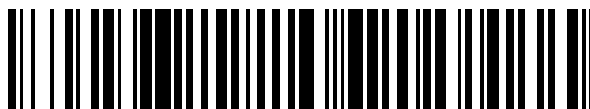


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 622**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 31/675 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2013** **PCT/CA2013/050248**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014** **WO14153636**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2013** **E 13880361 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018** **EP 2978450**

54 Título: **Método para mejorar la eficacia de una vacuna de survivina en el tratamiento de cáncer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
04.03.2019

73 Titular/es:

IMMUNOVACCINE TECHNOLOGIES INC. (100.0%)
130 Eileen Stubbs Avenue, Suite 19
Dartmouth, Nova Scotia B3B 2C4, CA

72 Inventor/es:

MANSOUR, MARC;
BERINSTEIN, NEIL L.;
WEIR, GENEVIEVE MARY y
STANFORD, MARIANNE M.

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 702 622 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para mejorar la eficacia de una vacuna de survivina en el tratamiento de cáncer

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a métodos para tratar cáncer y, en particular, a métodos para mejorar la eficacia de una vacuna de survivina en el tratamiento de cáncer mediante tratamiento previo con un agente que interfiere con la replicación del ADN.

10 Antecedentes de la invención

Las respuestas inmunitarias inducidas por vacunación pueden clasificarse a grandes rasgos en tipos humoral o celular. Se desea normalmente una respuesta humoral para proteger frente a invasores virales o bacterianos, mientras que la inmunidad frente a células infectadas viralmente y células cancerosas implica normalmente una respuesta mediada por células. La inmunidad humoral está tipificada por niveles altos de producción de anticuerpos por células B, mientras que la inmunidad celular está caracterizada por activación aumentada de linfocitos T CD8+ citotóxicos.

Muchas vacunas que se han mostrado prometedoras en desarrollo preclínico no han podido finalmente demostrar beneficio clínico cuando se sometieron a prueba en seres humanos.

En un estudio de fase II que evaluaba el tratamiento con una única dosis baja de ciclofosfamida en combinación con una vacuna que contenía cuatro péptidos modificados por HLA de clase I (Melan-A/MART-1, gp100, NY-ESO-1 y survivina) en pacientes con melanoma temprano (Filipazzi *et al.*, Clin Cancer Res, 18(23): 6485-6496, 2012), se notificó que la vacunación inducía un aumento en células T CD8+ de memoria efectoras específicas en el 75% de los pacientes. Sin embargo, el estudio no incluía una comparación con pacientes que recibían vacuna sin tratamiento con ciclofosfamida. Como tal, no está claro si la ciclofosfamida tenía alguna contribución a la eficacia de la vacuna. Además, los autores notificaron que la frecuencia de células Treg no cambió significativamente tras la administración de ciclofosfamida a dosis baja (página 6489, columna derecha).

En lo que se refiere a vacunas contra el cáncer, la intervención terapéutica es un reto complejo, y muchos aspectos de la enfermedad tal como la cronología de terapia en relación con el patrón de cuidados, estadio y tipo de cáncer tienen todos influencia en el desenlace del tratamiento. Sin embargo, hay tres características de la inmunoterapia que pueden proporcionar un mejor desenlace si se combinan de manera rigurosa:

(1) inmunogenicidad de la vacuna (es decir, adyuvante); (2) selección apropiada de antígenos asociados a tumores y (3) capacidad para superar la inmunosupresión inducida por tumores (Weir *et al.*, Cancer 3: 3114-3142, 2011; Berzofsky *et al.*, Semin Oncol 39(3): 348-357, 2012).

40 Sumario de la invención

Los solicitantes han descubierto ahora que la eficacia de una vacuna contra el cáncer (es decir, una vacuna de survivina) puede mejorarse con la administración previa de al menos dos dosis de un agente que interfiere con la replicación del ADN.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención se refiere a una combinación para mejorar la eficacia de una vacuna en el tratamiento de cáncer en un sujeto, siendo dicha combinación tal como se define en la reivindicación 1 adjunta.

En una realización de la presente invención, el agente que interfiere con la replicación del ADN se administra al sujeto diariamente durante siete días consecutivos cada catorce días (es decir, tratamiento semanal alterno). En una realización, este tratamiento semanal alterno con el agente que interfiere con la replicación del ADN empieza aproximadamente una semana antes de la primera administración de la vacuna de survivina.

En una realización de la presente invención, la vacuna de survivina se administra al sujeto una vez cada tres semanas.

En la presente invención, el agente que interfiere con la replicación del ADN es el agente alquilante, ciclofosfamida.

En una realización de la presente invención, la vacuna de survivina es una vacuna que comprende uno o más antígenos peptídicos de survivina que tienen la secuencia de aminoácidos: FEELTLGEF (SEQ ID NO: 1); FTELTLGEF (SEQ ID NO: 2); LTLGEFLKL (SEQ ID NO: 3); LMLGEFLKL (SEQ ID NO: 4); RISTFKNWPF (SEQ ID NO: 5); RISTFKNWPK (SEQ ID NO: 6); STFKNWPFL (SEQ ID NO: 7) y LPPAWQPFL (SEQ ID NO: 8).

En una realización de la presente invención, la vacuna de survivina es la vacuna DPX-Survivac inmunoterapéutica

anticancerígena candidata de Immunovaccine, Inc. DPX-Survivac comprende cinco antígenos peptídicos de survivina sintéticos que tienen las secuencias de aminoácidos: FTELTGGEF (SEQ ID NO: 2), LMLGEFLKL (SEQ ID NO: 4), RISTFKNWPK (SEQ ID NO: 6), STFKNWPFLL (SEQ ID NO: 7) y LPPAWQPFL (SEQ ID NO: 8); un epítipo universal de células T auxiliares de toxoide tetánico (AQYIKANSKFIGITEL; SEQ ID NO: 9); un adyuvante de polinucleótido poli I:C; liposomas que consisten en DOPC y colesterol y el portador hidrófobo Montanide® ISA 51 VG.

Otros aspectos y características de la presente invención resultarán evidentes para los expertos habituales en la técnica tras la revisión de la siguiente descripción de realizaciones específicas de la invención conjuntamente con las figuras acompañantes.

Breve descripción de las figuras

En las figuras, que ilustran realizaciones de la invención sólo a modo de ejemplo:

La figura 1 ilustra un diseño de ensayo clínico de fase I para evaluar la seguridad e inmunogenicidad de DPX-Survivac. La vacuna se administró cada tres semanas (3 vacunaciones separadas aproximadamente 21 días) con o sin administración oral de ciclofosfamida a dosis baja (50 mg dos veces al día, Baxter) entre los días de estudio -7 y +49. La ciclofosfamida a dosis baja se administró diariamente durante 7 días consecutivos cada 14 días. La ciclofosfamida se inició una semana antes de la primera vacunación. Los pacientes recibieron o bien (1) tres administraciones de 0,5 ml de DPX-Survivac (cohorte A), (2) tres administraciones de 0,1 ml de DPX-Survivac en combinación con ciclofosfamida a dosis baja tal como se explicó resumidamente (cohorte B) o bien (3) tres administraciones de 0,5 ml de DPX-Survivac en combinación con ciclofosfamida a dosis baja tal como se explicó resumidamente (cohorte C). Se recogieron muestras de sangre antes de la primera vacunación (nivel inicial) y aproximadamente 3-4 semanas tras cada vacunación para aislar y crioconservar células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Se recogieron también muestras de sangre en puntos de tiempo posteriores cuando fue posible. Se usaron PBMC para ensayos inmunológicos incluyendo ELISPOT y ensayos basados en citometría de flujo tales como tinción de tetrámeros y tinción de citocina intracelular (ICS).

La figura 2 proporciona resultados de detección de ELISPOT y muestra el aumento inducido por DPX-Survivac en la producción de interferón gamma en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con cáncer ovárico vacunados. Se estimularon las PBMC del sujeto durante la noche con péptidos de survivina en un ensayo de ELISPOT de IFN- γ . Los datos presentados representan el número de unidades formadoras de puntos (UFP) por millón de PBMC de sujetos individuales y las líneas representan valores medios en el nivel inicial y tras una, dos y tres dosis de administración de vacuna.

La figura 3 proporciona un resumen de factores de estimulación que representan el aumento en veces en células que secretan IFN-gamma para pacientes en relación con respuestas inmunitarias de nivel inicial en estos pacientes. Los factores de estimulación se calcularon usando los resultados de ELISPOT disponibles. Se excluyeron del análisis muestras con fondo alto no explicado en ELISPOT en ausencia de estimulación con péptido. Se requirió un factor de estimulación mínimo de 2x para considerar a un paciente como paciente que responde al tratamiento inmunitario en un punto de tiempo dado.

La figura 4 proporciona resultados de detección de ELISPOT y muestra el aumento inducido por DPX-Survivac en la producción de IFN-gamma en las PBMC de pacientes con cáncer ovárico vacunados. Se estimularon las PBMC del sujeto durante la noche con péptidos de survivina en un ensayo de ELISPOT de IFN- γ . Los datos presentados representan el número de unidades formadoras de puntos (UFP) por millón de PBMC de sujetos individuales.

La figura 5 ilustra los resultados de tinción de multímeros de CMH del sujeto representativo 02-04. Se sometieron a prueba células mononucleares de sangre periférica para detectar la presencia de células T CD8+ específicas de péptido por su capacidad para unirse a reactivos de multímeros de CMH (tetrámeros) diseñados usando el péptido de DPX-Survivac y la correspondiente molécula de CMH. Se realizó el ensayo o bien en PBMC no estimuladas (*ex vivo*) o bien estimuladas 10 días *in vitro* en presencia de péptido(s) de survivina de HLA coincidente. El multímero de CMH irrelevante basado en péptido de VIH sirvió como control negativo. Las figuras mostradas representan el porcentaje de células T CD8+ en muestras de PBMC tras la vacunación, que se unen específicamente a reactivos de multímeros de CMH. Se detectaron células T específicas usando citometría de flujo en donde se separaron PBMC en células vivas CD3+, con el fin de mostrar células doblemente positivas para CD8+ y la unión a tetrámeros.

Figura 6: Detección de un aumento inducido por DPX-Survivac en células T CD8+ en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con cáncer ovárico vacunados. Se sometieron a prueba PBMC del sujeto para detectar la presencia de células T CD8+ específicas de péptido por su capacidad para unirse a reactivos de multímeros de CMH (tetrámeros) diseñados usando el péptido de DPX-Survivac y la correspondiente molécula de CMH. Se realizó la valoración o bien en PBMC no estimuladas (*ex vivo*) o bien estimuladas 10 días *in vitro* en presencia de péptido(s) de survivina de HLA coincidente. Los datos presentados representan el porcentaje de células T CD8+ en la sangre periférica de sujetos individuales en el nivel inicial (círculos), tras 1 dosis (triángulos), 2 dosis (rombos) y 3 dosis (cuadrados).

La figura 7 ilustra análisis basados en tetrámeros y ELISPOT de respuestas inmunitarias y reactividad frente a secuencias de péptido de survivina nativas no modificadas o modificadas con aminoácido únicas, que demuestran la capacidad de las respuestas inmunitarias inducidas por la vacuna para reconocer tanto péptidos de survivina modificados como no modificados.

Descripción detallada

Los cánceres avanzados utilizan varios mecanismos para escapar de la detección y destrucción mediadas por el sistema inmunitario, reduciendo de ese modo la efectividad de agentes terapéuticos contra el cáncer en múltiples niveles.

La inmunosupresión inducida por tumores es una de las señas de identidad del cáncer y un obstáculo significativo para cualquier inmunoterapia para el cáncer, incluyendo vacunas de péptidos (Hanahan y Weinberg, Cell, 144(5): 646-674, 2011). A medida que se desarrollan, los tumores se adaptan para evitar y escapar de la detección inmunitaria a través de varios mecanismos. El microentorno tumoral, por ejemplo, regula por incremento muchos factores que promueven el desarrollo de células inmunosupresoras, tales como células T reguladoras CD4⁺FoxP3⁺ (Treg) (Curiel *et al.*, Nat Med 10(9): 942-949, 2004) y células supresoras de origen mielóide (MDSC) (Nagaraj y Gabrilovich, Cancer Res 68(8): 2561-3, 2008). El microentorno tumoral también contribuye a la supresión directa de células T CD8⁺ activadas liberando citocinas inmunosupresoras tales como TNF- β (Yang *et al.*, Trends Immunol 31(6): 220-227, 2010). Otros mecanismos de escape tumoral que responden a la presión inmunitaria son inmunoeedición, regulación por disminución de CMH de clase I y alteraciones en la presentación y el procesamiento de antígenos. Por tanto, es imperativo que células T CD8⁺ inducidas por vacuna tengan la oportunidad de reconocer y destruir rápidamente células tumorales antes de que tengan una oportunidad para adaptarse. El uso de agentes inmunomoduladores para contrarrestar la inmunosupresión inducida por tumores podría mejorar la eficacia de vacunas contra el cáncer (Yong *et al.*, JBiomed Biotechnol 2012: 605045).

La presente invención se refiere al tratamiento de cáncer en un sujeto mediante administración combinada de un agente que interfiere con la replicación del ADN y una vacuna de survivina.

La survivina, una proteína implicada en la regulación negativa de la apoptosis, está altamente expresada en muchos tipos de tumores y tiene valor de pronóstico notificado. Tal como se usa en el presente documento, "vacuna de survivina" pretende abarcar cualquier vacuna o medio de suministro de antígenos para administrar uno o más de los antígenos de survivina descritos en el presente documento a un sujeto. Realizaciones a modo de ejemplo de tales "vacunas de survivina" se describen en el presente documento; sin embargo, el experto en la técnica apreciará que se abarca cualquier vacuna o medios para suministrar antígenos a un sujeto.

Realizaciones de la presente invención se refieren a mejorar la eficacia de una vacuna (es decir, vacuna de survivina) en el tratamiento de cáncer mediante administración previa de al menos dos dosis de un agente que interfiere con la replicación del ADN.

En una realización particular por tanto, la invención se refiere a una combinación para mejorar la eficacia de una vacuna en el tratamiento de cáncer en un sujeto, siendo dicha combinación tal como se define en la reivindicación 1 adjunta.

Tal como se usa en el presente documento, "mejorar la eficacia de vacuna" o "mejorar la eficacia de una vacuna" o similares se refiere a cualquier cambio o alteración en la respuesta inmunitaria de un sujeto que puede hacer que la vacuna de survivina de la invención sea más eficaz en el tratamiento de cáncer. En algunas realizaciones, esto puede implicar acelerar la aparición de una respuesta inmunitaria y/o mejorar la persistencia o fuerza de una respuesta inmunitaria a la vacuna de survivina. La respuesta inmunitaria puede ser o bien una respuesta inmunitaria mediada por células o bien una respuesta inmunitaria humoral.

En la presente invención, un agente que interfiere con la replicación del ADN puede "mejorar la eficacia de la vacuna" potenciando o bien directamente o bien indirectamente la respuesta inmunitaria frente al antígeno de survivina en la vacuna. Esto puede lograrse, por ejemplo, reduciendo el número y/o la actividad de células inmunosupresoras. Se ha notificado que el microentorno tumoral, por ejemplo, regula por incremento muchos factores que promueven el desarrollo de células inmunosupresoras, tales como células T reguladoras CD4⁺FoxP3⁺ (Treg) (Curiel *et al.*, Nat Med 10(9): 942-949, 2004), células supresoras de origen mielóide (MDSC) (Nagaraj y Gabrilovich, Cancer Res 68(8): 2561-3, 2008) y células B CD19⁺CD5⁺CD1d^{hi}IL-10⁺ (Breg) (Balkwill *et al.*, Trends Immunol., 03 de diciembre de 2012, 10.1016/j.it.2012.10.007 (pub. elec. antes de la edición impresa)). Por tanto, la capacidad para reducir el número o la actividad de estas células inmunosupresoras representa una realización para mejorar la eficacia de vacuna.

"Mejorar la eficacia de una vacuna" también puede cumplirse, por ejemplo, aumentando el número y/o la actividad de células T CD8⁺ específicas de antígeno. A este respecto, se ha notificado que el microentorno tumoral, por ejemplo, contribuye a la supresión directa de células T CD8⁺ activadas liberando citocinas inmunosupresoras tales como

TNF- β (Yang *et al.*, Trends Immunol 31(6): 220-227, 2010). Por tanto, la capacidad para aumentar la actividad de células T CD8+ específicas de antígeno representa un posible mecanismo para mejorar la eficacia de vacuna. Un aumento en células T CD8+ específicas de antígeno puede ser el resultado de un número aumentado de tales células, actividad aumentada de tales células y/o la generación de una población enriquecida de células T CD8+ específicas de antígeno en relación con células T CD8+ totales, tal como por ejemplo mediante una disminución relativa en células T CD8+ totales.

Más generalmente, "mejorar la eficacia de una vacuna" se refiere a la capacidad de la invención para potenciar la inmunogenicidad de la vacuna, o bien potenciando una respuesta inmunitaria mediada por células o bien una respuesta inmunitaria humoral inducida por la vacuna; aumentar el número de células inmunitarias en un sitio de vacunación o un sitio tumoral; o mejorar un efecto terapéutico proporcionado por la vacuna de la invención, tal como potenciando el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de cáncer y/o aliviando, retrasando o inhibiendo la progresión de síntomas de enfermedad. La mejora de la eficacia de una vacuna también puede asociarse con una calidad de vida mejorada o una mortalidad disminuida, en comparación con el tratamiento de monoterapia.

"Mejorar la eficacia de una vacuna" también puede significar que son necesarias dosis inferiores de los principios activos de la combinación de la invención para producir el resultado deseado. Esto engloba tanto realizaciones en las que las propias dosificaciones son más pequeñas como realizaciones en las que la vacuna, y/o el agente que interfiere con la replicación del ADN, se aplican de manera menos frecuente.

Varios agentes quimioterápicos han demostrado actividad inmunomoduladora cuando se usaron a dosis bajas, no citotóxicas (Zitvogel *et al.*, Nat Rev Immunol 8(1): 59-73, 2008; Liu y Dalglish, Semin Oncol/39(3): 340-347, 2012). La ciclofosfamida fue uno de los primeros agentes inmunomoduladores descritos y tiene múltiples efectos sobre el sistema inmunitario cuando se usa a una fracción de la dosis comúnmente usada por sus efectos citotóxicos (Sistigu *et al.*, Semin Immunopathol 33(4): 369-383, 2011). Se ha notificado ciclofosfamida a dosis baja para reducir selectivamente y alterar la funcionalidad de Treg (Lutsiak *et al.*, Blood 105(7):2862-2868, 2005), inhibir la angiogénesis tumoral (Browder *et al.*, Cancer Res 60(7):1878-1886, 2000), aumentar la activación de células dendríticas (Radojic *et al.*, Cancer Immunol Immunother 59(1): 137-148, 2009) y desviar la respuesta inmunitaria hacia Th1 (Schiavoni *et al.*, Blood 95(6):2024-2030, 2000). En ratones, los efectos de una única administración de dosis baja en bolo de ciclofosfamida son transitorios, alcanzando normalmente el punto más bajo en el plazo de 4 días tras la administración y regresando a la normalidad en 7-10 días (Lutsiak *et al.*, Blood 105(7):2862-2868, 2005).

Cuando se usa en combinación con vacunas contra el cáncer, la ciclofosfamida a dosis baja se administra normalmente como una única inyección i.v. en bolo de aproximadamente 100-300 mg/m² en seres humanos (en contraposición a la dosis quimioterápica de 1-5 g/m²) de uno a tres días antes de la vacunación (Audia *et al.*, Clin Exp Immunol 150(3):523-530, 2007; Vermeij *et al.*, Int J Cancer 131(5): E670-680, 2012). Aunque este régimen ha demostrado ser promotor en modelos preclínicos, su traslado a ensayos clínicos no ha producido los mismos resultados ambiguos (Audia *et al.*, Clin Exp Immunol 150(3):523-530, 2007; Vermeij *et al.*, Int J Cancer 131(5): E670-680, 2012), aunque Walter *et al.* publicaron recientemente datos que mostraban que una única dosis de ciclofosfamida antes de una vacuna de péptido estaba asociada con una supervivencia del paciente más prolongada en un estudio de fase II en pacientes con carcinoma de células renales (RCC) (Walter *et al.*, Nat Med 18: 1254-1261, 2012). Sin embargo, no había ningún efecto cuantificable del tratamiento con sbCPA sobre la inmunogenicidad de la vacuna.

Un enfoque alternativo a la administración en bolo individual de ciclofosfamida es suministrarla en un programa metronómico administrando ciclofosfamida a dosis muy baja diariamente. La administración de ciclofosfamida metronómica se ha notificado que tiene efectos inmunomoduladores similares a la ciclofosfamida a dosis baja individual (Ghiringhelli *et al.*, Cancer Immunol Immunother 56(5): 641-648, 2007; Le y Jaffee, Cancer Res 72(14): 3439-3444, 2012).

Ahora se ha encontrado de manera sorprendente e inesperada que la administración de al menos dos dosis de ciclofosfamida a un sujeto antes de la administración de una vacuna de survivina (por ejemplo DPX-Survivac) puede mejorar la eficacia de la vacuna. Este es un hallazgo bastante significativo ya que los resultados dados a conocer en el presente documento se refieren a estudios de fase clínica en seres humanos, en comparación con estudios preclínicos en animales.

DPX-Survivac, una vacuna de survivina según la presente invención, es una vacuna inmunoterapéutica anticancerígena candidata para el tratamiento de cáncer. La vacuna DPX-Survivac está diseñada para seleccionar como diana survivina. Tal como se describe en el presente documento, DPX-Survivac contiene un decapeptido (SEQ ID NO: 6) y cuatro nonapéptidos (SEQ ID NO: 2, 4, 7 y 8) de la secuencia proteica de survivina, con diferentes restricciones de HLA (HLA-A1, A2, A3, A24 y B7).

El tratamiento de sujetos con DPX-Survivac en la cohorte A, cohorte B y cohorte C (véase la figura 1), tal como se describe en el presente documento, se dirigió a abordar el mejor programa de tratamiento para generar respuestas inmunitarias específicas de antígeno fuertes anticipadas, y el mantenimiento de respuestas inmunitarias dirigidas a tumores, persistentes a lo largo del tiempo. Esta respuesta de células T específicas de antígeno se espera que

ejerza una presión continua sobre tumores nuevos o en desarrollo, manteniendo a los pacientes en remisión más tiempo.

Los sujetos tratados con DPX-Survivac, según la presente invención, tenían análisis inmunitarios extensos que condujeron a varios hallazgos importantes en la parte de fase I del estudio clínico. Todos los sujetos que recibieron la terapia de combinación con DPX-Survivac (grupo de cohortes C, n=12), la cual comprendía un periodo de tratamiento con ciclofosfamida a dosis baja antes de la administración de la vacuna, demostraron respuestas inmunitarias específicas de antígeno medidas mediante al menos uno de los tres ensayos de monitorización inmunitaria del estudio (ELISPOT, análisis de tetrámeros y tinción celular intracelular multiparamétrica; Tabla 1).

Tabla 1: Resumen de los resultados de monitorización inmunitaria de 18 sujetos en fase 1 tratados con una vacuna de survivina, con o sin ciclofosfamida a dosis baja (IND nº. 14731).

Id. sujeto/cohorta	Tipo de HLA	ELISPOT	Tetrámero <i>ex vivo</i>	Tetrámero <i>in vitro</i>	byICS de polifuncionalidad
A/ 02-01 ^a	A26, A29	L	-	+ ^b	-
A/ 01-02	A24	M	N/A	N/A	-
A/ 02-03 ^a	A31, A33	L	N/A	N/A	-
A/ 09-13	A2	L, M	-	+	+
A/ 02-18	A1	M	+	+	-
A/ 01-19	A24	L	N/A	N/A	+
B/ 02-04	A2, A1	M, H	+	+	+
B/ 09-05	A3, B7	M, H	+	+	-
B/ 03-06	A2, A3	M	-	+ ^c	-
B/ 03-07	A1	L, M	-	+	-
B/ 02-11	A24	M	N/A	N/A	+
B/01-12	A3, A24	L, M	-	+	-
C/ 09-08	A2	H	+	+	+
C/ 10-09	A2, A24	H	+	+	+
C/ 11-10	A2,A3	H	+	+ ^c	+
C/ 01-15	B7	M	N/A	N/A	-
C/ 02-16	A1	H	+	+ ^c	+
C/ 11-17	A2	L	-	+	+

^a HLA no coincidente para péptidos de survivina en DPX-Survivac; ^b reacción cruzada con tetrámero de HLA-A1; ^c positivo con reactivos de tetrámeros basándose en dos tipos de HLA, A2 y A3 ó A1 y A2.

En la tabla 1, se expresan los resultados de ELISPOT (UFP/10⁶ PBMC), tal como se observan en puntos de tiempo tras el tratamiento, como bajos (L) cuando UFP fueron <128, medios (M) para UFP en el intervalo de 128-512 y altos (H) para UFP >512. El análisis de tetrámeros de PBMC se llevó a cabo o bien *ex vivo* (sin estimulación) o bien *in vitro* (con estimulación de péptido), y un aumento de dos veces de células T CD8+ específicas de antígeno con respecto a los niveles previos a la vacunación se indicaron como pacientes que responden al tratamiento positivos; N/A, no aplicable (falta de reactivo de prueba adecuado). Las células T COB+ específicas de antígeno polifuncionales se definen como aquellas células que secretan IFN- γ y al menos uno o ambos de TNF- α e IL-2 simultáneamente.

Todos los pacientes que responden intensamente al tratamiento del estudio se observaron dentro de las cohortes B y C que recibían terapia de combinación según la presente invención. En 11 de 12 sujetos en la cohorte B y C, se confirmaron las respuestas inmunitarias mediante dos ensayos (cinco sujetos) o tres ensayos (seis sujetos). Se establecieron generalmente respuestas inmunitarias con una o dos vacunaciones y se aumentaron o mantuvieron con administraciones de refuerzo. Se observó una respuesta a la dosis, produciendo los pacientes de la cohorte C respuestas de magnitud significativamente mayor (cohorte C frente a cohorte B, P=0,013). La ciclofosfamida a dosis baja, empezando antes de la administración de vacuna, potenció significativamente la dosis de 0,5 ml (cohorte C frente a cohorte A, P=0,015). De manera notable, la máxima frecuencia de células T CD8+ específicas de antígeno se detectaron *ex vivo* en PBL usando tetrámeros y se caracterizaron además como polifuncionales mediante ICS mutliparamétrica en pacientes de la cohorte C, demostrando que la combinación de ciclofosfamida a dosis baja con

la vacuna de survivina producía la respuesta inmunitaria contra survivina más robusta.

Los datos de ELISPOT para las cohortes A y C en la figura 2 se resumen en la tabla 2.

5 Tabla 2:

Número de Vacunaciones	Cohorte A Máxima respuesta inmunitaria mediante ELISPOT (UFP/10 ⁶ PBMC)	Cohorte C Máxima respuesta inmunitaria mediante ELISPOT (UFP/10 ⁶ PBMC)	Diferencia en veces (cohorte C / cohorte A)
1	130	2309	17,7
2	137	1911	13,9
3	284	2517	8,9

Se observará a partir de la tabla anterior (tabla 2) que la máxima respuesta inmunitaria lograda tras una única vacunación en la cohorte A (sólo vacuna; n=6) mediante ELISPOT fue de 130 UFP/10⁶ PBMC (intervalo de 55-130). En cambio, la máxima respuesta lograda tras una única vacunación en la cohorte C (vacuna + ciclofosfamida previa; n=6) mediante ELISPOT fue de 2309 UFP/10⁶ PBMC (intervalo de 2-2309). Esto representa una mejora de 17,7 veces en la máxima respuesta inmunitaria lograda, demostrando que los métodos de la invención que comprenden administración previa de un agente que interfiere con la replicación del ADN proporcionan una mejora significativa en la eficacia de una vacuna de survivina.

