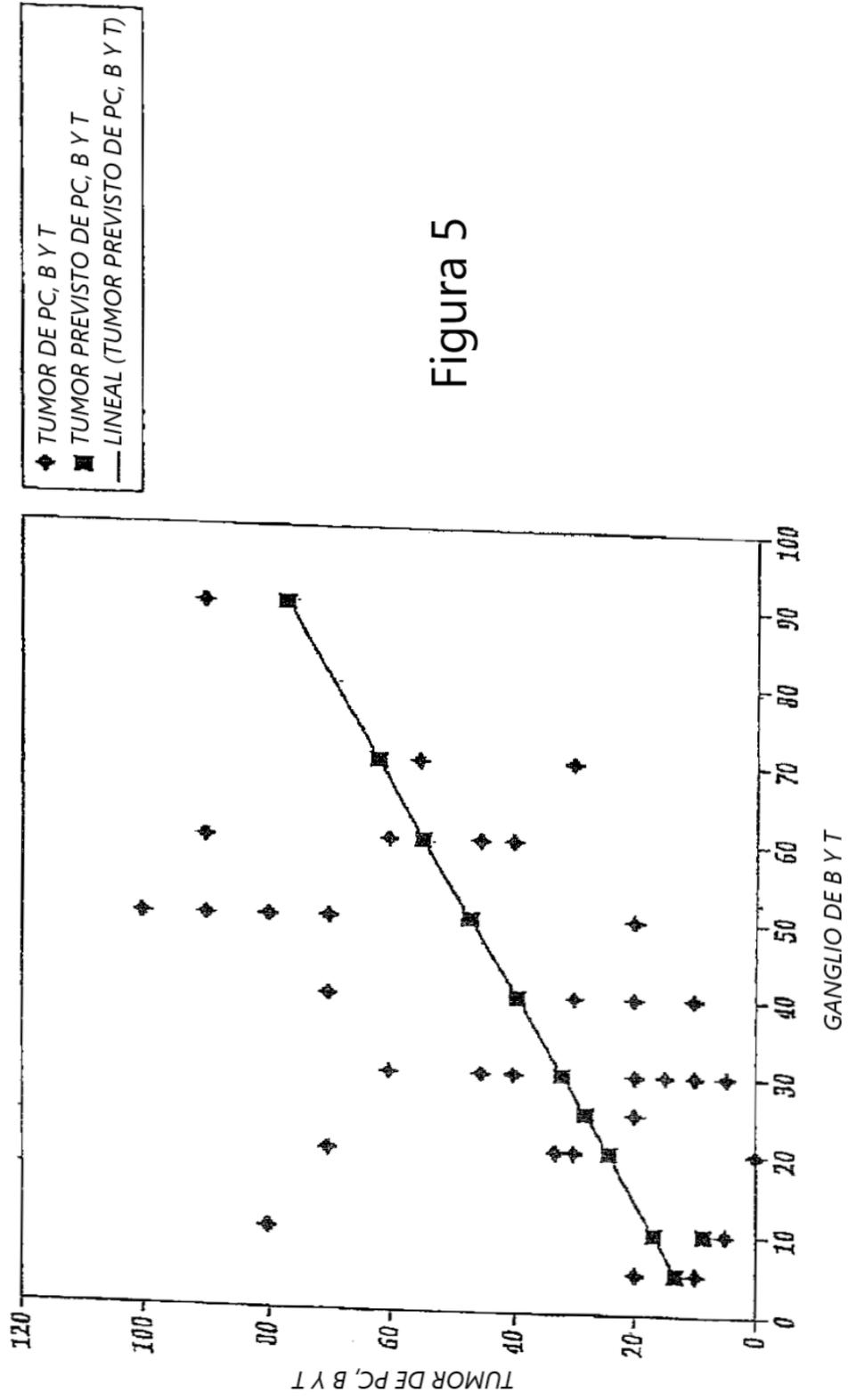


Figura 5

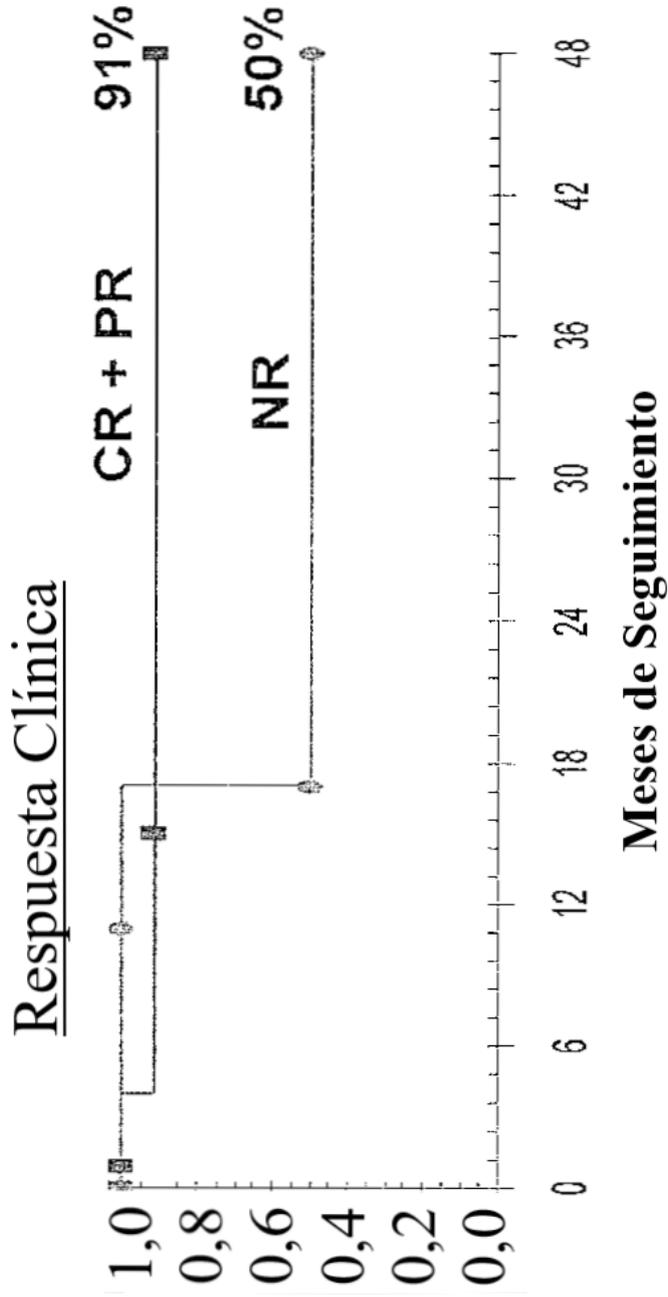


Figura 6

Supervivencia Global

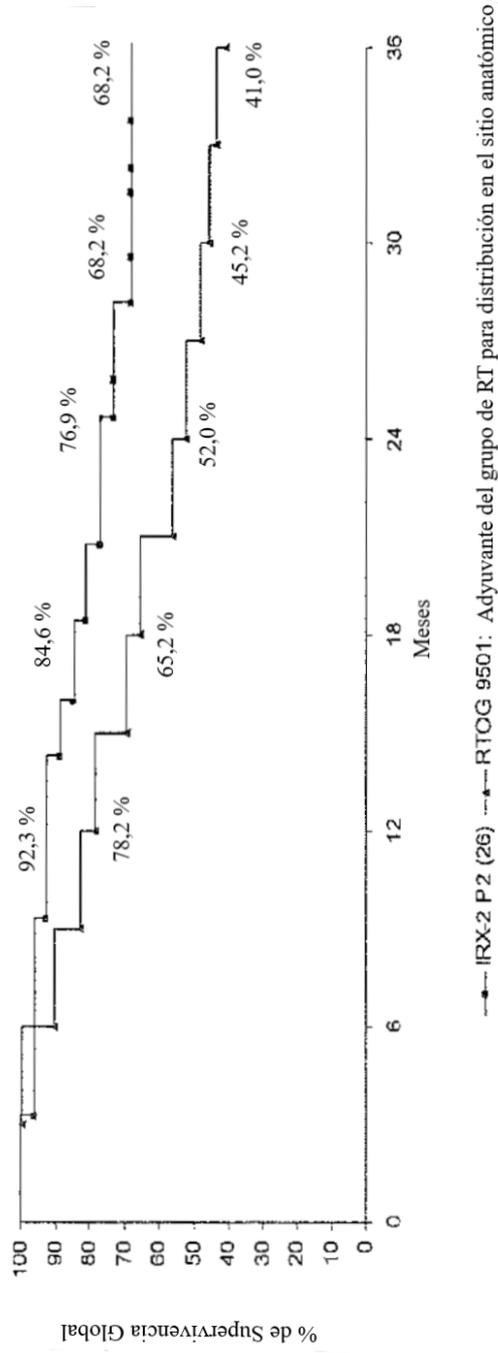


Figura 7

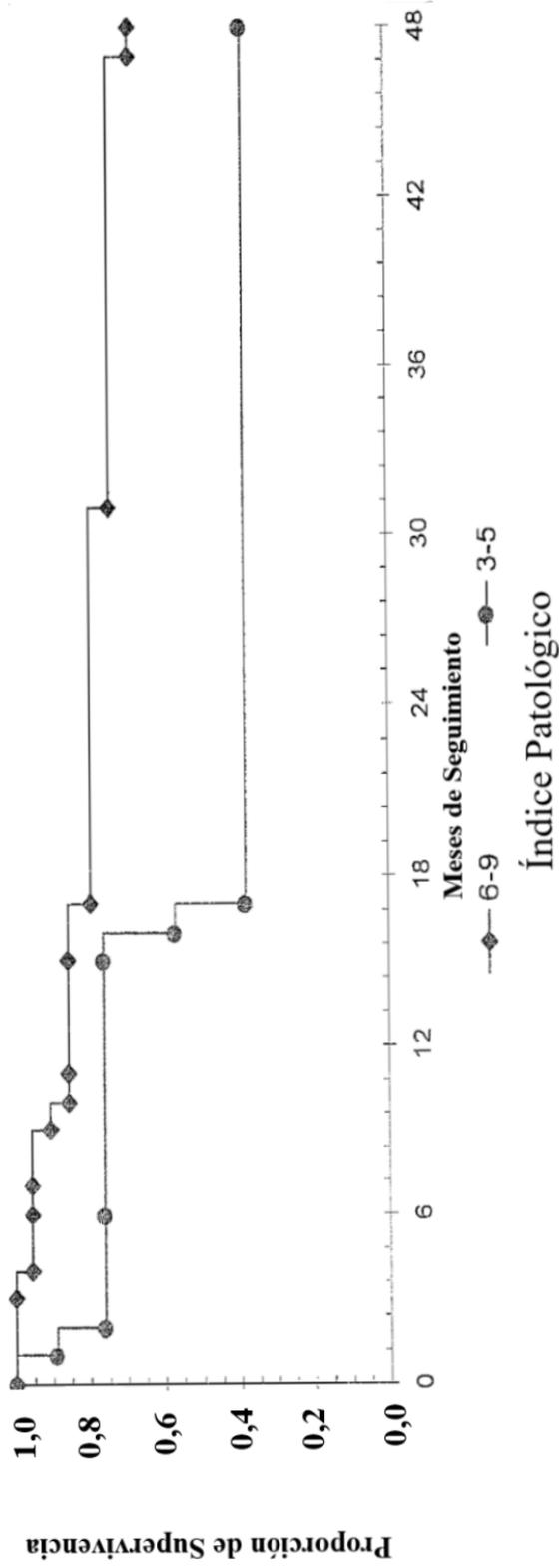


Figura 8

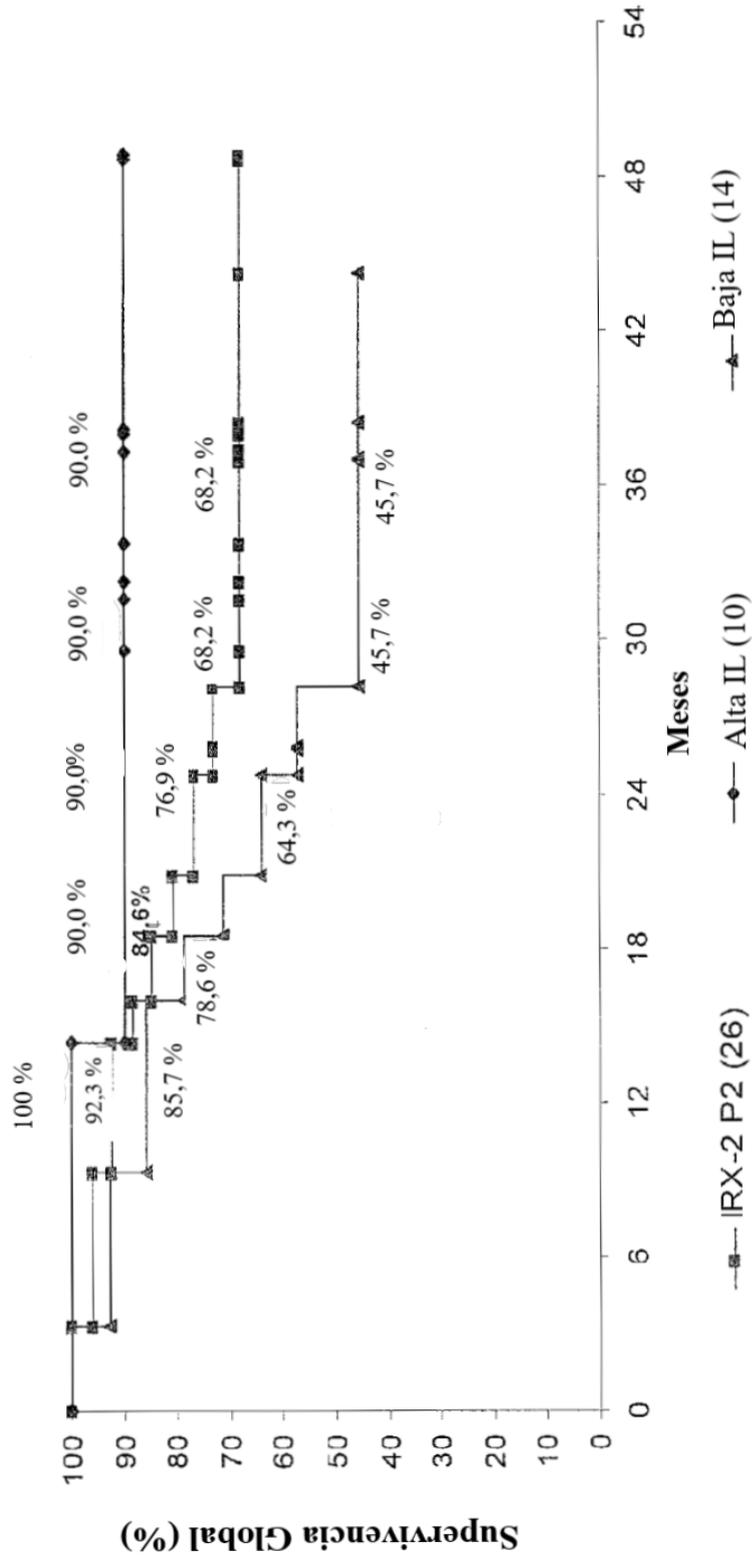


Figura 9

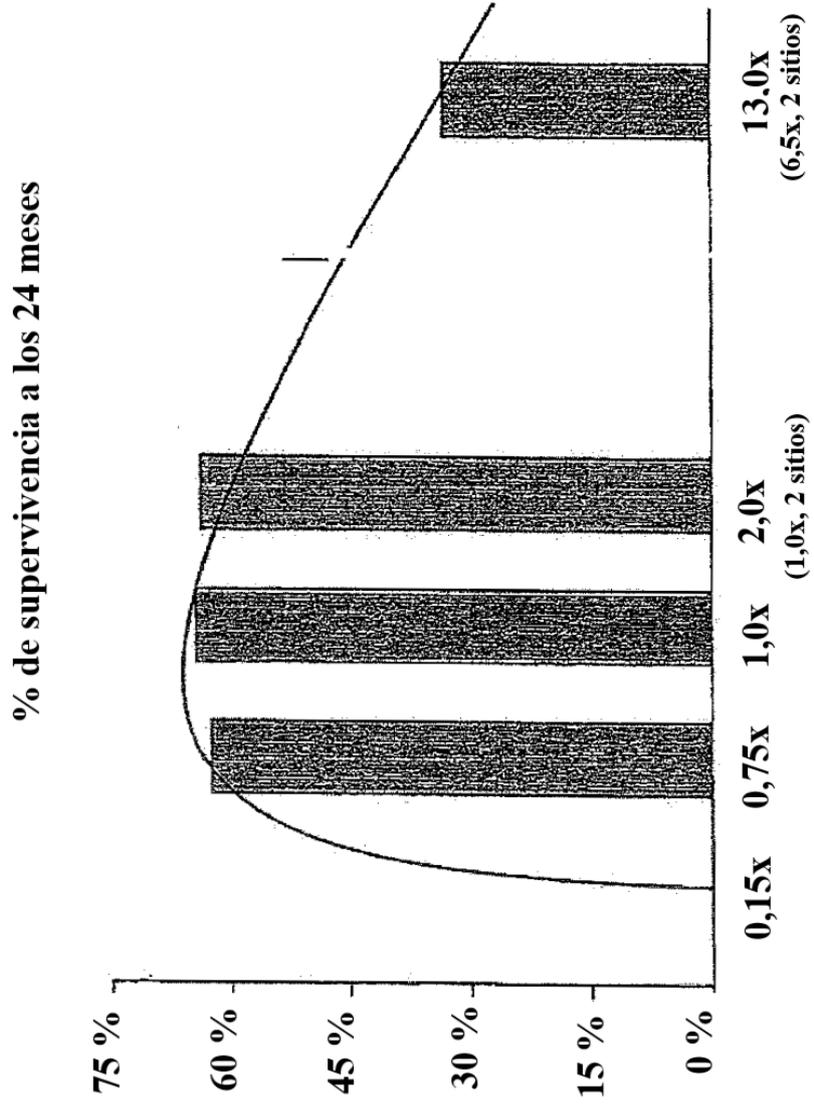


Figura 10

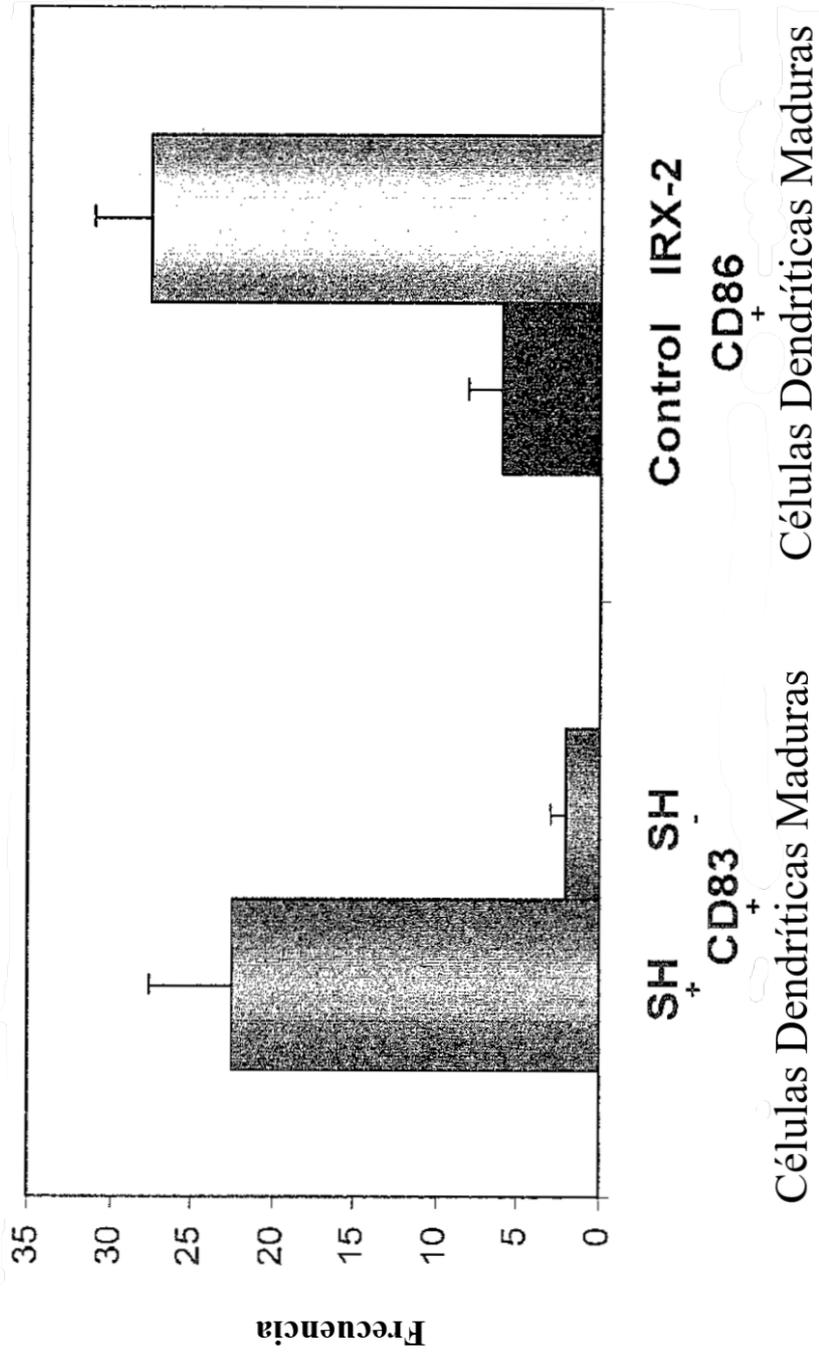


Figura 11A

Figura 11B

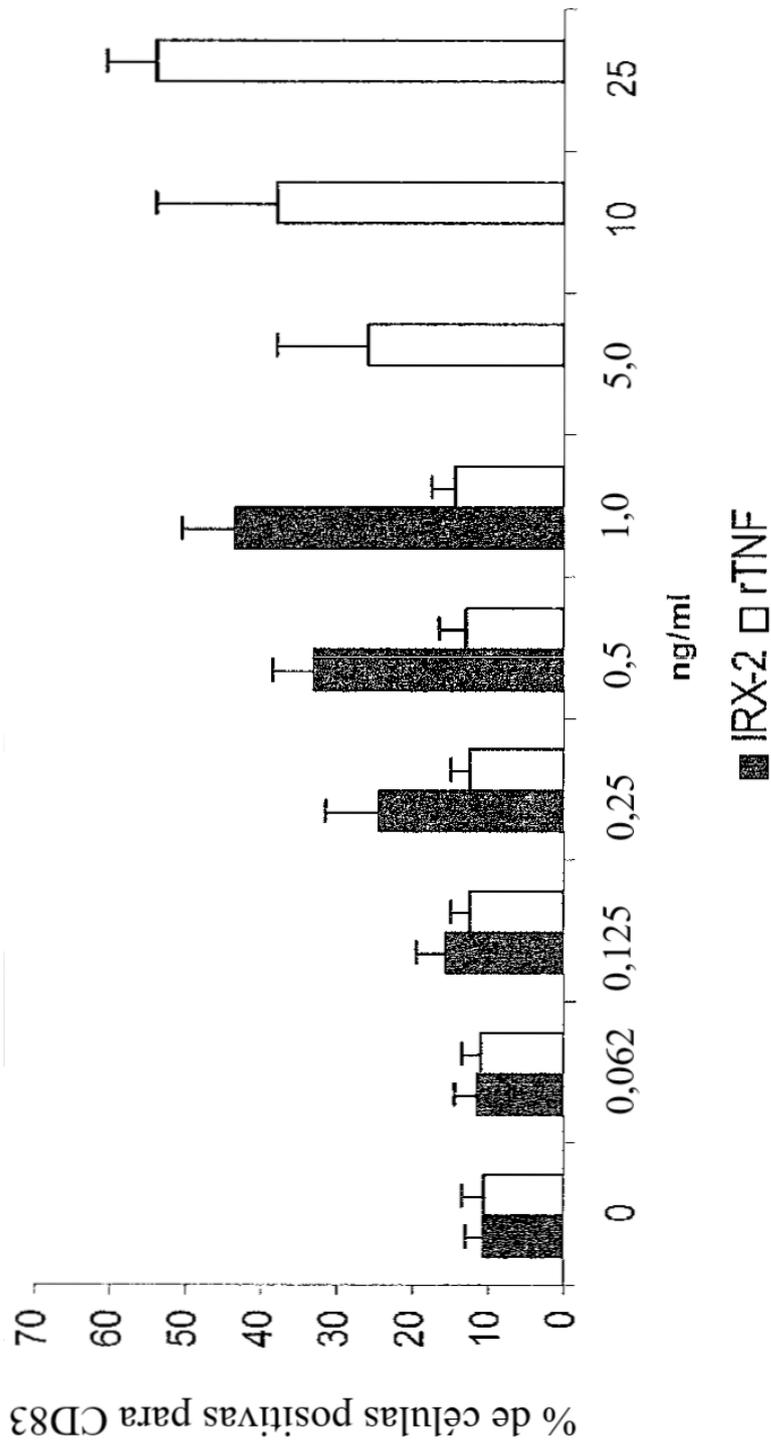


Figura 12



Figura 13B

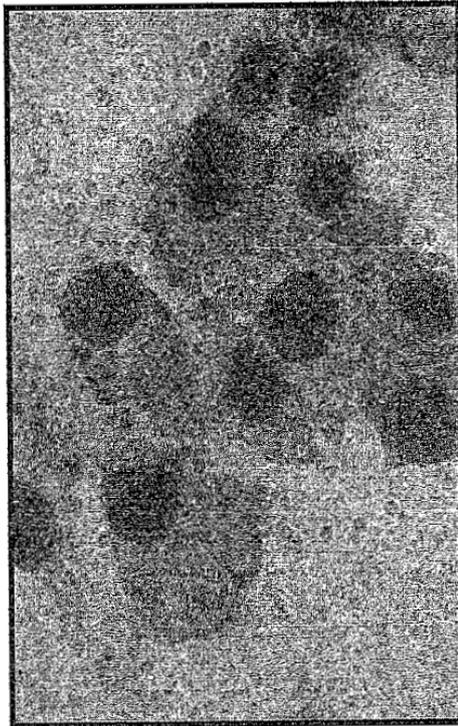


Figura 13A

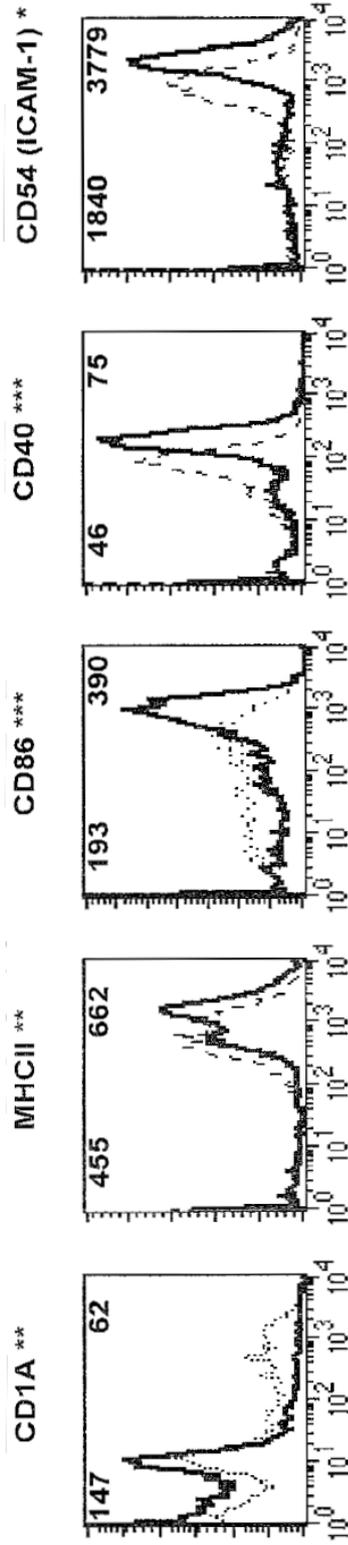


Figura 14