De manera similar, la eficacia de la vacuna DPX-Survivac también se encontró que se potenciaba mediante la invención cuando se administraron dos dosis o tres dosis de la vacuna. Tal como se muestra en la tabla 2, la máxima respuesta inmunitaria lograda tras dos vacunaciones en la cohorte A (vacuna sola; n=5) mediante ELISPOT es de 137 UFP/10⁶ PBMC (intervalo de 22-137), mientras que la máxima respuesta lograda tras dos vacunaciones en la cohorte C (vacuna + ciclofosfamida previa; n=6) mediante ELISPOT es de 1911 UFP/10⁶ PBMC (intervalo de 25-1911). Esto representa una mejora de 13,9 veces en la máxima respuesta inmunitaria lograda.

Tras tres vacunaciones, la máxima respuesta inmunitaria lograda en la cohorte A (vacuna sola; n=6) mediante ELISPOT fue de 284 UFP/10⁶ PBMC (intervalo de 12-284). En cambio, la máxima respuesta inmunitaria lograda en la cohorte C (vacuna + ciclofosfamida previa; n=6) mediante ELISPOT fue de 2517 UFP/10⁶ PBMC (intervalo de 38-2517). Esto representa una mejora de 8,9 veces en la máxima respuesta inmunitaria lograda.

Además, tal como se muestra en la figura 4, se encontró que tras tres vacunaciones, 4/6 pacientes en la cohorte C (vacuna + ciclofosfamida previa) tenían respuestas de ELISPOT por encima de 512 puntos/10⁶ PBMC, en comparación con 0/6 pacientes en la cohorte A (vacuna de survivina sola) (véase la figura 4). Estos resultados muestran que la ciclofosfamida a dosis baja potenció significativamente la respuesta inmunitaria proporcionada por la dosis de 0,5 ml de vacuna de survivina. Incluso tras tres dosis de vacunación en la cohorte A, ninguno de los pacientes en la cohorte A pudo lograr lo que se consideraba para el estudio que es una alta respuesta inmunitaria (es decir, UFP > 512).

La capacidad de la combinación de la invención para mejorar la eficacia de la vacuna DPX-Survivac se ilustra además mediante los datos presentados en la figura 3 que muestra el índice de estimulación para las 1, 2 y 3 administraciones de dosis de vacuna en las cohortes A, B y C. El índice de estimulación representa el aumento en veces en células que secretan IFN-gamma para pacientes en relación con respuestas inmunitarias de nivel inicial en estos pacientes. Tal como se muestra en la figura 3, el factor de estimulación logrado tras tres vacunaciones en la cohorte A (vacuna sola; n=6) fue de 0,4-8,9x, mientras que el factor de estimulación logrado tras tres vacunaciones en la cohorte C (vacuna + ciclofosfamida previa; n=6) fue de 1,2-79x. Esto representa una mejora de 8,9 veces en la máxima respuesta inmunitaria lograda en este punto de tiempo, demostrando que la invención que comprende administración previa de un agente que interfiere con la replicación del ADN proporciona una mejora significativa en la eficacia de una vacuna de survivina.

Además, el máximo factor de estimulación logrado en al menos un paciente tras 2 dosis en la cohorte A (vacuna sola; n=4) fue de 3,5x, mientras que el máximo factor de estimulación logrado en al menos un paciente tras 2 dosis en la cohorte C (vacuna + ciclofosfamida previa; n=6) fue de 59,7x. Esto representa una mejora de 17,1 veces en la máxima respuesta inmunitaria lograda en este punto de tiempo mediante los métodos de la invención que comprenden la administración de un agente que interfiere con la replicación del ADN antes de la vacunación con una vacuna de survivina.

La mayor magnitud de las respuestas inmunitarias generada por la invención (por ejemplo cohortes B y C), tal como se detectó mediante ELISPOT, también se caracterizó por la detección de respuestas de células T específicas de antígeno circulantes (mediante tinción de tetrámeros) y un perfil de respuesta de células T polifuncionales en la sangre (mediante tinción de ICS).

Tetrámero in vitro: 10 de 12 sujetos en las cohortes B y C pudieron evaluarse mediante tinción de tetrámeros (tabla 1). Los 10 mostraron pruebas fehacientes de inducción de células T CDS+ específicas de survivina tras una o dos vacunaciones con DPX-Survivac. La activación y el mantenimiento de estas células inmunitarias específicas son significativos ya que las células T CDS+ están implicadas en la identificación de células cancerosas, infiltración de tumores y destrucción de dianas cancerosas. Se encontró que todos los pacientes evaluables en la cohorte C tenían positividad de tetrámeros por encima del 1% de células T CD8+ totales (con estimulación *in vitro*) y alcanzando hasta tanto como el 34% de células T CD8+ totales. En cambio, la máxima positividad de tetrámeros registrada en la cohorte A mediante SD70 estaba por debajo del 1% de células T CD8+ totales (0,7%).

Tetrámero ex vivo: Tal como se muestra en la tabla 1 anterior, 1/6 pacientes en la cohorte A tuvieron células T CD8+ positivas para tetrámeros detectables al menos en un punto de tiempo tras la vacunación en PBMC en reposo/no estimuladas. Sin embargo, es de importancia en este paciente que las células T CD8+ específicas de antígeno no eran polifuncionales tal como se determinó mediante tinción de ICS. En cambio, 4/6 pacientes en la cohorte C tenían células T CD8+ positivas para tetrámeros al menos en un punto de tiempo tras la vacunación en PBMC en reposo/no estimuladas, y en estos pacientes se confirmó que las células T CD8+ específicas de antígeno eran polifuncionales mediante ICS.

Polifuncionalidad mediante JCS: Además, 5/6 pacientes en la cohorte C tenían células T CD8+ polifuncionales específicas de antígeno detectables, en comparación con sólo 2/6 pacientes en la cohorte A (tabla 1). Estos resultados indican que pacientes en la cohorte C producían una magnitud significativamente mayor y mayor frecuencia de células T CD8+ polifuncionales específicas de antígeno que pacientes en la cohorte A.

Se encontró que estos resultados obtenidos mediante tinción de ICS y de tetrámeros se correlacionaban con respuestas inmunitarias fuertes mediante ELISPOT. Se encontró que pacientes de la cohorte A que tenían células positivas para tetrámeros en PBMC en reposo/no estimulados o tenían células T CD8+ específicas de antígeno polifuncionales mediante ICS (es decir, positivos por al menos un ensayo pero no para ambos) tenían respuestas bajas/moderadas mediante ELISPOT (es decir, de entre 12-284 UFP/10⁶ PBMC tras tres vacunaciones). En cambio, pacientes de la cohorte C que eran positivos para tetrámeros y tenían células T CD8+ específicas de antígeno polifuncionales confirmadas tenían respuestas inmunitarias moderadas/altas mediante ELISPOT (es decir, de entre 773-2517 UFP/10⁶ PBMC tras tres vacunaciones).

Los resultados dados a conocer en el presente documento demuestran que las combinaciones de la invención tienen la capacidad de mejorar la eficacia de una vacuna de survivina. Las combinaciones de la invención pueden por tanto ser adecuadas para el tratamiento de cáncer, particularmente aquellos cánceres que expresan antígenos de survivina en su superficie celular. Además, las respuestas inmunitarias generadas por las vacunas de la invención pueden tener el potencial de seleccionar como diana no solo células tumorales que expresan los antígenos de survivina específicos tal como se contienen en la vacuna. Tal como se muestra en la figura 7, la respuesta inmunitaria generada mediante los péptidos de survivina modificados en DPX-Survivac también presentaba reactividad cruzada a péptidos nativos.

El nivel de inducción inmunitaria observado mediante la invención, que comprende administración previa de ciclofosfamida seguido por una vacuna de survivina era muy pronunciado y se observa raramente en otros enfoques de vacunas que seleccionan como diana autoantígenos. Estas respuestas inmunitarias robustas está aceptado generalmente que son muy difíciles de lograr en pacientes con cáncer y serán probablemente la base de respuestas inmunitarias antitumorales clínicamente significativas. La fuerza de las respuestas en la cohorte C demuestra que la adición previa de ciclofosfamida a dosis baja, como fármaco inmunomodulador, es un factor significativo en la mejora de la eficacia de la vacuna y la generación de las respuestas inmunitarias fuertes que se registraron.

Los resultados clínicos dados a conocer en el presente documento proporcionan una realización a modo de ejemplo de la invención que tiene una aplicación más amplia que cualquier agente que interfiere con la replicación del ADN y que cualquier vacuna de survivina, tal como se describe cada uno en el presente documento.

Agente que interfiere con la replicación del ADN

La presente invención implica administrar un agente que interfiere con la replicación del ADN antes de administrar la vacuna tal como se describe en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "interfiere con la replicación del ADN" pretende abarcar cualquier acción que previene, inhibe o retrasa el proceso biológico de copiado (es decir, replicación) del ADN de una célula. El experto en la técnica apreciará que existen diversos mecanismos para prevenir, inhibir o retrasar la replicación del ADN, tales como por ejemplo reticulación del ADN, metilación de ADN, sustitución de bases, etc. La invención abarca el uso de un agente que interfiere con la replicación del ADN mediante cualquier medio conocido en la técnica. El agente que interfiere con la replicación del ADN es un fármaco, concretamente ciclofosfamida.

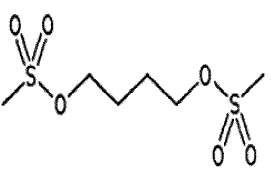
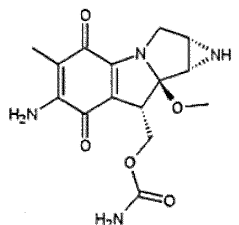
El agente que interfiere con la replicación del ADN es uno que, cuando se usa a dosis que no son quimioterápicas, puede afectar de manera selectiva a la replicación del ADN en células del sistema inmunitario, con la intención de

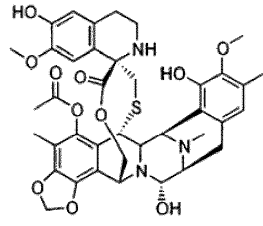
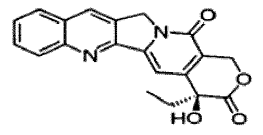
modular el sistema inmunitario para potenciar respuestas a la vacuna. Por “no quimioterápica”, quiere decirse que la dosis del agente es una dosis más baja que aquella que se usaría para destruir directa y selectivamente células y tejidos cancerosos o malignos.

- 5 Otras divulgaciones de un agente que interfiere con la replicación del ADN incluyen agentes que interfieren con la replicación del ADN para provocar muerte celular programada, con la capacidad para seleccionar como diana de manera selectiva células en división rápida del sistema inmunitario. El propósito de tales agentes es modular células del sistema inmunitario para potenciar respuestas a la vacuna. Tales agentes se usan normalmente en dosis que no se espera que sean quimioterápicas y se consideran aceptables para su uso en seres humanos. El propósito de la
- 10 selección como diana selectiva de células inmunitarias puede ser reducir el número de células inmunosupresoras y/o agotar células inmunitarias útiles implicadas en la mediación de la respuesta inmunitaria con los propósitos de inducir una rápida proliferación tras la retirada del fármaco que selecciona como diana la replicación del ADN.

- 15 La interferencia con la replicación del ADN que conduce a muerte celular puede provocarse por numerosos mecanismos, incluyendo pero sin limitarse a, la formación de reticulación del ADN (por ejemplo mediante agentes alquilantes, compuestos de platino, etc.), metilación del ADN (es decir, mediante agentes metilantes), sustitución de bases (es decir, mediante análogos de nucleósidos). Agentes a modo de ejemplo y sus mecanismos se describen en Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice (Cabner B.A., 5ª edición, Lippincott Williams & Wilkins, PA, EE.UU., 2011).

- 20 El agente que interfiere con la replicación del ADN, concretamente ciclofosfamida, es un agente alquilante.

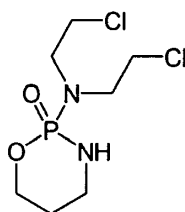
Inhibidor de la replicación del ADN	Grupo funcional	Descripción	Agentes a modo de ejemplo
Agentes alquilantes	Mostaza nitrogenada (biscloroetilamina) $RN(CH_2CH_2Cl)_2$	Alquilan el ADN	Ciclofosfamida Ifosfamida Mafosfamida Melfalán Bendamustina Uramustina Palifosfamida Clorambucilo 4-Hidroxíciclofosfamida
Agentes alquilantes	Alquilsulfonatos	Alquilan el ADN	Busulfano 
Antibióticos antitumorales	Aziridinas o etileniminas	Alquilan el ADN y se intercalan en el ADN	Mitomicina C  Yondelis

			
Compuestos platino	de Pt(II)	Se unen covalentemente al ADN	Cisplatino Carboplatino Oxaliplatino
Análogos nucleósidos	de Se asemejan a bases de purina o pirimidina	Se incorporan al ADN durante la replicación	Aciclovir Gemcitabina 5-Fluorouracilo Arabinósido de citosina Ganciclovir
Derivados camptotecina	de Alcaloides de quinolina	Inhibe la actividad de topoisomerasa I	Camptotecina  Topotecán Irinotecán

El agente que interfiere con la replicación del ADN, concretamente la ciclofosfamida, es un agente alquilante de mostaza de nitrógeno. Las mostazas de nitrógeno son agentes alquilantes del ADN no específicos. Las mostazas de nitrógeno forman iones aminio cíclicos (anillos aziridinio) mediante desplazamiento intramolecular del cloruro por el nitrógeno de la amina. Este grupo aziridino puede entonces alquilar el ADN atacando el centro nucleófilo N-7 en la base de guanina. Tras el desplazamiento del segundo cloro, se produce una segunda etapa de alquilación que da como resultado la formación de reticulaciones dentro de la cadena (ICL). Estas lesiones son altamente citotóxicas ya que bloquean procesos metabólicos fundamentales tales como replicación y transcripción del ADN.

10 Ciclofosfamida (CPA)

La ciclofosfamida (2-óxido de N,N-bis(2-cloroetil)-1,3,2-oxazafosfinan-2-amina), también conocida como citofosfano, es un agente alquilante de mostaza nitrogenada. La estructura química de ciclofosfamida es:



La ciclofosfamida también se conoce y se le hace referencia bajo las marcas comerciales Endoxan®, Cytosan®, Neosar®, Procytox® y Revimmune®. Otros agentes alquilantes de mostaza nitrogenada en la misma clase que la ciclofosfamida incluyen, sin limitación, palifosfamida, bendamustina e ifosfamida.

La ciclofosfamida (CPA) es un profármaco que se administra normalmente por medio de infusión intravenosa, pero también puede administrarse por vía parenteral y por vía oral (de Jonge, Huitema *et al.* 2005) con poca diferencia en biodisponibilidad (Juma, Rogers *et al.* 1979). CPA se convierte en sus metabolitos activos, 4-hidroxi-CPA y aldofosfamida, mediante oxidación por enzimas P450 en el hígado (Emmenegger, Shaked *et al.* 2007; 2011). Los metabolitos activos de CPA son solubles en lípidos y entran en las células a través de difusión pasiva. La 4-OH-CPA intracelular se descompone de manera espontánea en mostaza de fosforamida que el metabolito activo definitivo. La mostaza de fosforamida cataliza reticulaciones de ADN dentro y entre las cadenas así como reticulaciones de proteína de ADN que inhiben la replicación del ADN que conduce a muerte celular (de Jonge, Huitema *et al.* 2005).

La mostaza de fosforamida se elimina mediante conversión enzimática a carboxifosfamida mediante aldehído deshidrogenasa citoplásmica (ALDH) (Emmenegger, Shaked *et al.* 2007; 2011). Las células con bajos niveles de ALDH tienden a acumular metabolitos de CPA y son más sensibles a sus efectos y, efectivamente, regulación por incremento tumoral de ALDH es un mecanismo de resistencia a CPA (Zhang, Tian *et al.* 2005). Además de ALDH, bajos niveles de ATP intracelular también se han asociado con selectividad de CPA hacia tipos celulares particulares (Zhao, Cao *et al.* 2010). A dosis elevadas, normalmente en el intervalo de 1-5 g/m², los efectos de CPA son los más citotóxicos para células en división rápidamente indistintamente del tipo celular, y CPA es mielosupresor puesto que la mayoría de células hematogénicas se dividen rápidamente (Bruce, Meeker *et al.* 1966; Smith y Sladek 1985).

El aclaramiento sistémico total de CPA y su metabolitos varía entre 5-9 horas, y los niveles plasmáticos máximos del progenitor también varían considerablemente entre pacientes (3-11 horas) lo que refleja diferencias genéticas en el metabolismo entre personas (Cohen, Jao *et al.* 1971; Mouridsen, Faber *et al.* 1974). Se notifica que la administración repetida de CPA acorta la semivida de eliminación aumentando la actividad de enzimas implicadas en el metabolismo (D'Incalci, Bolis *et al.* 1979), pero se desconoce si esto conduce a metabolismo aumentado del metabolito activo (de Jonge, Huitema *et al.* 2005), particularmente a dosis bajas (Emmenegger, Shaked *et al.* 2007).

La traducción de la dosis de ser humano a estudios murinos se calcula usando la siguiente ecuación:

Dosis humana (mg/kg) = K_m de animal

Dosis de animal (mg/kg) = K_m de ser humano

Donde el valor K_m de ratón constante es 3 y el valor K_m de ser humano es 37 (Reagan-Shaw, Nihal *et al.* 2008). Usando este cálculo, el tratamiento metronómico diario en seres humanos que consiste en 50 mg dos veces al día, por vía oral es equivalente a 20,56 mg/kg en ratón. La dosis de 20 mg/kg por vía oral se ha evaluado en modelos preclínicos y se determina que es biológicamente equivalente a la dosis de ser humano (Voelcker, Wagner *et al.* 1984; Man, Bocci *et al.* 2002).

En las últimas dos décadas, se ha apreciado que CPA a dosis bajas para sus efectos moduladores inmunitarios y antiangiogénicos. En comparación con CPA a dosis altas, las dosis bajas de CPA, normalmente de 100-300 mg/m², carecen de actividad citotóxica generalizada pero parecen potenciar la eliminación tumoral mediada por el sistema inmunitario modulando selectivamente células del sistema inmunitario y también reduciendo la angiogénesis dentro del microentorno tumoral. Sola, la terapia con CPA a dosis bajas ha demostrado retardar el crecimiento tumoral en modelos animales, pero es ineficaz en la erradicación tumoral completa. Los mecanismos de retardo tumoral inducido por CPA son complementarios a la combinación con otras formas de terapia inmunitaria, tal como vacunas contra el cáncer. Puede administrarse CPA a dosis bajas, normalmente <300 mg/m², como una única inyección en embolada (sbCPA) o por vía oral a lo largo de varios días como terapia metronómica (mCPA). Los estudios pioneros de Robert North en los años 80 (North 1982; Awwad y North 1988) fueron los primeros en indicar que la CPA agota selectivamente células inmunosupresoras que eran responsables de reprimir respuestas inmunitarias activas hacia tumores. Desde entonces, también se ha comunicado que CPA reduce y perjudica selectivamente la funcionalidad de células T reguladoras CD4+CD25hiFoxP3+ (Lutsiak, Semnani *et al.* 2005), inhibe la angiogénesis tumoral (Browder, Butterfield *et al.* 2000), aumenta la activación de células dendríticas (Radojcic, Bezak *et al.* 2009), desvía la respuesta inmunitaria hacia Th1 (Schiavoni, Mattei *et al.* 2000) y restablece la función efectora de células T y NK (Ghiringhelli, Menard *et al.* 2007). En ratones, los efectos de una única administración de bajas dosis en bolo único de CPA son transitorios, alcanzando normalmente el nadir en el plazo de 4 días tras la administración y volviendo a ser normales a los 7-10 días (Lutsiak, Semnani *et al.* 2005; Salem, Al-Khami *et al.* 2012).

Se ha combinado CPA a dosis bajas con vacunas contra el cáncer en modelos preclínicos y en ensayos clínicos. Hermans *et al.* examinaron la eficacia del tratamiento con CPA a dosis bajas en ratones que portan tumores que se habían inmunizado profilácticamente con una estrategia de sensibilización/refuerzo de ADN/MVA. En resumen, los ratones se inmunizaron con ADN plasmídico que codifica para el antígeno tumoral mel3, luego se reforzaron con MVA que codifica para el mismo antígeno 14 días después. Siete días después del refuerzo con MVA, los ratones se indujeron con tumores B16-F10 y luego se trataron cada 6 días con CPA a dosis bajas (175 mg/kg, por vía intraperitoneal) (Hermans, Chong *et al.* 2003). Encontraron que los ratones previamente inmunizados y después tratados con CPA a dosis bajas tuvieron un retardo significativo en el crecimiento tumoral, pero ningún tratamiento solo tuvo efecto. No detectaron un aumento en el número de células T CD8+ específicas de antígeno. Un estudio de Barbon *et al.* en ratones que no portaban tumores demostró que 3 inyecciones diarias de CPA a dosis bajas (20 mg/kg/día por vía intraperitoneal) administradas antes de una vacuna de ADN que codifica para el antígeno CYP1B1 proporcionaron mejores respuestas inmunitarias que la administración individual de CPA a dosis bajas o elevadas (20 ó 200 mg/kg) 2 días antes de la vacuna (Barbon, Yang *et al.* 2010). Las dosis diarias de CPA se administraron con la última dosis que se producía 2 días antes de la vacunación. En este estudio, los tratamientos con CPA diarios fueron más eficaces en la reducción de los números totales de células Treg con un ahorro de células T efectoras CD8+. Wada *et al.* estudiaron diversos regímenes de CPA a dosis bajas (50 mg/kg por vía intravenosa) con una vacuna GVAX en un modelo tumoral de próstata TRAMP-C2/ HA autólogo (Wada, Yoshimura *et al.* 2009). Estos tumores se desarrollaron de manera natural en ratones y expresan el antígeno HA. CPA se administró una vez antes o una vez después de la vacunación para establecer el mejor régimen. La administración

previa de un único bolo a dosis bajas fue la más eficaz en la producción de células T CD8+. La inmunogenicidad de la vacuna se potenció además administrando a los ratones dos vacunaciones con 7 días de diferencia (día 0 y día 7) en combinación con una única dosis de ciclofosfamida a dosis bajas antes de cada vacuna (CPA administrada el día -1 y día 6). Comunicaron un aumento en el número de CD4 y CD8 circulantes totales, y específicamente un aumento en células T CD8+ específicas de antígeno. Un estudio de Salem *et al.* evaluó diferentes dosis de CPA como única administración de bajas dosis en bolo 3 días antes de la vacunación (Salem, Kadima *et al.* 2007). Este estudio usó un modelo transgénico mediante el cual, se trataron ratones de tipo natural con una única inyección por vía intraperitoneal de CPA 2 días antes de que células T transgénicas OT-1 se transfirieran de manera adoptiva y 3 días antes, los ratones se vacunaron con péptido de ovoalbúmina (100 ug; SIINFEKL, 257-264) s.c. administrado en PBS. La capacidad de que la vacuna aumente el número de células T específicas de antígeno circulantes se midió después del pretratamiento con PBS, 1 mg de CPA o 4 mg de CPA. Encontraron que 1 mg de CPA (correspondiente a una dosis de 50 mg/kg) no expandió las células T OT-I específicas de antígeno más que el tratamiento simulado con PBS, pero sí 4 mg de CPA (correspondiente a 200 mg/kg). Aunque ambas dosis se consideran “dosis bajas”, una única administración no dio como resultado potenciamiento uniforme de la respuesta inmunitaria inducida por la vacuna. Más recientemente, Peng *et al.* compararon CPA diaria (10 mg/kg/día) con sbCPA (50 mg/kg) en combinación con una vacuna de ADN que codifica para la proteína HPV16 E7 en un modelo tumoral TC-1 HPV16 (Peng, Lyford-Pike *et al.* 2012). En este modelo, los ratones se vacunaron terapéuticamente empezando 9 días después de la implantación y se repitió una vez a la semana durante las siguientes dos semanas. Se administró mCPA de manera continua durante cuatro semanas o se administró como una única dosis baja antes de cada vacunación. Todos los tratamientos con CPA comenzaron el día 8, un día antes de la primera vacunación. Encontraron que tanto sbCPA como mCPA se combinaron con la vacuna para proporcionar protección tumoral aumentada y que una única administración de CPA antes de cada vacuna proporciona las respuestas CD8 más fuertes y la mejor actividad antitumoral. Finalmente, Taieb *et al.* sometieron a prueba CPA a dosis bajas con una vacuna de exosoma Mart-1 en un modelo de melanoma (Taieb, Chaput *et al.* 2006). Brevemente, a ratones transgénicos HLA-A2 se les implantó tumores B16.A2 el día 0, después se trataron con CPA a dosis bajas (100 mg/kg por vía intraperitoneal) el día 6 y se vacunaron el día 12. Los ratones tratados con la combinación demostraron un control tumoral significativamente mejor que cualquier tratamiento solo, así como aumento significativo en células T CD8+ específicas de antígeno y liberación de IFN- γ .

También se ha sometido a prueba CPA a dosis bajas en ensayos clínicos. Ghiringhelli *et al.* comunicaron en primer lugar que mCPA (sin vacunación) administrada durante un mes como 50 mg dos veces al día en pacientes con cáncer en fase IV dio como resultado una disminución significativa en células Treg circulantes, pero los niveles circulantes totales de células CD4, CD8 y NK no resultaron afectados (Ghiringhelli, Menard *et al.* 2007). Además, comunicaron que las células T y células NK en pacientes tratados tuvieron una capacidad de proliferación aumentada, lo que sugiere que el tratamiento con mCPA puede combinarse bien con la vacuna. Un estudio de fase I/II (n=14) comparó la eficacia de una vacuna de células dendríticas (células dendríticas derivadas de monocitos cargadas con péptidos Her2/neu, hTERT y PADRE) con y sin único bolo a dosis bajas de CPA (sbCPA, 300 mg/m² administrado por vía intravenosa 2 días antes de la vacuna) en 14 pacientes con cáncer ovárico (Chu, Boyer *et al.* 2012). Se comunicó que los pacientes que recibieron el tratamiento de combinación tenían potencialmente mejor supervivencia libre de progresión y supervivencia global, pero los resultados no fueron estadísticamente significativos en este estudio debido a la pequeña población de pacientes. No detectaron disminuciones en células Treg circulantes en pacientes tratados con CPA, y no se demostró ningún potenciamiento de la respuesta de células T tal como se mide mediante ELISPOT de IFN- γ entre los grupos con CPA y sin CPA. Otro estudio de fase II de único grupo en pacientes con melanoma (n=28) sometió a prueba la combinación de una vacuna de células dendríticas (células dendríticas autólogas, cargadas con péptidos derivados de KLH, survivina, hTERT, p53 y PADRE, vacunadas por vía intradérmica) con mCPA administrada por vía oral pero empezando después de la vacunación (50 mg dos veces al día, una semana sí, una semana no) (Engell-Noerregaard *et al.* 2012). En la evaluación de las respuestas inmunitarias inducidas por la vacuna en este ensayo de único grupo (que combinó la vacuna basada en CD con IL-2, y un inhibidor de Cox-2 así como CPA), ELISPOT de IFN- γ indicó respuestas inmunitarias moderadas desde el nivel inicial hasta la cuarta vacunación, produciéndose respuestas lentamente decrecientes a lo largo del tiempo. De manera importante, estas respuestas fueron de baja frecuencia o directamente indetectables *ex vivo*, típico de la terapia de vacuna con péptidos sola. Las respuestas en estos pacientes no se compararon directamente con pacientes que recibieron vacuna sin tratamiento con CPA y no está claro si CPA sola o en combinación con IL-2 y un inhibidor de Cox-2 contribuyeron a la eficacia de la vacuna, en todo caso.

En un ensayo de fase II de único grupo en pacientes con cáncer ovárico (n=10), se combinó una vacuna que contenía un p53-SLP (péptido sintético largo), que consistía en diez péptidos solapantes sintéticos emulsionados en Montanide y administrados por vía subcutánea a pacientes (a intervalos de 3 semanas), con un único bolo a dosis bajas de CPA (sbCPA, 300 mg/m², 2 días antes de la vacuna). Este estudio comunicó respuestas de ELISPOT de IFN- γ aumentadas en pacientes que recibieron la terapia de combinación, en comparación con un ensayo anterior que sometía a prueba a la vacuna sola (Vermeij, Leffers *et al.* 2011). Sin embargo, comparar el resultado del tratamiento a lo largo de diferentes ensayos es propenso a sesgo de selección lo que podría desviar los resultados. Un ensayo realizado más sistemáticamente en melanoma comparó el uso de dos únicas vacunas multipeptídicas (que contenían péptidos de tirosinasa, MAGE-A1, MAGE-A3, gp100, MAGE-A10 y/o NY-ESO1) administradas con péptidos de células T auxiliares como una emulsión de agua en aceite, la mitad por vía subcutánea y la mitad por vía

intradérmica con o sin sbCPA (300 mg/m², antes de la vacunación). Este estudio examinó cuidadosamente las respuestas de células T CD4+ y CD8+ tras la vacunación mediante ELISPOT, y encontró que sbCPA no proporcionó mejora detectable en combinación con la vacunación. Finalmente, un estudio de fase I/II de Walter *et al.* en carcinoma de células renales sometió a prueba la combinación de una vacuna peptídica (IMA901) con sbCPA (300mg/m² 3 días antes de la vacuna) (Walter, Weinschenk *et al.* 2012). El estudio de fase II de dos grupos (n=68) comparó la vacuna con y sin tratamiento con sbCPA. Comunicaron que los pacientes con respuesta inmunitaria dentro del grupo tratado con la combinación de sbCPA/vacuna tuvieron mejor supervivencia que los pacientes que no respondían en el mismo grupo, y también el grupo tratado con vacuna sólo. Aún así, no hubo ningún efecto medible del tratamiento con sbCPA sobre la inmunogenicidad de la vacuna.

En resumen, CPA se ha sometido a prueba en combinación con vacunas en ensayos clínicos, tanto como una única infusión intravenosa a dosis bajas antes de la vacunación, así como una terapia oral a dosis bajas metronómica empezando después de la vacunación. Estos ensayos han generado resultados contradictorios y no demostraron un beneficio definitivo y ampliamente aplicable para el uso de CPA a dosis bajas con el fin de potenciar la actividad de la vacuna.

Hasta la fecha y según el conocimiento de los solicitantes, los beneficios de administrar una única dosis baja de CPA o múltiples dosis bajas de CPA antes de la vacunación no se han comparado directamente en un ensayo clínico. Se compararon los resultados obtenidos según la presente invención que comprende la administración de CPA repetida antes de la vacunación de pacientes con cáncer con la vacuna de survivina basada en múltiples péptidos (sometida a prueba frente a la vacuna sin CPA en el mismo ensayo) con resultados logrados con una única dosis baja de CPA antes de la vacunación con dos vacunas basadas en múltiples péptidos diferentes MELITAC 12.1 y MELITAC12.6 en pacientes con cáncer (ambas sometidas a prueba frente a la vacuna sin CPA en el mismo ensayo) por Slingluff *et al.* (2011).

En ausencia de tratamiento previo con CPA, la vacuna peptídica de survivina y las vacunas de melanoma MELITAC 12.1 y MELITAC 12.6 tuvieron potenciales de inmunogenicidad similares basándose en resultados de ELISPOT. Las respuestas inmunitarias producidas por hasta tres vacunaciones con MELITAC 12.1 y MELITAC 12.6 solas oscilaron entre 0-1095 puntos por 100.000 células T CD8+ para MELITAC 12.1 y 0-700 puntos para MELITAC 12.6. En comparación, los valores de ELISPOT de pacientes que recibieron hasta tres vacunaciones de DPX-Survivac solo, estaban en el intervalo de 0-291 puntos por 100.000 células T CD8+ después de convertir los valores de puntos por 1.000.000 de PBMC a puntos por 100.000 células T CD8+. Los recuentos de células T en PBMC de pacientes se determinaron mediante citometría de flujo y los datos presentados en el presente documento se convirtieron en número de puntos por 100.000 células T CD8+ para comparación directa con resultados producidos por las vacunas MELITAC.

De manera comparativa, combinar MELITAC 12.1 y MELITAC 12.6 con una única dosis baja de CPA antes de la vacuna produjo respuestas inmunitarias que oscilaban entre 0-1095 y 0-700 para MELITAC 12.1 y MELITAC 12.6, respectivamente. Por tanto, las respuestas inmunitarias generadas administrando una única dosis baja de CPA antes de MELITAC 12.1 y MELITAC 12.6 fueron esencialmente inalteradas en comparación con la vacuna sola.

En cambio, a los pacientes que se les administraron múltiples dosis de CPA antes de la vacunación con DPX-Survivac generaron respuestas de ELISPOT oscilaron entre 0-8467 puntos por 100.000 células T CD8+. Este aumento significativo en respuestas inmunitarias después de la administración repetida de CPA antes de la vacunación con DPX-Survivac (0-8467 frente a 0-291) demuestra que el tratamiento previo con dosis bajas repetidas de ciclofosfamida antes de la vacunación es más beneficioso para potenciar una respuesta inmunitaria mediante una vacuna que administrar una única dosis baja de ciclofosfamida antes de la vacunación.

Composiciones de vacuna

Tal como se usa en el presente documento, los términos “vacuna”, “composición de vacuna” o “composición” pueden usarse indistintamente.

Las composiciones de vacuna de la invención, para su uso junto con un agente que interfiere con la replicación del ADN, pueden ser de cualquier forma adecuada para la administración de un antígeno de survivina a un sujeto. Las composiciones de vacuna según la invención pueden formularse según métodos conocidos, tales como mediante mezclado del uno o más antígenos de survivina con uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables, preferiblemente aquellos aceptables para la administración a seres humanos. Ejemplos de tales excipientes, portadores y métodos de formulación pueden encontrarse, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co, Easton, PA). Para formular una composición de vacuna farmacéuticamente aceptable adecuada para administración eficaz, tales composiciones contendrán normalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno de survivina, tal como un polipéptido de survivina, un péptido de survivina o una variante de péptido de survivina tal como se describe en el presente documento, o una molécula o vector de ácido nucleico que codifica para tal antígeno de survivina.

Las composiciones de vacuna según la invención pueden administrarse a un sujeto en una cantidad

terapéuticamente eficaz. Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de vacuna o principio activo (por ejemplo, uno o más antígenos de survivina) eficaz para tratar, prevenir, aliviar o mejorar cáncer o síntomas de cáncer; prolongar la supervivencia del sujeto que está tratándose; y/o estimular, inducir o potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto, tal como una respuesta de células T citotóxica. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de la vacuna es una cantidad capaz de inducir una respuesta clínica en un sujeto en el tratamiento de cáncer. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz de la vacuna se encuentra bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación proporcionada en el presente documento. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar según una variedad de factores tales como el estado, el peso, el sexo y la edad del sujeto.

Una vez que se han seleccionado uno o más antígenos de survivina apropiados para su inclusión en una composición de vacuna según la invención, los antígenos pueden administrarse mediante diversos medios adecuados que se conocen en la técnica. Las composiciones de vacuna para su uso en la invención descritas en el presente documento pueden incluir, por ejemplo, y sin limitación, lipopéptidos (por ejemplo, Vitiello, A. *et al.*, J. Clin. Invest. 95:341, 1995), composiciones peptídicas encapsuladas en microesferas de poli(DL-lactida-co-glicólido) ("PLG") (véase, por ejemplo, Eldridge, *et al.*, Molec. Immunol. 28:287-294, 1991; Alonso *et al.*, Vaccine 12:299-306, 1994; Jones *et al.*, Vaccine 13:675-681, 1995), composiciones peptídicas contenidas en complejos estimuladores del sistema inmunitario (ISCOMS) (véase, por ejemplo, Takahashi *et al.* Nature 344:873-875, 1990; Hu *et al.*, Clin Exp Immunol. 113:235-243, 1998), múltiples sistemas de antígeno y péptido (MAP) (véase, por ejemplo, Tam, J. P., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85:5409-5413, 1988; Tam, J.P., J. Immunol. Methods 196:17-32, 1996), péptidos formulados como péptidos multivalentes; péptidos para su uso en sistemas de administración balísticos, normalmente péptidos cristalizados, vectores de administración virales (Perkus, M. E. *et al.*, En: Concepts in vaccine development, Kaufmann, S. H. E., ed., p. 379, 1996; Chakrabarti, S. *et al.*, Nature 320:535, 1986; Hu, S. L. *et al.*, Nature 320:537, 1986; Kieny, M.-P. *et al.*, AIDS Bio/Technology 4:790, 1986; Top, F. H. *et al.*, J. Infect. Dis. 124:148, 1971; Chanda, P. K. *et al.*, Virology 175:535, 1990), partículas de origen viral o sintético (por ejemplo, Kofler, N. *et al.*, J. Immunol. Methods. 192:25, 1996; Eldridge, J. H. *et al.*, Sem. Hematol. 30:16, 1993; Falo, L. D., Jr. *et al.*, Nature Med. 7:649, 1995), adyuvantes (Warren, H. S., Vogel, F. R., y Chedid, L.A. Annu. Rev. Immunol. 4:369, 1986; Gupta, R. K. *et al.*, Vaccine 11:293, 1993), liposomas (Reddy, R. *et al.*, J. Immunol. 148:1585, 1992; Rock, K. L., Immunol. Today 17:131, 1996), o, ADNc desnudo o adsorbido en partículas (Ulmer, J. B. *et al.*, Science 259:1745, 1993; Robinson, H. L., Hunt, L.A., y Webster, R. G., Vaccine 11:957, 1993; Shiver, J. W. *et al.*, En: Concepts in vaccine development, Kaufmann, S. H. E., ed., p. 423, 1996; Cease, K. B., y Berzofsky, J. A., Annu. Rev. Immunol. 12:923, 1994 y Eldridge, J. H. *et al.*, Sem. Hematol. 30:16, 1993).

Las composiciones de vacuna de la invención también abarcan modalidades mediadas por ácidos nucleicos. Por ejemplo, puede administrarse ADN o ARN que codifica para uno o más de los antígenos de survivina tal como se describe en el presente documento al sujeto. Tales enfoques se describen, por ejemplo, en Wolff *et al.*, Science 247:1465 (1990) así como en las patentes estadounidenses n.ºs 5.580.859; 5.589.466; 5.804.566; 5.739.118; 5.736.524; 5.679.647; y el documento WO 98/04720. Los ejemplos de tecnologías de administración a base de ADN incluyen "ADN desnudo", administración facilitada (mediada por bupivacaína, polímeros, péptido), complejos lipídicos catiónicos y administración mediada por partículas ("cañón de genes") o mediada por presión (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.922.687).

En realizaciones adicionales de las composiciones de vacuna, los antígenos de survivina (por ejemplo, péptidos de survivina) también pueden expresarse mediante vectores virales o bacterianos. Los ejemplos de vectores de expresión incluyen huéspedes virales atenuados, tales como vaccinia o viruela aviar. Este enfoque implica el uso de virus vaccinia, por ejemplo, como un vector para expresar secuencias de nucleótidos que codifican para los péptidos de survivina tal como se describe en el presente documento. Tras la introducción en un huésped infectado de manera aguda o crónica o en un huésped no infectado, el virus vaccinia recombinante expresa el péptido antigénico, y provoca de ese modo una respuesta inmunitaria en el huésped. Se describen vectores de vaccinia y métodos útiles en protocolos de inmunización en, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.722.848. Otro vector es BCG (bacilo de Calmette-Guérin). Los vectores de BCG se describen en Stover *et al.*, Nature 351:456-460 (1991). Una amplia variedad de otros vectores útiles para la administración o inmunización terapéutica de los péptidos de la invención, por ejemplo vectores de adenovirus y virus adenoasociados, vectores retrovirales, vectores de *Salmonella typhi*, vectores de toxina carbunco destoxificado, y similares, serán evidentes para los expertos en la técnica y se abarcan mediante las composiciones de vacuna descrita en el presente documento.

Las vacunas según la invención también abarcan composiciones que contienen uno o más de los antígenos de survivina, en los que el antígeno puede estar presente individualmente o como un constructo que contiene múltiples copias de los mismos o diferentes antígenos de survivina. Por ejemplo, el antígeno de survivina puede estar presente como una única molécula de ácido nucleico (por ejemplo, vector) que codifica para varios de los mismos o diferentes antígenos de survivina. O, en otras realizaciones, puede usarse un homopolímero que comprende múltiples copias del mismo antígeno de survivina, o un heteropolímero de diversos antígenos de survivina diferentes. Tales polímeros pueden tener la ventaja de proporcionar una reacción inmunológica aumentada ya que comprenden múltiples copias de antígenos de survivina, de modo que el efecto resultante puede ser una capacidad potenciada para inducir una respuesta inmunitaria con el uno o más determinantes antigénicos de survivina. La composición puede comprender una región que se produce de manera natural de uno o más antígenos de survivina o puede

comprender antígenos preparados, por ejemplo, de manera recombinante o mediante síntesis química.

Una vacuna de la invención también puede incluir células que presentan antígenos (APC), tales como células dendríticas (CD), como un vehículo para presentar el uno o más antígenos de survivina (por ejemplo, péptidos de survivina). Tales composiciones de vacuna pueden crearse *in vitro*, tras la movilización y cosecha de células dendríticas, mediante lo cual la carga de células dendríticas se produce *in vitro*. Por ejemplo, se transfectan células dendríticas con ADN o ARN que codifica para el uno o más de los antígenos de survivina, o se pulsan con antígenos peptídicos de survivina. La célula dendrítica puede entonces administrarse a un sujeto para obtener una respuesta inmunitaria *in vivo*.

Una vacuna según la invención puede administrarse mediante cualquier medio adecuado, tal como por ejemplo inyección (por ejemplo intramuscular, intradérmica, subcutánea, intravenosa o intraperitoneal), aerosol, oral, nasal, tópica, intravaginal, transdérmica, transmucosa, o cualquier otra vía adecuada. La vacuna puede formularse para distribución sistémica o localizada en el cuerpo del sujeto. Las formulaciones sistémicas incluyen las diseñadas para administración mediante inyección, así como las diseñadas para administración transdérmica, transmucosa u oral.

Para inyección, las vacunas pueden formularse en un portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba tal como se describe en el presente documento, tal como una emulsión de agua en aceite o un portador a base de aceite. En algunas realizaciones, pueden usarse liposomas junto con el portador. Las vacunas también pueden formularse como disoluciones acuosas tales como en disolución de Hank, disolución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica.

Tal como será evidente a partir de lo anterior, se pretende que las composiciones de vacuna de la invención abarquen cualquier medio de administración de composición o antígeno (por ejemplo, vectores virales) que son útiles en el tratamiento de cáncer, incluyendo composiciones que pueden estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto, tal como una respuesta de células T citotóxica específica tras la administración.

Para obtener las composiciones de vacuna de la invención, puede ser adecuado combinar el antígeno de survivina, que puede ser un péptido de survivina relativamente pequeño, con diversos materiales tales como adyuvantes, excipientes, tensioactivos, componentes inmunoestimuladores y/o portadores. Pueden incluirse adyuvantes en la composición de vacuna para potenciar la respuesta inmunitaria específica. Pueden usarse diferentes portadores según la vía deseada de administración o la distribución deseada en el sujeto, por ejemplo, sistémica o localizada.

En una realización particular, la vacuna para su uso en la invención es una composición que comprende al menos un antígeno de survivina, liposomas y un portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba. En una realización adicional, la composición puede comprender además un adyuvante. En una realización adicional, la composición puede comprender además un epítipo de células T auxiliares o antígeno.

Por tanto, en una realización, la composición de vacuna comprende uno o más antígenos de survivina; un epítipo de células T auxiliares; un adyuvante; liposomas; y un portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba. El epítipo de células T auxiliares puede, por ejemplo, ser un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos AQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 9). El adyuvante puede ser, por ejemplo, un polinucleótido poli I:C.

En una realización adicional, la vacuna para su uso en los métodos de la invención es una composición que comprende al menos un antígeno de survivina, junto con la plataforma adyuvante de vacuna basada en liposomas y/o basada en compuestos anfifáticos de Immunovaccine, Inc, incluyendo, pero sin limitarse a, las tecnologías de plataforma VacMax® y DepoVax™ (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6.793.923 y 7.824.686; los documentos WO 2002/038175; WO 2007/041832; WO 2009/039628; WO 2009/043165 y WO 2009/146523). La plataforma DepoVax™ es una formulación de administración de vacunas que proporciona exposición controlada y prolongada de antígenos más adyuvante al sistema inmunitario. La plataforma puede proporcionar una respuesta inmunitaria fuerte, específica y sostenida y es capaz de eficacia de única dosis.

En una realización adicional, la vacuna de la invención es cualquier composición adecuada tal como se describió anteriormente, que comprende uno o más antígenos peptídicos de survivina que tienen la secuencia de aminoácidos: FEELTLGEF (SEQ ID NO: 1); FTELTLGEF (SEQ ID NO: 2); LTLGEFLKL (SEQ ID NO: 3); LMLGEFLKL (SEQ ID NO: 4); RISTFKNWPF (SEQ ID NO: 5); RISTFKNWPK (SEQ ID NO: 6); STFKNWPFL (SEQ ID NO: 7) y LPPAWQPFL (SEQ ID NO: 8).

En una realización adicional, la composición de vacuna comprende cinco antígenos peptídicos de survivina que comprende las secuencias de aminoácidos: FTELTLGEF (SEQ ID NO: 2), LMLGEFLKL (SEQ ID NO: 4), RISTFKNWPK (SEQ ID NO: 6), STFKNWPFL (SEQ ID NO: 7) y LPPAWQPFL (SEQ ID NO: 8); un epítipo de células T auxiliares; un adyuvante; liposomas y un portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba. El epítipo de células T auxiliares puede, por ejemplo, ser un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos AQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 9). El adyuvante puede ser, por ejemplo, un polinucleótido poli I:C. Los liposomas pueden, por ejemplo, estar compuestos por 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfolina (DOPC; fosfolípido sintético) y colesterol. El portador hidrófobo puede, por ejemplo, ser Montanide® ISA51 VG.

En una realización particular, la vacuna de la invención puede ser la vacuna inmunoterapéutica anticancerígena candidata de Immunovaccine Inc's DPX-Survivac. DPX-Survivac comprende cinco antígenos peptídicos sintéticos de survivina que tienen las secuencias de aminoácidos: FTELTGGEF (SEQ ID NO: 2), LMLGEFLKL (SEQ ID NO: 4), RISTFKNWPK (SEQ ID NO: 6), STFKNWPF (SEQ ID NO: 7) y LPPAWQPFL (SEQ ID NO: 8); un epítipo universal de células T auxiliares de toxoide tetánico (AQYIKANSKFIGITEL; SEQ ID NO: 9); un adyuvante de polinucleótido poli I:C; liposomas que consisten en DOPC y colesterol; y el portador hidrófobo Montanide® ISA 51 VG. Las cantidades a modo de ejemplo de cada componente (por ml de vacuna) incluyen, sin limitación, 1,0 mg de cada antígeno de survivina; 0,5 mg de epítipo de células T auxiliares (por ejemplo SEQ ID NO: 9); 0,4 mg de adyuvante (por ejemplo polinucleótido poli I:C); 120,0 mg de fosfolípido DOPC sintético; 12,0 mg de colesterol y 0,7 ml de portador hidrófobo (por ejemplo Montanide® ISA51 VG).

La vacuna puede comprender opcionalmente además componentes adicionales tales como, por ejemplo, emulsionantes. Una divulgación más detallada de realizaciones a modo de ejemplo de la vacuna, y los componentes de la misma, se describen tal como sigue.

(i) Antígenos de survivina

Las composiciones de vacuna de la invención comprenden al menos un antígeno de survivina. La expresión "al menos uno" se usa en el presente documento de manera intercambiable con la expresión "uno o más". Estas expresiones, a menos que se declare explícitamente lo contrario en el presente documento, se refieren al número de diferentes antígenos de survivina en la vacuna, y no a la cantidad de cualquier antígeno de survivina particular. Según el significado común de "al menos uno" o "uno o más", la composición de vacuna de la invención contiene un mínimo de un antígeno de survivina.

La survivina, también denominada inhibidor baculoviral de repetición de apoptosis que contiene 5 (BIRC5), es una proteína implicada en la regulación negativa de apoptosis. Se ha clasificado como un miembro de la familia de inhibidores de proteínas de apoptosis (IAP). La survivina es una proteína citoplásmica de 16,5 kDa que contiene un único motivo BIR y una región helicoidal carboxiterminal altamente cargada en lugar de un dedo RING. La codificación génica para survivina es prácticamente idéntica a la secuencia de receptor-1 proteásico de células efectoras (EPR-1), pero orientada en la dirección opuesta. La secuencia codificante para la survivina (*Homo sapiens*) es de 429 nucleótidos de longitud (SEQ ID NO: 10) incluyendo codones de terminación. La proteína codificada survivina (*Homo sapiens*) es de 142 aminoácidos de longitud (SEQ ID NO: 11).

Se postula que la proteína survivina funciona para inhibir la activación de caspasa, lo que conduce de ese modo a regulación negativa de apoptosis o muerte celular programada. Coherente con esta función, la survivina se ha identificado como uno de los genes principales regulados por incremento de manera invariable en muchos tipos de cáncer pero no en tejido normal (véase, por ejemplo Altieri *et al.*, Lab Invest, 79: 1327-1333, 1999; y la patente estadounidense n.º 6.245.523). Este hecho, por tanto, hace que la survivina sea una diana ideal para la terapia contra el cáncer dado que las células cancerosas se seleccionan como diana mientras que las células normales no. En efecto, la survivina se expresa altamente en muchos tipos tumorales, incluyendo una gran parte de cáncer humano, y se ha comunicado valor de pronóstico.

Las vacunas de la invención comprenden uno o más antígenos de survivina. Tal como se usa en el presente documento, el término "antígeno de survivina" abarca cualquier péptido, polipéptido o variante de los mismos (por ejemplo, variante de péptido de survivina) derivado de una proteína survivina o un fragmento de la misma. El término "antígeno de survivina" también abarca un polinucleótido que codifica para un péptido de survivina, variante de péptido de survivina o equivalente funcional de péptido de survivina descrito en el presente documento. Los polinucleótidos pueden ser ADN (por ejemplo, ADN o ADNc genómico) o ARN (por ejemplo, ARNm) o combinaciones de los mismos. Pueden producirse de manera natural o sintética (por ejemplo, sintetizarse químicamente). Se contempla que el polinucleótido puede contener modificaciones de una o más bases nitrogenadas, azúcares de pentosa o grupos fosfato en la cadena de nucleótido. Tales modificaciones se conocen bien en la técnica y pueden ser con el fin de, por ejemplo, mejorar la estabilidad del polinucleótido.

En una realización, el antígeno de survivina puede comprender el polipéptido de survivina de longitud completa o un ácido nucleico que codifica para el polipéptido de survivina de longitud completa. Alternativamente, el antígeno de survivina puede ser un péptido de survivina que comprende un fragmento de cualquier longitud de la proteína survivina. Las realizaciones a modo de ejemplo incluyen un péptido de survivina que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 residuos de aminoácido. En realizaciones específicas, el péptido de survivina consiste en un heptapéptido, un octapéptido, un nonapéptido, un decapeptido o un undecapéptido, que consiste en 7, 8, 9, 10, 11 residuos de aminoácido consecutivos de la proteína survivina (por ejemplo SEQ ID NO: 11), respectivamente. Las realizaciones particulares del antígeno de survivina incluyen péptidos de survivina de aproximadamente 9 ó 10 aminoácidos.

Los antígenos de survivina de la invención también abarcan variantes y equivalentes funcionales de péptidos de survivina. Variantes o equivalentes funcionales de un péptido de survivina abarcan péptidos que presentan

secuencias de aminoácidos con diferencias en comparación con la secuencia específica de la proteína survivina, tal como una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácido, o cualquier combinación de los mismos. La diferencia puede medirse como una reducción en la identidad como entre la secuencia de proteína survivina y la variante de péptido de survivina o equivalente funcional de péptido de survivina.

5 La identidad entre secuencias de aminoácidos puede calcularse usando algoritmos bien conocidos en la técnica. Las variantes de péptido de survivina o equivalentes funcionales han de considerarse que se encuentran dentro del significado de un "antígeno de survivina" de la invención cuando son, preferiblemente, respecto a la totalidad de su longitud, al menos el 70% idénticas a una secuencia peptídica de una proteína survivina, tal como al menos el 75%
10 idénticas, al menos el 80% idénticas, al menos el 85% idénticas, al menos el 90% idénticas, o al menos el 95% idénticas, incluyendo el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idénticas a una secuencia peptídica de una proteína survivina. En una realización particular, la variante de péptido de survivina tiene una secuencia que es al menos el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% idéntica a una secuencia consecutiva de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

15 La proteína survivina de la cual puede derivarse el antígeno de survivina es una proteína survivina de cualquier especie animal en la que la proteína se expresa. Una realización particular es la proteína survivina de seres humanos (SEQ ID NO: 11). Basándose en la secuencia de la proteína survivina seleccionada, el antígeno de survivina puede derivarse mediante cualquier tratamiento químico o enzimático apropiado de la proteína survivina o
20 ácido nucleico codificante. Alternativamente, el antígeno de survivina puede sintetizarse mediante cualquier procedimiento de síntesis de péptidos o ácidos nucleicos convencional con el que el experto habitual en la técnica está familiarizado.

25 El antígeno de survivina de la invención (péptido o ácido nucleico) puede tener una secuencia que es una secuencia de survivina nativa. Alternativamente, el antígeno de survivina puede ser un péptido o secuencia de ácido nucleico modificada mediante una o más sustituciones, deleciones o adiciones, tales como por ejemplo las variantes de péptido de survivina o equivalentes funcionales descritos en el presente documento. Los procedimientos y modificaciones de péptidos de survivina a modo de ejemplo que aumentan la inmunogenicidad de los péptidos incluyen, por ejemplo, los descritos en el documento WO 2004/067023 que implican sustituciones de aminoácido
30 introducidas en posiciones de anclaje que aumentan la unión del péptido a la molécula HLA de clase I.

En una realización, el antígeno de survivina es cualquier péptido derivado de la proteína survivina, o cualquier variante de péptido de survivina de la misma, que puede unir moléculas de HLA de clase I del CMH. En este sentido, el antígeno de survivina puede ser cualquier péptido de survivina, o variante de péptido de survivina de la misma, que puede inducir o potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto.

35 En una realización, el antígeno de survivina es un antígeno peptídico que comprende una secuencia de aminoácidos de la proteína survivina (SEQ ID NO: 11) que puede provocar una respuesta en linfocitos T citotóxicos (CTL) en un sujeto, o una molécula de ácido nucleico que codifica para dicho péptido.

40 En una realización, la vacuna comprende uno o más péptidos sintéticos de survivina, o variantes de los mismos, basándose en la secuencia de aminoácidos de la proteína survivina, tal como la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11.