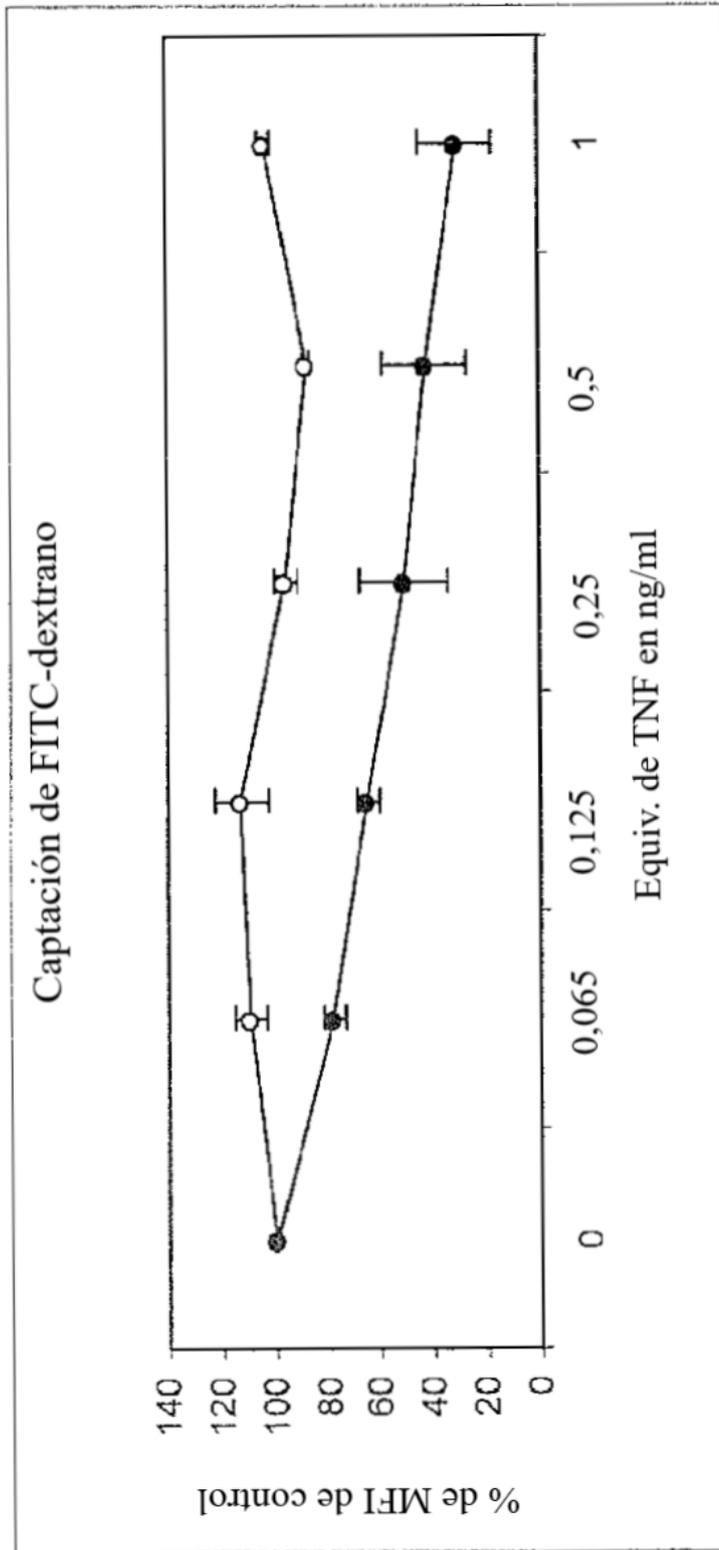


Figura 15

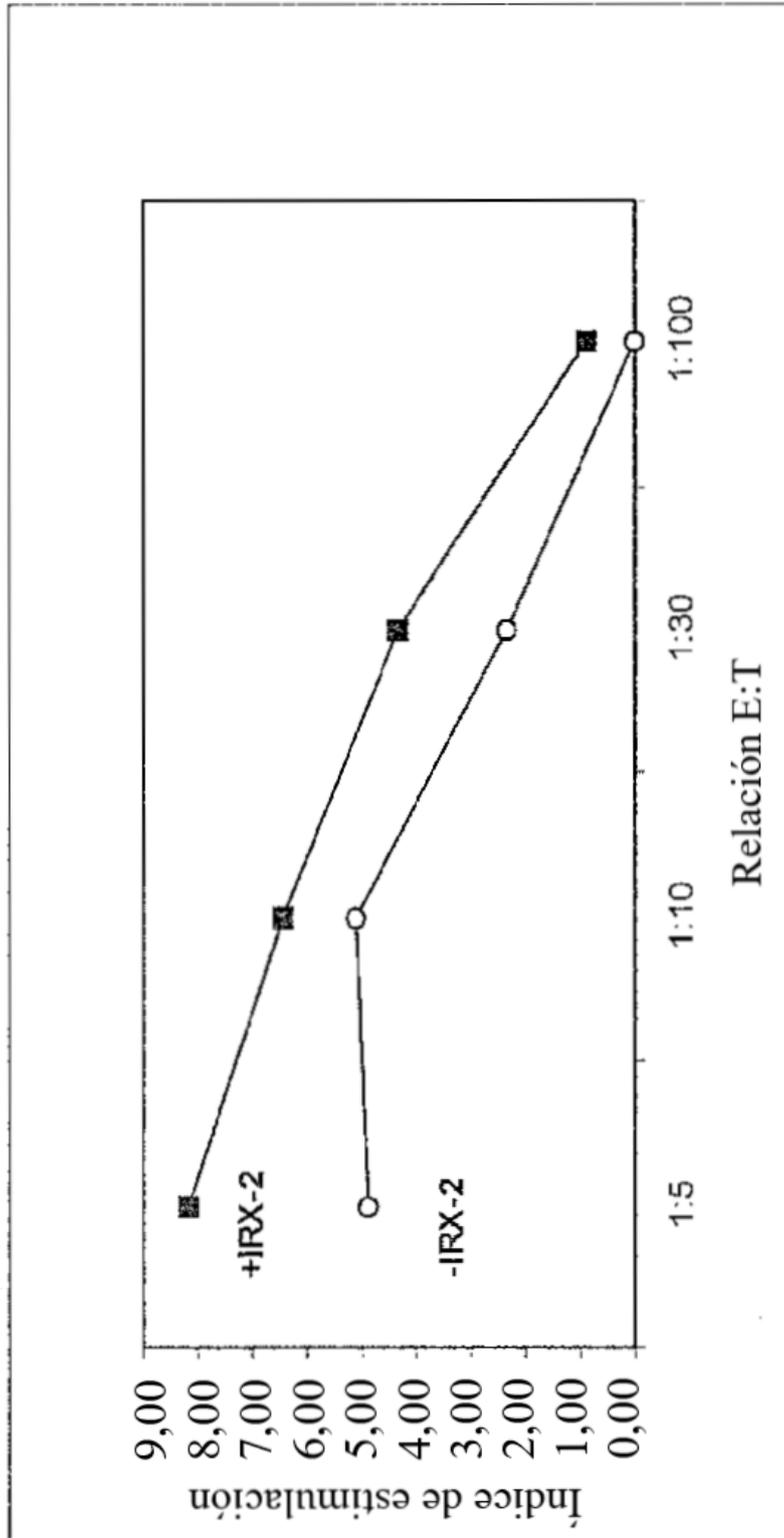


Figura 16

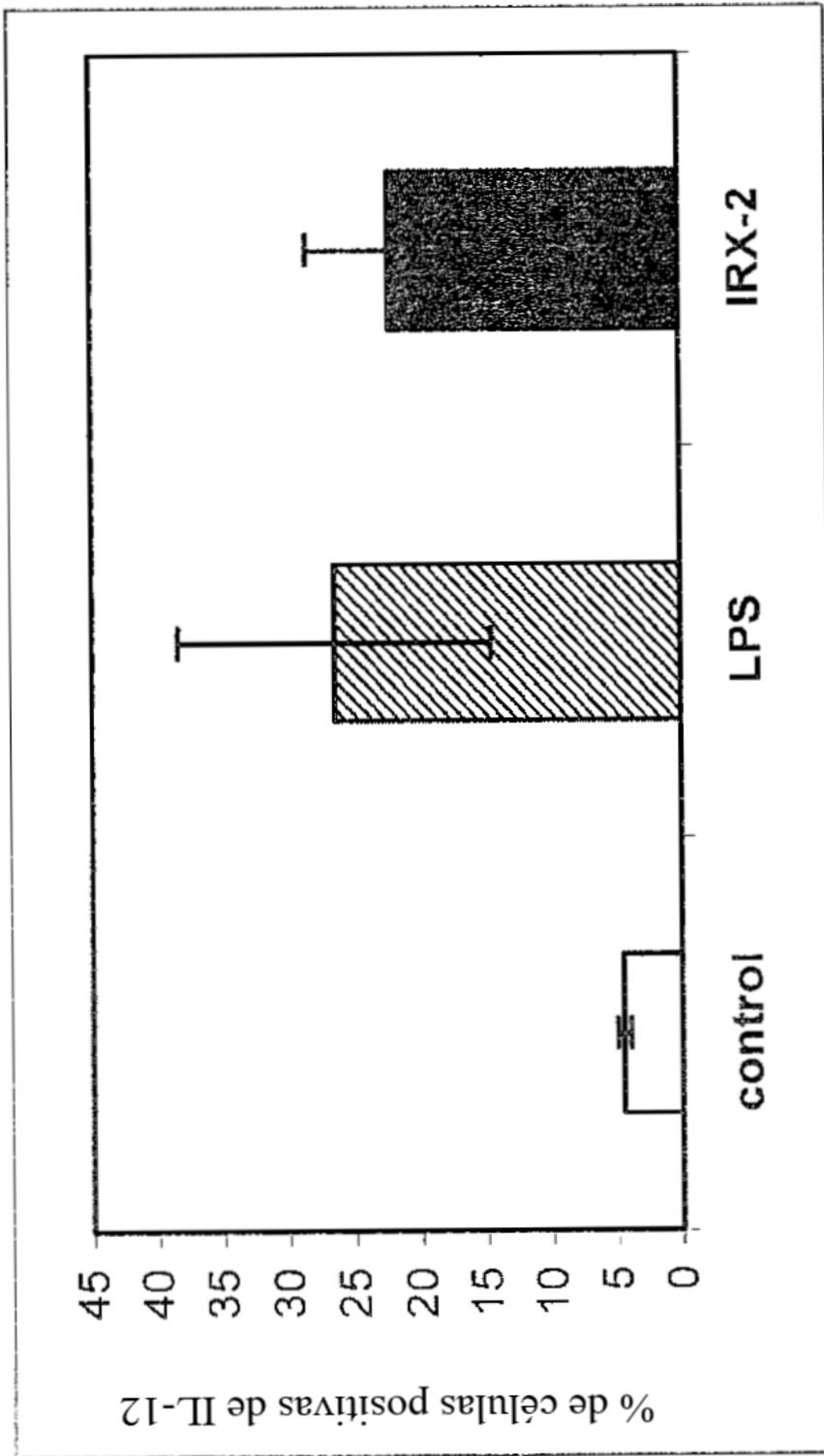


Figura 17A

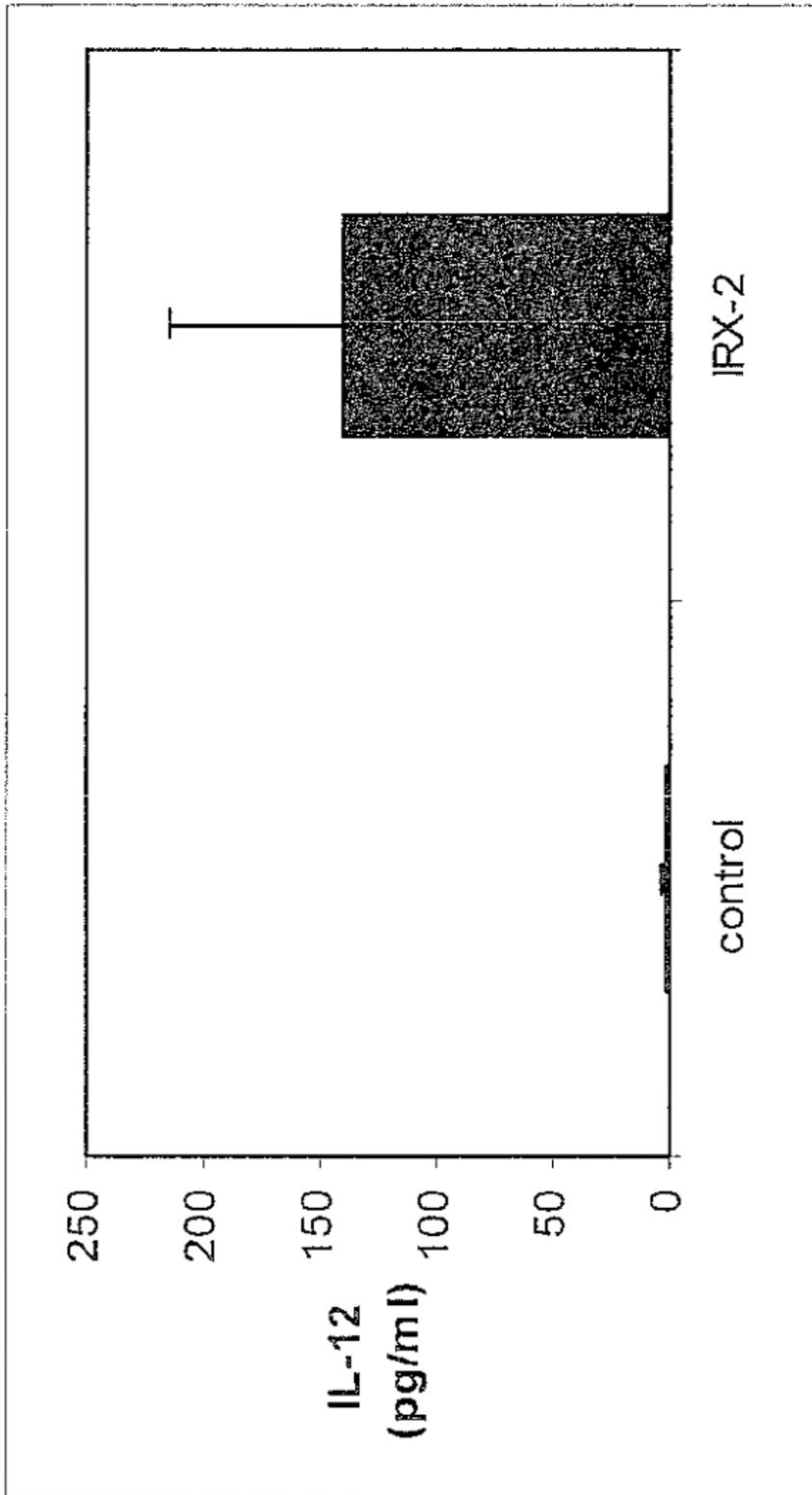


Figura 17B

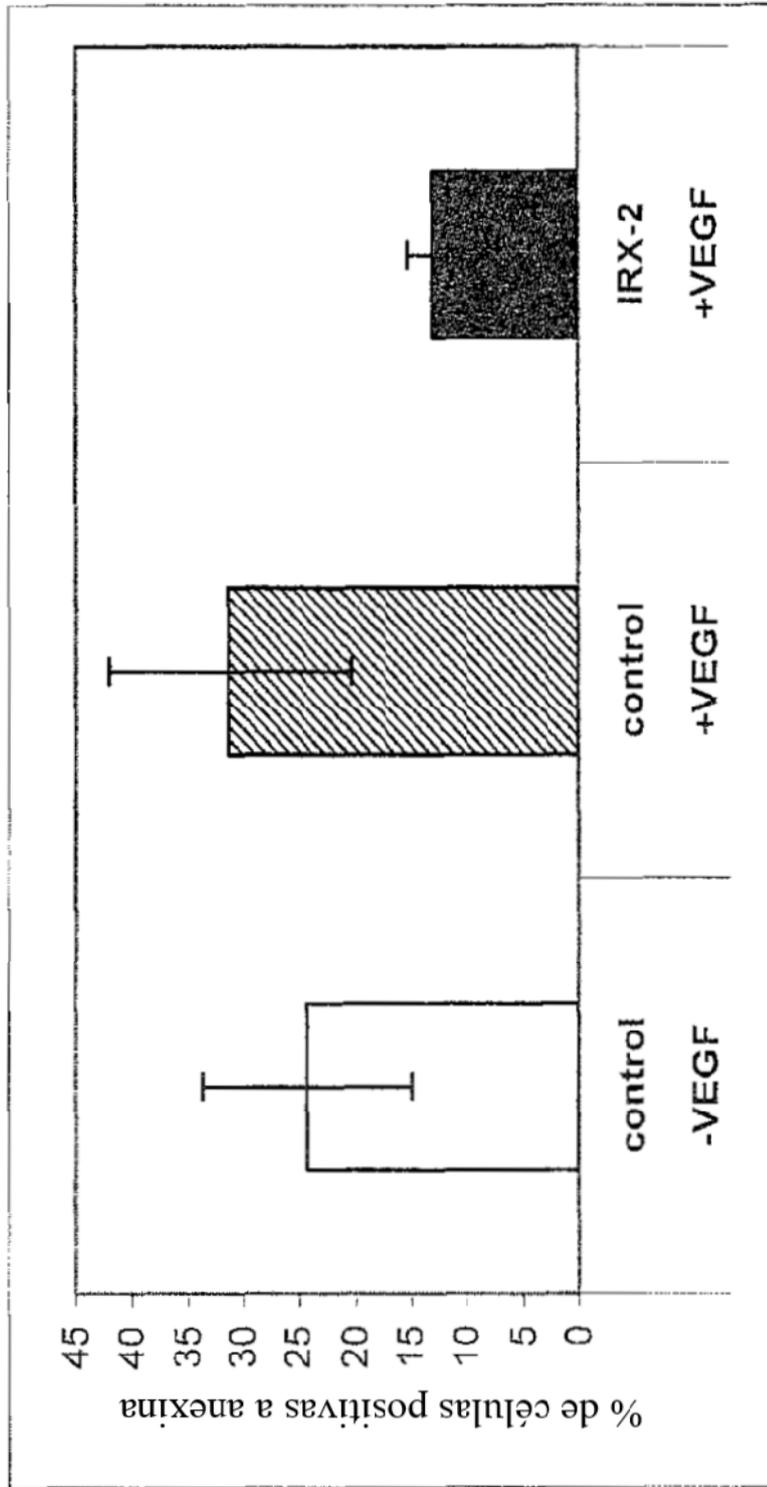


Figura 18

Figura 19A

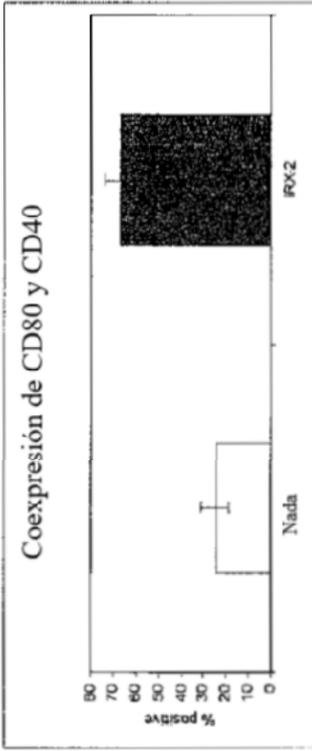
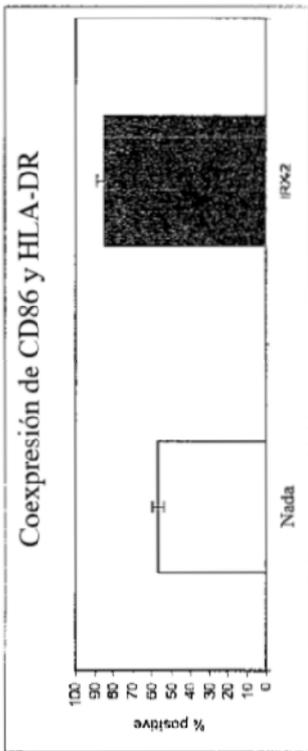


Figura 19B

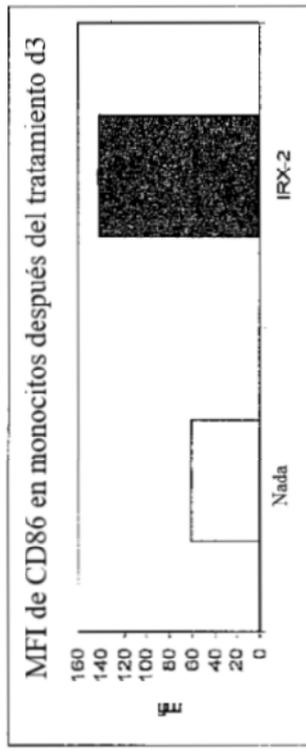
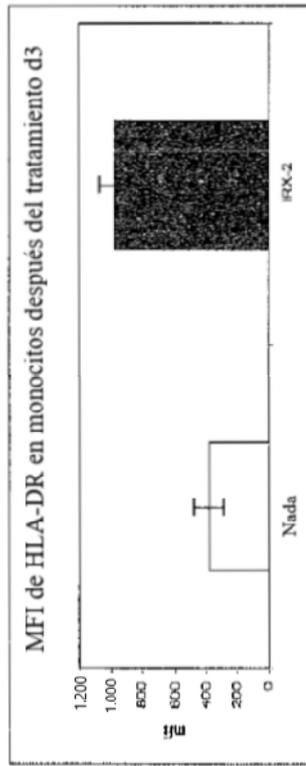


Figura 19C

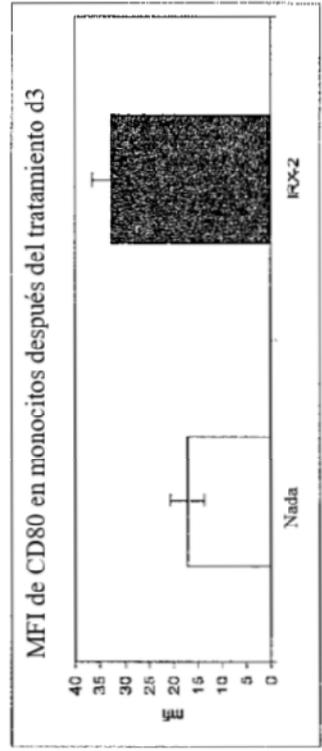
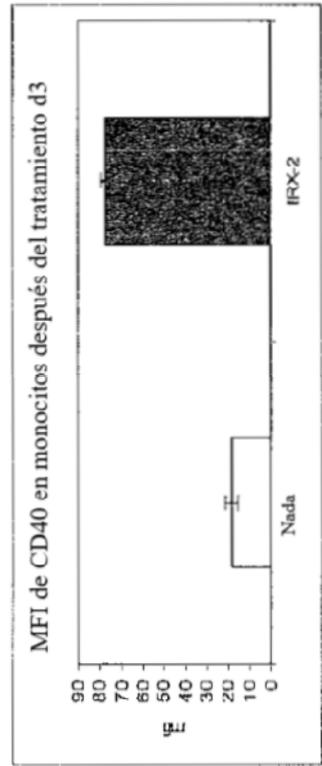
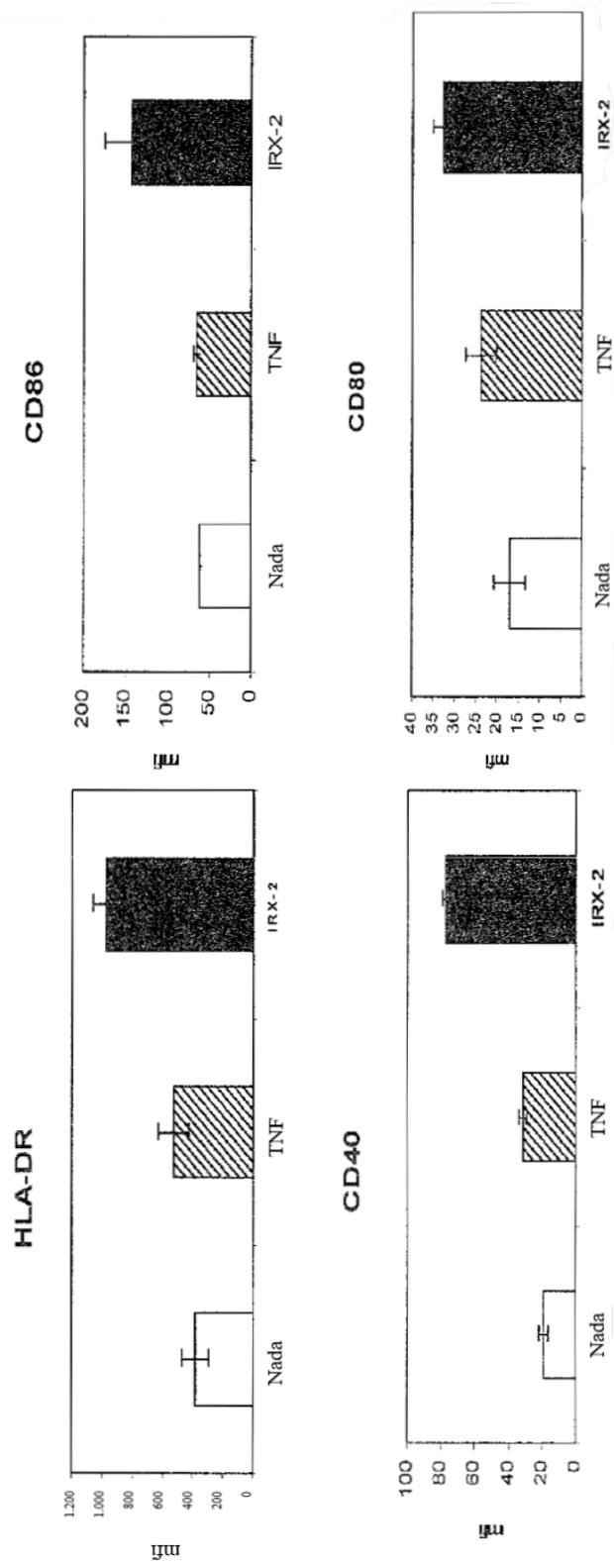


Figura 20



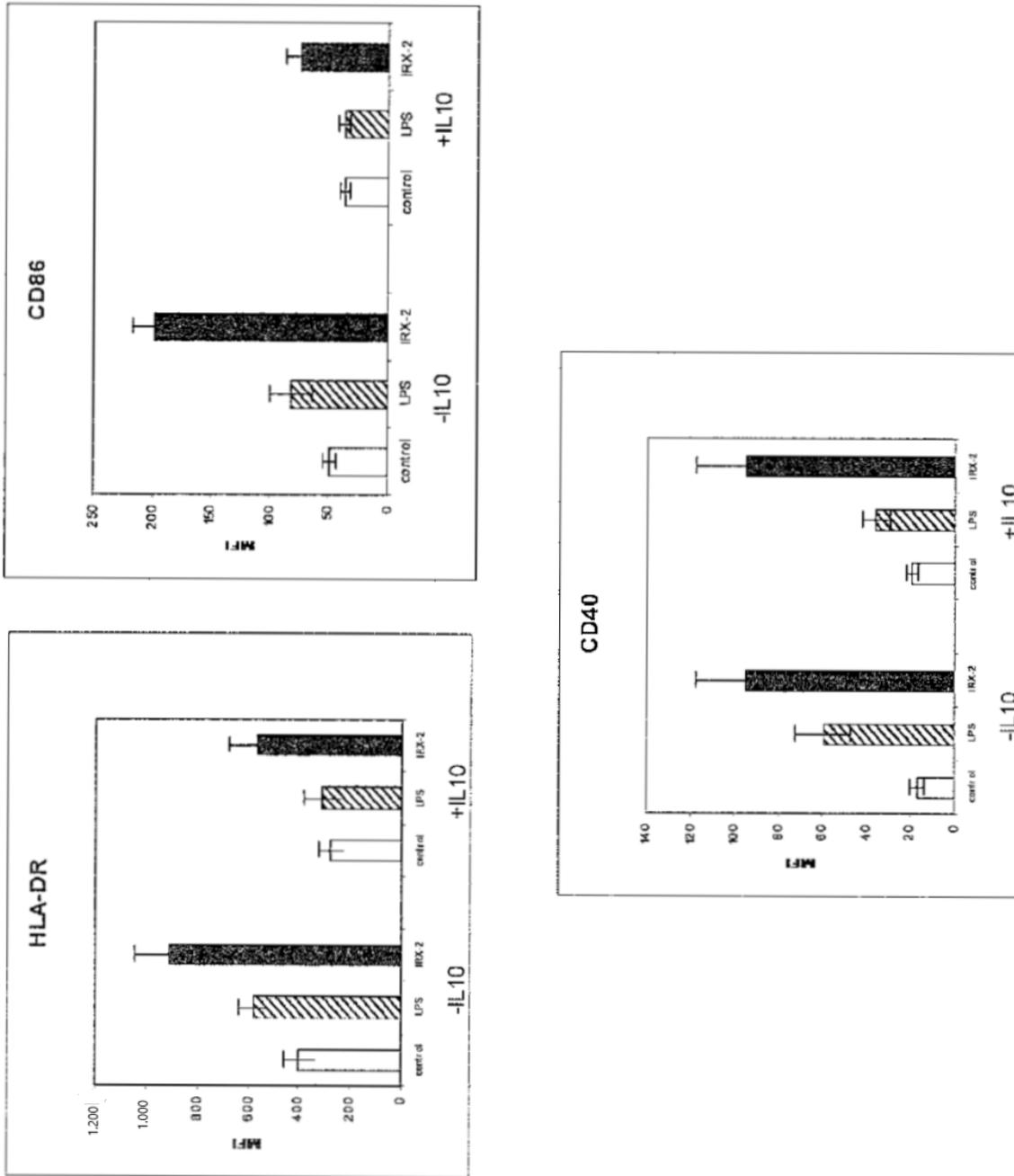


Figura 21

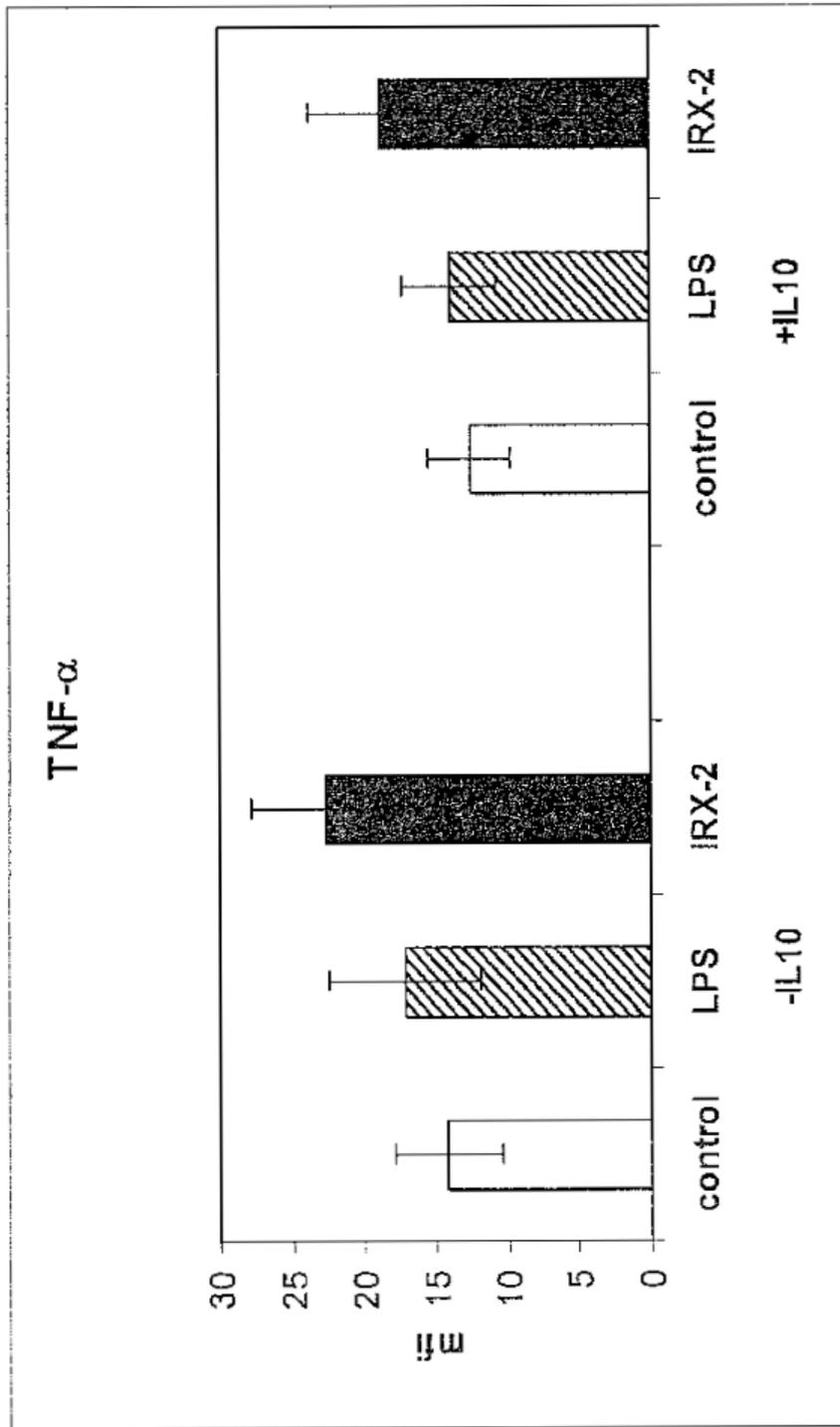


Figura 22

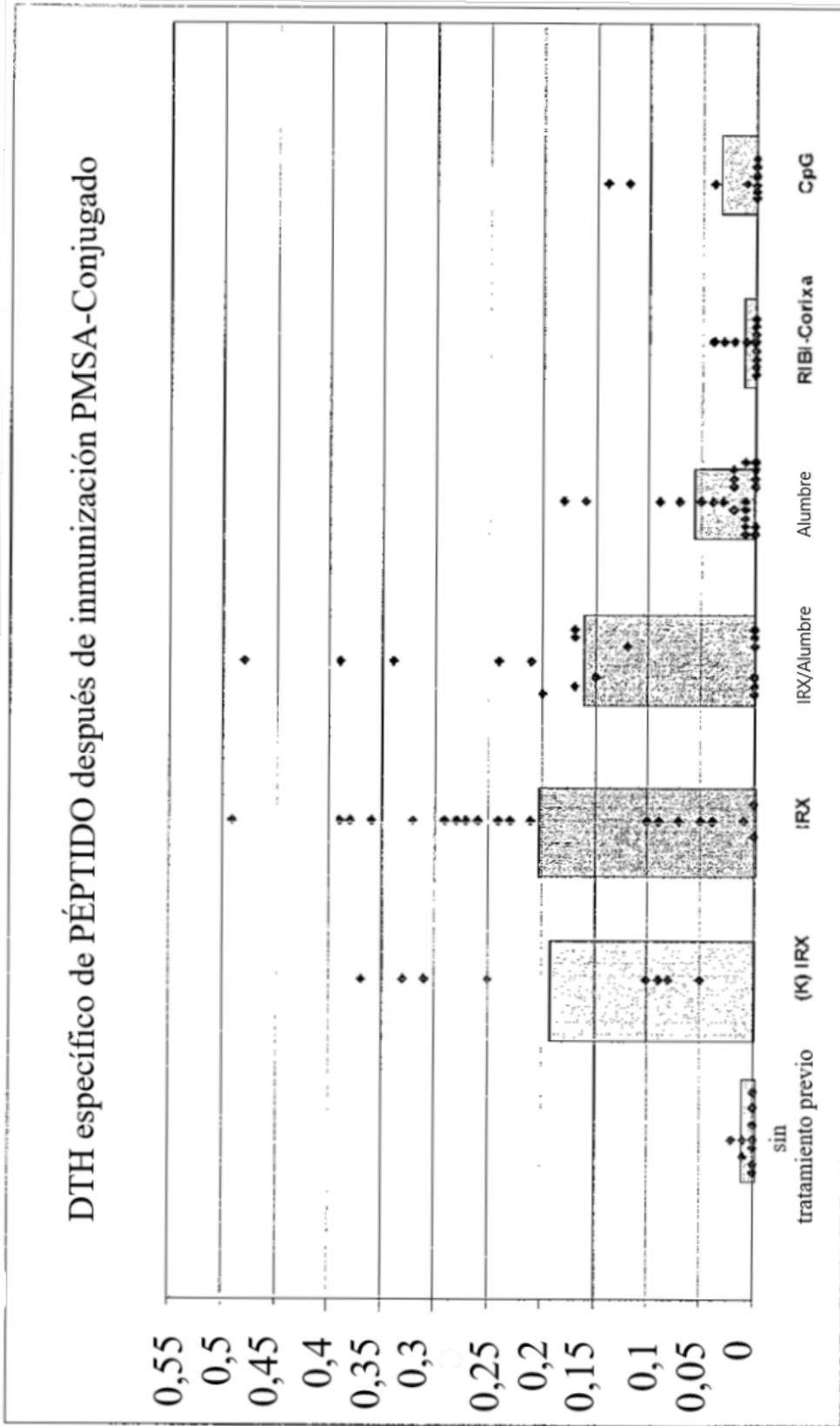


Figura 23

Figura 24A

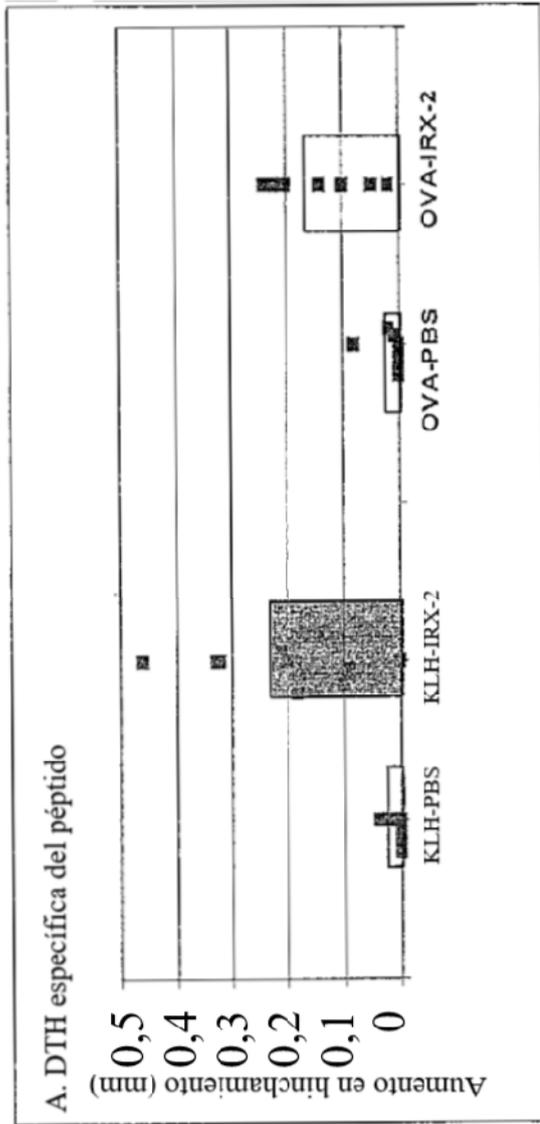
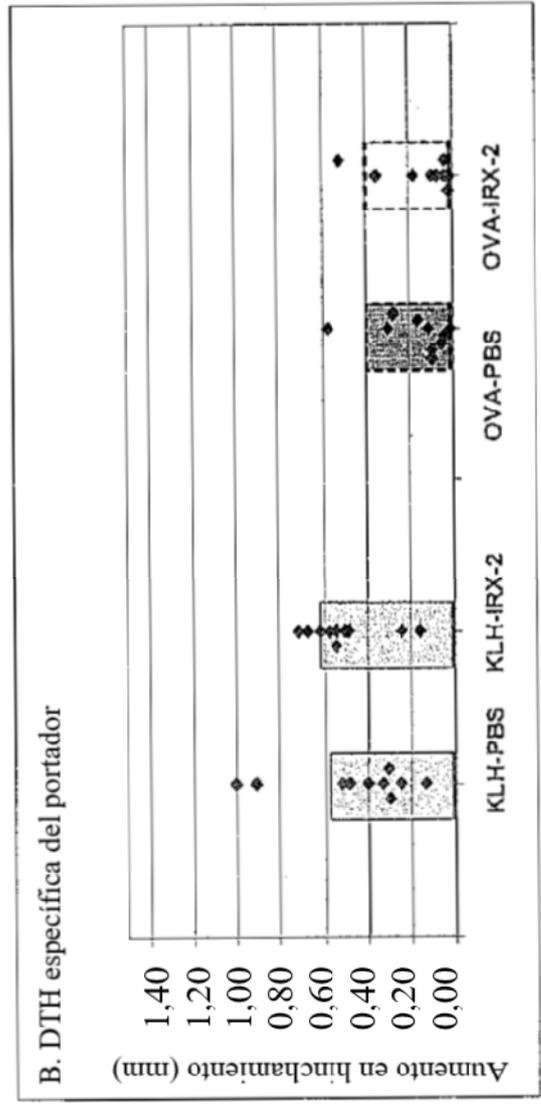