45 Los péptidos de survivina, variantes de péptido de survivina y equivalentes funcionales de survivina, y sus usos con fines de diagnóstico y terapéutico, específicamente en cáncer, se han descrito, por ejemplo, en los documentos WO 2004/067023 y WO 2006/081826. Los péptidos novedosos dados a conocer en estas publicaciones se encontró que podían provocar respuestas en linfocitos T citotóxicos (CTL) en pacientes con cáncer. En particular, en el documento WO 2004/067023, se encontró que pueden derivarse péptido limitados por la clase I del CMH a partir de la proteína
50 survivina, que pueden unirse a moléculas de HLA de clase I del CMH y provocar de ese modo tanto respuestas inmunitarias de CTL *ex vivo* como *in situ* en pacientes que padecen una amplia variedad de enfermedades oncológicas.

55 En una realización, la vacuna de la invención puede incluir uno cualquiera o más de los péptidos de survivina, variantes de péptido de survivina o equivalentes funcionales de péptido de survivina dados a conocer en los documentos WO 2004/067023 y WO 2006/081826.

60 En otra realización, la vacuna de la invención puede incluir uno o más de un péptido de survivina, variante de péptido de survivina o equivalente funcional de péptido de survivina que tiene la capacidad de unirse a cualquiera de las moléculas de clase I del CMH seleccionadas de moléculas de HLA-A, HLA-B o HLA-C.

Las moléculas de HLA-A de clase I del CMH a modo de ejemplo a las cuales puede unirse el péptido de survivina, variante de péptido de survivina, o equivalente funcional de péptido de survivina incluyen, sin limitación, HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A9, HLA-A10, HLA-A11, HLA-A19, HLA-A23, HLA-A24, HLA-A25, HLA-A26, HLA-A28, HLA-A29, HLA-A30, HLA-A31, HLA-A32, HLA-A33, HLA-A34, HLA-A36, HLA-A43, HLA-A66, HLA-A68 y HLA-A69.

Las moléculas de HLA-B de clase I del CMH a modo de ejemplo a las cuales puede unirse el péptido de survivina, variante de péptido de survivina, o equivalente funcional de péptido de survivina incluyen, sin limitación, HLA-B5, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B12, HLA-B13, HLA-B14, HLA-B15, HLA-B16, HLA-B17, HLA-B18, HLA-B21, HLA-B22, HLA-B27, HLA-B35, HLA-B37, HLA-B38, HLA-B39, HLA-B40, HLA-B41, HLA-B42, HLA-B44, HLA-B45, HLA-B46 y HLA-B47.

Las moléculas de HLA-C de clase I del CMH a modo de ejemplo a las cuales puede unirse el péptido de survivina, variante de péptido de survivina, o equivalente funcional de péptido de survivina incluyen, sin limitación, HLA-C1, HLA-C2, HLA-C3, HLA-C4, HLA-C5, HLA-C6, HLA-C7 y HLA-C16.

En una realización particular, la vacuna de la invención puede comprender uno o más de los antígenos peptídicos de survivina seleccionados de:

i) FEELTLGEF (SEQ ID NO: 1) [HLA-A1]

ii) FTELTLGEF (SEQ ID NO: 2) [HLA-A1]

iii) LTLGEFLKL (SEQ ID NO: 3) [HLA-A2]

iv) LMLGEFLKL (SEQ ID NO: 4) [HLA-A2]

v) RISTFKNWPF (SEQ ID NO: 5) [HLA-A3]

vi) RISTFKNWPK (SEQ ID NO: 6) [HLA-A3]

vii) STFKNWPFL (SEQ ID NO: 7) [HLA-A24]

viii) LPPAWQPFL (SEQ ID NO: 8) [HLA-B7]

Los péptidos de survivina indicados anteriormente representan, sin limitación, péptidos limitados por la clase I del CMH a modo de ejemplo abarcados por la invención. La molécula de HLA de clase I del CMH específica a la que se cree que se unen cada uno de los péptidos de survivina, se muestra a la derecha entre corchetes. Una vacuna de la invención puede comprender uno o más de estos péptidos de survivina, en cualquier combinación adecuada.

En una realización adicional, la vacuna de la invención comprende uno cualquier o más de los cinco péptidos de survivina indicados a continuación, en cualquier combinación adecuada:

i) FTELTLGEF (SEQ ID NO: 2) [HLA-A1]

ii) LMLGEFLKL (SEQ ID NO: 4) [HLA-A2]

iii) RISTFKNWPK (SEQ ID NO: 6) [HLA-A3]

iv) STFKNWPFL (SEQ ID NO: 7) [HLA-A24]

v) LPPAWQPFL (SEQ ID NO: 8) [HLA-B7]

En una realización particular, la composición de la invención comprende los cinco antígenos peptídicos de survivina indicados anteriormente, tal como se encuentra en Immunovaccine Inc's o cualquier combinación o uno o más de los antígenos peptídicos. En una realización preferida, la composición comprenderá los cinco de los antígenos peptídicos de survivina, vacuna inmunoterapéutica anticancerígena candidata DPX-Survivac.

Además del al menos un antígeno de survivina, las realizaciones adicionales de la vacuna de la invención pueden comprender uno o más antígenos adicionales útiles en el tratamiento de cáncer o útiles en la inducción o potenciamiento de una respuesta inmunitaria contra el cáncer. Las realizaciones a modo de ejemplo de tales antígenos adicionales se describen a continuación.

(ii) Antígenos adicionales

Otros antígenos que pueden ser útiles en las composiciones de la invención incluyen, sin limitación, antígenos que pueden inducir o potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto que sería beneficiosa en el tratamiento de cáncer, por ejemplo, una respuesta inmunitaria mediada por células.

La inmunidad mediada por células es una respuesta inmunitaria que no implica anticuerpos pero más bien implica la activación de macrófagos y células citolíticas naturales, la producción de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno y la liberación de diversas citocinas en respuesta a un antígeno. Los linfocitos T citotóxicos son un

subgrupo de linfocitos T (un tipo de leucocito) que puede inducir la muerte de células somáticas o tumorales infectadas; destruyen células que se infectan con virus (u otros patógenos), o son de otro modo disfuncionales o dañadas.

5 La mayoría de células T citotóxicas expresan receptores de células T que pueden reconocer un antígeno peptídico específico unidos a moléculas del CMH de clase I. Estos CTL también expresan CD8 (células T CD8+), que se atrae a porciones de la molécula de clase I del CMH. Esta afinidad mantiene el CTL y la célula diana unidos juntos durante la activación específica de antígeno.

10 La inmunidad celular protege al cuerpo, por ejemplo, activando linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno que son capaces de lisar células corporales que presentan epítomos de antígeno foráneo sobre su superficie, tal como células infectadas por virus, células con bacterias intracelulares, y células cancerosas que presentan antígenos tumorales; activando macrófagos y células citolíticas naturales, permitiéndolos destruir patógenos intracelulares; y estimulando las células para secretar una variedad de citocinas que influyen en la función de otras células
15 implicadas en respuestas inmunitarias adaptativas y respuestas inmunitarias innatas.

Por consiguiente, en realizaciones adicionales, las composiciones de vacuna de la invención pueden comprender un antígeno adicional al uno o más antígenos de supervivencia. Por ejemplo, el antígeno adicional puede ser, sin limitación,
20 un péptido, un polipéptido o proteína nativa, no nativa, recombinante o desnaturalizada adecuada, o un fragmento de la misma, o un epítipo que puede inducir o potenciar una respuesta inmunitaria de CTL en un sujeto.

El antígeno adicional también puede ser un polinucleótido que codifica para el polipéptido que funciona como antígeno. Se conocen estrategias de vacunación basadas en ácido nucleico, en las que una composición de vacuna que contiene un polinucleótido se administra a un sujeto. El polipéptido antigénico codificado por el polinucleótido se
25 expresa en el sujeto, de modo que el polipéptido antigénico está presente finalmente en el sujeto, justo como si la composición de vacuna en sí misma había contenido el polipéptido. Con los fines de la presente invención, el antígeno adicional, cuando el contexto lo dicta, abarca tales polinucleótidos que codifican para el polipéptido que funciona como antígeno.

30 El término "polipéptido" abarca cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud (por ejemplo, al menos 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ó 20 aminoácidos) o modificación postraducciona (por ejemplo, glicosilación o fosforilación), e incluye, por ejemplo, proteínas naturales, polipéptidos y péptidos sintéticos o recombinantes, epítomos, moléculas híbridas, variantes, homólogos, análogos, peptoides, peptidomiméticos, etc. Por tanto, una variante o derivado incluye delecciones, incluyendo truncaciones y fragmentos; inserciones y adiciones, por ejemplo
35 sustituciones conservativas, mutantes dirigidos al sitio y variantes alélicas; y modificaciones, incluyendo peptoides que tienen uno o más grupos amino no amino (por ejemplo, azúcar, lípido, etc.) unidos covalentemente al péptido y modificaciones postraduccionales. Tal como se usa en el presente documento, el término "sustituciones de aminoácido conservadas" o "sustituciones conservativas" se refiere a la sustitución de un aminoácido por otra en una ubicación dada en el péptido, donde la sustitución puede realizarse sin pérdida sustancial de la función relevante. En
40 la elaboración de tales cambios, pueden realizarse sustituciones de residuos de aminoácido similares basándose en similitud relativa de sustituyentes de cadena lateral, por ejemplo, su tamaño, carga, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y similares, y tales sustituciones pueden evaluarse para determinar su efecto sobre la función del péptido mediante pruebas de rutina. Los ejemplos específicos, no limitativos de una sustitución conservativa incluyen los siguientes ejemplos:

45

Residuo original	Sustituciones conservativas
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr

Residuo original	Sustituciones conservativas
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

Pueden usarse polipéptidos o péptidos que tienen una identidad sustancial con respecto a una secuencia de antígeno preferida. Se considera que dos secuencias tienen identidad sustancial si, cuando se alinean de manera óptima (permitiéndose huecos), comparten al menos aproximadamente el 50% de identidad de secuencia, o si las secuencias comparten motivos funcionales definidos. En realizaciones alternativas, puede considerarse que las secuencias alineadas de manera óptima son sustancialmente idénticas (es decir, tienen identidad sustancial) si comparten al menos el 60%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% de identidad respecto a una región especificada. El término "identidad" se refiere a similitud de secuencia entre dos moléculas de polipéptidos. La identidad puede determinarse comparando cada posición en las secuencias alineadas. Un grado de identidad entre secuencias de aminoácidos es una función del número de aminoácidos idénticos o coincidentes en posiciones compartidas por las secuencias, por ejemplo, respecto a una región especificada. El alineamiento óptimo de las secuencias para comparaciones de identidad puede llevarse a cabo usando una variedad de algoritmos, como se conocen en la técnica, incluyendo el programa ClustalW, disponible en <http://clustalw.genome.ad.jp>, el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math 2: 482, el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, la búsqueda por método de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, y las implementaciones informatizadas de estos algoritmos (tales como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, Madison, WI, EE.UU.). También puede determinarse la identidad de secuencia usando el algoritmo BLAST, descrito en Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-10 (usando las configuraciones por defecto publicadas). Por ejemplo, puede usarse la herramienta "BLAST 2 Sequences", disponible a través del National Center for Biotechnology Information (a través de internet en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/bl2seq/wblast2.cgi>), seleccionando el programa "blastp" a las siguientes configuraciones por defecto: umbral esperado 10; tamaño de letra 3; matriz BLOSUM 62; existencia de huecos costes 11, extensión 1. En otra realización, el experto en la técnica puede alinear rápida y adecuadamente cualquier secuencia dada y deducir la identidad de secuencia y/u homología mediante mera inspección visual.

Los polipéptidos y péptidos usados como antígeno adicional en la vacuna de la invención pueden aislarse de fuentes naturales, ser sintéticos o ser polipéptidos generados de manera recombinante. Los péptidos y proteínas pueden expresarse de manera recombinante *in vitro* o *in vivo*. Los péptidos y polipéptidos usados para practicar la invención pueden elaborarse y aislarse usando cualquier método conocido en la técnica. Los polipéptidos y péptidos usados para practicar la invención también pueden sintetizarse, en su totalidad o en parte, usando métodos químicos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Caruthers (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215-223; Hom (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225-232; Banga, A. K, Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, Pa. Por ejemplo, la síntesis de péptidos puede realizarse usando diversas técnicas de fase sólida (véase, por ejemplo, Roberge (1995) Science 269:202; Merrifield (1997) Methods Enzymol. 289:3-13) y puede lograrse síntesis automática, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos ABI 431A (Perkin Elmer) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

En algunas realizaciones, el antígeno adicional puede ser un antígeno purificado, por ejemplo, desde aproximadamente el 25% hasta el 50% puro, desde aproximadamente el 50% hasta aproximadamente el 75% puro, desde aproximadamente el 75% hasta aproximadamente el 85% puro, desde aproximadamente el 85% hasta aproximadamente el 90% puro, desde aproximadamente el 90% hasta aproximadamente el 95% puro, desde aproximadamente el 95% hasta aproximadamente el 98% puro, desde aproximadamente el 98% hasta aproximadamente el 99% puro, o superior al 99% puro.

Tal como se indicó anteriormente, el antígeno adicional incluye un polinucleótido que codifica para el polipéptido que funciona como antígeno. Tal como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" abarca una cadena de nucleótidos de cualquier longitud (por ejemplo 9, 12, 18, 24, 30, 60, 150, 300, 600, 1500 o más nucleótidos) o número de hebras (por ejemplo monocatenario o bicatenario). Los polinucleótidos pueden ser ADN (por ejemplo ADN o ADNc genómico) o ARN (por ejemplo ARNm) o combinaciones de los mismos. Pueden producirse de manera natural o ser sintéticos (por ejemplo, sintetizados químicamente). Se contempla que el polinucleótido puede contener modificaciones de una o más bases nitrogenadas, azúcares de pentosa o grupos fosfato en la cadena de nucleótido. Tales modificaciones se conocen bien en la técnica y pueden ser con el fin de, por ejemplo, mejorar la estabilidad del polinucleótido.

El polinucleótido puede administrarse en diversas formas. En algunas realizaciones, puede usarse un polinucleótido desnudo, o bien en forma lineal, o insertarse en un plásmido, tal como un plásmido de expresión. En otras

realizaciones, puede usarse un vector vivo tal como un vector viral o bacteriano.

Pueden estar presentes una o más secuencias reguladoras que ayudan en la transcripción de ADN en ARN y/o traducción de ARN en un polipéptido. En algunos casos, tales como en el caso de un polinucleótido que es una molécula de ARN mensajero (ARNm), no se requieren secuencias reguladoras en relación con el proceso de transcripción (por ejemplo, un promotor) y la expresión de proteínas puede efectuarse en ausencia de un promotor. El experto en la técnica puede incluir secuencias reguladoras adecuadas según requieran las circunstancias.

En algunas realizaciones, el polinucleótido está presente en un casete de expresión, en el que se une operativamente a secuencias reguladoras que permitirán que el polinucleótido se exprese en el sujeto al que se le administra la composición de la invención. La elección de casete de expresión depende del sujeto al que se le administra la composición así como las características deseadas para el polipéptido expresado.

Normalmente, un casete de expresión incluye un promotor que es funcional en el sujeto y puede ser constitutivo o inducible; un sitio de unión a ribosoma; un codón de iniciación (ATG) si es necesario; el polinucleótido que codifica para el polipéptido de interés; un codón de terminación; y opcionalmente una región terminal 3' (terminador de la traducción y/o transcripción). Pueden incluirse secuencias adicionales tales como una región que codifica para un péptido de señal. El polinucleótido que codifica para el polipéptido de interés puede ser homólogo o heterólogo con respecto a cualquiera de las demás secuencias reguladoras en el casete de expresión. Las secuencias que van a expresarse junto con el polipéptido de interés, tal como un péptido de señal que codifica para una región, se ubican normalmente adyacentes al polinucleótido que codifica para la proteína que va a expresarse y colocarse en el marco de lectura apropiado. El marco de lectura abierto constituido por el polinucleótido que codifica para la proteína que va a expresarse únicamente o junto con cualquier otra secuencia que va a expresarse (por ejemplo, el péptido de señal), se coloca debajo del control del promotor de modo que la transcripción y la traducción se producen en el sujeto al que se le administra la composición.

La cantidad de un antígeno adicional usado en un tratamiento individual con una composición de vacuna tal como se describe en el presente documento puede variar según el tipo de antígeno y el tamaño del sujeto. Un experto en la técnica será capaz de determinar, sin experimentación indebida, la cantidad eficaz de un antígeno adicional para usar en una aplicación particular. El término "cantidad eficaz" tal como se usa en el presente documento significa una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado deseado.

En algunas realizaciones, el antígeno adicional puede ser al menos un epítipo de CTL que puede inducir una respuesta de CTL. Por ejemplo, el antígeno adicional puede ser un epítipo de CTL derivado de una proteína identificada como que está regulada por incremento en células cancerosas.

En una realización, el epítipo de CTL puede ser un epítipo de una proteína asociada a tumor, tal como por ejemplo, una proteína asociada a melanoma. En algunas realizaciones, la proteína asociada a melanoma es proteína 2 relacionada con tirosina (TRP-2) o p53, que puede obtenerse mediante diversos métodos que incluyen tecnología recombinante o síntesis química.

Los siguientes genes, sin limitación, codifican para proteínas asociadas a tumor que tienen secuencias peptídicas que pueden incorporarse como antígenos adicionales en la vacuna de la invención: p53, HPV E6 y E7, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, HER2/neu, hTERT, hTERT, iCE, MUC1, MUC2, PRAME, P15, RUI, RU2, SART-1, SART-3, WT1, PSA, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, gp100, MART-1/Melan A, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, BAGE, DAM-6, DAM-10, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7B, GAGE-8, NA88-A, NY-ESO-1, NY-ESO-1a (CAG-3), AFP, β -catenina/m, caspasa-8/m, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, Ras, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, miosina/m, RAGE, SART-2, survivina, TRP-2/INT2 y 707-AP.

En una realización, la vacuna puede comprender una mezcla de epítopos de CTL asociados con cáncer como antígenos para inducir una respuesta de CTL. Por ejemplo, el antígeno puede comprender al menos uno o más de un antígeno de survivina tal como se describe en el presente documento, tal como por ejemplo y sin limitación, antígenos peptídicos de survivina que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos: FEELTLGEF (SEQ ID NO: 1); FTELTGEF (SEQ ID NO: 2); LTLGEFLKL (SEQ ID NO: 3); LMLGEFLKL (SEQ ID NO: 4); RISTFKNWPF (SEQ ID NO: 5); RISTFKNWPK (SEQ ID NO: 6); STFKNWPFL (SEQ ID NO: 7); y LPPAWQPFL (SEQ ID NO: 8), junto con al menos un antígeno adicional de una proteína asociada a tumor.

(iii) Epítipo de células T auxiliares

En algunas realizaciones, la vacuna de la invención comprende al menos un epítipo de células T auxiliares o antígeno de células T auxiliares.

Los epítopos de células T auxiliares son una secuencia de aminoácidos (aminoácidos naturales o no naturales) que tienen actividad de células T auxiliares. Los epítopos de células T auxiliares se reconocen por los linfocitos T auxiliares, que desempeñan un papel importante en el establecimiento y la maximización de las capacidades del

sistema inmunitario, y están implicados en la activación y el direccionamiento de otras células inmunitarias, tales como, por ejemplo, linfocitos T citotóxicos.

Un epítipo de células T auxiliares puede consistir en un epítipo continuo o discontinuo. Por tanto, no cada aminoácido de una célula T auxiliar es necesariamente parte del epítipo. Por consiguiente, los epítipos de células T auxiliares, incluyendo análogos y segmentos de epítipos de células T auxiliares, pueden potenciar o estimular una respuesta inmunitaria. Los epítipos de células T auxiliares inmunodominantes son grandes rasgos reactivos en poblaciones animales y humanas con tipos de CMH ampliamente divergentes (Celis *et al.* (1988) J. Immunol. 140:1808-1815; Demotz *et al.* (1989) J. Immunol. 142:394-402; Chong *et al.* (1992) Infect. Immun. 60:4640-4647). El dominio de célula T auxiliar de los péptidos objeto tiene desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 aminoácidos y preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 30 aminoácidos. Cuando están presentes múltiples epítipos de células T auxiliares, entonces cada epítipo de células T auxiliares actúa independientemente.

En algunas realizaciones, el epítipo de células T auxiliares puede formar parte de un antígeno descrito en el presente documento. En particular, si el antígeno es de tamaño suficiente, puede contener un epítipo que funciona como epítipo de células T auxiliares. En otras realizaciones, el epítipo de células T auxiliares es una molécula diferente del antígeno.

En otra realización, los análogos de epítipo de células T auxiliares pueden incluir sustituciones, deleciones e inserciones de desde uno hasta aproximadamente 10 residuos de aminoácido en el epítipo de células T auxiliares. Los segmentos de célula T auxiliar son porciones contiguas de un epítipo de células T auxiliares que son suficientes para potenciar o estimular una respuesta inmunitaria. Un ejemplo de segmentos de célula T auxiliar es una serie de péptidos solapantes que se derivan de un único péptido más largo.

En una realización particular, las composiciones de la invención pueden comprender como epítipo de células T auxiliares o antígeno, el péptido de la toxina tetánica A16L (830 a 844; AQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 9), con un residuo de alanina añadido a su extremo amino para potenciar la estabilidad (Slingluff *et al.*, Clin Cáncer Res., 7: 3012-3024, 2001).

Otras fuentes de epítipos de células T auxiliares que pueden usarse en las presentes composiciones incluyen, por ejemplo, epítipos de células T auxiliares del antígeno de la superficie de la hepatitis B, epítipos de células T auxiliares de toxina pertussis, epítipo de células T auxiliares de la proteína F del virus del sarampión, epítipo de células T auxiliares de la proteína de la membrana exterior principal de *Chlamydia trachomatis*, epítipos de células T auxiliares de la toxina diftérica, epítipos de células T auxiliares de circunsporozoito de *Plasmodium falciparum*, epítipos de células T auxiliares de triosa fosfato isomerasa de *Schistosoma mansoni*, epítipos de células T auxiliares de TraT de *Escherichia coli* y análogos y segmentos de potenciamiento del sistema inmunitario de cualquiera de estos epítipos de células T auxiliares.

En algunas realizaciones, el epítipo de células T auxiliares puede ser un epítipo universal de células T auxiliares. Un epítipo universal de células T auxiliares tal como se usa en el presente documento se refiere a un péptido u otra molécula inmunogénica, o un fragmento de la misma, que se une a una multiplicidad de las moléculas del CMH de clase II de manera que activa la función de células T de manera limitada a la clase II (células T CD4+). Un ejemplo de un epítipo universal de células T auxiliares es PADRE (epítipo pan-DR) que comprende la secuencia peptídica AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 12), en la que X puede ser ciclohexilalanilo. PADRE tiene específicamente un epítipo CD4+ de células T auxiliares, es decir, estimula la inducción de una respuesta de células T auxiliares CD4+ específica de PADRE.

Además del péptido de la toxina tetánica modificado A16L mencionado anteriormente, el toxoide tetánico tiene otros epítipos de células T auxiliares que trabajan de manera similar que PADRE. Las toxinas tetánica y diftérica tienen epítipos universales para células CD4+ humanas (Dietelm-Okita, B.M. *et al.*, J. Infect. Diseases, 181:1001-1009, 2000). En otra realización, el epítipo de células T auxiliares puede ser un péptido toxoide tetánico tal como F21E que comprende la secuencia peptídica FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (aminoácidos 947-967; SEQ ID NO: 13).

En determinadas realizaciones, el epítipo de células T auxiliares se fusiona con al menos uno del uno o más antígenos de survivina en la vacuna de la invención o con el antígeno adicional que puede incluirse en la vacuna (por ejemplo, un péptido de fusión).

(iv) Adyuvantes

En algunas realizaciones, la vacuna de la invención comprende uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Un gran número de adyuvantes se han descrito y los conocen los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., EE.UU. 1985) y The United States Pharmacopoeia: The National Formulary (USP 24 NF19) publicada en 1999.

Los adyuvantes a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, alumbre, otros compuestos de aluminio, bacilo de Calmette y Guérin (BCG), TiterMax™, Ribi™, adyuvante completo de Freund (FCA), oligodesoxinucleótidos que contienen CpG (CpG ODN), lipopéptidos y polinucleótidos poli I:C. Un CpG ODN a modo de ejemplo es 5'-TCCATGACGTTTCCTGACGTT-3' (SEQ ID NO: 14). El experto puede seleccionar fácilmente otros CpG ODN apropiados basándose en la especie diana y la eficacia. Un lipopéptido a modo de ejemplo incluye, sin limitación, Pam3Cys-SKKK (EMC Microcollections, Alemania) o variantes, homólogos y análogos de los mismos. La familia Pam2 de lipopéptidos ha mostrado ser una alternativa eficaz a la familia Pam3 de lipopéptidos.

En una realización particular, la vacuna comprende un polinucleótido poli I:C como adyuvante, tal como por ejemplo y sin limitación, un polinucleótido sintético de desoxiinosina/citoxina de 26 meros.

Tal como se usa en el presente documento, un "poli I:C" o "polinucleótido poli I:C" es una molécula de polinucleótido bicatenaria (ARN o ADN o una combinación de ADN y RNA), cada hebra de la cual contiene al menos 6 residuos de ácido inosínico o citidílico contiguos, o 6 residuos contiguos seleccionados de ácido inosínico y ácido citidílico en cualquier orden (por ejemplo IICIC, ICICIC o IICCC), y que puede inducir o potenciar la producción de al menos una citocina inflamatoria, tal como interferón, en un sujeto mamífero. Los polinucleótidos poli I:C tendrán normalmente una longitud de aproximadamente 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 25, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 1000 o más residuos. El límite superior no se cree que sea esencial. Los polinucleótidos poli I:C preferidos pueden tener una longitud mínima de aproximadamente 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 ó 30 nucleótidos y una longitud máxima de aproximadamente 1000, 500, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45 ó 40 nucleótidos.

Cada hebra de un polinucleótido poli I:C puede ser un homopolímero de residuos de ácido inosínico o citidílico, o cada hebra puede ser un heteropolímero que contiene ambos residuos de ácido inosínico y citidílico. En cualquier caso, el polímero puede estar interrumpido por uno o más residuos de ácido distinto de inosínico o distinto de citidílico (por ejemplo uridina), siempre que haya al menos una región contigua de 6 residuos de I, 6 de C o 6 de I/C tal como se describió anteriormente. Normalmente, cada hebra de un polinucleótido poli I:C contendrá no más de 1 residuo distinto de I/C por 6 residuos de I/C, más preferiblemente, no más de 1 residuo distinto de I/C por cada 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 o 30 residuos de I/C.

Los residuos de ácido inosínico o ácido citidílico (u otros) en el polinucleótido poli I:C pueden derivatizarse o modificarse tal como se conoce en la técnica, siempre que se conserve la capacidad del polinucleótido poli I:C para promover la producción de una citocina inflamatoria, tal como interferón. Los ejemplos no limitativos de derivados o modificaciones incluyen por ejemplo modificaciones de azido, modificaciones de flúor o el uso uniones tioéster (o similares) en lugar de uniones fosfodiéster naturales para potenciar la estabilidad *in vivo*. El polinucleótido poli I:C también puede modificarse para por ejemplo potenciar su resistencia a la degradación *in vivo* por ejemplo complejando la molécula con poli-lisina y carboximetilcelulosa cargadas positivamente, o con un péptido sintético cargado positivamente.

El polinucleótido poli I:C se incluirá normalmente en la composiciones de la invención en una cantidad de desde aproximadamente 0,001 mg hasta 1 mg por dosis unitaria de la composición. En determinadas realizaciones, la cantidad de polinucleótido poli I:C será de aproximadamente 0,04 mg/ml de la composición de vacuna.

Otros adyuvantes adecuados de la vacuna son los que activan o aumentan la actividad de TLR2. Tal como se usa en el presente documento, un adyuvante que "activa" o "aumenta la actividad" de un TLR incluye cualquier adyuvante, en algunas realizaciones un adyuvante a base de lípidos, que actúa como agonista de TLR. Además, la activación o disminución de la actividad de TLR2 abarca su activación en cualquier forma monomérica, homodimérica o heterodimérica, y particularmente incluye la activación de TLR2 como un heterodímero con TLR1 o TLR6 (es decir TLR1/2 o TLR2/6).

Una realización a modo de ejemplo de un adyuvante que activa o aumenta la actividad de TLR2 es un adyuvante a base de lípidos que comprende al menos un resto lipídico o componente lipídico.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "resto lipídico" o "componente lipídico" se refiere a cualquier ácido grado (por ejemplo acilos grasos) o derivado del mismo, incluyendo por ejemplo triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos. Los ácidos grasos a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, grupos palmitoilo, miristoilo, estearoilo y decanoilo o cualquier grupo acilo grado saturado o insaturado C2 a C30, preferiblemente cualquier grupo acilo grado saturado o insaturado C14 a C22, y más preferiblemente un grupo acilo grado saturado o insaturado C16. Por tanto, tal como se le hace referencia en el presente documento, la expresión "adyuvante basado en lípidos" abarcan cualquier adyuvante que comprende un grupo acilo graso o derivado del mismo.

Los adyuvantes basados en lípidos contienen un mínimo de al menos un resto lipídico, o un análogo de resto lipídico sintético/semisintético, que puede acoplarse sobre un aminoácido, un oligopéptido u otras moléculas (por ejemplo un hidrato de carbono, un glicano, un polisacárido, biotina, rodamina, etc.). Por tanto, sin limitación, el adyuvante basado en lípidos puede ser, por ejemplo, un lipoaminoácido, un lipopéptido, un lipoglicano, un lipopolisacárido o un ácido lipoteicoico. Además, un resto lipídico o estructura que contiene un resto lipídico puede acoplarse de manera

covalente o no covalente a un antígeno para crear compuestos antigénicos con propiedades adyuvantes incorporadas. Por ejemplo, y sin limitación, el resto basado en lípidos puede comprender un catión (por ejemplo níquel) para proporcionar una carga positiva para la unión no covalente.

- 5 En algunas realizaciones, el resto lipídico o componente lipídico puede producirse de manera natural, tal como por ejemplo un componente de la pared celular (por ejemplo lipoproteína) de una bacteria Gram-positiva o Gram-negativa, *Rhodopseudomonas viridis*, o micoplasma. En otras realizaciones, el resto lipídico o componente lipídico puede ser sintético o semisintético.
- 10 El adyuvante basado en lípidos puede comprender ácido palmítico (PAM) como al menos uno de los componentes o restos lipídicos del adyuvante. Tales adyuvantes basados en lípidos se denominan en el presente documento "adyuvante de ácido palmítico". El ácido palmítico es un lípido de bajo peso molecular encontrado en la lipoproteína de Braun inmunológicamente reactiva de *Escherichia coli*. Otros nombres químicos comunes para el ácido palmítico incluyen, por ejemplo, ácido hexadecanoico en la nomenclatura de la IUPAC y ácido 1-pentadecanocarboxílico. La
- 15 fórmula molecular del ácido palmítico es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$. Tal como entenderán los expertos en la técnica, es posible que la cadena lipídica del ácido palmítico pueda alterarse. Los compuestos a modo de ejemplo que pueden usarse en el presente documento como adyuvantes de ácido palmítico, y métodos para su síntesis, se describen por ejemplo en las publicaciones de patente estadounidense US 2008/0233143; US 2010/0129385; y US 2011/0200632.
- 20 Tal como se describió anteriormente para restos lipídicos generalmente, un adyuvante de ácido palmítico contiene como mínimo al menos un resto ácido palmítico, que puede acoplarse sobre un aminoácido, un oligopéptido u otras moléculas. Un resto ácido palmítico o una estructura que contiene ácido palmítico puede acoplarse de manera covalente o no covalente a un antígeno para crear compuestos antigénicos con propiedades adyuvantes incorporadas. El resto ácido palmítico o una estructura química que contiene ácido palmítico puede conjugarse con
- 25 un péptido de cisteína (Cys) para permitir diversas configuraciones estructurales del adyuvante, incluyendo estructuras lineales y ramificadas. El residuo de cisteína se ha extendido comúnmente mediante residuos polares tales como serina (Ser) y/ o lisina (Lys) en el extremo C-terminal para crear compuestos adyuvantes con solubilidad mejorada. Los compuestos adyuvantes que contienen ácido palmítico podrían mezclarse con un antígeno, asociarse con un antígeno a través de interacciones no covalentes o alternativamente unirse covalentemente a un antígeno, o
- 30 bien directamente o bien con el uso de un ligador/espaciador, para generar respuestas inmunitarias potenciadas. Lo más comúnmente, se unen dos restos ácido palmítico a una estructura principal de glicerilo y un residuo de cisteína para crear dipalmitoil-S-gliceril-cisteína (PAM_2Cys) o tripalmitoil-S-gliceril-cisteína (PAM_3Cys), que pueden usarse también en múltiples configuraciones tal como se describió anteriormente.
- 35 Por tanto, en una realización, el adyuvante de la composición puede comprender un resto o componente de ácido palmítico. El resto ácido palmítico puede modificarse o manipularse para mejorar su estabilidad *in vitro* o *in vivo*, potenciar su unión a receptores (tales como por ejemplo receptores de tipo toll tal como se describe más adelante) o potenciar su actividad biológica.
- 40 En una realización particular, el adyuvante de ácido palmítico puede comprender PAM_2Cys o PAM_3Cys . En otra realización particular, el adyuvante de ácido palmítico puede ser Pam-2-Cys-Ser-(Lys)₄ o Pam-3-Cys-Ser-(Lys)₄. Tales adyuvantes de ácido palmítico están disponibles, por ejemplo, como reactivos de investigación de EMC Microcollections GmbH (Alemania) e InvivoGen (San Diego, California, EE.UU.). También están disponibles de EMC Microcollections diversos análogos de Pam-2-Cys-Ser-(Lys)₄ y Pam-3-Cys-Ser-(Lys)₄, incluyendo análogos
- 45 marcados.

La composición de la invención puede comprender un adyuvante tal como se describió anteriormente en combinación con al menos otro adyuvante adecuado. Realizaciones a modo de ejemplo del al menos otro adyuvante abarcan, pero de ningún modo se limitan a, compuestos orgánicos e inorgánicos, polímeros, proteínas, péptidos, azúcares de fuentes sintéticas, no biológicas o biológicas (incluyendo pero sin limitarse virosomas, partículas similares a virus, virus y bacterias de sus componentes).

- Los ejemplos adicionales de adyuvantes compatibles pueden incluir, sin limitación, quimiocinas, agonistas de receptores de tipo Toll, factores estimulantes de colonias, citocinas, 1018 ISS, sales de aluminio, Amplivax, AS04, AS15, ABM2, Adjumer, Algammulin, AS01B, AS02 (SBASA), AS02A, BCG, calcitriol, quitosano, toxina del cólera, CP-870,893, CpG, polilC, CyaA, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA), ftalato de dibutilo (DBP), dSLIM, gamma inulina, GM-CSF, GMDP, glicerol, IC30, IC31, Imiquimod, ImuFact IMP321, IS Patch, ISCOM, ISCOMATRIX, JuvImmune, LipoVac, LPS, proteína de núcleo lipídico, MF59, monofosforil lípido A, Montanide® IMS1312,
- 55 adyuvantes a base de Montanide®, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, sistema de vector PepTel, otras moléculas a base de palmitoil, micropartículas de PLG, resiquimod, escualeno, SLR172, YF-17 DBCG, QS21, QuilA, P1005, poloxámero, saponina, polinucleótidos sintéticos, zimosano, toxina pertussis.
- 60

Por consiguiente, la composición puede comprender uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, al menos uno del uno o más antígenos de survivina o el antígeno adicional puede acoplarse a

- 65 al menos uno de los adyuvantes.

La cantidad de adyuvante usado depende de la cantidad de antígeno y del tipo de adyuvante. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de adyuvante necesaria en una aplicación particular mediante pruebas empíricas.

5 (v) *Liposomas*

En algunas realizaciones, la vacuna de la invención comprende liposomas. En una realización particular, se incluyen liposomas cuando las composiciones de vacuna comprenden un portador que comprende una fase continua de una hidrófoba tal como se describe en el presente documento.

Los liposomas representan una realización particular de un sistema adyuvante abarcado por la presente invención. Sin embargo, las vacunas de la invención pueden no incluir liposomas. Más bien, en otras realizaciones de las vacunas, los uno o más antígenos de survivina pueden combinarse con cualquier adyuvante adecuado para la administración del antígeno de survivina a un sujeto.

Los liposomas son membranas de bicapa lipídica completamente cerradas que contienen un volumen acuoso atrapado. Los liposomas pueden ser vesículas unilamelares (que presentan una única membrana bicapa) o vesículas multilamelares caracterizadas por bicapas de múltiples membranas, cada bicapa puede estar o no separada de la siguiente por una capa acuosa. Puede encontrarse una discusión general de los liposomas en Gregoriadis G. Immunol. Today, 11:89-97, 1990; y Frezard, F., Braz. J. Med. Bio. Res., 32:181-189, 1999. Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, el término "liposomas" pretende abarcar todas de tales estructuras vesiculares tal como se describió anteriormente, incluyendo, sin limitación, las descritas en la técnica como "niosomas", "transferosomas" y "virosoomas".

Aunque puede usarse cualquier liposomas en esta invención, incluyendo liposomas preparados a partir de lípidos de arqueobacterias, los liposomas particularmente útiles usan fosfolípidos y colesterol no esterificado en la formulación de liposoma. El colesterol se usa para estabilizar los liposomas y cualquier otro compuesto que estabilice los liposomas puede reemplazar al colesterol. Los expertos en la técnica conocen otros compuestos estabilizantes de liposomas. Por ejemplo, los fosfolípidos saturados producen liposomas con mayores temperaturas de transición indicando estabilidad aumentada.

Fosfolípidos que se usan preferiblemente en la preparación de liposomas son aquellos con al menos un grupo de cabeza seleccionado del grupo que consiste en fosfoglicerol, fosfoetanolamina, fosfoserina, fosfocolina (por ejemplo DOPC; 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina) y fosfoinositol. Se prefieren más liposomas que comprenden lípidos que son el 94-100% de fosfatidilcolina. Tales lípidos están disponibles comercialmente en la lecitina Fosfolipon® 90 G. Cuando se usa también colesterol no esterificado en la formulación de liposomas, el colesterol se usa en una cantidad equivalente a aproximadamente el 10% del peso del fosfolípido. Si se usa un compuesto distinto de colesterol para estabilizar los liposomas, un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad necesaria en la composición.

Pueden obtenerse composiciones de liposomas, por ejemplo, usando lípidos naturales, lípidos sintéticos, esfingolípidos, lípidos de éteres, esteroides, cardiolipina, lípidos catiónicos y lípidos modificados con poli(etilenglicol) y otros polímeros. Los lípidos sintéticos pueden incluir los siguientes constituyentes de ácido graso; lauroílo, miristoílo, palmitoílo, estearoílo, araquidoílo, oleoílo, linoleoílo, erucoílo, o combinaciones de estos ácidos grasos.

45 (vi) *Portadores*

En algunas realizaciones, la vacuna de la invención comprende un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, un portador farmacéuticamente aceptable se refiere a cualquier sustancia adecuada para administrar una composición de vacuna de la invención, y que es útil en la presente invención.

Se conocen bien en la técnica portadores que pueden usarse con las vacunas de la invención, e incluyen, pero de ningún modo se limitan a, por ejemplo, agua, solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer, disolución de dextrosa, disoluciones que contienen suero, disolución de Hank, otras disoluciones acuosas fisiológicamente equilibradas, emulsiones de aceite en agua, aceites, emulsiones de agua en aceite, ésteres, poli(etileno-acetato de vinilo), copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico, poli(ácido láctico), gelatina, matrices de colágeno, polisacáridos, poli(D,L lactida), poli(ácido málico), poli(caprolactona), celulosas, albúmina, almidón, caseína, dextrano, poliésteres, etanol, metacrilato, poliuretano, polietileno, polímeros de vinilo, glicoles, tiroglobulina, albúminas tales como albúmina sérica bovina, toxoide tetánico, poliaminoácidos tales como poli-L-lisina, poli-ácido L-glutámico, proteína de núcleo de virus de la hepatitis B, influenza, mezclas de los mismos y similares. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 2000, Gennaro, A R ed., Eaton, Pa.: Mack Publishing Co.

En una realización particular, el portador de la composición de vacuna es un portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba, preferiblemente una sustancia hidrófoba líquida. La fase continua puede ser

una sustancia hidrófoba esencialmente pura o una mezcla de sustancias hidrófobas. Además, el portador puede ser una emulsión de agua en una sustancia hidrófoba o una emulsión de agua en una mezcla de sustancia hidrófobas, siempre que la sustancia hidrófoba constituya la fase continua. Además, en otra realización, el portador puede funcionar como adyuvante.

Sustancia hidrófobas que son útiles en las composiciones tal como se describen en el presente documento son aquellas que son farmacéuticamente y/o inmunológicamente aceptables. El portador es preferiblemente un líquido pero determinadas sustancias hidrófobas que no son líquidas a temperatura atmosférica pueden licuarse, por ejemplo mediante calentamiento, y son también útiles en esta invención. En una realización, el portador hidrófobo puede ser una emulsión de solución salina tamponada con fosfato/adyuvante incompleto de Freund (PBS/FIA).

Emulsiones de aceite o de agua en aceite son portadores particularmente adecuados para su uso en la composición de vacuna de la invención. Los aceites deben ser farmacéuticamente y/o inmunológicamente aceptables. Los aceites adecuados incluyen, por ejemplo, aceites minerales (especialmente aceite mineral ligero o de baja viscosidad tal como Drakeol® 6VR), aceites vegetales (por ejemplo, aceite de soja), aceites de nueces (por ejemplo, aceite de cacahuete), o mezclas de los mismos. Por tanto, en una realización particular el portador es una sustancia hidrófoba tal como aceite vegetal, aceite de nueces o aceite mineral. También pueden usarse grasas animales y materiales poliméricos hidrófobos artificiales, particularmente aquellos que son líquidos a temperatura atmosférica o que pueden licuarse de manera relativamente fácil.

Para potenciar la inmunogenicidad de vacunas contra el cáncer, Immunovaccine Inc. ha desarrollado una plataforma de vacuna adyuvante diseñada para facilitar una respuesta inmunitaria fuerte y robusta a antígenos peptídicos. DepoVax™ (DPX) es una formulación de liposoma en aceite, que incluye un adyuvante de TLR y péptido de células T auxiliares universal, que puede formularse con cualquier epítipo, o mezcla de epítipos, para inducir una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T citotóxicos (Karkada *et al.*, J Immunother 33(3):250-261, 2010) y/o una respuesta inmunitaria humoral. DPX forma un depósito fuerte en el sitio de inmunización que prolonga la exposición del antígeno al sistema inmunitario.

Se ha mostrado que una única vacunación con péptidos en DPX da como resultado respuestas inmunitarias equivalentes o mejores que múltiples vacunaciones con péptidos en otras formulaciones convencionales, tales como emulsiones de Montanide ISA51 VG, similar a VacciMax que era una plataforma de vacuna basada en emulsión de primera generación (Daftarian *et al.*, J Transl Med 5: 26, 2007; Mansour *et al.*, J Transl Med 5: 20, 2007). Una vacuna de péptidos basada en DepoVax™ denominada DPX-0907 ha completado recientemente un ensayo clínico de fase I en pacientes con cáncer de mama, ovario y próstata demostrando seguridad e inmunogenicidad en estos pacientes avanzados (Berinstein *et al.*, J Transl Med 10(1): 156, 2012).

Por tanto, en una realización particular, el portador de la vacuna de la invención puede ser el sistema adyuvante basado en liposomas de Immunovaccine, Inc. A diferencia de vacunas basadas en emulsión de agua en aceite, que depende de aceite que atrapa gotitas de agua que contienen antígeno y adyuvante, las formulaciones basadas en DepoVax™ dependen de liposomas para facilitar la incorporación de antígenos y adyuvantes directamente en el aceite, sin la necesidad de emulsificación. Las ventajas de este enfoque incluyen: (1) potenciación de la solubilidad de antígenos hidrófilos/adyuvante en diluyentes oleosos que de lo contrario tendrían normalmente una solubilidad máxima en diluyentes de base acuosa, y (2) la eliminación de procedimientos de emulsificación engorrosos antes de la administración de la vacuna.

En una realización preferida, el portador es aceite mineral o es un oleato de manida en disolución de aceite mineral, tal como el disponible comercialmente como Montanide® ISA 51 (SEPPIC, Francia).

En determinadas realizaciones, las composiciones pueden estar sustancialmente libres de agua (por ejemplo, "libres de agua"). Es posible que el portador hidrófobo de estas composiciones "libres de agua" pueda contener todavía pequeñas cantidades de agua, siempre que el agua esté presente en la fase no continua del portador. Por ejemplo, componentes individuales de la composición pueden tener agua unida que puede no eliminarse completamente mediante procesos tales como liofilización o evaporación y determinados portadores hidrófobos pueden contener pequeñas cantidades de agua disuelta en los mismos. Generalmente, las composiciones de la invención que están "libres de agua" contienen, por ejemplo, menos de aproximadamente el 10%, el 9%, el 8%, el 7%, el 6%, el 5%, el 4%, el 3%, el 2%, el 1%, el 0,5%, el 0,1%, el 0,05% o el 0,01% de agua en una base de peso/peso del peso total del componente portador de la composición.

Métodos de preparación de composiciones de vacuna a modo de ejemplo

En una realización particular, la composición de vacuna de la invención es una que comprende al menos un antígeno de survivina, liposomas y un portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba.

Se conocen bien en la técnica métodos para preparar liposomas. Véanse por ejemplo Gregoriadis (1990) y Frezard (1999) ambos citados anteriormente. Puede usarse cualquier método adecuado para preparar liposomas en la práctica de la invención, o pueden obtenerse liposomas de una fuente comercial. Los liposomas se preparan

normalmente hidratando los componentes de liposomas que formarán la bicapa lipídica (por ejemplo fosfolípidos y colesterol) con una disolución acuosa, que puede ser agua pura o una disolución de uno o más componentes disueltos en agua, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina libre de fosfato o cualquier otra disolución acuosa fisiológicamente compatible.

En una realización, puede solubilizarse un componente de liposomas o mezcla de componentes de liposomas, tales como un fosfolípido (por ejemplo Fosfolipon® 90G) o DOPC y colesterol, en un disolvente orgánico, tal como una mezcla de cloroformo y metanol, seguido por filtrar (por ejemplo un filtro de PTFE de 0,2 µm) y secar, por ejemplo mediante evaporación rotatoria, para eliminar los disolventes.

La hidratación de la mezcla de lípidos resultante puede efectuarse por ejemplo inyectando la mezcla de lípidos en una disolución acuosa o sonicando la mezcla de lípidos y una disolución acuosa. Durante la formación de liposomas, los componentes de liposomas forman bicapas individuales (unilamelares) o bicapas múltiples (multilamelares) que rodean un volumen de la disolución acuosa con la que los componentes de liposomas se hidratan.

En algunas realizaciones, los liposomas se deshidratan luego, tal como mediante secado por congelación o liofilización.

Los liposomas se combinan con un portador apropiado, tal como un portador que comprende una fase hidrófoba continua. Esto puede realizarse de una variedad de modos.

Si el portador se compone únicamente de una sustancia hidrófoba o una mezcla de sustancia hidrófobas (por ejemplo uso de un portador de aceite mineral al 100%), los liposomas pueden simplemente mezclarse con la sustancia hidrófoba, o si hay múltiples sustancias hidrófobas, mezclarse con una cualquiera o una combinación de las mismas.

Si en su lugar el portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba contiene una fase acuosa discontinua, el portador adoptará normalmente la forma de una emulsión de la fase acuosa en la fase hidrófoba, tal como una emulsión de agua en aceite. Tales composiciones pueden contener un emulsionante para estabilizar la emulsión y para promover una distribución uniforme de los liposomas. En este sentido, los emulsionantes pueden ser útiles incluso si se usa un portador libre de agua, para el fin de promover una distribución uniforme de los liposomas en el portador. Los emulsionantes típicos incluyen oleato de manida (Arlacel™ A), lecitina (por ejemplo lecitina S100), un fosfolípido, Tween™ 80 y Spans™ 20, 80, 83 y 85. Normalmente, la razón en volumen (v/v) de sustancia hidrófoba con respecto a emulsionante está en el intervalo de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1 prefiriéndose una razón de aproximadamente 10:1.

Los liposomas pueden añadirse a la emulsión terminada, o pueden estar presentes en o bien la fase acuosa o bien la fase hidrófoba antes de la emulsificación.

El/los antígeno(s) de supervivencia o un antígeno adicional tal como se describe en el presente documento puede(n) introducirse en diversas fases diferentes del procedimiento de formulación. Puede incorporarse más de un tipo antígeno en la composición. Tal como se usa en esta sección, el término "antígeno" se usa en general y puede referirse a un antígeno de supervivencia tal como se describe en el presente documento, a uno o más antígenos de supervivencia, a un antígeno adicional tal como se describe en el presente documento o a uno o más antígenos adicionales, o cualquier combinación de los mismos. El término se usa en general para describir cómo cualquier antígeno puede formularse en las composiciones de vacuna de la invención. El término "antígeno" abarca tanto la forma singular "antígeno" como el plural "antígenos". No es necesario que todos los antígenos se introduzcan en la composición de vacuna del mismo modo.

En algunas realizaciones, el antígeno está presente en la disolución acuosa usada para hidratar los componentes que se usan para formar las bicapas lipídicas de los liposomas (por ejemplo fosfolípido(s) y colesterol). En este caso, el antígeno se encapsulará en el liposoma, presente en su interior acuoso. Si los liposomas resultantes no se lavan ni se secan, de manera que hay disolución acuosa residual presente que se mezcla en última instancia con el portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba, es posible que pueda estar presente antígeno adicional fuera de los liposomas en el producto final. En una técnica relacionada, el antígeno puede mezclarse con los componentes usados para formar las bicapas lipídicas de los liposomas, antes de la hidratación con la disolución acuosa. El antígeno puede añadirse también a liposomas preformados, en cuyo caso el antígeno puede cargarse activamente en los liposomas, o unirse a la superficie de los liposomas o el antígeno puede permanecer externo a los liposomas. En tales realizaciones, antes de la adición de antígeno, los liposomas preformados pueden ser liposomas vacíos (por ejemplo que no contienen antígeno encapsulado o adyuvante a base de lípidos) o los liposomas preformados pueden contener adyuvante a base de lípidos incorporado en o asociado con los liposomas. Estas etapas pueden producirse preferiblemente antes del mezclado con el portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba.

En un enfoque alternativo, el antígeno puede mezclarse en su lugar con el portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba, antes, durante o después de que el portador se combine con los liposomas. Si

el portador es una emulsión, el antígeno puede mezclarse con cualquiera o ambas de la fase acuosa o fase hidrófoba antes de la emulsificación. Alternativamente, el antígeno puede mezclarse con el portador después de la emulsificación.

- 5 La técnica de combinar el antígeno con el portador puede usarse junto con la encapsulación del antígeno en los liposomas tal como se describió anteriormente, de manera que el antígeno está presente tanto dentro de los liposomas como en el portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba.

- 10 Los procedimientos descritos anteriormente para introducir el antígeno en la composición se aplican también al epítipo de células T auxiliares y/o al adyuvante de las composiciones tal como se describen en el presente documento, en realizaciones en las que se incluyen. Es decir, el epítipo de células T auxiliares y/o adyuvante pueden introducirse en por ejemplo uno o más de: (1) la disolución acuosa usada para hidratar los componentes que se usan para formar las bicapas lipídicas de los liposomas; (2) la disolución acuosa tras la formación de las bicapas lipídicas de los liposomas; (3) los componentes usados para formar las bicapas lipídicas de los liposomas; o (4) el portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba, antes, durante o después de que el portador se combine con los liposomas. Si el portador es una emulsión, el epítipo de células T auxiliares y/o adyuvante puede mezclarse con o bien cualquier o bien ambos de la fase acuosa o fase hidrófoba antes, durante o después de la emulsificación.

- 20 La técnica de combinar el epítipo de células T auxiliares y/o adyuvante con el portador puede usarse junto con la encapsulación de estos componentes en los liposomas, o con la adición de estos componentes a los liposomas, de manera que el epítipo de células T auxiliares y/o adyuvante esté presente dentro y/o fuera de los liposomas y en el portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba.

- 25 El epítipo de células T auxiliares y/o adyuvante puede incorporarse en la composición junto con el antígeno en la misma etapa de procesamiento, o por separado, en una etapa de procesamiento diferente. Por ejemplo, el antígeno, epítipo de células T auxiliares y adyuvante pueden estar todos presentes en la disolución acuosa usada para hidratar los componentes de liposomas que forman la bicapa lipídica, de manera que los tres componentes quedan encapsulados en los liposomas. Alternativamente, el antígeno y el epítipo de células T auxiliares pueden encapsularse en los liposomas, y el adyuvante mezclarse con el portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba. En una realización adicional, el epítipo de células T auxiliares y/o adyuvante puede incorporarse en la composición después de la etapa de encapsulación del antígeno haciendo pasar la preparación de liposoma-antígeno a través de una miniextrusora manual y luego mezclando la preparación de liposoma-antígeno obtenida con el adyuvante a base de lípidos en, por ejemplo, tampón fosfato. El epítipo de células T auxiliares y/o adyuvante puede incorporarse también en la composición, o bien solo o bien junto con antígeno, después de que se hayan formado los liposomas, de manera que el epítipo de células T auxiliares y adyuvante puede asociarse o permanecer externo a los liposomas. El epítipo de células T auxiliares y/o adyuvante puede incorporarse también en o asociarse con liposomas antes de la adición del antígeno, permaneciendo el antígeno fuera de los liposomas preformados o cargado en/asociado con los liposomas mediante procesamiento adicional. En tales realizaciones, la preparación resultante puede liofilizarse y luego reconstituirse en el portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba. Se apreciará que son posibles muchas de tales combinaciones.

- 45 En una realización particular, la vacuna de la invención es DPX-Survivac. A continuación se presenta un método a modo de ejemplo para preparar DPX-Survivac. Sin embargo, se apreciará que también se abarcan realizaciones alternativas en el presente documento, tales como las descritas anteriormente en las que el antígeno, adyuvante y epítipo de células T auxiliares pueden introducirse en cualquier fase en la formulación de la vacuna, en cualquier orden y en última instancia pueden encontrarse dentro, fuera o tanto dentro como fuera de los liposomas.

- 50 Para preparar DPX-Survivac, en un método a modo de ejemplo, se forma un complejo con los cinco antígenos de survivina (SEQ ID No: 2, 4, 6, 7 y 8); adyuvante (polinucleótido poli I:C) y liposomas (DOPC y colesterol) en un tampón acuoso mediante un procedimiento de mezclado e hidratando los componentes lipídicos en presencia de los antígenos de survivina y adyuvante, se extruye para lograr un tamaño de partícula que puede esterilizarse por filtración, luego se carga en viales y se liofiliza hasta dar una torta seca. La torta seca se resuspende entonces en el portador hidrófobo Montanide ISA51 VG antes de su inyección. Este método a modo de ejemplo de preparación puede usarse con cualquier combinación de antígenos de survivina, cualquier adyuvante adecuado y cualquier epítipo de células T auxiliares adecuado.