Figura 24B



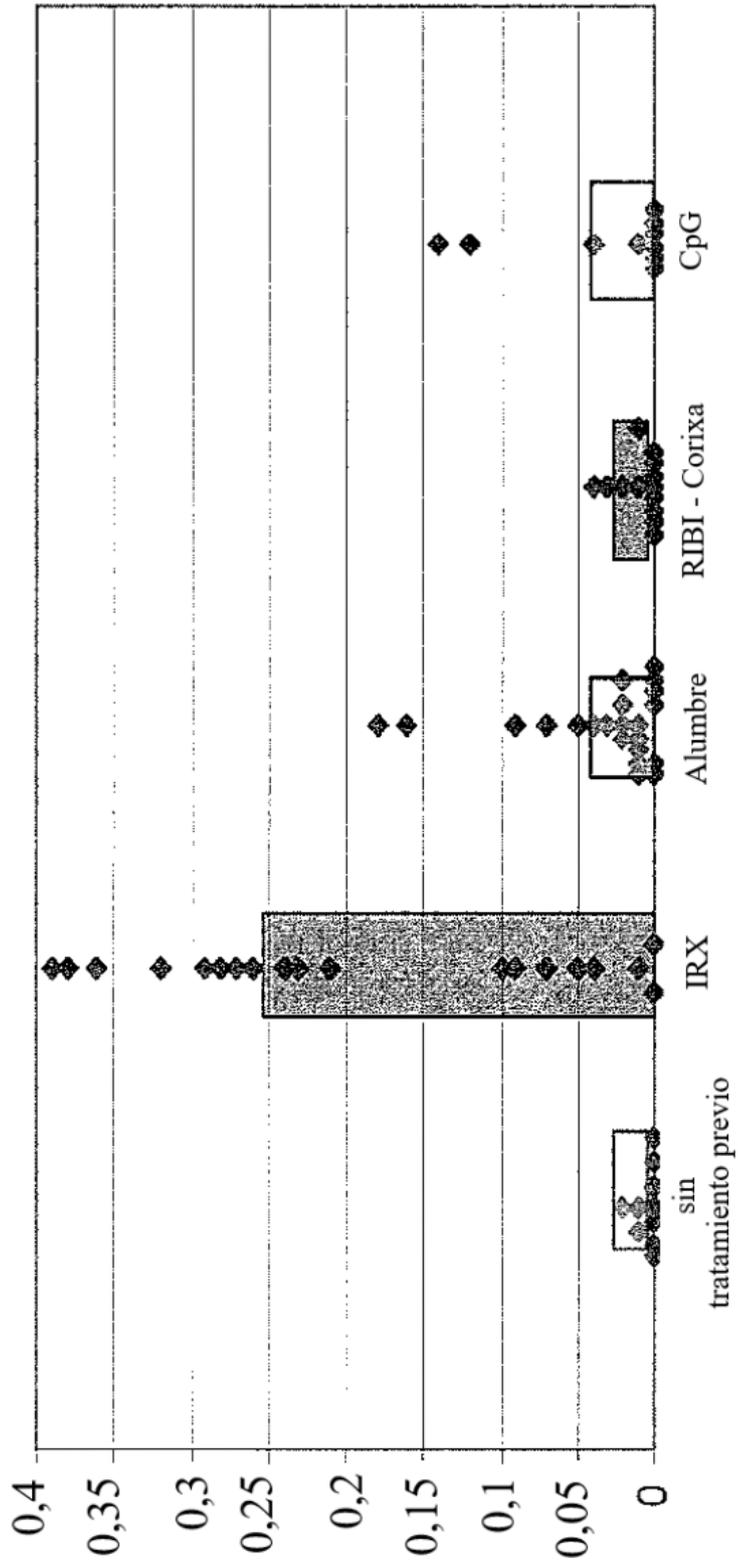


Figura 26

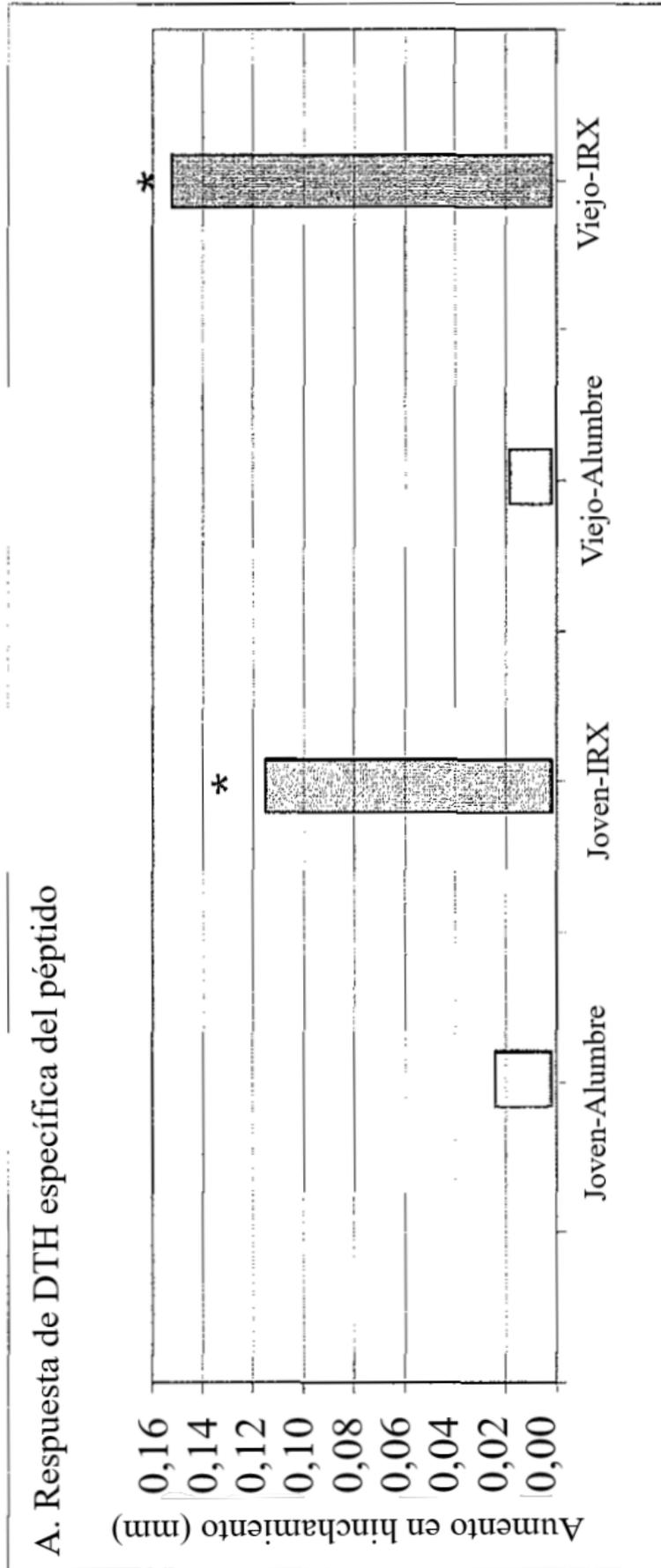


Figura 27A

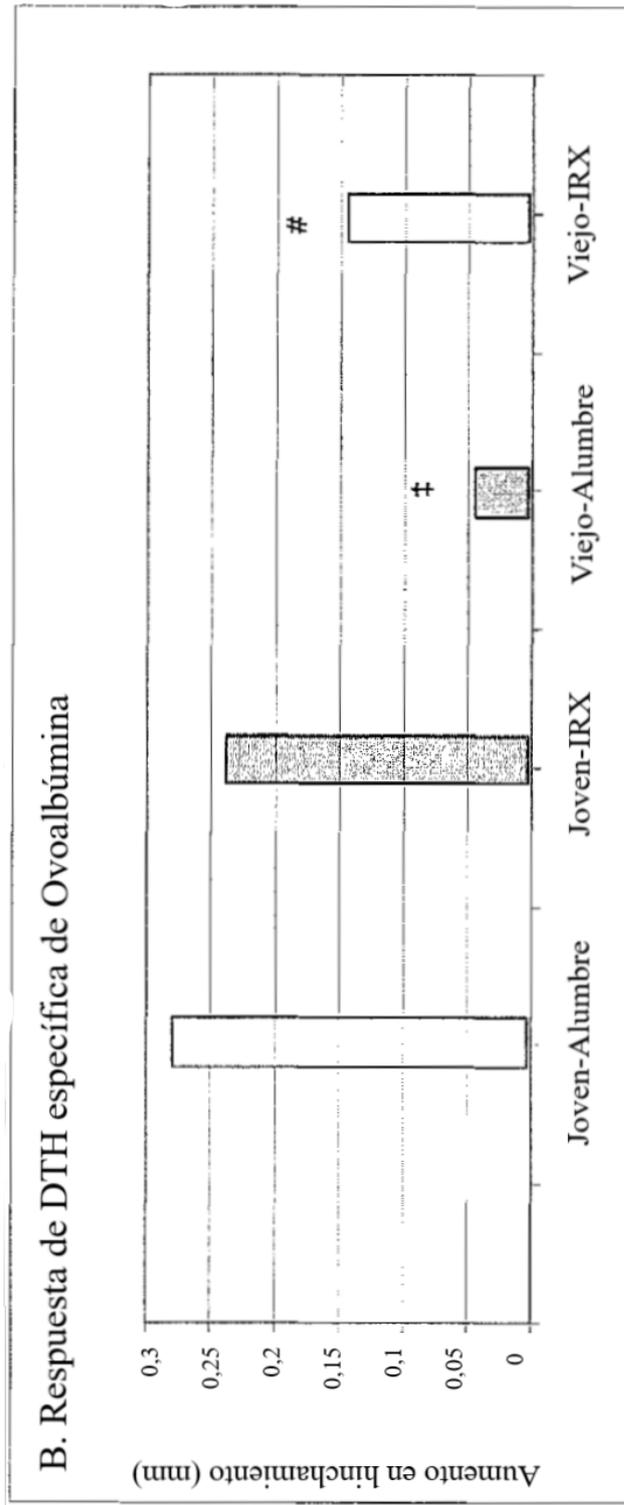


Figura 27B

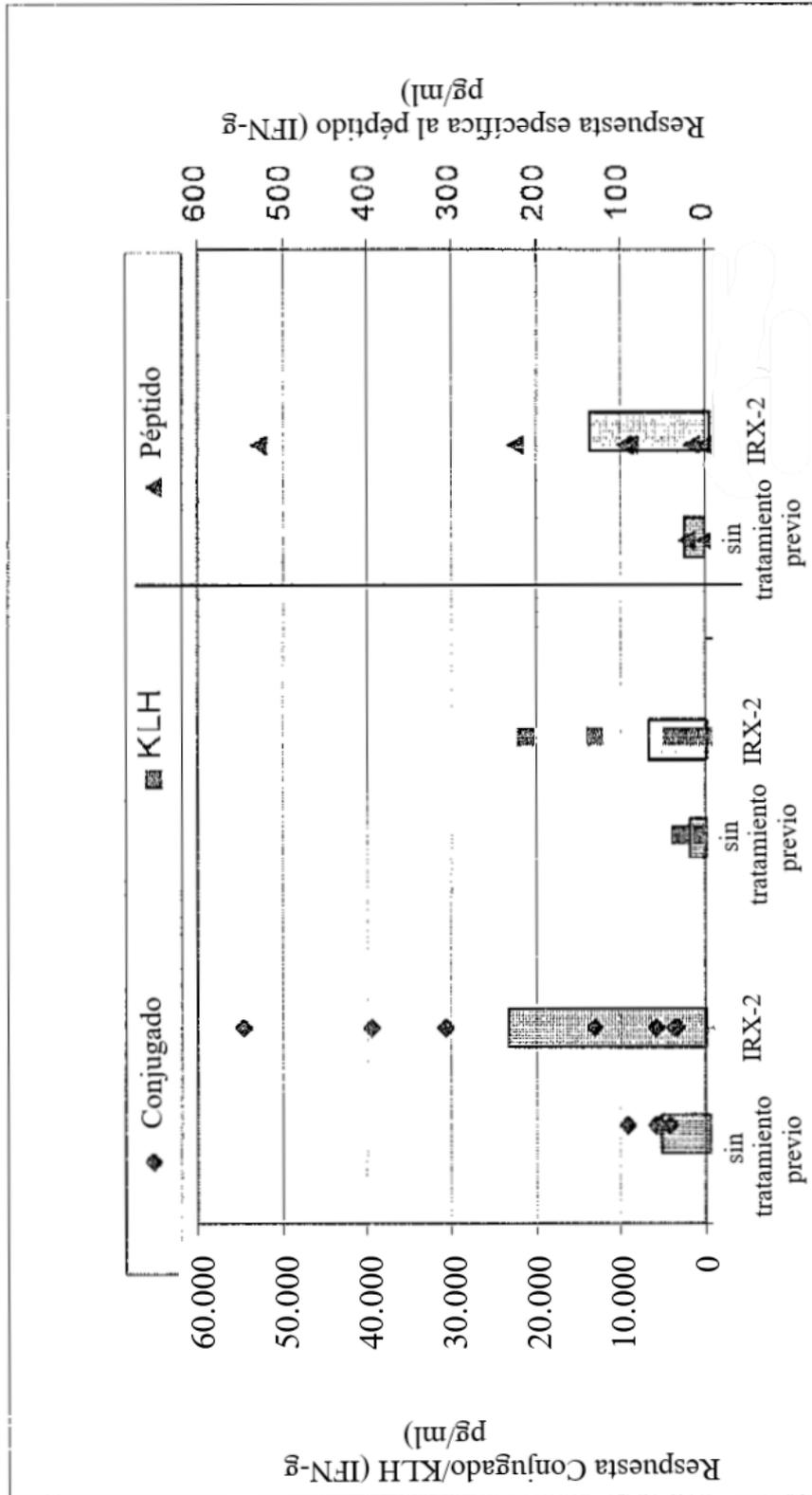


Figura 28

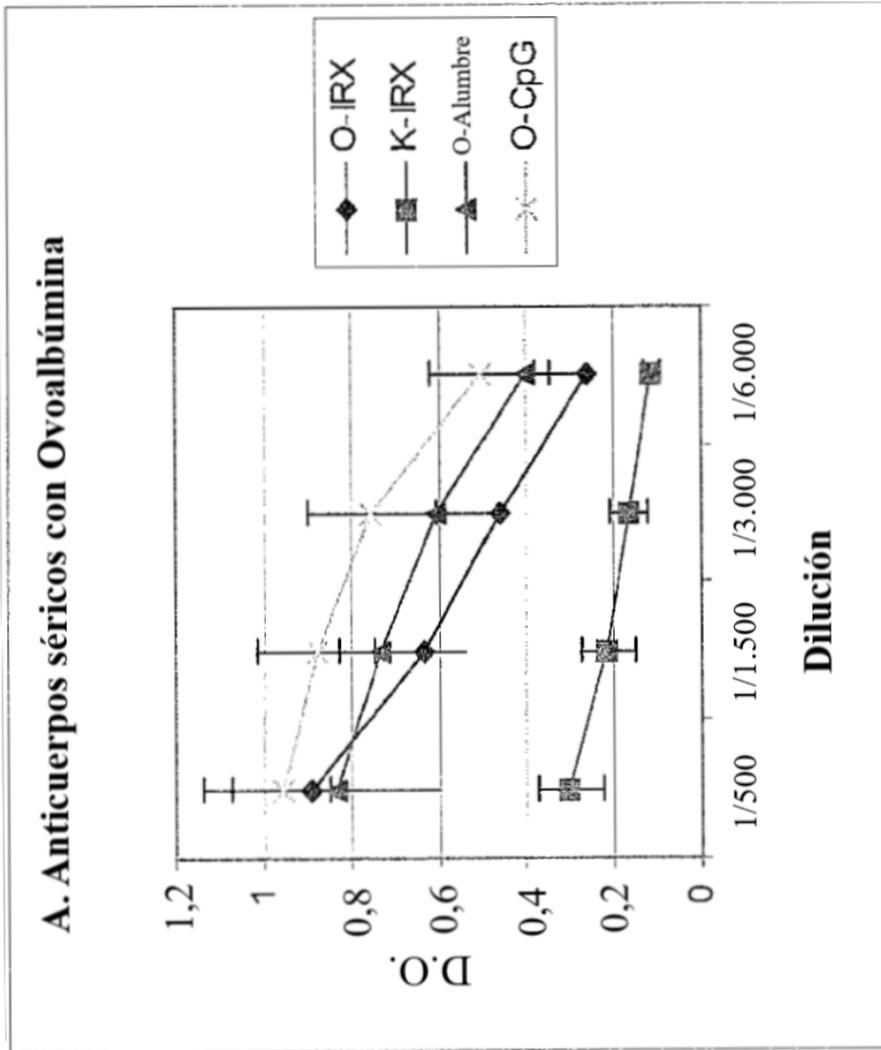


Figura 29A

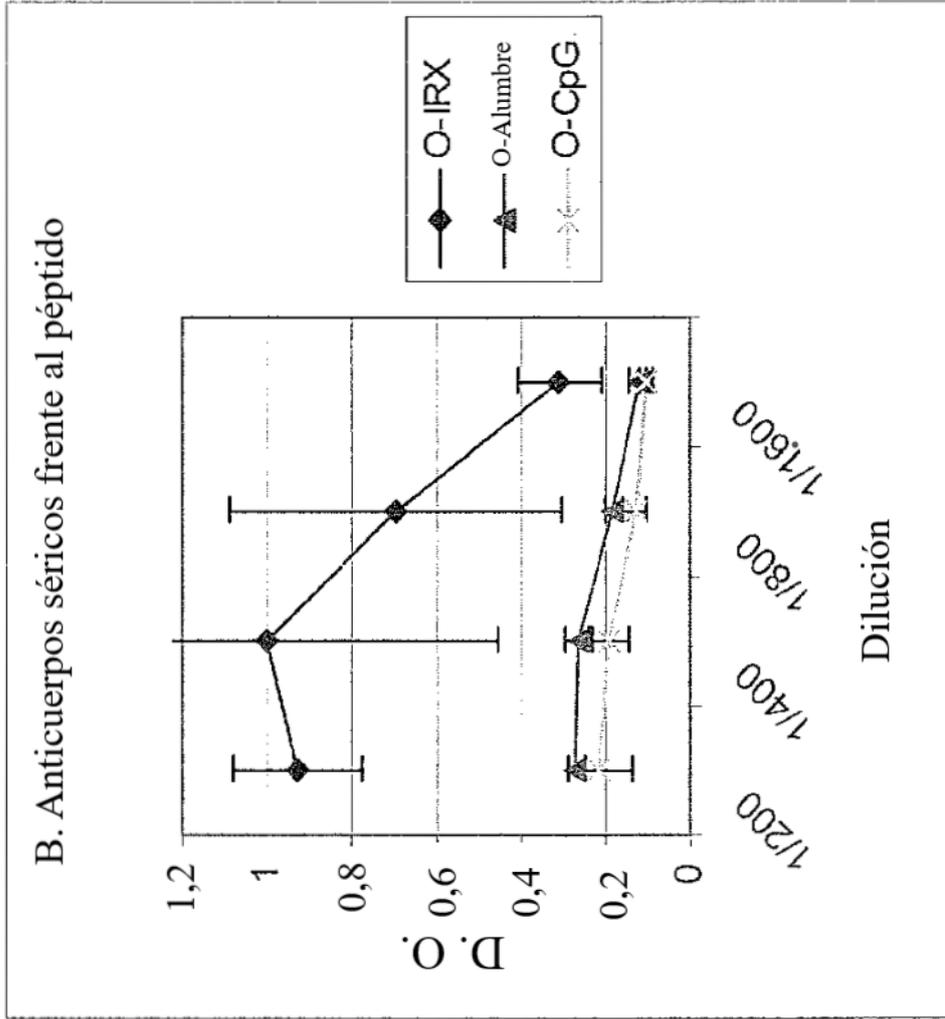


Figura 29B

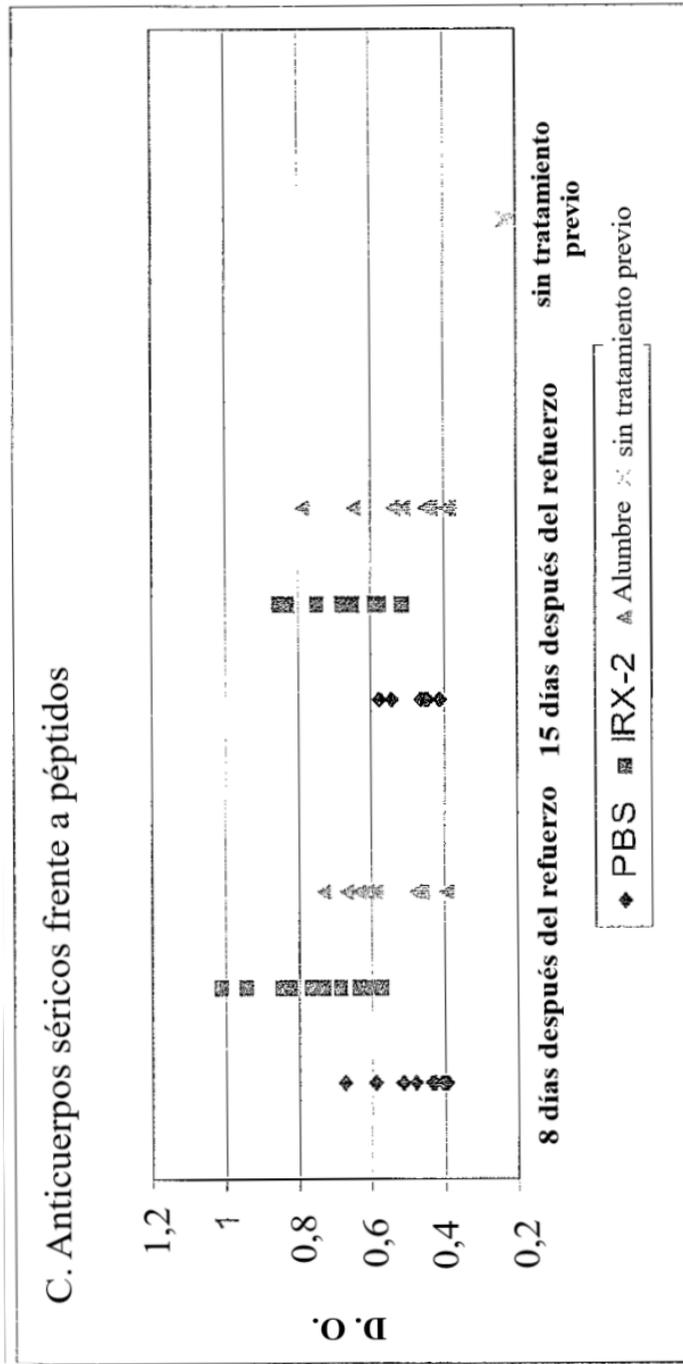


Figura 29C

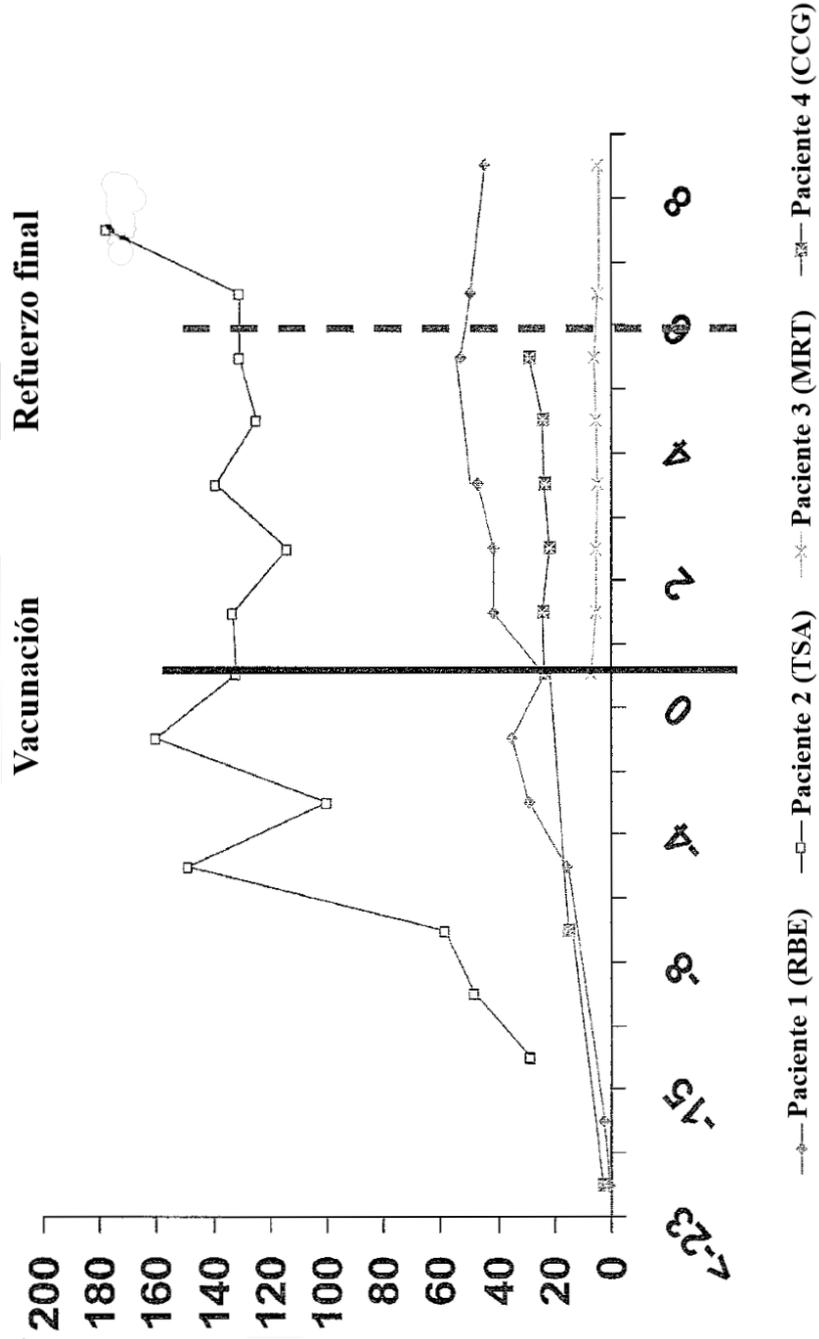


Figura 30

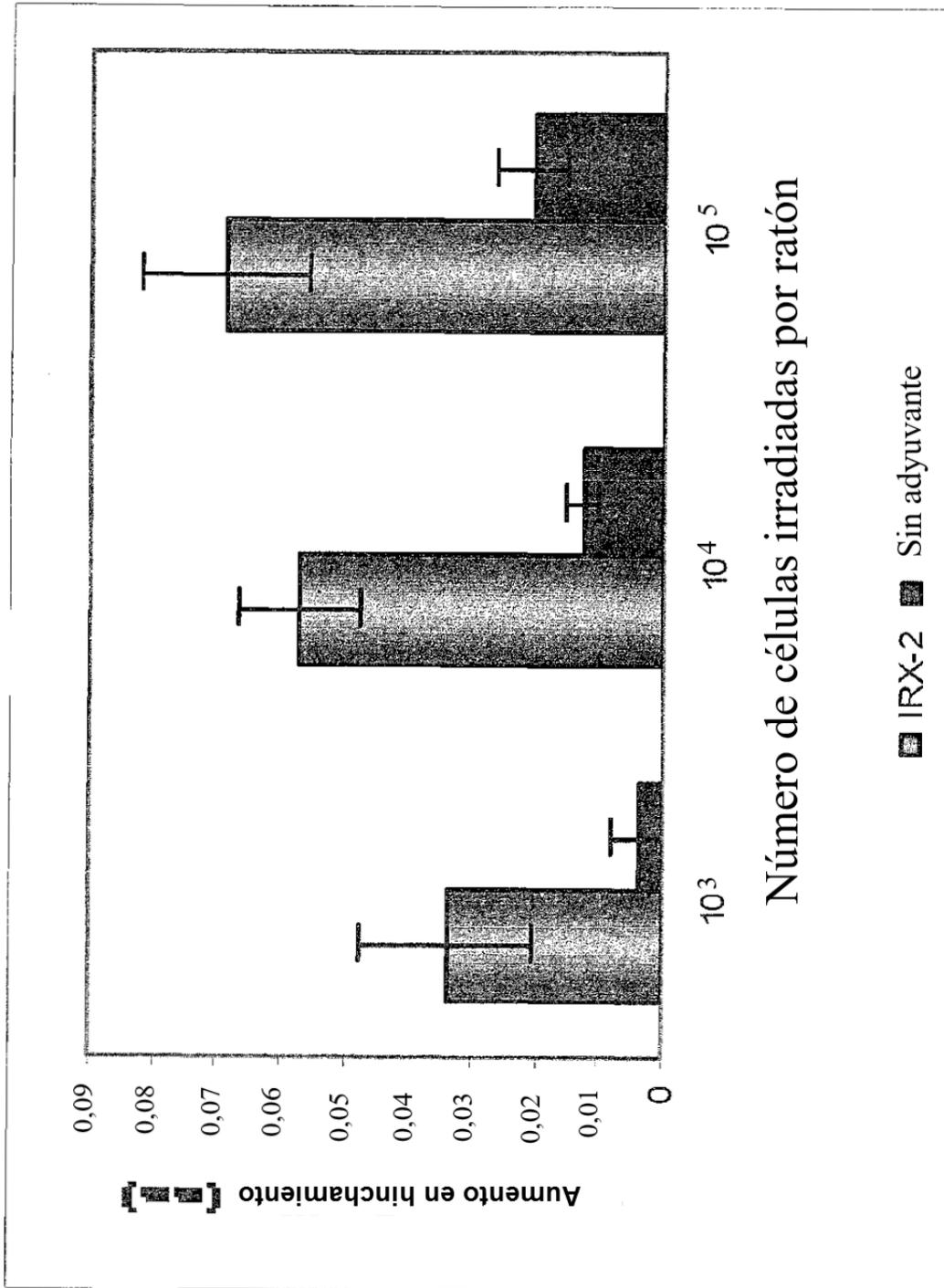


FIGURA 31

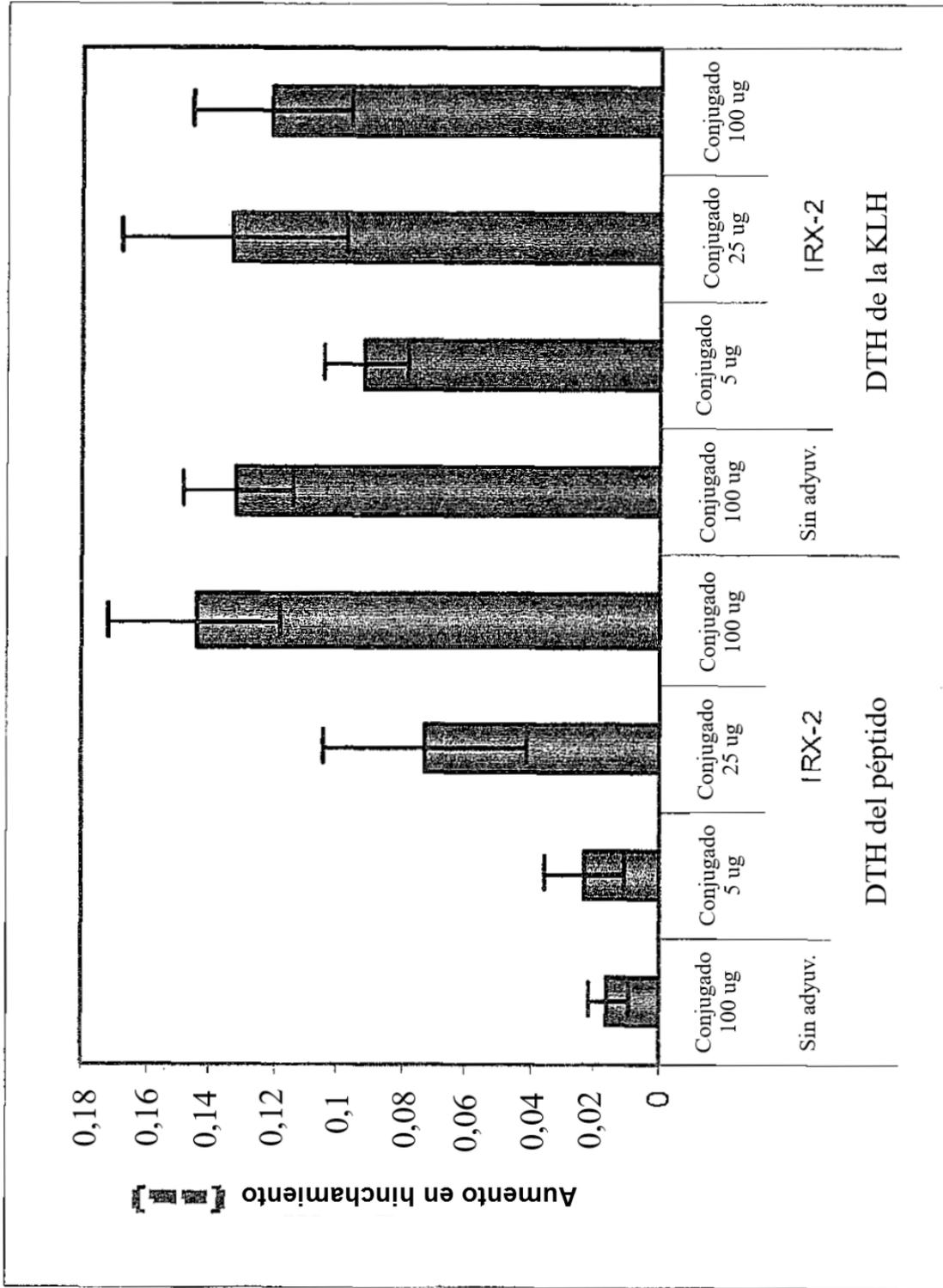


FIGURA 32

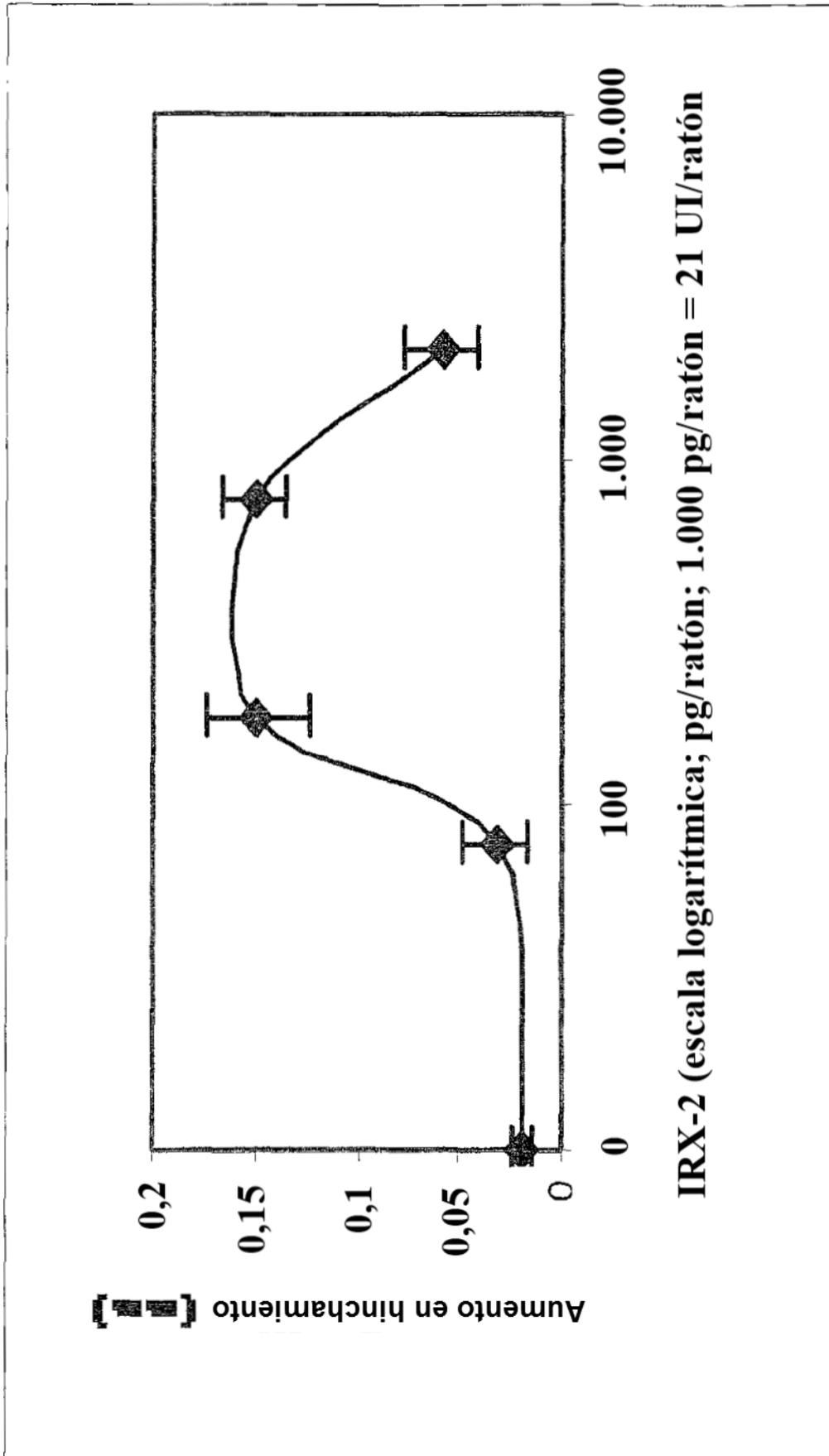


FIGURA 33A