- 60 Si la composición contiene uno o más adyuvantes adicionales, tales adyuvantes adicionales pueden incorporarse en la composición de un modo similar tal como se describió anteriormente para el adyuvante o combinando varios de tales métodos tal como puede ser adecuado para el/los adyuvante(s) adicional(es).

- 65 Pueden añadirse a tales composiciones estabilizadores tales como azúcares, antioxidantes o conservantes que mantienen la actividad biológica o mejoran la estabilidad química para prolongar la vida útil de almacenamiento del antígeno, adyuvante, los liposomas o el portador hidrófobo continuo.

En algunas realizaciones, puede usarse una mezcla de antígeno/adyuvante, en cuyo caso el antígeno y adyuvante

se incorporan en la composición al mismo tiempo. Una “mezcla de antígeno/adyuvante” se refiere a una realización en la que el antígeno y adyuvante están en el mismo diluyente al menos antes de su incorporación en la composición. El antígeno y adyuvante en una mezcla de antígeno/adyuvante pueden estar, aunque no necesariamente, unidos químicamente, tal como mediante enlaces covalentes.

En algunas realizaciones, el portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba puede tener por sí mismo actividad adyuvante. Adyuvante incompleto de Freund y Montanide® ISA 51 VG, son ejemplos de un portador hidrófobo con efecto adyuvante. Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, cuando se usa el término “adyuvante”, pretende indicar la presencia de un adyuvante además de cualquier actividad adyuvante proporcionada por el portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba.

Modo de administración

El alcance de la invención comprende la administración combinada de un agente que interfiere con la replicación del ADN y una vacuna que comprende al menos un antígeno de survivina.

Para mejorar la eficacia de la vacuna, realizaciones de la invención comprenden la administración de al menos dos dosis del agente que interfiere con la replicación del ADN antes de la primera administración de la vacuna. Conjuntamente con estas realizaciones, el agente puede administrarse adicionalmente al sujeto en cualquier otro momento antes, durante o después del transcurso de tratamiento con la vacuna, siempre que se administren al menos dos dosis antes de una primera administración de la vacuna.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “combinación”, “coadministración” o “administración combinada” o similares pretenden abarcar la administración del agente que interfiere con la replicación del ADN y la vacuna a un único paciente, y pretenden incluir casos en los que el agente y la vacuna no se administran necesariamente por la misma vía de administración o al mismo tiempo. Por ejemplo, el agente que interfiere con la replicación del ADN y la vacuna pueden ser para administración separada, secuencial o alterna.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “al menos dos dosis” pretende abarcar cualquier número de dosis que sea mayor de una única dosis. En una realización, las al menos dos dosis incluyen entre 2-50 dosis, más particularmente entre 2-28 dosis y más particularmente entre 2-14 dosis. En una realización, las al menos dos dosis son 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 dosis. Las al menos dos dosis pueden estar separadas por cualquier cantidad de tiempo adecuada. En una realización particular, las al menos dos dosis comprenden 2 dosis diariamente durante un periodo de una semana, totalizando 14 dosis.

El agente que interfiere con la replicación del ADN se administra normalmente en una cantidad suficiente para proporcionar un efecto inmunomodulador. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “efecto inmunomodulador” se refiere a la capacidad del agente que interfiere con la replicación del ADN para alterar (modular) uno o más aspectos del sistema inmunitario y/o células del sistema inmunitario. En una realización, la “cantidad suficiente para proporcionar un efecto inmunomodulador” es una cantidad del agente que pueden afectar de manera selectiva a la replicación del ADN en células del sistema inmunitario. Por ejemplo, la cantidad de agente puede ser una cantidad suficiente para seleccionar como diana selectivamente células que se dividen rápidamente del sistema inmunitario para provocar muerte celular programada. Esta cantidad también puede describirse como una dosis que “no es quimioterápica”, tal como se define en el presente documento.

La “cantidad suficiente para proporcionar un efecto inmunomodulador” puede denominarse de manera intercambiable en el presente documento cantidad de “dosis baja”. Por tanto, la invención implica preferiblemente el uso de una dosis baja de un agente que interfiere con la replicación del ADN en combinación con la vacuna. Cuando está relacionada con una realización particular de la invención en donde el agente que interfiere con la replicación del ADN es el agente alquilante ciclofosfamida, la expresión “dosis baja” se refiere normalmente a una dosis de ciclofosfamida que es menor de 300 mg/m², tal como por ejemplo 100-300 mg/m². En cuanto a administración diaria, una “dosis baja” de ciclofosfamida está normalmente entre aproximadamente 25-300 mg/día, y preferiblemente 50-150 mg/día. Particularmente adecuada es una cantidad de dosificación diaria de 100 mg de ciclofosfamida. También es particularmente adecuado administrar aproximadamente 50 mg de ciclofosfamida por dosis. Las cantidades de “dosis baja” de otros agentes que interfieren con la replicación del ADN, tal como se abarca en el presente documento, las conocerían los expertos en la técnica, o podrían determinarse mediante la experiencia de rutina.

Los métodos de la invención implican administrar al menos dos dosis de un agente que interfiere con la replicación del ADN, y luego posteriormente administrar una vacuna de la invención. Por “administrar posteriormente”, quiere decirse que la administración del agente que interfiere con la replicación del ADN comienza antes de la primera administración de la vacuna (por ejemplo se administran al menos dos dosis de agente al sujeto antes de la vacuna). Sin embargo, tal como se describe en el presente documento, la administración al sujeto de agente que interfiere con la replicación del ADN puede continuar después de que comienza la administración de la vacuna. En realizaciones alternativas, la administración del agente que interfiere con la replicación del ADN se detiene antes de la primera administración de la vacuna.

En la invención, la primera dosis de un agente que interfiere con la replicación del ADN precede a cualquier tratamiento del sujeto con la vacuna. En una realización, la cantidad mínima de tiempo que separa la primera administración del agente que interfiere con la replicación del ADN y la primera administración de la vacuna puede ser cualquier cantidad de tiempo suficiente para proporcionar un efecto inmunomodulador. Tal como apreciará el experto, la cantidad de tiempo suficiente para proporcionar un efecto inmunomodulador puede depender de muchas variables y puede no ser la misma para pacientes individuales.

En algunas realizaciones, la primera dosis de un agente que interfiere con la replicación del ADN se administra al menos 12 horas antes de la primera administración de la vacuna, y preferiblemente al menos dos, cuatro o seis días antes de la primera vacunación. En una realización adicional, la primera dosis del agente que interfiere con la replicación del ADN puede proporcionarse aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 días, o más, antes de la primera administración de la vacuna. En una realización particular, la primera administración del agente que interfiere con la replicación del ADN se produce 1-4 días antes de la primera administración de la vacuna. Particularmente adecuada es una primera administración del agente que interfiere con la replicación del ADN aproximadamente una semana antes de la primera administración de la vacuna.

Después de la primera dosis con el agente que interfiere con la replicación del ADN, la dosis posterior puede administrarse a cualquier intervalo de tiempo deseado entre dosis, siempre que se administren al menos dos dosis del agente antes de la primera administración de la vacuna. La dosificación con el agente que interfiere con la replicación del ADN puede detenerse antes, durante o después del transcurso del tratamiento con la vacuna.

En una realización, la primera dosis va seguida por una o más dosis de mantenimiento. Tal como se usa en el presente documento, el término "dosis de mantenimiento" pretende abarcar una dosis del agente que interfiere con la replicación del ADN que se administra un intervalo y/o cantidad tal como para mantener una cantidad suficiente del agente, y/o sus metabolitos activos, en el cuerpo del sujeto (por ejemplo evitar el aclaramiento sistémico total del mismo del agente y/o sus metabolitos activos). Al proporcionar una dosis de mantenimiento, puede ser posible prolongar y/o mantener el efecto inmunomodulador del agente que interfiere con la replicación del ADN durante un periodo de tiempo prolongado antes, durante y/o después del transcurso de la administración con la vacuna.

En una realización, para mantener el efecto inmunomodulador, el agente que interfiere con la replicación del ADN puede administrarse 1, 2, 3, 4 ó 5 veces al día, o más, siempre que se mantenga la administración a dosis baja (por ejemplo las múltiples dosis más pequeñas se añaden a la dosis baja diaria deseada). Una única dosis (es decir, administración) del agente que interfiere con la replicación del ADN puede administrarse en un único punto de tiempo, tal como por ejemplo una píldora que se traga. Alternativamente, una única dosis del agente que interfiere con la replicación del ADN puede administrarse a lo largo de un periodo continuo corto, tal como por ejemplo mediante goteo intravenoso.

Para realizaciones de la invención en la que el agente que interfiere con la replicación del ADN es ciclofosfamida, puede ser apropiado proporcionar una dosis de mantenimiento, por ejemplo, cada 6-18 horas. El experto en la técnica sabría o podría determinar, mediante experiencia de rutina, el intervalo apropiado para la dosis de mantenimiento de ciclofosfamida, así como para otros agentes que interfieren con la replicación del ADN tal como se abarca en el presente documento.

En una realización particular, el agente que interfiere con la replicación del ADN se administra durante un periodo de al menos dos días consecutivos antes de la primera administración de la vacuna. En estos días, el agente que interfiere con la replicación del ADN puede administrarse al sujeto al menos 1, 2, 3 ó 4 veces al día, o cualquier número deseado de veces para proporcionar la cantidad de dosis baja diaria del agente.

En otra realización, el agente que interfiere con la replicación del ADN se administra durante un periodo de aproximadamente una semana antes de la primera administración de la vacuna. Pueden proporcionarse múltiples dosis durante este periodo de una semana. En realizaciones a modo de ejemplo, el agente que interfiere con la replicación del ADN puede administrarse cada día, cada dos días o a cualquier intervalo adecuado para proporcionar la dosis de mantenimiento descrita. Por ejemplo, una realización particular de la invención comprende administrar el agente dos veces al día durante un periodo de aproximadamente una semana antes de administrar la vacuna.

En la invención, puede haber una interrupción en el tratamiento con el agente que interfiere con la replicación del ADN antes de la primera administración de la vacuna. En tales realizaciones, la administración del agente que interfiere con la replicación del ADN puede detenerse permanente o temporalmente antes de la primera administración de la vacuna. El periodo de tiempo entre la última dosis del agente que interfiere con la replicación del ADN y la primera dosis de la vacuna puede ser cualquier periodo de tiempo adecuado siempre que el sujeto todavía obtenga un beneficio inmunomodulador del agente. Por ejemplo, y sin limitación, la administración del agente que interfiere con la replicación del ADN puede detenerse al mismo tiempo que se administra la primera dosis de la vacuna o en cualquier momento hasta aproximadamente una semana antes de la primera dosis de la vacuna. Por ejemplo, y sin limitación, la administración del agente que interfiere con la replicación del ADN puede detenerse a las aproximadamente 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60 ó 72 horas, o más, antes de la primera dosis de la

vacuna. En una realización particular, la administración del agente que interfiere con la replicación del ADN se detiene aproximadamente 2, 4 ó 7 días antes de la primera dosis de la vacuna.

En una realización alternativa, el tratamiento del sujeto con el agente que interfiere con la replicación del ADN continúa a lo largo de todo el transcurso del tratamiento con la vacuna, con o sin interrupciones intermitentes en la administración del agente. En realizaciones adicionales, el tratamiento con el agente que interfiere con la replicación del ADN puede continuar tras cesar la vacunación.

Por tanto, en una realización, el agente que interfiere con la replicación del ADN puede administrarse durante el periodo antes de cada administración con la vacuna. Alternativamente, el agente que interfiere con la replicación del ADN puede administrarse sólo durante el periodo antes de la primera administración con la vacuna.

Tal como se describe en el presente documento, el tratamiento con el agente que interfiere con la replicación del ADN puede continuar tras la primera administración con la vacuna. En una realización, la administración del agente que interfiere con la replicación del ADN continúa en una base diaria, con o sin interrupciones intermitentes, a lo largo de todo el transcurso del tratamiento con la vacuna. Por tanto, en algunas realizaciones, el agente se administrará antes de y durante el tratamiento con la vacuna. En tales casos, una vez que comienza la administración de la vacuna, es posible que el agente que interfiere con la replicación del ADN se administre al mismo tiempo que la vacuna, de manera inmediatamente secuencial, o a momentos diferentes en el día. Cuando el agente que interfiere con la replicación del ADN se administra al mismo tiempo que la vacuna, puede incluirse en la composición de vacuna de la invención como una única composición o administrarse en una composición separada.

Alternativamente, la administración del agente que interfiere con la replicación del ADN puede suspenderse durante los días que se administra la vacuna. Por tanto, los regímenes de la presente invención pueden incluir interrumpir la administración del agente que interfiere con la replicación del ADN durante el transcurso de la administración de la vacuna.

Las realizaciones descritas en el presente documento para administrar el agente que interfiere con la replicación del ADN antes de la primera administración de la vacuna se aplican también a la administración del agente después de la primera administración de la vacuna (por ejemplo antes de cada administración posterior de la vacuna).

Como realización particularmente adecuada, la invención comprende el tratamiento metronómico del sujeto con el agente que interfiere con la replicación del ADN. Para fines de la presente invención, "tratamiento metronómico", "régimen metronómico" o "dosificación metronómica" o similar, pretende referirse a una administración frecuente de una cantidad de dosis inferior a la normal del agente que interfiere con la replicación del ADN. Tal como se usa en el presente documento, el término "cantidad de dosis normal" puede referirse, por ejemplo y sin limitación, a o bien: (i) la dosis tolerada máxima establecida (MTD) o dosis convencional por medio de un programa de dosificación tradicional, o (ii) en casos en los que se ha establecido una cantidad de bolo individual a dosis baja para un agente que interfiere con la replicación del ADN particular, que a esa cantidad de dosis baja.

En dosificación metronómica, puede administrarse en última instancia una dosis acumulada igual, menor o mayor a lo largo de un determinado periodo de tiempo que se administraría por medio de un programa de dosificación tradicional. En una realización particularmente adecuada, esto se logra prolongando el lapso de tiempo durante el cual se realiza la dosificación y/o aumentando la frecuencia de administraciones, al tiempo que se disminuye la cantidad administrada en comparación con la cantidad de dosis normal. Por ejemplo, cuando se administra normalmente una cantidad de dosis baja de 300 mg/m² de un agente que interfiere con la replicación del ADN (por ejemplo mediante inyección en bolo individual), un régimen metronómico puede comprender administrar la misma cantidad a lo largo de un periodo de varios días administrando una dosis baja frecuente. Mediante este enfoque, puede usarse la dosificación metronómica, por ejemplo, para proporcionar la dosis de mantenimiento tal como se describe en el presente documento.

En una realización de la presente invención, el tratamiento metronómico con el agente que interfiere con la replicación del ADN pretende abarcar una administración de dosis baja diaria del agente a lo largo de un determinado periodo de tiempo, tal como por ejemplo un periodo de 2, 3, 4, 5, 6 ó 7, o más, días consecutivos. Durante estos días de dosificación metronómica, el agente que interfiere con la replicación del ADN puede proporcionarse a intervalos regulares frecuentes o intervalos variables. Por ejemplo, en una realización, una dosis del agente que interfiere con la replicación del ADN puede administrarse cada 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 ó 24 horas. En otra realización, una dosis del agente que interfiere con la replicación del ADN puede administrarse cada 2, 3 ó 4 días.

En algunas realizaciones de la presente invención, puede haber interrupciones o huecos en los periodos de tratamiento metronómico con el agente que interfiere con la replicación del ADN. De esta manera, el tratamiento metronómico con el agente que interfiere con la replicación del ADN puede producirse de un modo cíclico, alternando entre periodos con y sin administración. Son particularmente adecuados intervalos en los que el agente que interfiere con la replicación del ADN se administra al sujeto diariamente en intervalos semanales alternos. Por ejemplo, un periodo de administración de una semana del agente que interfiere con la replicación del ADN va seguido por una suspensión del tratamiento de una semana, y el ciclo se repite.

En una realización por tanto, la invención comprende administrar el agente que interfiere con la replicación del ADN al sujeto diariamente durante un periodo de una semana cada dos semanas. En un aspecto particular de esta realización, la administración del agente que interfiere con la replicación del ADN comienza aproximadamente una semana antes de la primera administración de la vacuna.

En lo que se refiere a la vacuna de la invención, en algunas realizaciones puede ser particularmente adecuado administrar la vacuna al sujeto a un intervalo una vez cada semana, una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas, preferiblemente una vez cada tres semanas. La frecuencia y duración de la administración de la vacuna puede ajustarse sin embargo según se desee para cualquier sujeto dado, y puede ser más o menos frecuente que una vez cada semana, una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. El intervalo entre las administraciones también puede no ser constante durante el transcurso del tratamiento con la vacuna. En la invención, la vacuna puede administrarse al sujeto 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces. Se entenderá que el tratamiento con la vacuna puede continuarse durante un periodo indefinido dependiendo de cómo está progresando el tratamiento del cáncer en el sujeto.

En una realización de la invención, el agente que interfiere con la replicación del ADN puede administrarse como un agente de sensibilización durante el periodo intermitente antes de cada administración de la vacuna.

En una realización particular, la invención que comprende la combinación de un agente que interfiere con la replicación del ADN y una vacuna de survivina implicará que la vacuna se administre al sujeto a un intervalo de una vez cada tres semanas (por ejemplo día 0, 21, 42, 63, 84, etc.) comenzando la primera administración el agente que interfiere con la replicación del ADN aproximadamente una semana antes (por ejemplo día -7) de la primera administración de la vacuna y continuando diariamente (por ejemplo de manera metronómica) a intervalos semanales alternos. En la figura 1 se muestra un régimen de tratamiento tal como este.

Tal como apreciará el experto, la frecuencia y duración de la administración del agente que interfiere con la replicación del ADN y la vacuna pueden ajustarse según se desee para cualquier sujeto dado. Los factores que pueden tenerse en cuenta incluyen, por ejemplo: la naturaleza de los uno o más antígenos de survivina en la vacuna; el tipo de cáncer; la edad, el estado físico, el peso corporal, el sexo y la dieta del sujeto; y otros factores clínicos.

El agente que interfiere con la replicación del ADN puede administrarse mediante cualquier medio de administración adecuado y cualquier vía de administración adecuada. En una realización, el agente que interfiere con la replicación del ADN se administra por vía oral, tal como en forma de una píldora, un comprimido o una cápsula. En una realización alternativa, el agente se administra mediante inyección (por ejemplo intravenosa). En una realización particular de la invención, el agente es ciclofosfamida y se administra por vía oral.

La vacuna de la invención tal como se describe en el presente documento puede formularse en una forma que es adecuada para administración oral, nasal, rectal o parenteral. La administración parenteral incluye modos de administración intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intramuscular, transepitelial, intrapulmonar, intratecal y tópica. En realizaciones en las que la vacuna se formula como una composición que comprende los uno o más antígenos de survivina, liposomas y un portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba, una vía de administración particularmente adecuada puede ser inyección (por ejemplo intradérmica, intramuscular o subcutánea) para lograr un efecto de depósito en el sitio de inyección. La vacuna y el agente que interfiere con la replicación del ADN no se administran necesariamente por la misma vía de administración o al mismo tiempo.

En una realización particular de la invención, el agente que interfiere con la replicación del ADN es un agente alquilante, tal como por ejemplo ciclofosfamida.

Indicaciones de tratamiento

Tal como se describe en el presente documento, la presente invención se refiere al tratamiento de cáncer. Los cánceres que pueden tratarse y/o prevenirse mediante la invención pueden incluir, por ejemplo, cualquier cáncer que exprese survivina o que sobreexpresa survivina en comparación con células normales.

En una realización, los cánceres que pueden tratarse mediante la invención incluyen, sin limitación, carcinoma, adenocarcinoma, linfoma, leucemia, sarcoma, blastoma, mieloma y tumores de células germinales. En una realización, el cáncer está en forma de un tumor sólido. Sin limitación, las realizaciones particularmente adecuadas incluyen glioblastoma, mieloma múltiple, cáncer ovárico, cáncer de las trompas de Falopio o cáncer peritoneal.

En algunas realizaciones, el sujeto puede haberse sometido a cirugía para eliminar un gran volumen del tumor, y la invención puede aplicarse antes y/o después de la extirpación del volumen del tumor. En otras realizaciones, puede habersele administrado al sujeto radioterapia, quimioterapia o alguno otro tratamiento no quirúrgico para controlar o destruir células cancerosas o malignas, y la invención puede aplicarse antes de o posteriormente a estas terapias.

En determinadas realizaciones, el cáncer está en un estadio avanzado.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “tumor”, “células tumorales”, “cáncer” y “células cancerosas” (usados de manera intercambiable), se refieren a células que presentan crecimiento anómalo, caracterizadas por una pérdida significativa del control de la proliferación celular o células que se han inmortalizado. El término “cáncer” o “tumor” incluye tumores o cáncer metastásico así como no metastásico. Un cáncer puede diagnosticarse usando criterios generalmente aceptados en la técnica, incluyendo la presencia de un tumor maligno.

“Tratar” o “tratamiento de”, o “prevenir” o “prevención de”, tal como se les hace referencia en el presente documento se refieren a un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, alivio o mejora de uno o más síntomas o estados, disminución del grado de enfermedad, estabilización del estado de enfermedad, prevención del desarrollo de la enfermedad, prevención de la propagación de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, retraso o ralentización del comienzo de la enfermedad, conferir inmunidad protectora frente a un agente causante de la enfermedad y mejora o alivio del estado patológico. “Tratar” o “prevenir” puede significar también prolongar la supervivencia de un paciente más allá de lo esperado en ausencia de tratamiento y puede significar también inhibir la progresión de la enfermedad temporalmente, aunque más preferiblemente, implica prevenir la aparición de la enfermedad tal como previniendo la infección en un sujeto. “Tratar” o “prevenir” también puede referirse a una reducción en el tamaño de la masa tumoral.

En el tratamiento y/o la prevención del cáncer, la invención puede usarse para “mejorar la eficacia de la vacuna”, tal como se describe esta expresión en el presente documento. Esto puede implicar mejorar la eficacia de la vacuna en la inducción de cualquiera o ambas de una respuesta inmunitaria mediada por células o una respuesta inmunitaria humoral. Esto puede implicar también reducir la supresión inmunitaria inducida por el tumor.

Tal como se usa en el presente documento, “que induce” o “inducir” una respuesta inmunitaria es provocar, mejorar y/o potenciar una respuesta inmunitaria. La inducción de una respuesta inmunitaria abarca casos en los que la respuesta inmunitaria se potencia, se eleva, se mejora o se fortalece en beneficio del sujeto en relación con el estado de respuesta inmunitaria previo, por ejemplo, antes de la aplicación de la invención.

Tal como se usa en el presente documento, el término “respuesta inmunitaria mediada por células” se refiere a un aumento en la cantidad de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno, macrófagos, células citotóxicas naturales o citocinas en el cuerpo de un sujeto en respuesta a la introducción del antígeno en el cuerpo del sujeto.

La inmunidad mediada por células es una respuesta inmunitaria que no implica anticuerpos sino que más bien implica la activación de macrófagos y células citotóxicas naturales, la producción de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno y la liberación de diversas citocinas en respuesta a un antígeno. Los linfocitos T citotóxicos son un subgrupo de T linfocitos (un tipo de glóbulos blancos) que pueden inducir la muerte de células tumorales o somáticas infectadas; destruyen células que están infectadas con virus (u otros patógenos), o por lo demás están dañadas o son difuncionales.

La mayoría de las células T citotóxicas expresan receptores de células T que pueden reconocer un antígeno peptídico específico unido a moléculas de CMH de clase I. Estos CTL también expresan CDS (células T CDS+), que es atraída por porciones de la moléculas de CMH de clase I. Esta afinidad mantiene el CTL y la célula diana unidos estrechamente entre sí durante la activación específica de antígeno.

La inmunidad celular protege el cuerpo, por ejemplo, activando linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno (por ejemplo, células T CDS+ específicas de antígeno) que pueden lisar células corporales que presentan epítopos de antígeno foráneo en su superficie, tales como células infectadas con virus, células con bacterias intracelulares y células cancerosas que presentan antígenos tumorales; activando macrófagos y células citotóxicas naturales, que les permiten destruir patógenos intracelulares; y estimulando a las células a secretar una variedad de citocinas que influyen en la función de otras células implicadas en respuestas inmunitarias adaptativas y respuestas inmunitarias innatas.

La inmunidad celular es un componente importante de la respuesta inmunitaria adaptativa y tras el reconocimiento del antígeno por las células a través de su interacción con células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas, los linfocitos B y, en un menor grado, los macrófagos, protegen al cuerpo mediante diversos mecanismos tales como:

1. activación de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno que pueden inducir apoptosis en células del cuerpo que presentan epítopos de antígeno foráneo en su superficie, tales como células infectadas con virus, células con bacterias intracelulares y células cancerosas que presentan antígenos tumorales;
2. activación de macrófagos y células citotóxicas naturales, que les permiten destruir patógenos intracelulares; y
3. estimulación de células para que secreten una variedad de citocinas que influyen en la función de otras

células implicadas en respuestas inmunitarias adaptativas y respuestas inmunitarias innatas.

La inmunidad mediada por células es la más eficaz para eliminar células infectadas con virus, pero también participa en la defensa frente a hongos, protozoos, cánceres y bacterias intracelulares. También desempeña un papel importante en el rechazo de trasplantes.

Puesto que la inmunidad mediada por células implica la participación de diversos tipos de células y está mediada por diferentes mecanismos, podrían usarse varios métodos para demostrar la inducción o eficacia mejorada de inmunidad tras la aplicación de la invención. Estos podrían clasificarse a grandes rasgos en detección de: i) células presentadoras de antígeno específicas; ii) células efectoras específicas y sus funciones y iii) liberación de mediadores solubles tales como citocinas.

i) Células presentadoras de antígeno: células dendríticas y células B (y en un menor grado macrófagos) están equipadas con receptores inmunoestimuladores especiales que permiten una activación potenciada de células T, y se denominan células presentadoras de antígeno (APC) profesionales. Estas moléculas inmunoestimuladoras (también denominadas moléculas coestimuladoras) están reguladas por incremento en estas células tras infección o vacunación, durante el proceso de presentación de antígenos a células efectoras tales como células T citotóxicas CD4+ y CD8+. Tales moléculas coestimuladoras (tales como CD80, CD86, CMH de clase I o CMH de clase II) pueden detectarse usando citometría de flujo con anticuerpos conjugados con fluorocromo dirigidos contra estas moléculas junto con anticuerpos que identifican específicamente APC (tales como CD11c para células dendríticas).

ii) Células T citotóxicas: (también conocidas como Tc, célula T citolítica o linfocitos T citotóxicos (CTL)) son un subgrupo de células T que inducen la muerte de células que están infectadas con virus (y otros patógenos), o que expresan antígenos tumorales. Estos CTL atacan directamente a otras células que portan determinadas moléculas foráneas o anómalas en su superficie. La capacidad de tal citotoxicidad celular puede detectarse usando ensayos citolíticos *in vitro* (ensayo de liberación de cromo). Por tanto, la inducción de inmunidad celular adaptativa puede demostrarse mediante la presencia de tales células T citotóxicas, en las que, cuando las células diana cargadas con antígeno se lisan por CTL específicos que se generan *in vivo* tras la vacunación o infección.

Las células T citotóxicas vírgenes se activan cuando su receptor de células T (TCR) interacciona fuertemente con una molécula de CMH de clase I unida a péptido. Esta afinidad depende del tipo y la orientación del complejo de antígeno/CMH, y es lo que mantiene el CTL y la célula infectada unidos entre sí. Una vez activado, el CTL experimenta un proceso denominado expansión clonal en el que gana funcionalidad, y se divide rápidamente, para producir un ejército de células efectoras "armadas". Los CTL activados se desplazarán entonces por todo el cuerpo en busca de células que llevan un péptido de CMH de clase I + único. Esto podría usarse para identificar tales CTL *in vitro* usando tetrámeros de péptido-CMH de clase I en ensayos de citometría de flujo.

Cuando se exponen a estas células somáticas infectadas o disfuncionales, los CTL efectores liberan perforina y granzima: citotoxinas que forman poros en la membrana plasmática de la célula diana, permitiendo que fluyan iones y agua al interior de la célula infectada, y provocando que estalle o se lise. Los CTL liberan granzima, una serina proteasa entra en las células por medio de poros induciendo apoptosis (muerte celular). La liberación de estas moléculas de CTL puede usarse como medida de la inducción satisfactoria de una respuesta inmunitaria celular tras la vacunación. Esto puede hacerse mediante ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) o ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas de puntos (ELISPOT) en donde los CTL pueden medirse cuantitativamente. Puesto que los CTL también pueden producir citocinas importantes tales como IFN- γ , puede lograrse la medición cuantitativa de células CD8 que producen IFN- γ mediante ELISPOT y mediante medición por citometría de flujo de IFN- γ intracelular en estas células.

Células T "auxiliares" CD4+: los linfocitos CD4+, o células T auxiliares, son mediadores de la respuesta inmunitaria, y desempeñan un papel importante en el establecimiento y la maximización de las capacidades de la respuesta inmunitaria adaptativa. Estas células no tienen actividad citotóxica o fagocítica; y no pueden destruir células infectadas o aclarar patógenos, sino que, en esencia "gestionan" la respuesta inmunitaria, dirigiendo a otras células para que realicen estas tareas. Pueden inducirse dos tipos de respuestas de células T auxiliares CD4+ efectoras mediante una APC profesional, designadas Th1 y Th2, cada una diseñada para eliminar diferentes tipos de patógenos.

Las células T auxiliares expresan receptores de células T (TCR) que reconocen antígeno unido a moléculas de CMH de clase II. La activación de una célula T auxiliar virgen provoca que libere citocinas, lo que influye en la actividad de muchos tipos de células, incluyendo la APC que las activó. Las células T auxiliares requieren un estímulo de activación mucho más suave que las células T citotóxicas. Las células T auxiliares pueden proporcionar señales extra que "ayudan" a activar a las células citotóxicas. Dos tipos de respuestas de células T auxiliares CD4+ efectoras pueden inducirse por APC profesionales, designadas Th1 y Th2, cada una diseñada para eliminar diferentes tipos de patógenos. Las dos poblaciones de células Th difieren en el patrón de las proteínas efectoras (citocinas) producidas. En general, las células Th1 ayudan en la respuesta inmunitaria celular mediante activación de macrófagos y células

T citotóxicas; mientras que las células Th2 promueven la respuesta inmunitaria humoral mediante estimulación de células B para su conversión en células plasmáticas y mediante formación de anticuerpos. Por ejemplo, una respuesta regulada por células Th1 puede inducir IgG2a e IgG2b en ratón (IgG1 e IgG3 en seres humanos) y favorecer una respuesta inmunitaria mediada por una célula a un antígeno. Si la respuesta de IgG a un antígeno está regulada por células de tipo Th2, puede potenciar predominantemente la producción de IgG1 en ratón (IgG2 en seres humanos). La medida de citocinas asociadas con respuestas Th1 o Th2 proporcionará una medida de vacunación satisfactoria. Esto puede lograrse mediante ELISA específico diseñado para citocinas Th1 tales como IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α y otras, o citocinas Th2 tales como IL-4, IL-5, IL10 entre otras.

iii) Medición de citocinas: liberadas a partir de ganglios linfáticos regionales proporcionan una buena indicación de inmunización satisfactoria. Como resultado de la presentación de antígenos y la maduración de APC y células efectoras inmunitarias tales como células T CD4+ y CD8+, células de ganglios linfáticos liberan varias citocinas. Cultivando estas LNC *in vitro* en presencia de antígeno, puede detectarse una respuesta inmunitaria específica de antígeno midiendo la liberación de determinadas citocinas importantes tales como IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α y GM-CSF. Esto podría hacerse mediante ELISA usando sobrenadantes de cultivo y citocinas recombinantes como patrones.

Tal inmunización satisfactoria puede determinarse de varios modos conocidos por el experto incluyendo, pero sin limitarse a, inhibición de la hemaglutinación (HA) y ensayos de inhibición de la neutralización en suero para detectar anticuerpos funcionales; estudios de exposición, en los que sujetos vacunados se exponen con el patógeno asociado para determinar la eficacia de la vacunación; y el uso de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para determinar la población de células que expresan un marcador de superficie celular específico, por ejemplo en la identificación de linfocitos de memoria o activados. Un experto puede determinar también si la invención mejoraba la eficacia de una respuesta mediada por una célula inmunitaria usando otros métodos conocidos. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Immunology Coligan *et al.*, ed. (Wiley Interscience, 2007).

En algunas realizaciones, la invención también puede usarse para tratar cáncer induciendo una respuesta humoral inmunitaria o mejorando la eficacia de la vacuna en la inducción de una respuesta humoral inmunitaria. Tales realizaciones pueden tener una aplicación particular en casos en los que la vacuna de la invención incluye un antígeno adicional tal como se describe en el presente documento, distinto de un antígeno de supervivencia. Estos métodos pueden implicar el tratamiento de cáncer induciendo tanto una respuesta inmunitaria mediada por células como una respuesta inmunitaria humoral.

Una respuesta inmunitaria humoral, en contraposición a inmunidad mediada por células, está mediada por anticuerpos secretados que se producen en las células del linaje de linfocito B (células B). Tales anticuerpos secretados se unen a antígenos, tales como por ejemplo aquellos en las superficies de patógenos y/o sustancias foráneas (por ejemplo virus, bacterias, etc.) y los marcan para su destrucción.

Un "anticuerpo" es una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancial o parcialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante κ , λ , α , γ , δ , ϵ y μ , así como la miríada de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como o bien κ o bien λ . Las cadenas pesadas se clasifican como γ , μ , α , δ o ϵ , que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Una unidad estructural de inmunoglobulina típica (anticuerpo) comprende una proteína que contiene cuatro polipéptidos. Cada unidad estructural de anticuerpo se compone de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada una una cadena "ligera" y una "pesada". El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable principalmente responsable del reconocimiento de antígenos. Las unidades estructurales de anticuerpos (por ejemplo de las clases de IgA e IgM) también pueden ensamblarse para dar formas oligoméricas entre sí y cadenas de polipéptido adicionales, por ejemplo como pentámeros de IgM en asociación con el polipéptido de cadena J.

Los anticuerpos son los productos de glicoproteína específicos de antígeno de un subconjunto de glóbulos blancos denominados linfocitos B (células B). El acoplamiento de un antígeno con un anticuerpo expresado en la superficie de células B puede inducir una respuesta de anticuerpos que comprende la estimulación de células B para que se activen, experimenten mitosis y se diferencien de manera terminal dando células plasmáticas, que están especializadas para la síntesis y secreción de anticuerpo específico de antígeno.

Las células B son los únicos productores de anticuerpos durante una respuesta inmunitaria y son, por tanto, un elemento clave para una inmunidad humoral eficaz. Además de producir grandes cantidades de anticuerpos, las células B también actúan como células presentadoras de antígeno y pueden presentar antígeno a células T, tales como linfocito T auxiliar CD4 o citotóxico CD8, propagando así la respuesta inmunitaria. Las células B, así como las células T, son parte de la respuesta inmunitaria adaptativa que puede ayudar en la eficacia de la vacuna. Durante una respuesta inmunitaria activa, inducida o bien por vacunación o bien por infección natural, se activan células B específicas de antígeno y se expanden clonalmente. Durante la expansión, las células B evolucionan para tener una mayor afinidad por el epítopo. La proliferación de células B puede inducirse indirectamente mediante células T auxiliares activadas, y también directamente a través de la estimulación de receptores, tales como los receptores de

tipo Toll (TLR).

Las células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas y células B, son atraídas a los sitios de vacunación y pueden interactuar con antígenos y adyuvantes contenidos en la vacuna. El adyuvante estimula a las células para que se activen y el antígeno proporciona el modelo para la diana. Diferentes tipos de adyuvantes proporcionan diferentes señales de estimulación a las células. Por ejemplo, polinucleótido poli I:C (un agonista de TLR3) puede activar células dendríticas, pero no células B. Adyuvantes tales como Pam3Cys, Pam2Cys y FSL-1 son especialmente adecuados para activar e iniciar la proliferación de células B, que se espera que facilite la producción de una respuesta de anticuerpos (Moile *et al.*, Curr Med Chem, 2008; So ., J Immunol, 2012).

Tal como se usa en el presente documento, el término "respuesta de anticuerpos" se refiere a un aumento en la cantidad de anticuerpos específicos de antígeno en el cuerpo de un sujeto en respuesta a la introducción del antígeno en el cuerpo del sujeto.

Un método de evaluación de una respuesta de anticuerpos es medir los títulos de anticuerpos reactivos con un antígeno particular. Esto puede realizarse usando una variedad de métodos conocidos en la técnica tales como ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) de sustancias que contienen anticuerpos obtenidas de animales. Por ejemplo, los títulos de anticuerpos séricos que se unen a un antígeno particular pueden determinarse en un sujeto antes y después de la exposición al antígeno. Un aumento estadísticamente significativo en el título de anticuerpos específicos de antígeno tras la exposición al antígeno indicaría que el sujeto ha establecido una respuesta de anticuerpos al antígeno.

Otros ensayos que pueden usarse para detectar la presencia de un anticuerpo específico de antígeno incluyen, sin limitación, ensayos inmunológicos (por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA)), ensayos de inmunoprecipitación y ensayos de inmunotransferencia de proteínas (por ejemplo, inmunotransferencia de tipo Western); y ensayos de neutralización (por ejemplo, neutralización de la infectividad viral en un ensayo *in vitro* o *in vivo*).

La invención, al mejorar la eficacia de la vacuna en la inducción de una respuesta inmunitaria humoral, puede ser capaz de tratar y/o prevenir el cáncer.

Una respuesta inmunitaria humoral es el mecanismo principal para vacunas contra enfermedades infecciosas. Sin embargo, una respuesta inmunitaria humoral también puede ser útil para combatir el cáncer. Complementando una vacuna contra el cáncer, que está diseñada para producir una respuesta de células T CD8+ citotóxicas que pueden reconocer y destruir células cancerosas, una respuesta mediada por células B puede seleccionar como diana células cancerosas a través de otros mecanismos que pueden en algunos casos cooperar con una célula T CD8+ citotóxica para lograr un beneficio máximo. Los ejemplos de mecanismos de respuesta antitumoral mediada por células B (por ejemplo mediada por respuesta inmunitaria humoral) incluyen, sin limitación: 1) Anticuerpos producidos por células B que se unen a antígenos de superficie encontrados en células tumorales u otras células que influyen en la tumorigénesis. Tales anticuerpos, por ejemplo, pueden inducir la destrucción de células diana a través de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o fijación del complemento, dando como resultado potencialmente la liberación de antígenos adicionales que pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario; 2) anticuerpos que se unen a receptores en células tumorales bloqueando su estimulación y en efecto neutralizan sus efectos; 3) anticuerpos que se unen a factores liberados por o asociados con tumor o células asociadas a tumores para modular una ruta de señalización o celular que soporta el cáncer; y 4) anticuerpos que se unen a dianas intracelulares y median en la actividad antitumoral a través de un mecanismo actualmente desconocido.

El sujeto que va a tratarse mediante los métodos de la invención puede ser cualquier vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

Kits y reactivos

Para poner en práctica la presente invención, las composiciones tal como se describen en el presente documento pueden proporcionarse opcionalmente a un usuario como un kit. Por ejemplo, un kit de la invención contiene uno o más componentes de las composiciones de la invención. El kit puede comprender además uno o más reactivos adicionales, material de envasado, recipientes para contener los componentes del kit y un conjunto de instrucciones o manual de usuario que detalla métodos preferidos de uso de los componentes del kit.

En una realización particular, la vacuna de la invención (por ejemplo DPX-Survivac) se suministra como un kit que contiene dos recipientes. El recipiente 1, por ejemplo, puede comprender el sistema de adyuvante liofilizado (por ejemplo liposomas), antígenos de survivina y adyuvante. El recipiente 2, por ejemplo, puede contener el componente de aceite (Montanide® ISA51 VG) solo. Un volumen apropiado (0,1 ó 0,5 ml) de la vacuna reconstituida puede inyectarse por vía subcutánea.

En una realización, el kit puede contener adicionalmente un agente que interfiere con la replicación del ADN. El agente que interfiere con la replicación del ADN puede incluirse en el kit con un tercer recipiente, o el agente puede

incluirse en el recipiente 1 o recipiente 2, tal como se describió anteriormente. En una realización particular, el agente que interfiere con la replicación del ADN que se incluye en el kit es un agente alquilante, tal como por ejemplo, ciclofosfamida.

5 Aspectos de la divulgación

Los aspectos particulares de la presente descripción incluyen los siguientes:

- 10 (1) Un método para mejorar la eficacia de una vacuna en el tratamiento de cáncer en un sujeto, comprendiendo, consistiendo en o consistiendo esencialmente en dicho método:
 - (i) administrar al sujeto al menos dos dosis de un agente que interfiere con la replicación del ADN en una cantidad suficiente para proporcionar un efecto inmunomodulador; y
 - 15 (ii) posteriormente administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la vacuna, en el que la vacuna comprende al menos un antígeno de survivina.
- 20 (2) El método según el párrafo (1) que comprende administrar una primera dosis del agente al sujeto al menos dos días antes de administrar la vacuna, y preferiblemente al menos cuatro días antes de administrar la vacuna.
- (3) El método según el párrafo (1) que comprende administrar una primera dosis del agente al sujeto aproximadamente una semana antes de administrar la vacuna.
- 25 (4) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (3) que comprende administrar el agente durante un periodo de al menos dos días consecutivos.
- (5) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (4) que comprende administrar al sujeto una primera dosis del agente, seguido por una o más dosis de mantenimiento del agente.
- 30 (6) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (5) que comprende administrar el agente al sujeto al menos 1, 2, 3 ó 4 veces al día antes de administrar la vacuna.
- (7) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (6) que comprende administrar el agente dos veces al día durante un periodo de aproximadamente una semana antes de administrar la vacuna.
- 35 (8) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (7), en el que la administración al sujeto del agente se detiene antes de administrar la vacuna.
- (9) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (7), en el que la administración al sujeto del agente continúa durante el transcurso de la administración de la vacuna.
- 40 (10) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (9) que comprende administrar la vacuna al sujeto aproximadamente una vez cada tres semanas.
- 45 (11) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (10) que comprende administrar la vacuna al sujeto 2, 3, 4 o más veces.
- (12) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (11) que comprende administrar el agente que interfiere con la replicación del ADN al sujeto en un régimen metronómico.
- 50 (13) El método según el párrafo (12), en el que el régimen metronómico comprende administrar el agente al sujeto diariamente durante un periodo de aproximadamente una semana cada dos semanas.
- (14) El método según el párrafo (13) que comprende administrar el agente al sujeto comenzando aproximadamente una semana antes de administrar una primera dosis de la vacuna, y que comprende administrar la vacuna al sujeto aproximadamente una vez cada tres semanas.
- 55 (15) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (14), en el que el antígeno de survivina es un antígeno peptídico o un ácido nucleico que codifica para un antígeno.
- 60 (16) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (15), en el que el antígeno de survivina es un antígeno peptídico que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de la proteína survivina (SEQ ID NO: 11) que puede provocar una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) en el sujeto, o una molécula de ácido nucleico que codifica para dicho antígeno peptídico.
- 65 (17) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (16), en el que el antígeno de survivina es un

antígeno peptídico que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos FEELTLGEF (SEQ ID NO: 1); FTELTLGEF (SEQ ID NO: 2); LTLGEFLKL (SEQ ID NO: 3); LMLGEFLKL (SEQ ID NO: 4); RISTFKNWPF (SEQ ID NO: 5); RISTFKNWPK (SEQ ID NO: 6); STFKNWPFL (SEQ ID NO: 7); y LPPAWQPFL (SEQ ID NO: 8), o cualquier combinación de las mismas; o una molécula de ácido nucleico que codifica para dicho antígeno peptídico.

(18) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (14), en el que el al menos un antígeno de survivina comprende, consiste en o consiste esencialmente en una mezcla de cinco antígenos peptídicos que comprende la secuencia de aminoácidos FTELTLGEF (SEQ ID NO: 2); LMLGEFLKL (SEQ ID NO: 4); RISTFKNWPK (SEQ ID NO: 6); STFKNWPFL (SEQ ID NO: 7) o LPPAWQPFL (SEQ ID NO: 8).

(19) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (18), en el que el agente que interfiere con la replicación del ADN puede seleccionar como diana selectivamente células que se dividen rápidamente del sistema inmunitario y provocar muerte celular programada.

(20) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (19), en el que el agente que interfiere con la replicación del ADN es un agente alquilante.

(21) El método según el párrafo 20, en el que el agente alquilante es un agente alquilante de mostaza de nitrógeno.

(22) El método según el párrafo (21), en el que el agente alquilante de mostaza de nitrógeno es ciclofosfamida.

(23) El método según el párrafo (22), en el que la cantidad suficiente para proporcionar un efecto inmunomodulador es de aproximadamente 25-300 mg/día, preferiblemente de aproximadamente 50-100 mg/día y más preferiblemente de aproximadamente 100 mg/día de ciclofosfamida.

(24) El método según los párrafos (22) o (23), en el que la cantidad suficiente para proporcionar un efecto inmunomodulador es de aproximadamente 50 mg de ciclofosfamida por dosis.

(25) El método según uno cualquiera de los párrafos (22) a (24) que comprende administrar por vía oral la ciclofosfamida al sujeto.

(26) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (25) que comprende administrar la vacuna al sujeto mediante inyección, tal como mediante inyección subcutánea.

(27) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (26), en el que la vacuna es una composición que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en el al menos un antígeno de survivina, liposomas y un portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba.

(28) El método según el párrafo (27), en el que la composición comprende además un epítipo de linfocitos T auxiliares.

(29) El método según el párrafo (28), en el que el epítipo de linfocitos T auxiliares es un péptido que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos AQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 9).

(30) El método según uno cualquiera de los párrafos (27) a (29), en el que la composición comprende además un adyuvante.

(31) El método según el párrafo (30), en el que el adyuvante es un polinucleótido poli I:C.

(32) El método según uno cualquiera de los párrafos (27) a (31), en el que el portador es una sustancia hidrófoba tal como un aceite vegetal, aceite de nueces o aceite mineral.

(33) El método según uno cualquiera de los párrafos (27) a (31), en el que el portador es aceite mineral o es un oleato de manida en disolución de aceite mineral, por ejemplo Montanide® ISA 51.

(34) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (33), en el que el agente mejora la eficacia de la vacuna potenciando directamente la respuesta inmunitaria contra el antígeno, tal como aumentando la actividad o el número de células T CD8+ específicas de antígeno.

(35) El método según el párrafo (34), en el que el aumento de la actividad o el número de células T CD8+ específicas de antígeno implica un enriquecimiento de células T CD8+ específicas de antígeno debido a una disminución relativa en las células T CD8+ totales.

(36) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (33), en el que el agente mejora la eficacia de la vacuna reduciendo el número o la actividad de células inmunosupresoras, por ejemplo células T reguladoras CD4⁺FoxP3⁺ (Treg), células supresoras de origen mieloide (MDSC) y/o células B CD19⁺CD1d⁺CD5⁺ (Breg).

(37) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (36), en el que el cáncer es un tumor sólido subcutáneo.

(38) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (36), en el que el cáncer es cáncer ovárico, cáncer de las trompas de Falopio o cáncer peritoneal.

(39) El método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (38), en el que el sujeto es un ser humano.

(40) Uso de un agente que interfiere con la replicación del ADN en combinación con una vacuna que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en al menos un antígeno de survivina para mejorar la eficacia de la vacuna en el tratamiento de cáncer, en el que al menos dos dosis del agente son para su administración antes de la vacuna.

(41) Combinación de un agente que interfiere con la replicación del ADN y una vacuna que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en al menos un antígeno de survivina para su uso en un método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (39).

(42) Composición tal como se describe en el presente documento para su uso en un método según uno cualquiera de los párrafos (1) a (39).

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Un estudio de fase I realizado en los Estados Unidos (IND n.º 14731) y Canadá (CTA-A n.º 155301) examinó la seguridad y potencia inmunitaria de DPX-Survivac en combinación con ciclofosfamida en pacientes con cáncer ovárico.

DPX-Survivac es una vacuna inmunoterapéutica anticancerígena candidata que contiene un decapeptido y cuatro nonapéptidos derivados de la secuencia proteica de survivina, con restricciones de HLA diferentes (HLA-A1, A2, A3, A24 y B7). Específicamente, DPX-Survivac comprende cinco antígenos peptídicos de survivina sintéticos que tienen las secuencias de aminoácidos: FTELTGGEF (SEQ ID NO: 2), LMLGEFLKL (SEQ ID NO: 4), RISTFKNWPK (SEQ ID NO: 6), STFKNWPFL (SEQ ID NO: 7) y LPPAWQPFL (SEQ ID NO: 8); un epítipo universal de linfocitos T auxiliares toxoide tetánico (AQYIKANSKFIGITEL; SEQ ID NO: 9); un adyuvante de polinucleótido de poli I:C; liposomas que consisten en DOPC y colesterol; y el portador hidrófobo Montanide® ISA 51 VG. La vacuna DPX-Survivac está diseñada para seleccionar como diana survivina.

En el estudio clínico, 18 de 19 pacientes con cáncer ovárico avanzado tratados con quimioterapia de platino y que no mostraban progresión de la enfermedad completaron su terapia de vacuna. La cohorte A (6 pacientes) recibió tres inyecciones de vacuna de 0,5 ml separadas 3 semanas; la cohorte B y cohorte C (6 pacientes cada una) recibieron tres inyecciones de vacuna de 0,1 ml o 0,5 ml, respectivamente, en combinación con ciclofosfamida a dosis oral baja metronómica. El ensayo clínico se realizó según el programa mostrado en la figura 1.

Se evaluaron los acontecimientos adversos usando CTCAE v4.0. Se recogió sangre para estudiar la función inmunitaria y la inmunidad de células T inducida por la vacuna (análisis realizados mediante (i) ELISPOT, (ii) análisis de tetrámeros y (iii) tinción de citocina intracelular multiparamétrica). Se analizaron estadísticamente medidas repetidas de inmunidad mediante ELISPOT en el nivel inicial y tras 1, 2 y 3 inyecciones usando un modelo lineal general.

(i) Ensayo de ELISPOT de IFN- γ para detectar PBMC específicas de antígenos funcionales

Se sometieron a prueba muestras de PBMC congeladas tomadas de sujetos del ensayo clínico en el ensayo de ELISPOT de IFN- γ para determinar la respuesta de recuerdo a los antígenos de prueba especificados. Se estimularon PBMC descongeladas con un conjunto de cinco péptidos de survivina y con el/los correspondiente(s) péptido(s) dependiendo del tipo de HLA del sujeto. Las respuestas a los antígenos, control negativo (células en medio solo) y el control positivo (PHA) se sometieron a prueba en pocillos por duplicado. Se sometieron a prueba los antígenos a una concentración de 50 y 5 μ g/ml para someter a prueba la dependencia de la dosis además de la especificidad de antígeno. Se sembraron en placa las muestras clínicas de PBMC a una concentración de 300.000 células/pocillo de una placa de ELISPOT de 96 pocillos junto con PBMC de sexo coincidente del sujeto de control sano.

El día 1, se recubrieron las placas con 80 µl/pocillo de un primer anticuerpo diluido en PBS y se refrigeraron las placas durante la noche en una caja humidificada. El día 2, se lavaron las placas 3x con PBS, 200 µl/pocillo; se retiró el PBS en exceso dando golpecitos a las placas. Se añadieron 100 µl/pocillo del/de los antígeno(s) deseados para la activación de células T seguido por 100 µl/pocillo de PBMC de prueba o control. Se incubaron las células a 37°C en un incubador humidificado durante 24 horas para la secreción de IFN-γ. Hasta esta etapa, todas las etapas se realizaron en una condición estéril. El día 3, se lavaron las placas 3x con PBS, 3x con PBS-TWEEN seguido por la adición de 80 µl/pocillo de anticuerpo secundario biotinilado en PBS-TWEEN-BSA y se incubaron durante la noche en un refrigerador, en una caja humidificada. El día 4, se lavaron las placas 3x con PBS-TWEEN, 200 µl/pocillo, seguido por la adición de 100 µl/pocillo de reactivo de detección terciario en PBS-BSA y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lavaron las placas 3x con PBS-TWEEN y 3x con PBS, y se añadirán 200 µl/pocillo de dilución de revelado recién preparada. Se monitorizó el desarrollo de puntos a temperatura ambiente, normalmente durante 10-60 minutos, comprobando cuidadosamente la ausencia de desarrollo de color en los pocillos de control de medio y la aparición de puntos en pocillos que contienen antígeno. Se detuvo la reacción enjuagando las placas con agua corriente mientras se les daba golpecitos. Se secaron las placas al aire durante la noche y se almacenaron a temperatura ambiente en la oscuridad. Entonces se exploraron las placas de ELISPOT usando un analizador de placas automatizado. Se procesaron los recuentos de UFP sin procesar y se resumieron para obtener datos sobre la secreción por PBMC de IFN-γ inducida por antígeno.

20 Materiales de ELISPOT:

Disoluciones:

1. PBS: sometido a prueba en cultivo tisular estéril
2. PBS-TWEEN al 0,05%: por ejemplo, 500 µl de Tween-20 en 1 l de PBS
3. PBS-BSA al 1%: por ejemplo, 10 g de BSA-fracción V en 1 l de PBS (1%)
4. PBS-TWEEN-BSA al 1%: por ejemplo, 1 l de PBS-TWEEN más 10 g de BSA-fracción V

Medio:

Medio de prueba libre de suero complementado con L-glutamina al 1%.

Células de prueba:

PBMC humanas (congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas)

3 x 10⁵ células por pocillo de las muestras de prueba

Incubador: 37°C, humidificado, el 7% de CO₂

Disolución de AEC:

100 mg de AEC (3-amino-9-etilcarbazol) en 10 ml de DMF (N,N,dimetilformamida)

Preparada en un tubo de vidrio, en una campana de extracción

Tampón de AEC (acetato 0,1 M):

148 ml de ácido acético 0,2 M (11,55 ml de ácido acético glacial por l de H₂O) más

352 ml de acetato de sodio 0,2 M (27,2 g por l de H₂O).

Llevar hasta 1 l con H₂O. Ajustar a pH 5,0

Disolución de revelado (para usarse inmediatamente):

800 µl de disolución de AEC más 24 ml de tampón de AEC. Filtrar por 0,45 µm. Añadir 12 µl de H₂O₂ (30%)

(ii) Células T CD8+ específicas de antígeno usando multímeros de CMH (tetrámeros)

Los reactivos de multímeros de CMH ayudan a identificar células T CD8+ específicas de antígeno generado en sujetos vacunados. Estas células T específicas expresan TCR que puede reconocer y unirse al/a los péptido(s)

usado(s) en la vacuna (cuando se conjugan con moléculas del CMH). La respuesta inmunitaria a los péptidos de vacuna se ve reflejada por la expansión de células T específicas de antígeno. Tales células T CD8+ se midieron directamente *ex vivo* poco después de descongelar las PBMC y después de la estimulación *in vitro* y la expansión inducida por citocinas en presencia de los antígenos peptídicos de survivina incluidos en DPX-Survivac.