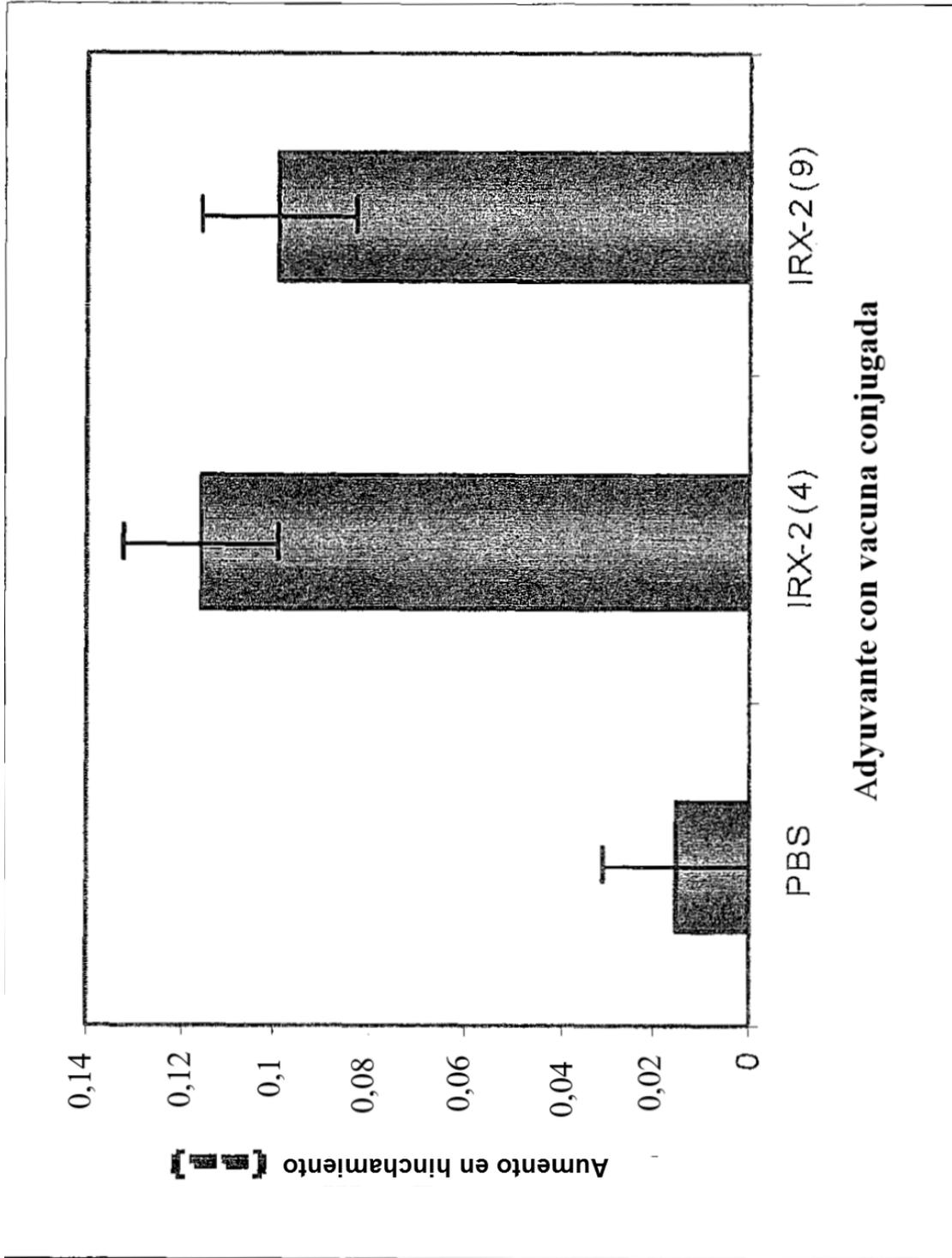


FIGURA 33B

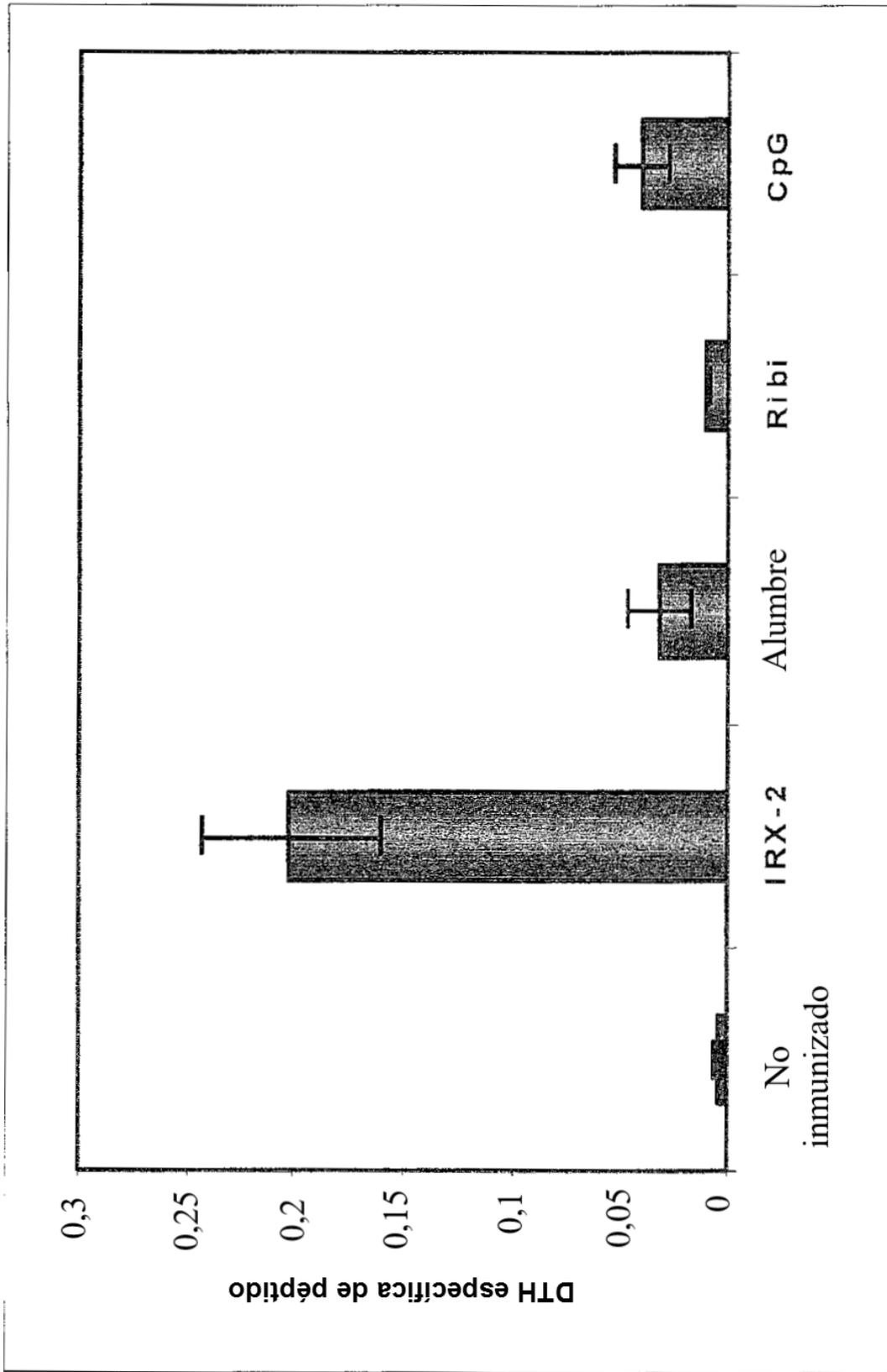


FIGURA 34

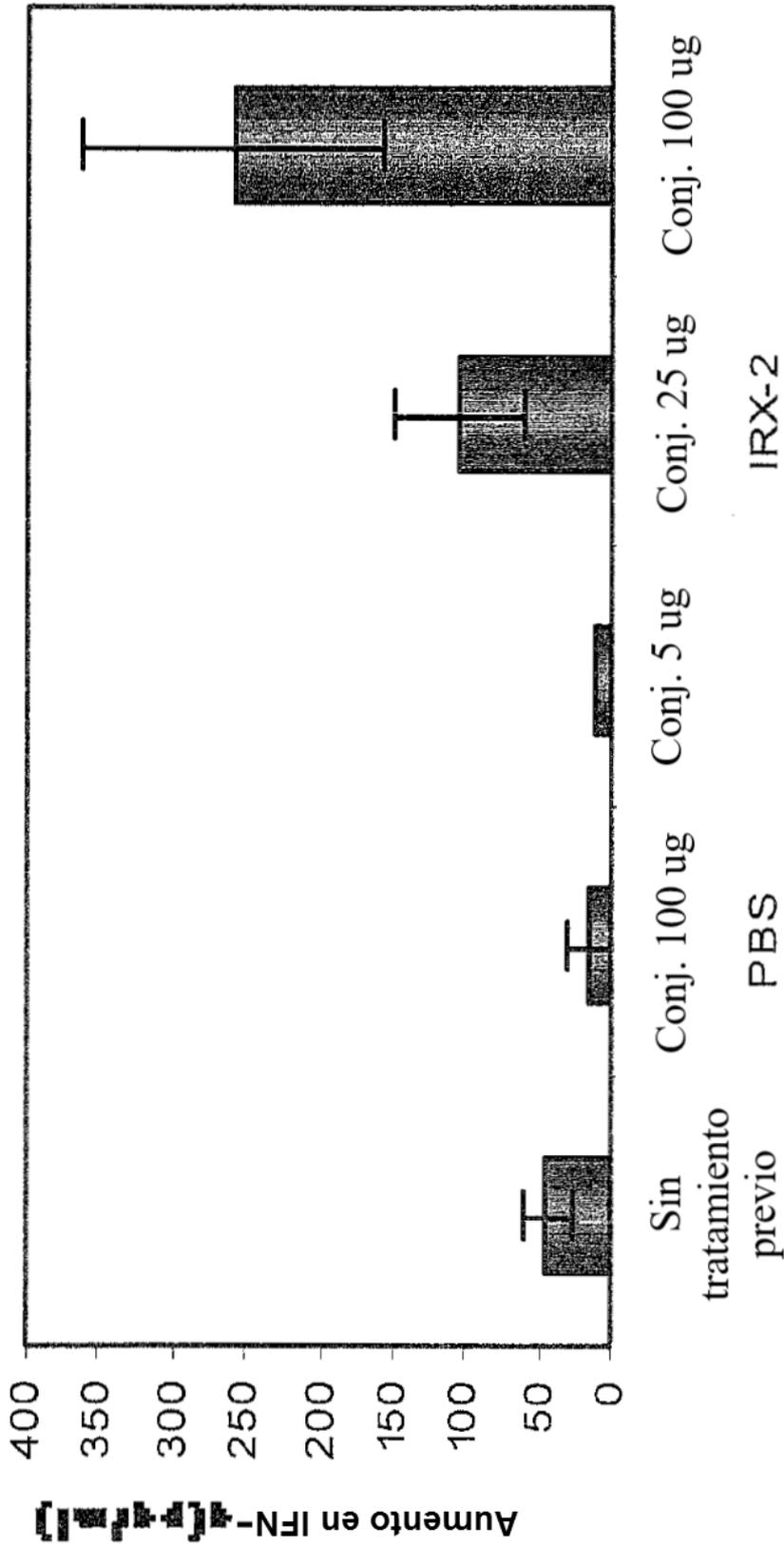


FIGURA 35

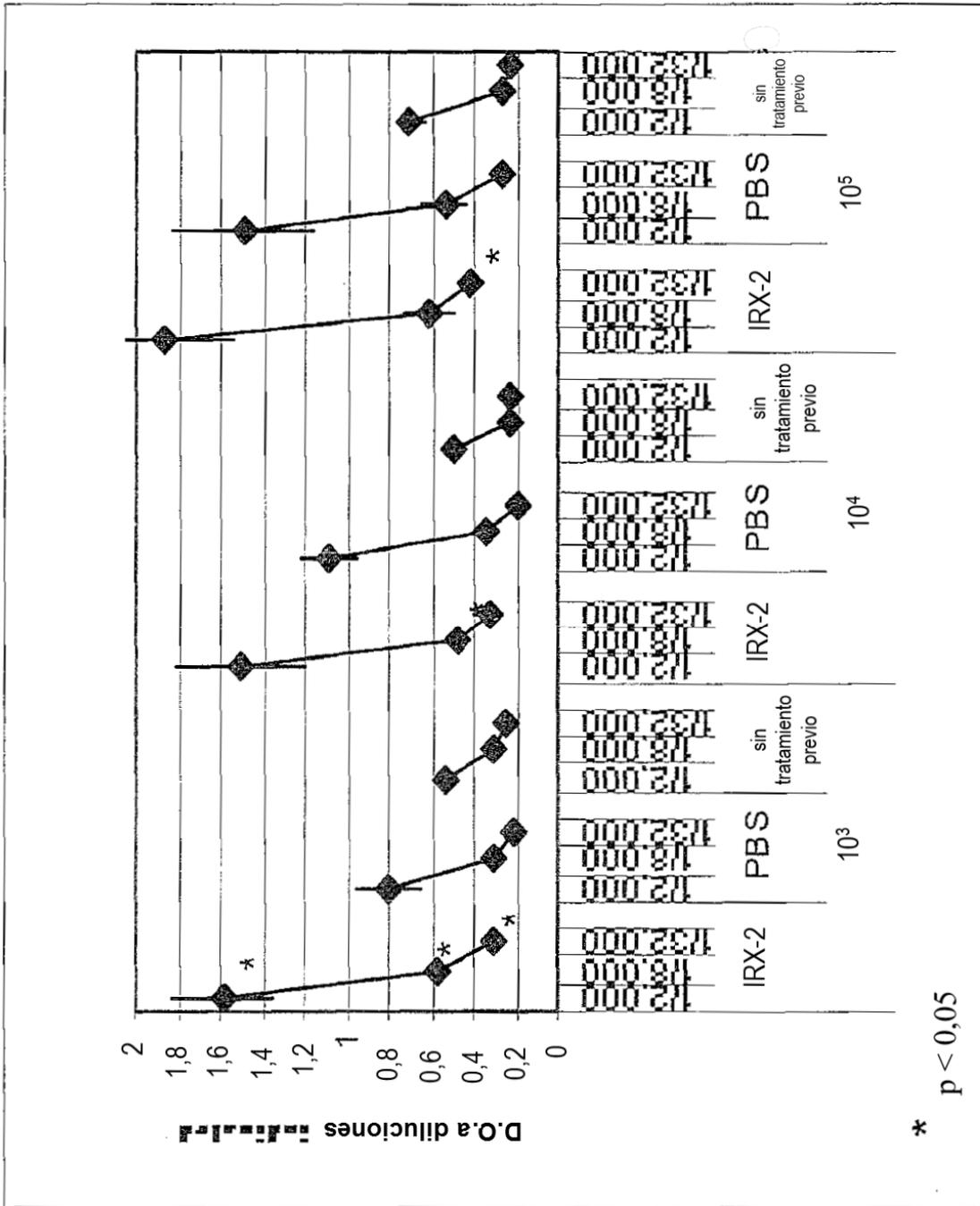


FIGURA 36

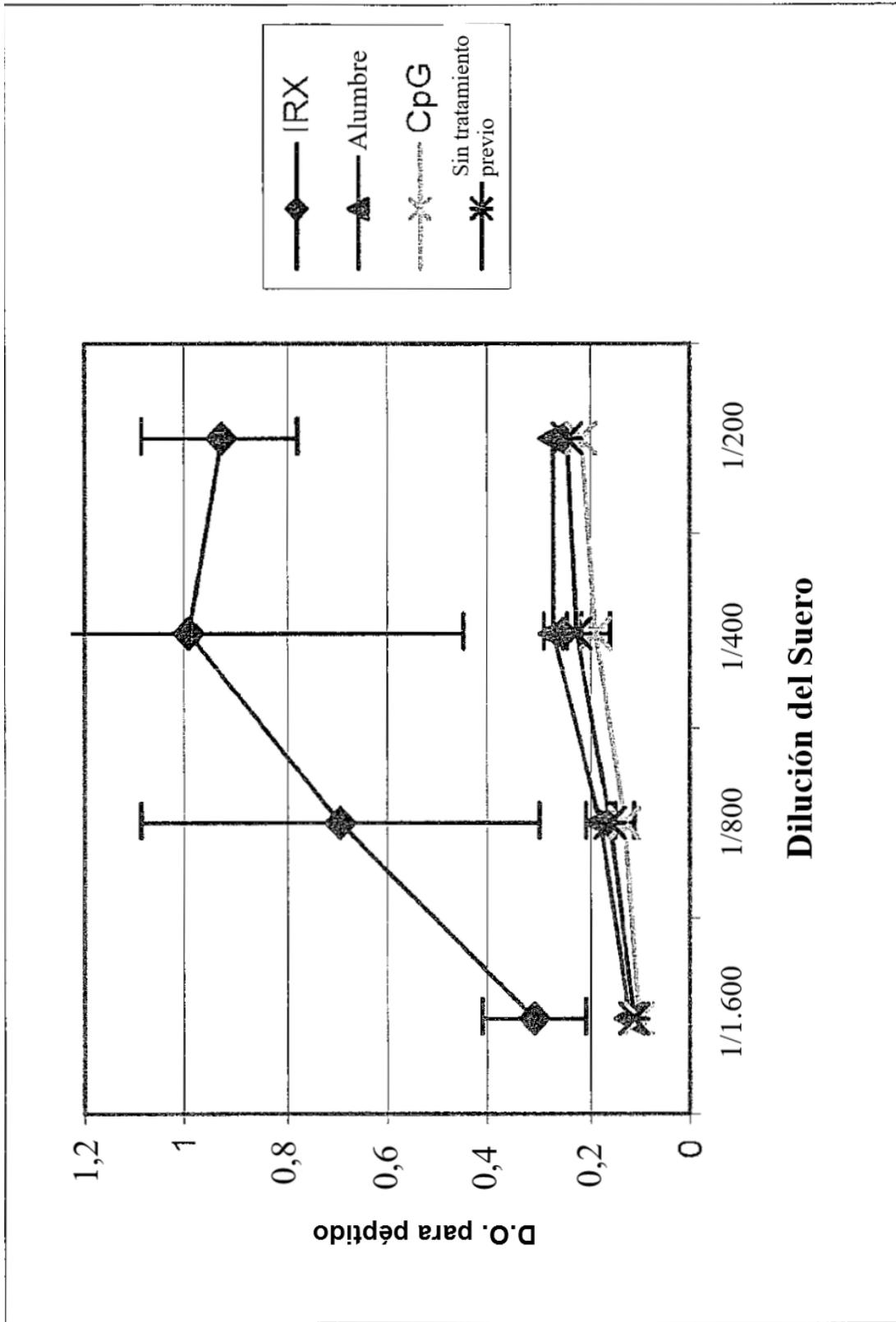
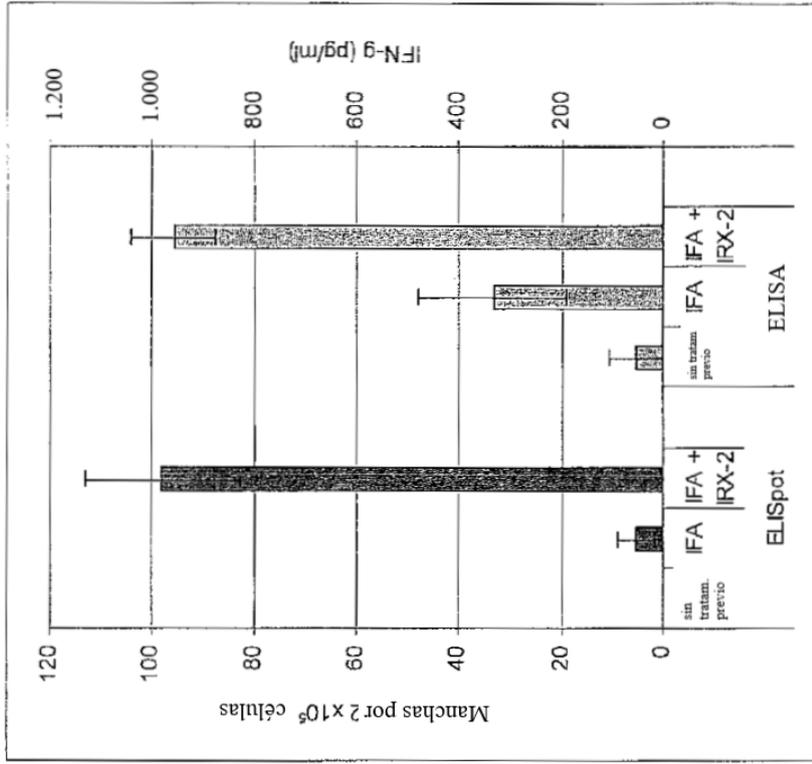


FIGURA 37

B. ELISpot frente a ELISA para Linfocitos del bazo



A. Respuesta ELISpot específica de NFT

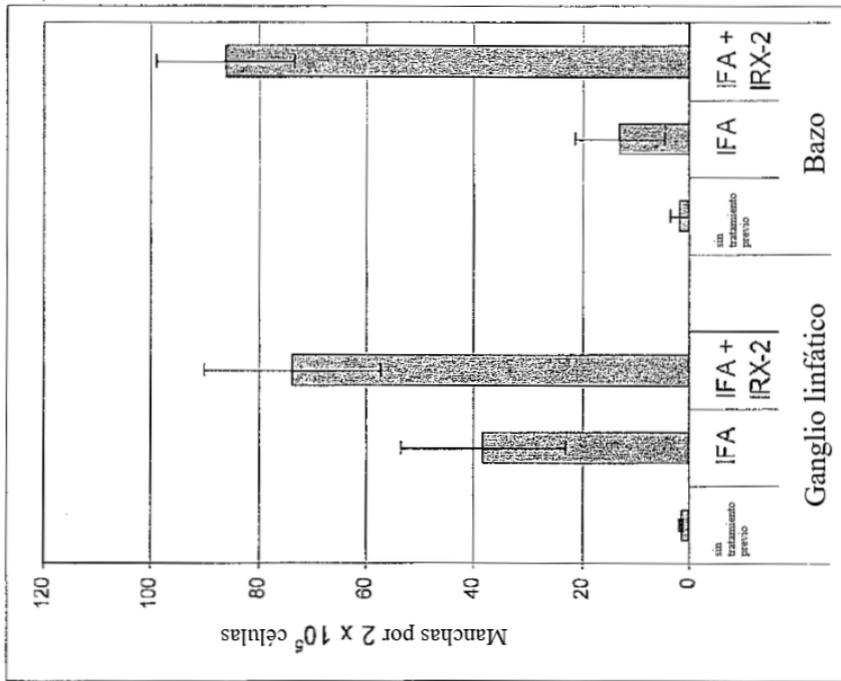


Figura 38

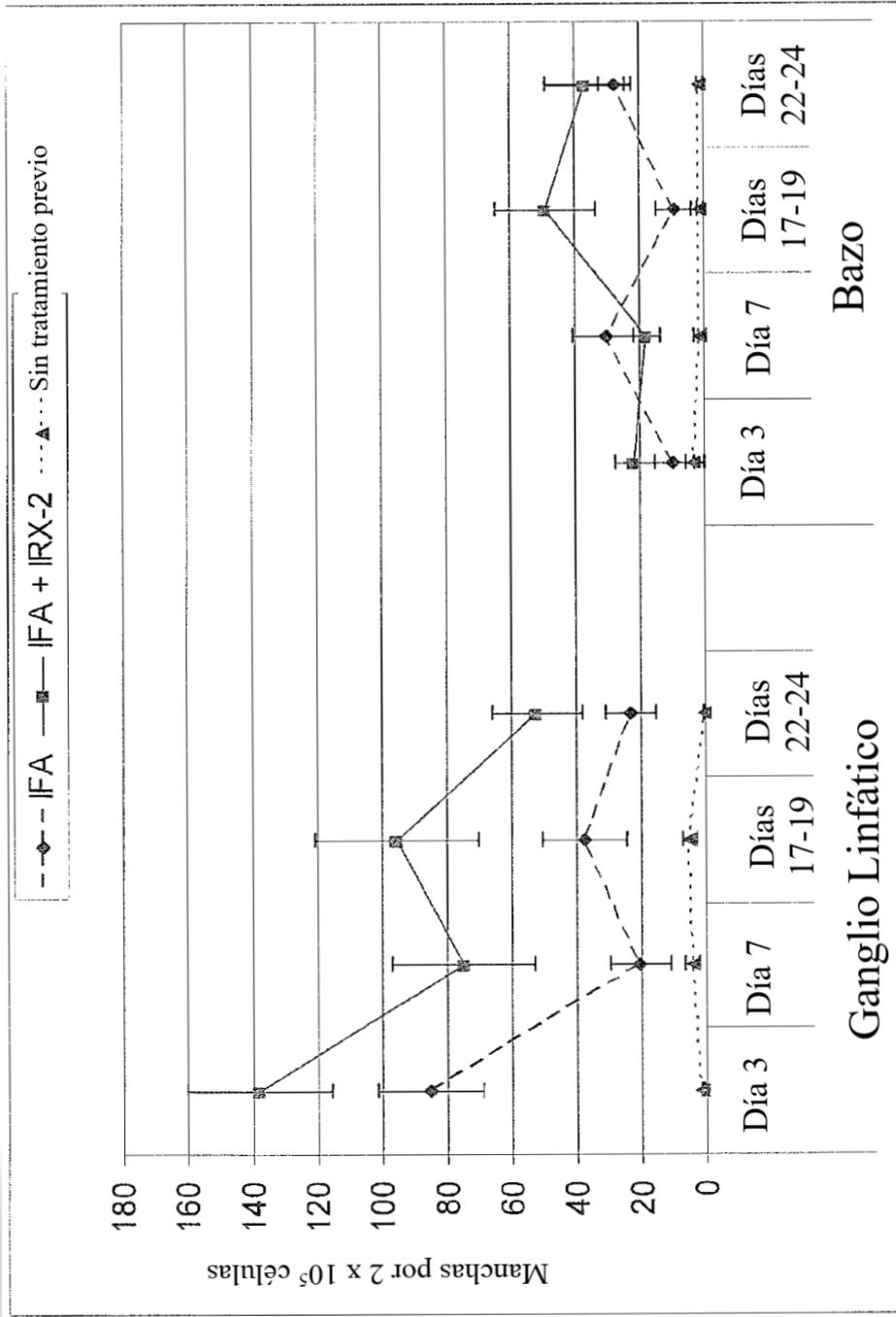
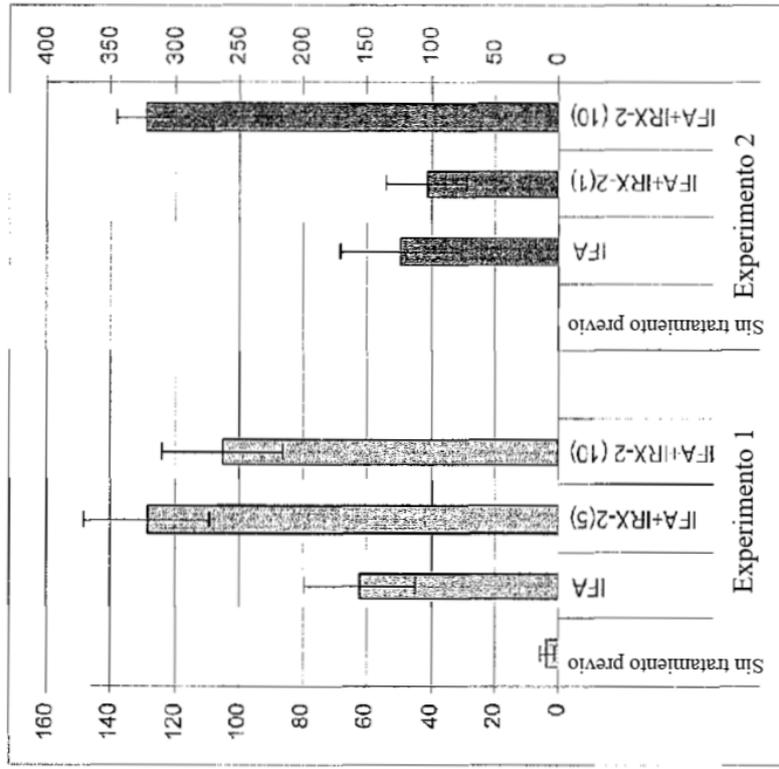


Figura 39

B. Número de administraciones de IRX-2



A. Dosis de IRX-2

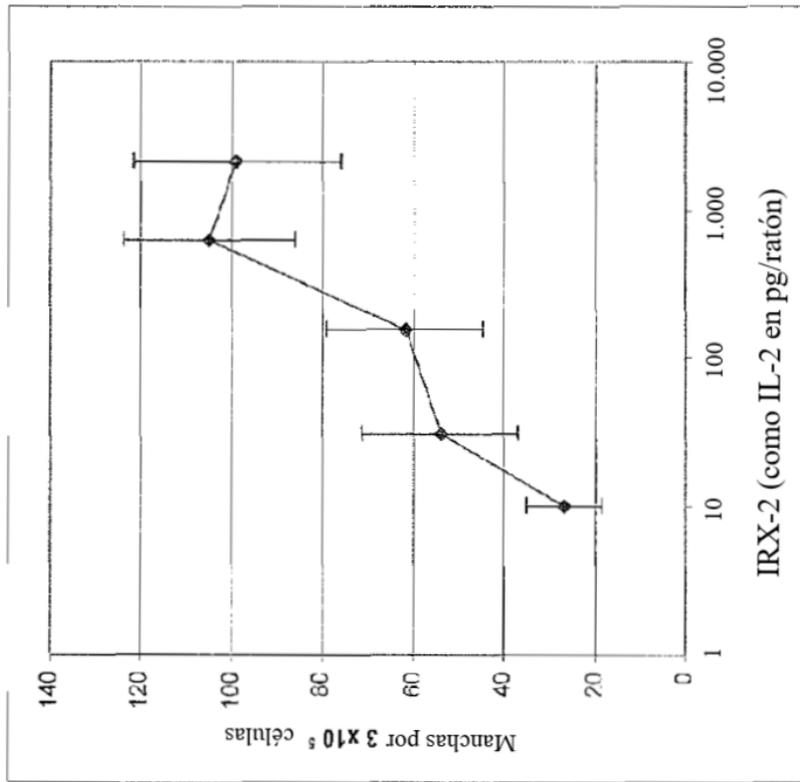
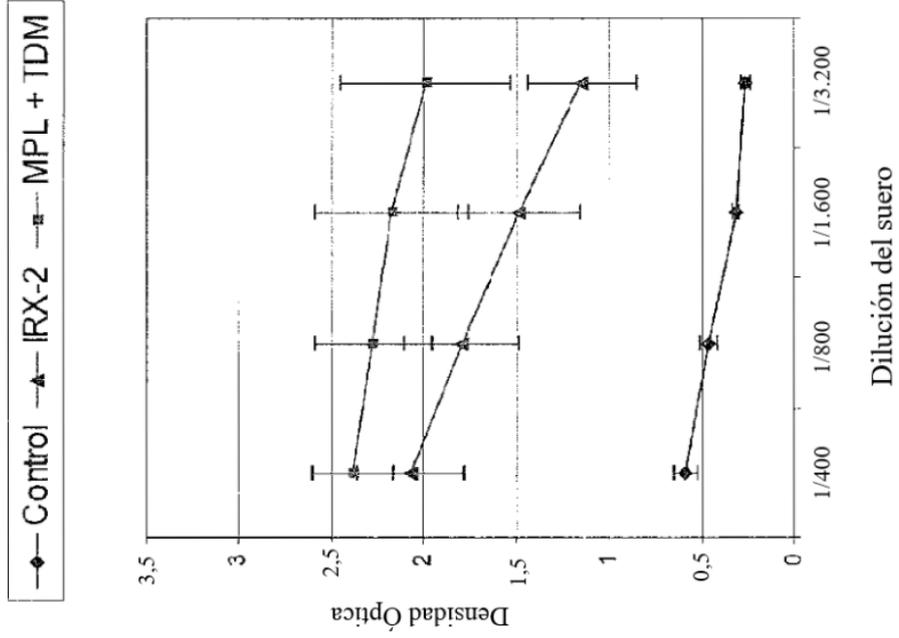


Figura 40

B. Respuesta de anticuerpos de la Ovoalbúmina



A. Respuesta de células T específica del NFT

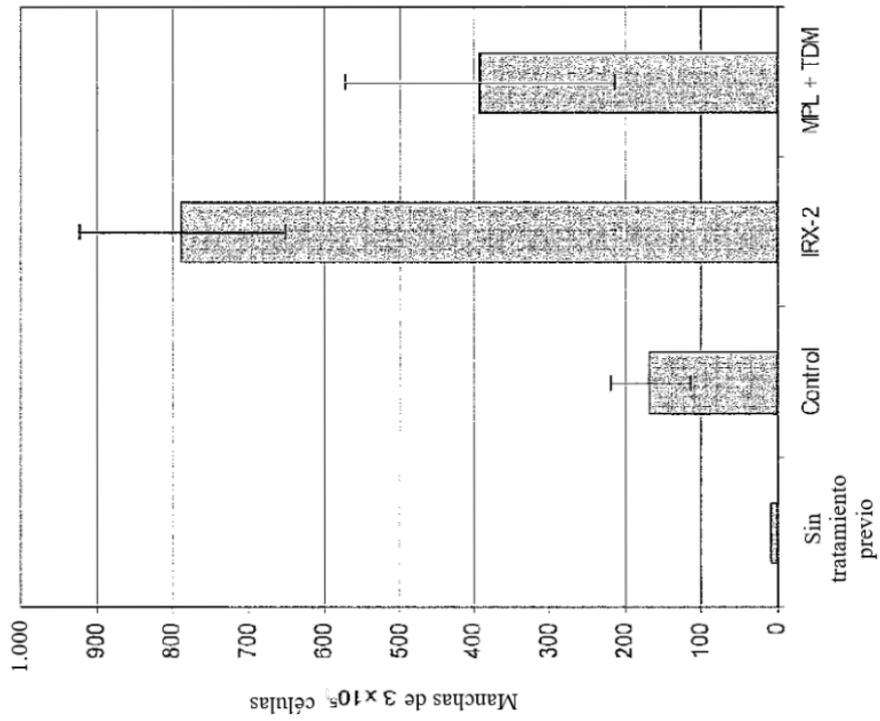


Figura 41

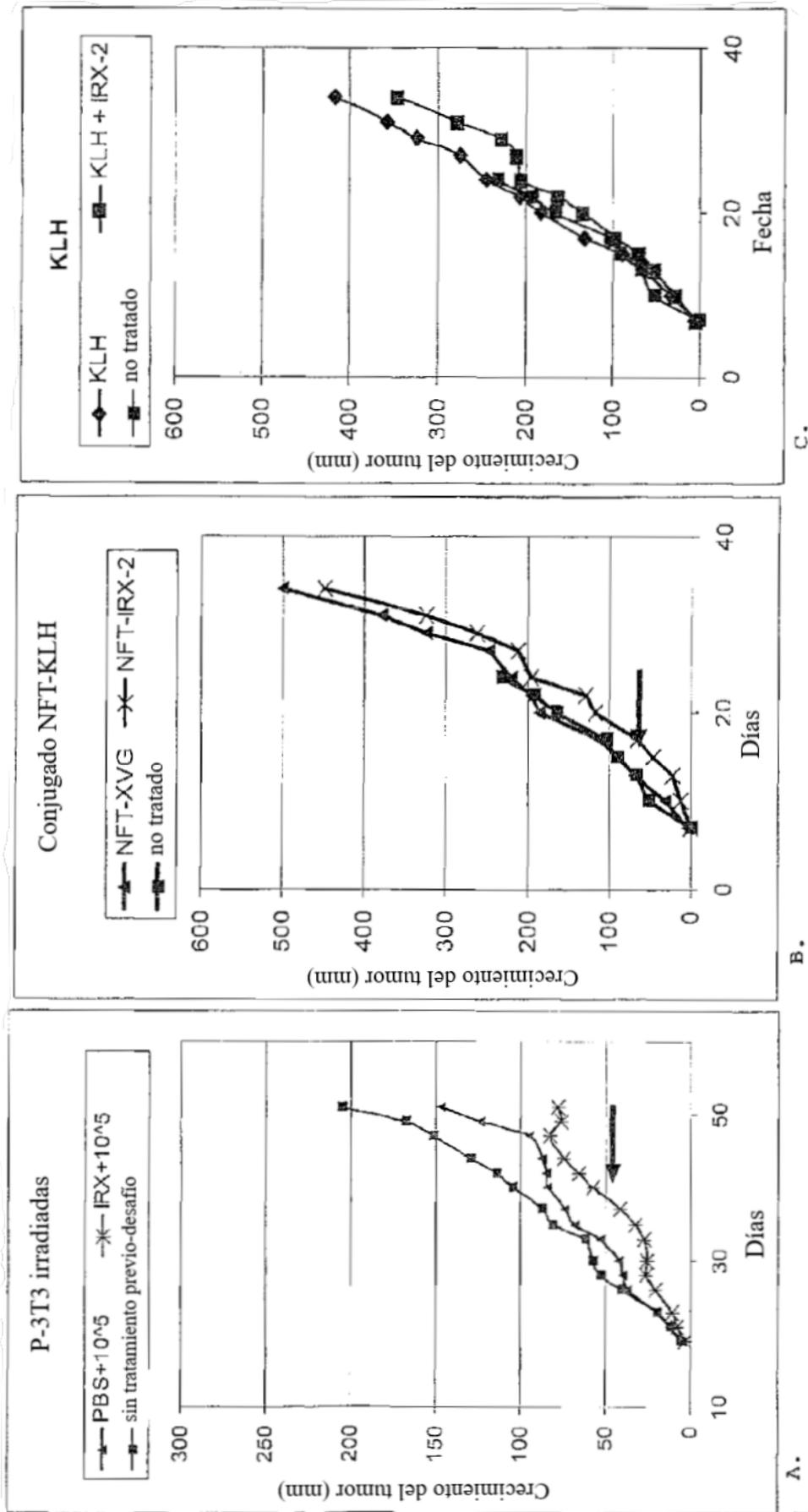


Figura 42

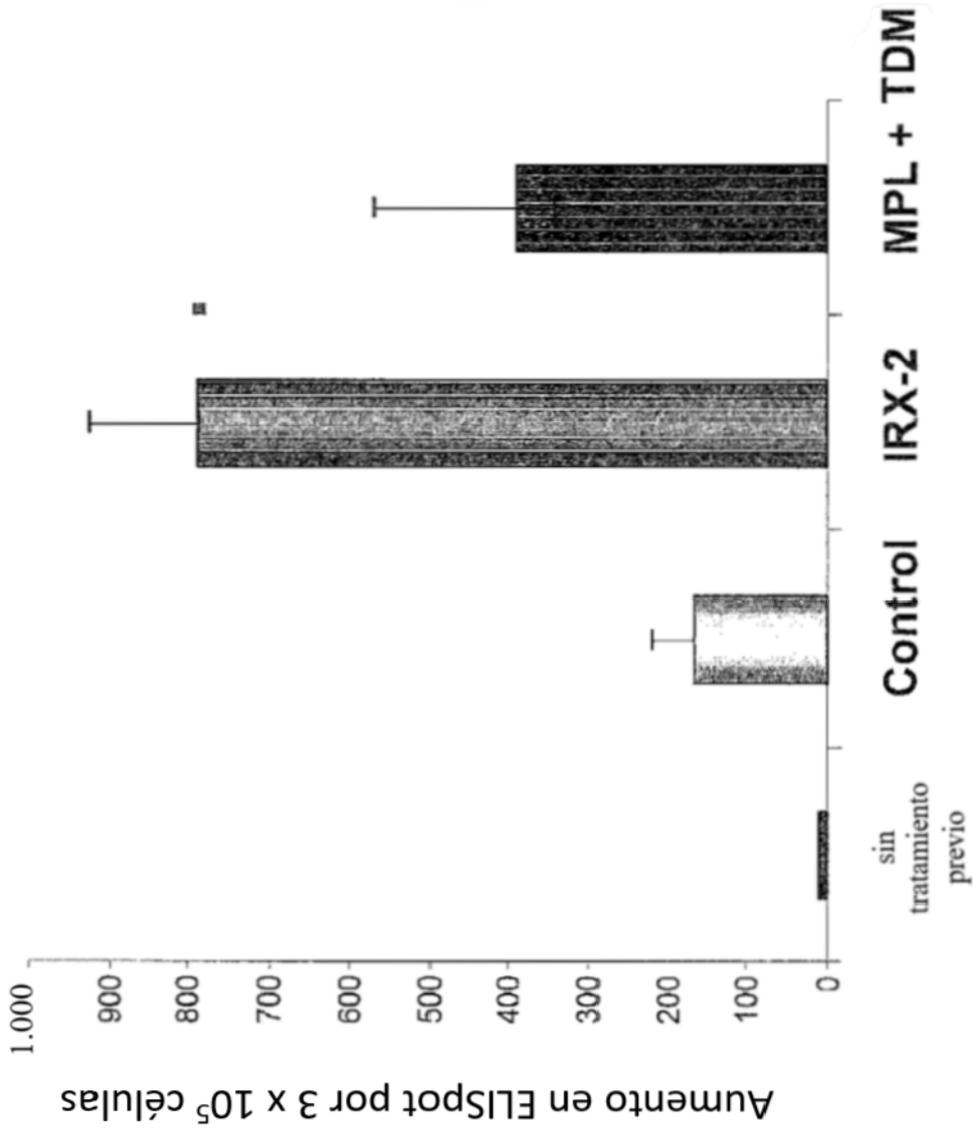


Figura 43

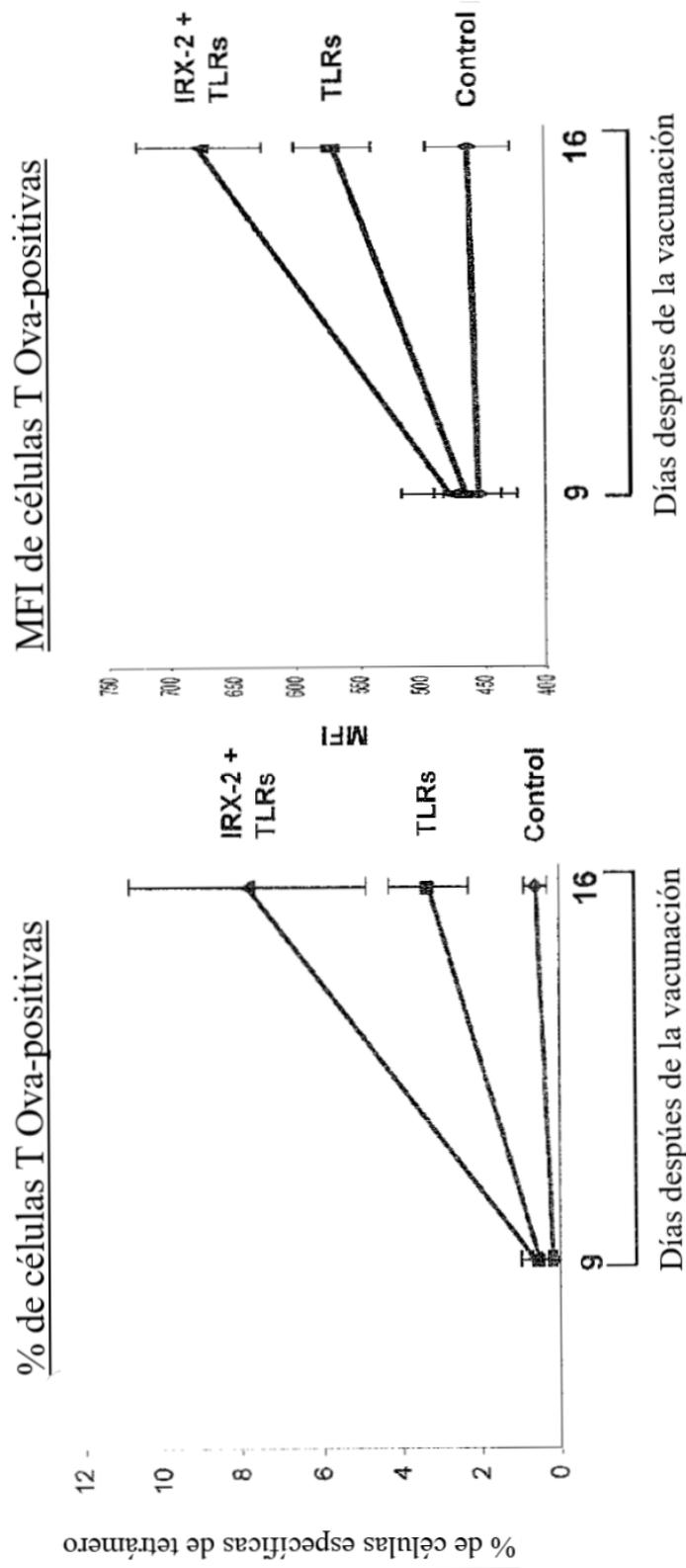
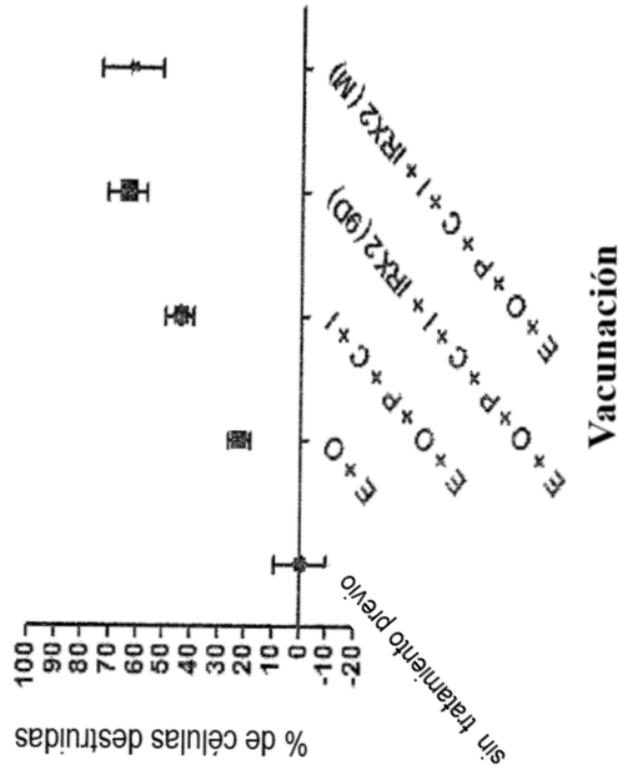


Figura 44

**Ensayo de CTL *in-vivo* con esplenocitos
pulsados con péptido marcado**



- El ensayo muestra *in vivo* la destrucción del 24 % de las células diana en ratones vacunados en ausencia de IRX-2, aumentada hasta el 63 % en ratones vacunados en presencia de IRX-2

Leyenda:
 E = emulsión
 O = péptidos Ova
 P = Poli I:C
 C = CpG
 I = IFN-gamma
 M = IRX-2 incluida en la vacuna

Figura 45

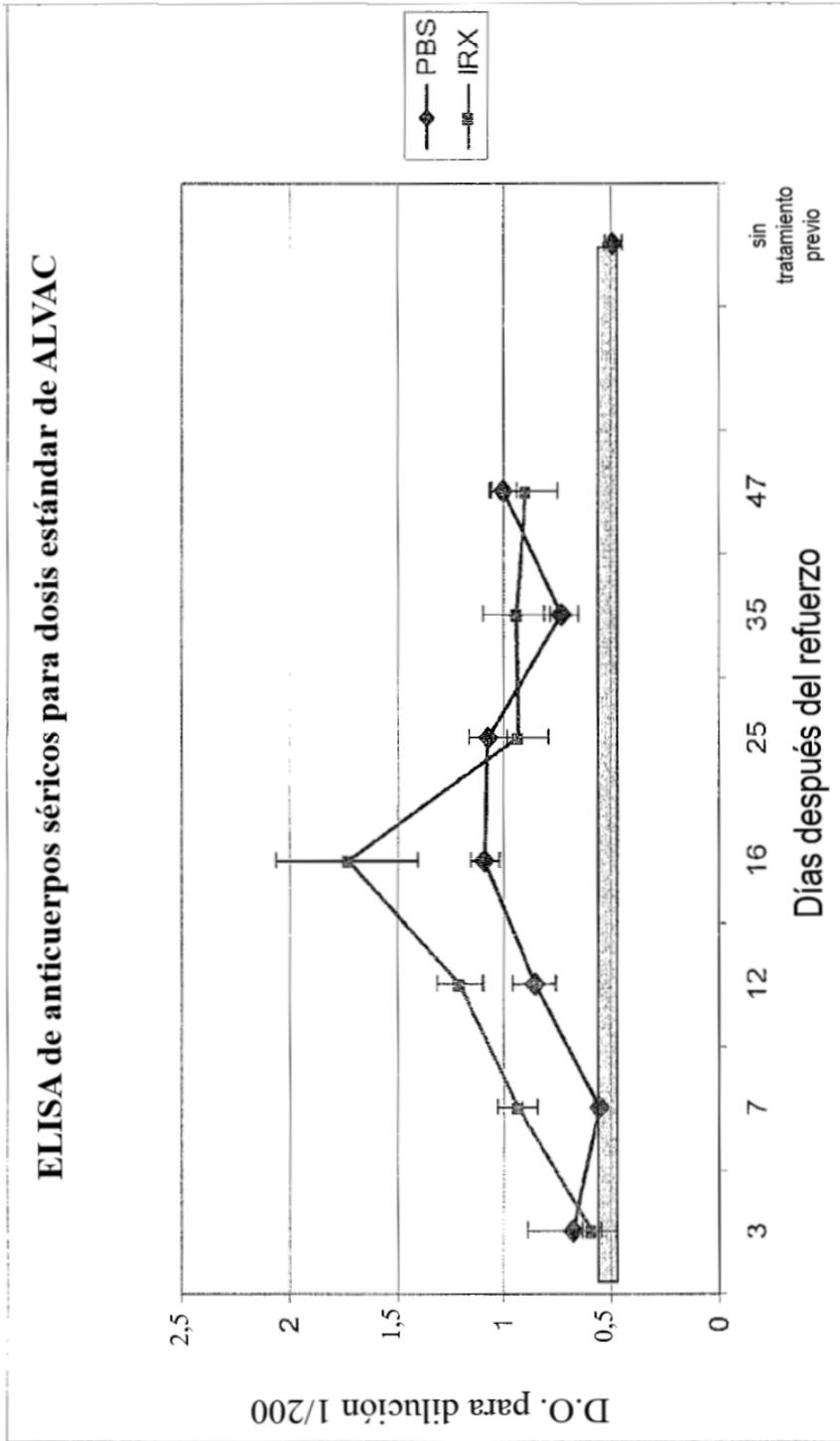


Figura 46

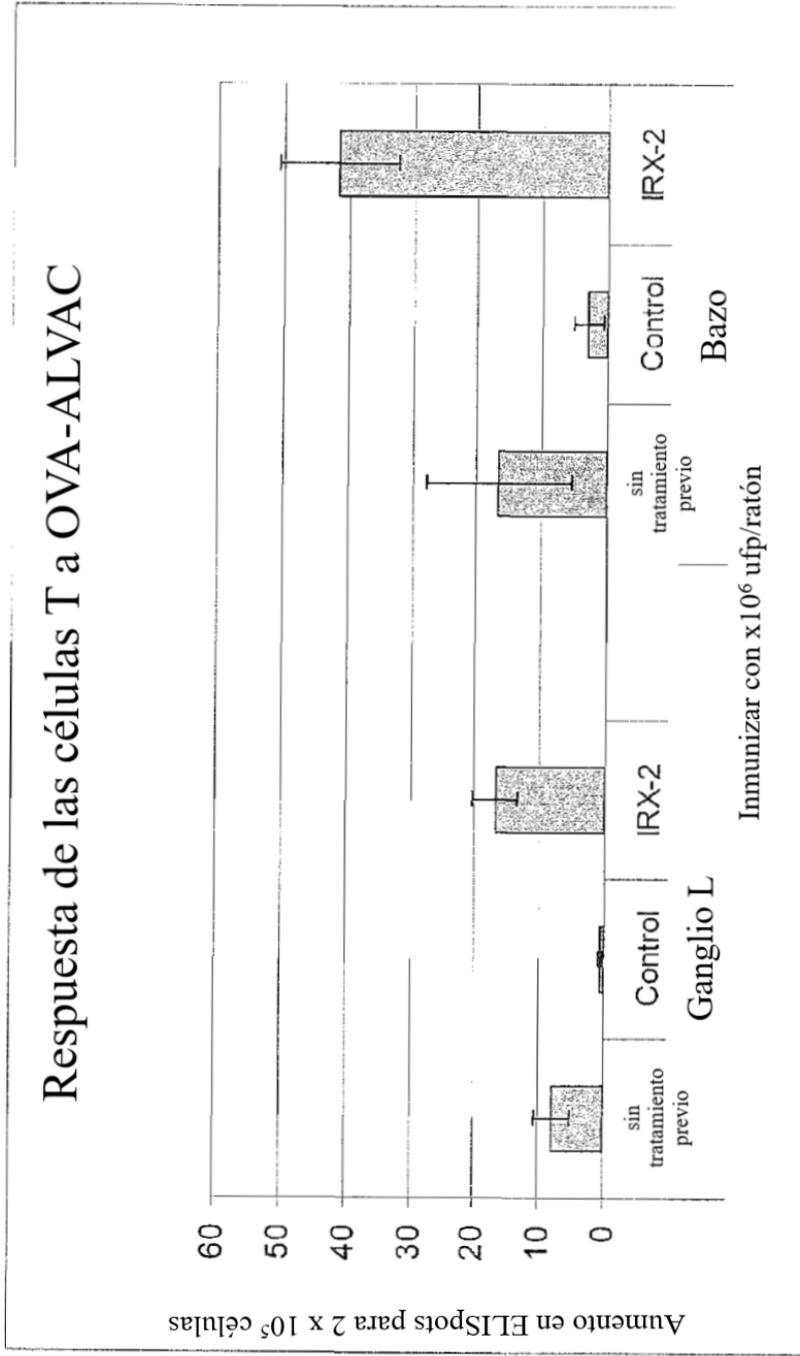


Figura 47

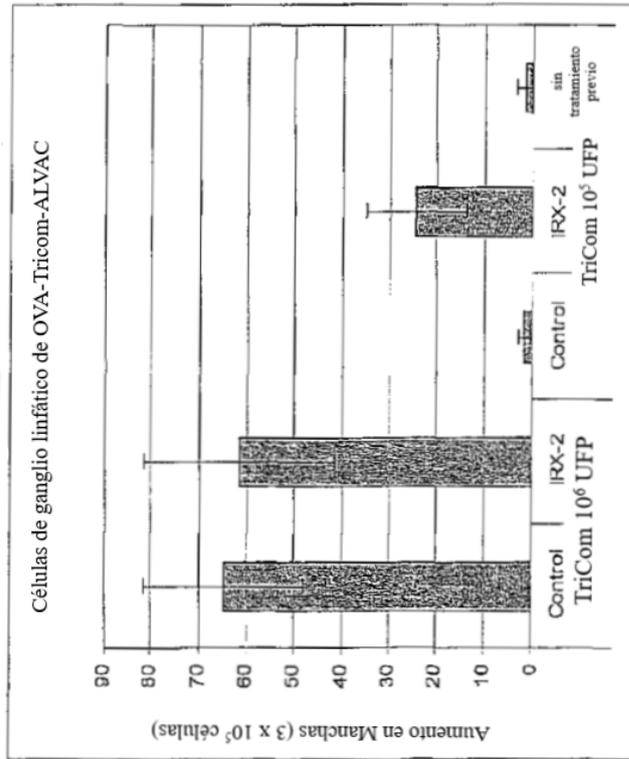
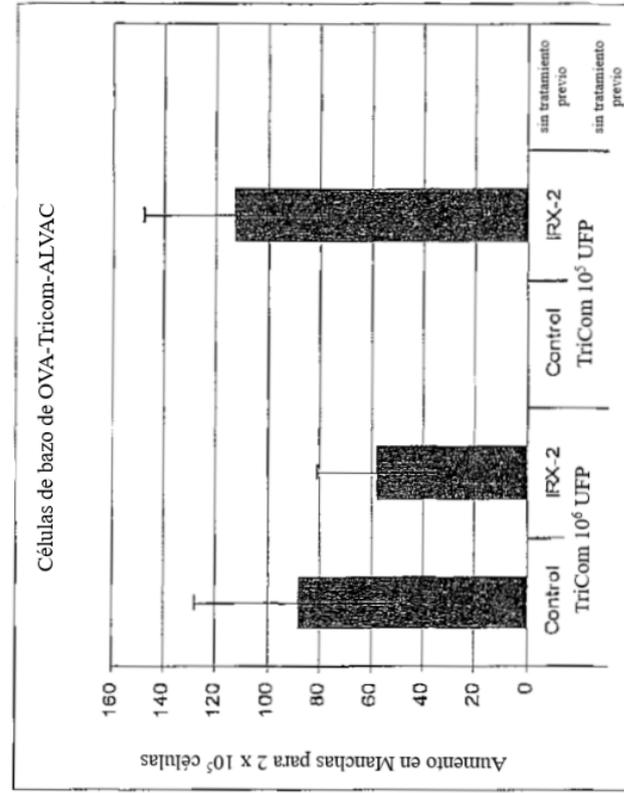


Figura 48

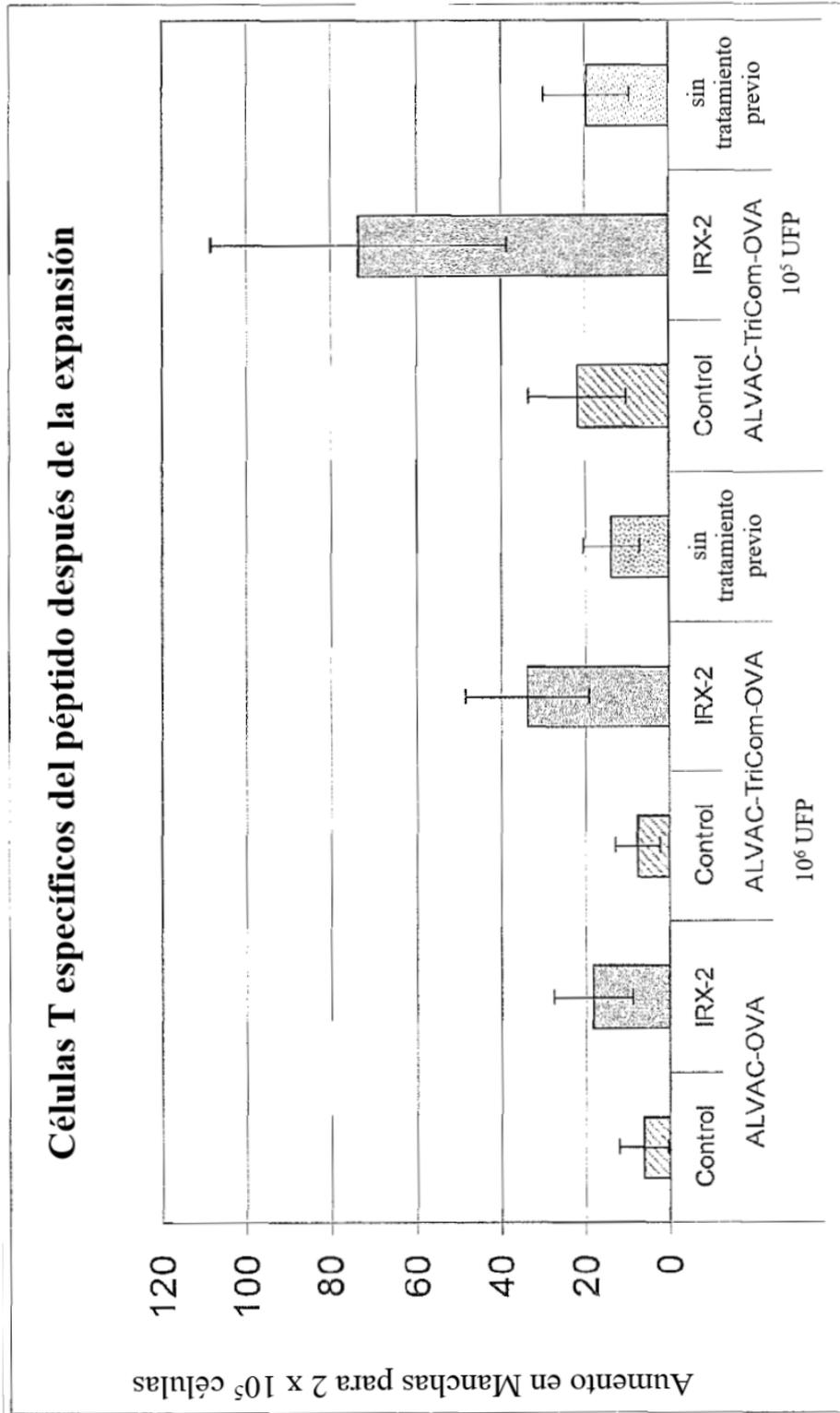


Figura 49

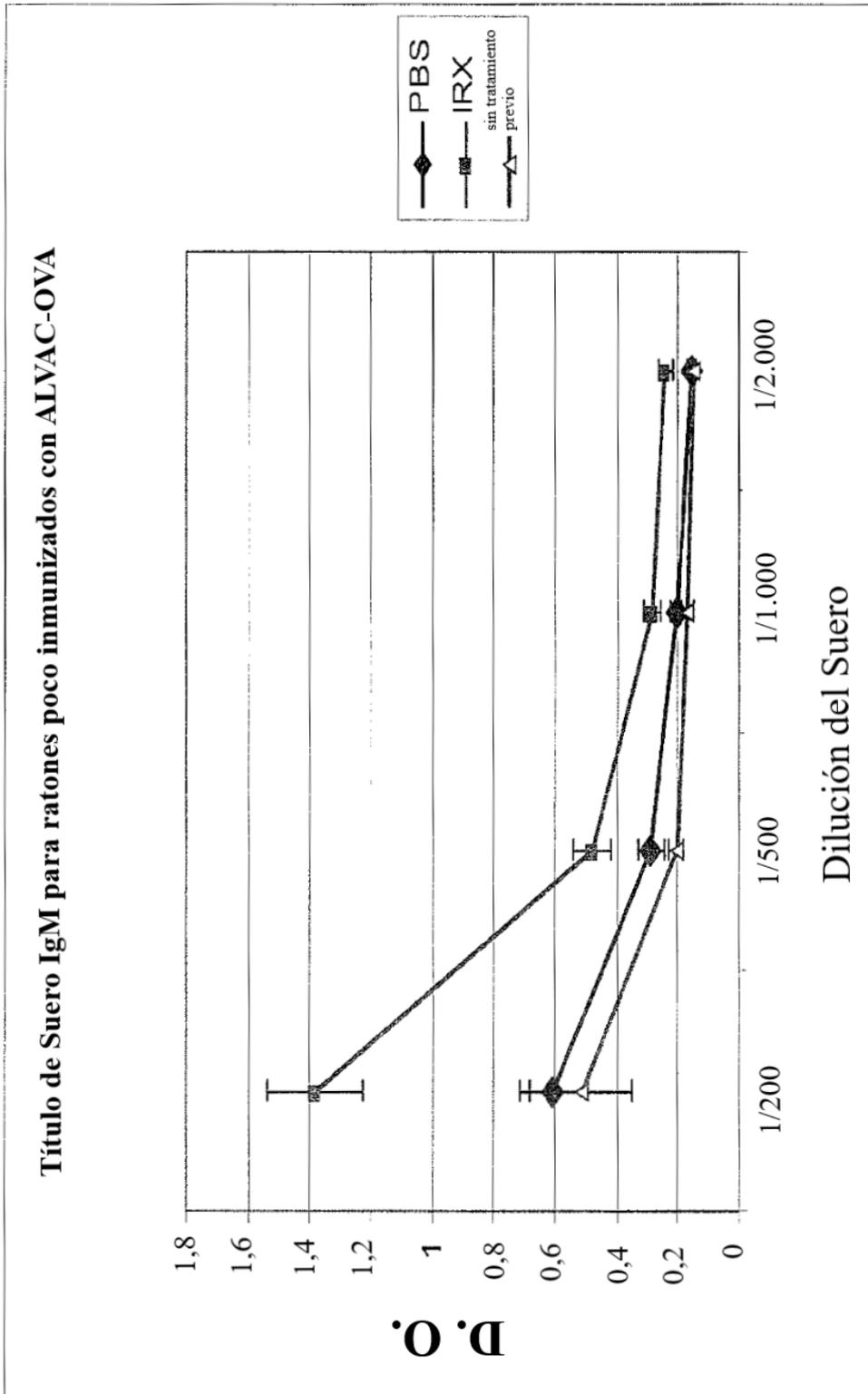


Figura 50

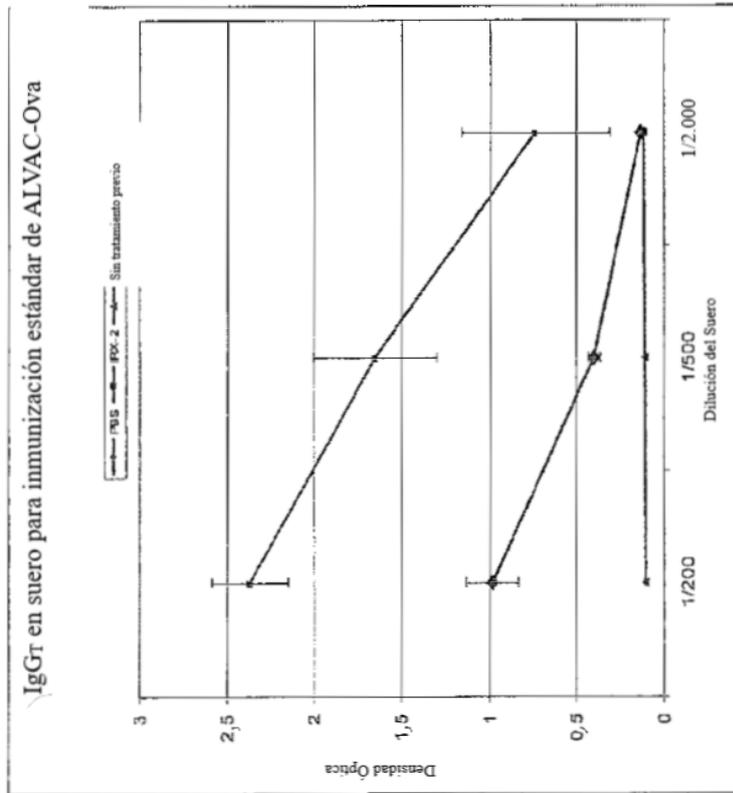
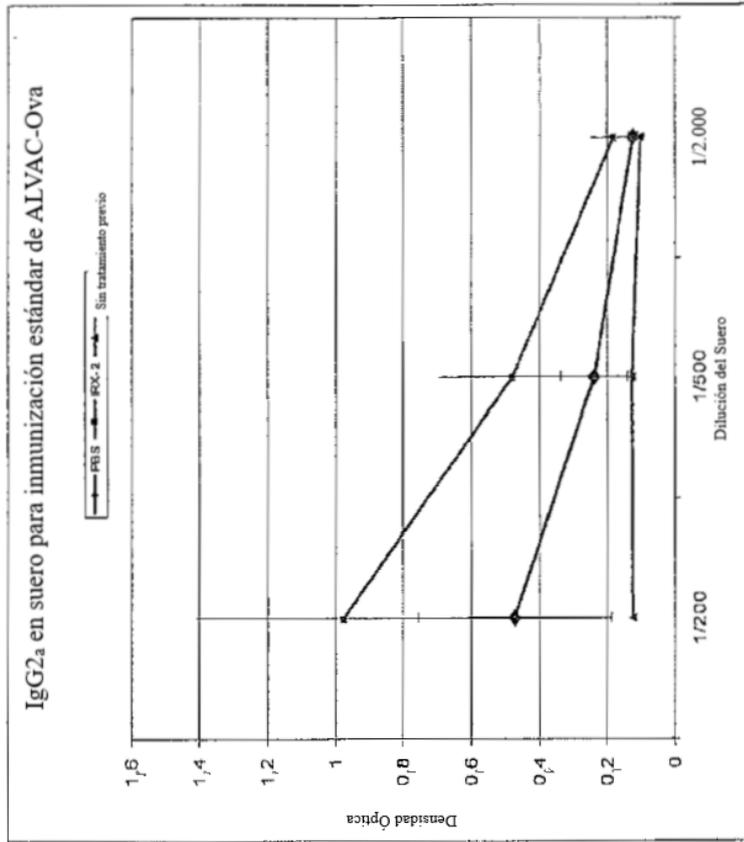


Figura 51