Se usaron reactivos de multímeros de CMH, tales como tetrámeros (Beckman Coulter o TC Metrix, para HLA-A1, A2 y A3; TC Metrix para HLA-A24 y B7) para la detección específica de células T CD8+ inducidas por la vacuna. Para PBMC activadas tanto *ex vivo* como *in vitro*, se usaron PBMC de control y reactivos de multímeros de CMH de control en el ensayo. Se usaron PBMC de donantes sanos CMV+ conocidas junto con multímero de CMH específico de CMV como control positivo y se usará un reactivo específico de VIH como control negativo para la validación dentro de y entre ensayos y garantía de calidad.

A. Detección *ex vivo* de células T CD8+ específicas de antígeno:

Se realizó la tinción *ex vivo* para detectar células T específicas en la sangre en citometría de flujo de 10 colores, junto con fenotipado de células T reguladoras (Treg). El cóctel de tinción incluía: vivo/muerto, CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD27, CD25, Ki67, Foxp3 y el reactivo de tetrámero que coincidía con el tipo de HLA del sujeto. Las pruebas de cualificación del ensayo para verificar que la permeabilización celular para la tinción de Foxp3 intracelular para células Treg no interfiere con la tinción de la superficie celular se completaron satisfactoriamente. El análisis *ex vivo* de los tetrámeros consistía en teñir PBMC descongeladas y que reposaron durante la noche usando el cóctel de anticuerpos (tal como se mostró anteriormente) y el reactivo de tetrámero para citometría de flujo. Brevemente, se tiñeron en primer lugar PBMC descongeladas con el reactivo de tetrámero a 4°C durante 30 minutos y se lavaron en tampón IMF (PBS + BSA al 0,5% + azida de sodio al 0,01%). Entonces se tiñeron las células con mezcla de anticuerpos, que contenía diferentes anticuerpos conjugados con fluorocromo como marcadores fenotípicos, durante 30 minutos a 4°C. Entonces se lavaron las células y se fijaron en paraformaldehído al 1% y se usaron para citometría de flujo. Para detectar los niveles de células B, se usaron tubos separados para teñir las células con anticuerpo frente a CD19, puesto que la permeabilización celular para Foxp3 afecta de manera adversa a la unión al anticuerpo frente a CD19.

B. Activación *in vitro* de PBMC para detectar células T CD8+ específicas:

Para la activación y expansión *in vitro* de células T específicas de antígeno, se cultivaron PBMC de las mismas células descongeladas y usadas para el análisis *ex vivo* en presencia de antígeno peptídico de survivina y citocinas (IL-2 e IL-15) durante 10 días. Brevemente, se realizó la viabilidad de células descongeladas y que reposaron durante la noche y se suspendieron las PBMC a 1×10^6 células/ml en medio RPMI-1640 complementado con FCS inactivado por calor al 10%, L-glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 50 μ M, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 μ g/ml, IL-2 recombinante humana 10 UI/ml e IL-15 recombinante humana 10 ng/ml. En una placa de 24 pocillos, se colocaron 1×10^6 células/pocillo en 1,0 ml de medio y las células o bien se dejaron sin tratar o bien se estimularon con péptido de survivina de HLA coincidente apropiado a una concentración final de 5 μ g/ml. Se incubaron las células en un incubador humificado a 37°C con un suministro del 5% de CO₂. El día 3, 6 y 8, se aspiró cuidadosamente el medio sin alterar las células teniendo cuidado para dejar algo de medio de modo que las células no se secan. Se añadió un volumen apropiado (1,0 ml) de medio RPMI completo precalentado con citocinas (IL-2 10 UI/ml e IL-15 10 ng/ml). El día 10, se recogieron todas las células y se lavaron una vez con medio RPMI sencillo, una vez con tampón IMF y se usaron para la tinción de tetrámeros (5 colores) según el protocolo: vivo/muerto, CD3, CD8, CD45RA y uno o dos reactivos de multímeros de CMH, dependiendo del tipo de HLA de los sujetos. Puesto que podría haber reactividad cruzada del tetrámero de HLA-A2 con PBMC de los sujetos o bien A1 o bien A3, también se sometieron a prueba células de los sujetos con estos dos últimos tipos de HLA con el reactivo diseñado para HLA-A2. En paralelo con PBMC de pacientes, también se activaron PBMC de control sano CMV+ conocidas con el conjunto de péptidos CEF para generar una muestra de control positivo que podría usarse para comparaciones dentro de y entre ensayos. Tras la tinción, se fijaron las células en paraformaldehído al 1% para la citometría de flujo.

(iii) Citometría de flujo multiparamétrica (ICS)

El ensayo de citometría de flujo multiparamétrico se considera muy informativo porque permite la detección simultánea de múltiples citocinas/quimiocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-17 y otros) y marcadores fenotípicos y/o funcionales (CD3, CD4, CD8, CD19, CD27, CD45RA, CD107a granzima-B, CCR7, etc.). Además, se ha mostrado que las células T multifuncionales (que secretan múltiples citocinas) están asociadas con una respuesta inmunitaria de tipo 1 protectora y la detección de tales células en sujetos incluidos es probable que refleje la eficacia inmunitaria de la vacuna administrada.

Se realizó el ensayo de ICS como una citometría de flujo de 12 colores que incluía: marcador vivo/muerto, CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD27 (como subconjunto y marcadores de diferenciación de memoria) junto con IFN- γ , TNF- γ , IL-2, IL-17, granzima-B y CD107a (para citocinas y otros marcadores funcionales). La selección de marcadores fenotípicos usados en el ensayo permite la identificación de células T de memoria centrales/efectoras específicas

que es probable que respondan a los antígenos de vacuna en el ensayo. Las condiciones de estimulación celular incluían: sin estimulación, controles positivos de PMA/ionomicina, péptidos de survivina agrupados que están incluidos en la vacuna, péptido de HLA coincidente para un sujeto dado y estimulación con conjunto de péptidos CEF (CMV/EBV/FLU) de PBMC de control. Además de PBMC de pacientes, se usaron PBMC de donantes sanos de HLA-A2 conocidas como control interno para garantía de calidad. Brevemente, se estimularon 10^6 PBMC, tras reposar durante la noche, durante 1 hora con péptidos individuales y conjuntos de péptidos en presencia de anticuerpos anti-CD107a. Las concentraciones de péptidos individuales o conjuntos de péptidos finales usadas para la estimulación fueron de 1 $\mu\text{g/ml}$. Se añadieron inhibidores de la secreción de proteínas (GolgiPlug™/GolgiStop™, BD Bioscience) tras 1 hora de estimulación, y se incubaron las células durante 5 horas adicionales a 37°C y el 5% de CO_2 . Tras la estimulación *in vitro*, se lavaron las células y se tiñó la superficie durante 30 minutos a 4°C (CD8, CD27 CD3, CD4 y CD45RA y marcador de viabilidad) seguido por tinción intracelular (IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-2) de células fijadas/permeabilizadas durante 30 minutos a 4°C. Se adquirirán las células marcadas en un citómetro de flujo LSR II usando el software FACS DiVa (BD Bioscience) y se analizarán usando el software FlowJo. Se realizarán análisis de citocinas multifuncionales tras la separación rigurosa de cada población positiva para citocinas. Además, se usó SPICE, una aplicación de software de extracción de datos, para analizar conjuntos de datos de FlowJo grandes a partir de citometría de flujo policromática y para organizar gráficamente los datos normalizados.

Resultados:

Se establecieron generalmente respuestas inmunitarias específicas de antígeno, tal como se evaluaron mediante la producción de IFN- γ en análisis de ELISPOT, con una o dos vacunaciones y se aumentaron o se mantuvieron con refuerzos (figuras 2-4). Se observó una respuesta a la dosis, produciendo los pacientes de la cohorte C respuestas de magnitud significativamente mayor (cohorte C frente a cohorte B, $P=0,013$). La ciclofosfamida a dosis baja potenció significativamente la dosis de 0,5 ml (cohorte C frente a cohorte A, $P=0,015$). Estos resultados demuestran que la combinación de modulación inmunitaria con ciclofosfamida a dosis baja en combinación con DPX-Survivac generó las respuestas inmunitarias más fuertes. Los pacientes en la cohorte C pudieron montar una respuesta inmunitaria con tan sólo una dosis de vacuna después de tan sólo una semana de administración de ciclofosfamida a dosis baja previa. Las respuestas logradas en la cohorte C tras una, dos o tres dosis (tan altas como 2309, 1911 y 2517 puntos por 10^6 PBMC) sólo pudieron lograrse con la combinación de vacuna de survivina y ciclofosfamida a dosis baja.

La mayor magnitud de las respuestas inmunitarias generadas por la vacuna de survivina en las cohortes B y C se caracterizaban por la detección de respuestas de células T específicas de antígeno circulante y un perfil de respuesta de células T polifuncionales en la sangre (figuras 5 y 6). En algunos sujetos, estas células T CD8+ específicas de antígeno circulante pueden detectarse *ex vivo* mediante tinción de tetrámeros, y tales células T específicas pueden expandirse también adicionalmente mediante estimulación con antígeno(s) peptídico(s) de HLA coincidente *in vitro*. 10 de 12 sujetos que recibieron la terapia de combinación de DPX-Survivac pudieron evaluarse mediante tinción de tetrámeros; los 10 mostraron una fuerte evidencia de inducción de células T CD8+ específicas de survivina tras una o dos vacunaciones con DPX-Survivac. De manera importante, las respuestas de células T CD8+ se mantuvieron con vacunaciones de refuerzo. La activación y el mantenimiento de estas células inmunitarias específicas es de interés particular en inmunoterapia puesto que las células T CD8+ están implicadas en la identificación de células cancerosas, infiltración de tumores y destrucción de dianas de cáncer. Las respuestas más fuertes se observaron en la cohorte C mediante análisis de tetrámeros, confirmando los resultados obtenidos mediante ELISPOT. La mayoría de los pacientes en la cohorte C tenían una positividad de tetrámeros por encima del 1% de las células T CD8+ totales (con estimulación *in vitro*) y alcanzando tanto como el 22% de las células T CD8+ totales. En cambio, la positividad de tetrámeros más alta registrada en la cohorte A estaba por debajo del 1% de las células T CD8+ totales (0,7%). Esto demuestra que la combinación de ciclofosfamida a dosis baja y vacuna generaba respuestas inmunitarias específicas de antígeno significativamente mayores.

Varios sujetos tratados con DPX-Survivac también mostraron la inducción de células T CD8+ polifuncionales que eran indicativas de una respuesta inmunitaria protectora. Cada uno de dos sujetos, de seis, en cada una de las cohortes A y B y 5 sujetos de 6 en la cohorte C era positivo para células T CD8+ que secretan múltiples citocinas. La mayoría de estas células CD8 eran de un fenotipo de memoria central, lo que indica una exposición a antígeno previa e inducción de una respuesta inmunitaria duradera frente a survivina en sujetos tratados. En la tabla 4 se muestran resultados de sujetos representativos positivos para la positividad a múltiples citocinas tras el tratamiento.

Tabla 4:

Id de sujeto	Citocinas	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
09-08	IFN- γ + TNF- α + IL2	ND*	+
	IFN- γ + TNF- α	ND*	-
	TNF- α + IL2	ND*	+
	IFN- γ + IL2	ND*	+

10-09	IFN- γ + TNF- α + IL2	-	+
	IFN- γ + TNF- α	-	+
	TNF- α + IL2	-	+
	IFN- γ + IL2	-	-
11-10	IFN- γ + TNF- α + IL2	-	+
	IFN- γ + TNF- α	-	-
	TNF- α + IL2	-	+
	IFN- γ + IL2	-	-
02-16	IFN- γ + TNF- α + IL2	-	+
	IFN- γ + TNF- α	-	+
	TNF- α + IL2	-	+
	IFN- γ + IL2	-	+

La tabla anterior (tabla 4) proporciona los resultados de tinción de ICS a partir de sujetos que responden representativos, los sujetos 09-08, 10-09, 11-10 y 02-16, que muestran células T CD8 de memoria central que secretan múltiples citocinas. Se sometieron a prueba células mononucleares de sangre periférica para detectar la presencia de células T CD8+ polifuncionales mediante tinción de citocinas intracelulares (ICS). Tras una estimulación a corto plazo (5 horas) con péptidos de survivina, se tiñó la superficie de las células para detectar marcadores fenotípicos tales como CD3, CD4, CD8, CD27, CD45RA, se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron adicionalmente para detectar la presencia de citocinas intracelulares tales como INF- γ , TNF- α e IL-2. Se usó análisis de citometría de flujo usando el software Flow-Jo para detectar células T CD8+ (CD27+CD45RA-) de memoria central que secretan una sola o múltiples citocinas en los puntos de tiempo de nivel inicial y tras la vacunación, excepto para el sujeto 09-08 con células T CD8+ (CD3+CD8+CD45RA+CD27-) diferenciadas tardíamente. (+) indica detección de células T polifuncionales en muestras de sangre después del tratamiento con un intervalo de frecuencia de >0,05% a >3,0% de subconjuntos de células T CD8+ de memoria analizados. (-) indica ausencia de células T CD8 polifuncionales detectables. (*) no determinado debido a PBMC de mala calidad.

Ejemplo 2:

Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los pacientes 02-04, 11-10, 02-16, 03-07, 09-08, 10-09 y 01-12 el día de estudio 70, 4 semanas después de la tercera vacunación con DPX-Survivac, administrada en combinación con ciclofosfamida metronómica tal como se describió. La excepción es el paciente 09-08, en donde la muestra analizada era del día de estudio 126, 12 semanas después de la tercera vacunación. Se determinó el haplotipo de HLA de todos los pacientes, y se muestran entre paréntesis junto con los números de ID de paciente (véase la figura 7). Se analizó la respuesta inmunitaria en estos pacientes *ex vivo* usando el ensayo de ELISPOT (figura 7; panel izquierdo) o análisis de tetrámeros *in vitro* mediante citometría de flujo (figura 7; panel derecho), tras la estimulación con péptidos de survivina agrupados. En el ensayo de ELISPOT, se estimularon las PBMC de pacientes con péptidos agrupados, que representan o bien los péptidos modificados incluidos en la vacuna DPX-Survivac (barras negras; SurA1.T (SEQ ID NO: 2), SurA2.M (SEQ ID NO: 4), SurA3.K (SEQ ID NO: 6), así como los péptidos SurA24 (SEQ ID NO: 7) y SurB7 (SEQ ID NO: 8) sin modificar), o un conjunto de péptidos que sustituyen a los péptidos modificados para los péptidos nativos de proteína survivina (barras blancas; SurA1 (SEQ ID NO: 1), SurA2 (SEQ ID NO: 3), SurA3 (SEQ ID NO: 5)).

En la tabla 5 se muestran los péptidos modificados contenidos en DPX-Survivac:

Tabla 5:

Péptido nativo	Secuencia de péptido nativo	Péptido modificado	Secuencia de péptido modificado
SurA1	FEELTLGEF (SEQ ID NO: 1)	SurA1.T	FIELTLGEF (SEQ ID NO: 2)
SurA2	LTLGEFLKL (SEQ ID NO: 3)	SurA2.M	LMLEGEFLKL (SEQ ID NO: 4)
SurA3	RISTFKNWPF (SEQ ID NO: 5)	SurA3.K	RISTFKNWPK (SEQ ID NO: 6)

Para el análisis de tetrámeros, se usó un único péptido (nativo o modificado) para estimular PBMC en presencia de citocinas IL-2/IL-15 durante 10 días y se detectó la frecuencia de linfocitos T específicos de antígeno usando reactivos de tetrámeros diseñados basándose en péptido modificado y moléculas de HLA correspondientes. Se espera que los pacientes generen respuestas inmunitarias a los péptidos correspondientes a su tipo de HLA

relevante (es decir, SurA1 a HLA-A1, SurA2 a HLA-A2 y SurA3 a HLA-A3). Tal como se demuestra en la figura 7, las respuestas inmunitarias generadas a los péptidos de survivina modificados contenidos en DPX-Survivac demuestran una reactividad cruzada significativa con los péptidos nativos, tal como se observa tanto en los análisis de ELISPOT como de tetrámeros de muestras de sangre después de la vacunación. Por tanto, se espera que las células T CD8+ inducidas por la vacuna DPX-Survivac seleccionen como diana células tumorales que expresan péptidos nativos conjuntamente con moléculas de HLA correspondientes sobre la superficie celular. Debido a la reactividad cruzada inmunitaria observada hacia secuencias de péptido de survivina nativas, se espera que la inclusión de péptidos nativos en una vacuna produjera una respuesta inmunitaria que puede reconocer secuencias nativas si están presentes sobre células seleccionadas como diana por la vacuna.

Lista de secuencias

<110> ImmunoVaccine Technologies Inc.

<120> Método para mejorar la eficacia de una vacuna de survivina en el tratamiento de cáncer

<130> 78961-124

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Péptido sintético

<220>

<223> Péptido de survivina SurA1

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(9)

<223> survivin93-101

<400> 1

Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe

1

5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Péptido sintético

<220>

<223> Péptido de survivina modificado SurA1.T

<400> 2

Phe Thr Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe

1

5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Péptido sintético

<220>

<223> Péptido de survivina SurA2

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(9)

<223> survivin96-104

<400> 3

Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
 1 5
 <210> 4
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Péptido sintético
 <220>
 <223> Péptido de survivina modificado SurA2.M
 10 <400> 4
 Leu Met Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
 1 5
 <210> 5
 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Péptido sintético
 <220>
 20 <223> Péptido de survivina SurA3
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(10)
 25 <223> survivin18-27
 <400> 5
 Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe
 1 5 10
 30 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Péptido sintético
 35 <220>
 <223> Péptido de survivina modificado SurA3.K
 <400> 6
 Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Lys
 1 5 10
 40 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Péptido sintético
 45 <220>
 <223> Péptido de survivina SurA24
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> survivin20-28
 <400> 7
 Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu
 1 5
 55 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Péptido sintético

<220>

<223> Péptido de survivina SurB7

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(9)

<223> survivin6-14

10

<400> 8

Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu

1 5

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Péptido sintético

15

<220>

<223> Epítipo universal de linfocito T auxiliar de toxoide tetánico

20

<400> 9

Ala Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu

1 5 10 15

25

<210> 10

<211> 429

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 10

atgggtgccc	cgacgttgcc	ccctgcctgg	cagccctttc	tcaaggacca	cgcctctct	60
acattcaaga	actggccctt	cttgaggggc	tgcgcctgca	ccccggagcg	gatggccgag	120
gctggcttca	tccactgccc	cactgagaac	gagccagact	tggcccagtg	tttcttctgc	180
ttcaaggagc	tggaaggctg	ggagccagat	gacgaccca	tagaggaaca	taaaaagcat	240
tcgtccgggt	gcgctttcct	ttctgtcaag	aagcagtttg	aagaattaac	ccttggtgaa	300
tttttgaaac	tggaacagaga	aagagccaag	aacaaaattg	caaaggaaac	caacaataag	360
aagaaagaat ttgaggaaac tgcgaagaaa gtgcgccgtg ccatcgagca gctggctgcc						420
atggattga						429

35

<210> 11

<211> 142

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

```

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

```

<210> 12

<211> 13

5 <212> PRT

<213> Péptido sintético

<220>

10 <223> Epítopo universal de linfocito T auxiliar PADRE ("*pan-DR epitope*", epítopo pan-DR)

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

15

<400> 12

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala

1

5

10

<210> 13

20 <211> 21

<212> PRT

<213> Péptido sintético

<220>

25 <223> Epítopo de linfocitos T auxiliares, péptido de toxoide tetánico F21E

<400> 13

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser

1

5

10

15

Ala Ser His Leu Glu

20

30 <210> 14

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Oligonucleótido CpG sintético

<400> 14

tccatgacgt tcctgacgtt 20

40

REIVINDICACIONES

1. Combinación de un agente que interfiere con la replicación del ADN y una vacuna que comprende al menos un antígeno de survivina para su uso en un método para mejorar la eficacia de la vacuna en el tratamiento de cáncer en un sujeto, en la que se le administra al sujeto al menos dos dosis del agente en una cantidad suficiente para proporcionar un efecto inmunomodulador; y se le administra posteriormente al sujeto una cantidad eficaz terapéuticamente de la vacuna,
 5 en la que el agente que interfiere con la replicación del ADN es ciclofosfamida y se le administra al sujeto la ciclofosfamida en un régimen metronómico, en la que dicho régimen metronómico comprende administrar la ciclofosfamida al sujeto diariamente durante un periodo de aproximadamente una semana cada dos semanas;
 10 en la que la vacuna es una composición preparada con el al menos un antígeno de survivina, liposomas y un portador que comprende una fase continua de una sustancia hidrófoba.
2. Combinación para su uso según la reivindicación 1, en la que se le administra al sujeto la ciclofosfamida al menos 1, 2, 3 ó 4 veces al día antes de administrar la vacuna.
3. Combinación para su uso según la reivindicación 1, en la que se le administra al sujeto la ciclofosfamida dos veces al día antes de administrar la vacuna.
4. Combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que se le administra al sujeto la vacuna aproximadamente una vez cada tres semanas.
5. Combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que se le administra al sujeto la vacuna 2, 3, 4 o más veces.
6. Combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que se le administra al sujeto la ciclofosfamida empezando aproximadamente una semana antes de una primera dosis de la vacuna y la vacuna se administra al sujeto aproximadamente una vez cada tres semanas.
7. Combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el antígeno de survivina es:
 35 - un antígeno peptídico o un ácido nucleico que codifica para un antígeno;
 - un antígeno peptídico que comprende una secuencia de aminoácidos de la proteína survivina (SEQ ID NO: 11) que puede provocar una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) en el sujeto, o una molécula de ácido nucleico que codifica para dicho antígeno peptídico; o
 40 - un antígeno peptídico que comprende la secuencia de aminoácidos FEELTLGEF (SEQ ID NO: 1); FTELTLGEF (SEQ ID NO: 2); LTLGEFLKL (SEQ ID NO: 3); LMLGEFLKL (SEQ ID NO: 4); RISTFKNWPF (SEQ ID NO: 5); RISTFKNWPK (SEQ ID NO: 6); STFKNWPFL (SEQ ID NO: 7); y LPPAWQPFL (SEQ ID NO: 8), o cualquier combinación de las mismas; o una molécula de ácido que codifica para dicho antígeno peptídico.
8. Combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el al menos un antígeno de survivina comprende una mezcla de cinco antígenos peptídicos, en la que el primer antígeno peptídico comprende la secuencia de aminoácidos FTELTLGEF (SEQ ID NO: 2); el segundo antígeno peptídico comprende la secuencia de aminoácidos LMLGEFLKL (SEQ ID NO: 4); el tercer antígeno peptídico comprende la secuencia de aminoácidos RISTFKNWPK (SEQ ID NO: 6); el cuarto antígeno peptídico comprende la secuencia de aminoácidos STFKNWPFL (SEQ ID NO: 7) y el quinto antígeno peptídico comprende la secuencia de aminoácidos LPPAWQPFL (SEQ ID NO: 8).
9. Combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la cantidad suficiente para proporcionar un efecto inmunomodulador es de aproximadamente 25-300 mg/día, preferiblemente de aproximadamente 50-100 mg/día y más preferiblemente de aproximadamente 100 mg/día de ciclofosfamida.
10. Combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la ciclofosfamida se administra a aproximadamente 50 mg de ciclofosfamida por dosis para proporcionar el efecto inmunomodulador.
11. Combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que se le administra al sujeto la ciclofosfamida por vía oral y se le administra al sujeto la vacuna mediante inyección.

12. Combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la vacuna comprende además un epítipo de células T auxiliares y/o un adyuvante.
- 5 13. Combinación para su uso según la reivindicación 12, en la que el epítipo de células T auxiliares comprende la secuencia de aminoácidos AQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 9) y el adyuvante es un polinucleótido poli I:C.
- 10 14. Combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que la sustancia hidrófoba del portador es un aceite vegetal, aceite de nueces o aceite mineral, preferiblemente aceite mineral.
- 15 15. Combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que la ciclofosfamida mejora la eficacia de la vacuna:
 - potenciando directamente la respuesta inmunitaria frente al antígeno aumentando la actividad o el número de células T CD8+ específicas de antígeno; y/o
 - 20 - reduciendo el número o actividad de células inmunosupresoras, en la que las células inmunosupresoras comprenden uno o más de células T reguladoras CD4⁺FoxP3⁺ (Treg), células supresoras de origen mielóide (MDSC) y células B CD19⁺CD1d⁺CD5⁺ (Breg).
- 25 16. Combinación para su uso según la reivindicación 15, en la que el aumento de la actividad o el número de células T CD8+ específicas de antígeno implica un enriquecimiento de células T CD8+ específicas de antígeno debido a una disminución relativa en las células T CD8+ totales.
- 30 17. Combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que el cáncer es:
 - un tumor sólido subcutáneo; y/o
 - cáncer ovárico, cáncer de las trompas de Falopio o cáncer peritoneal.
- 35 18. Combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que el sujeto es un ser humano.

Figura 1

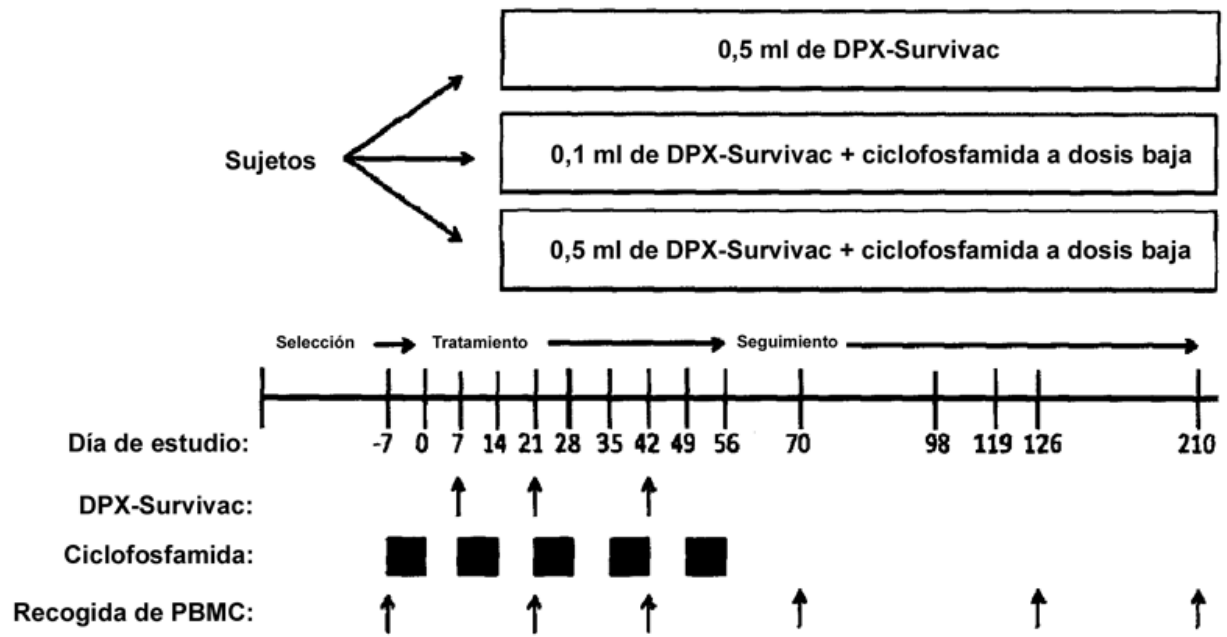


Figura 2

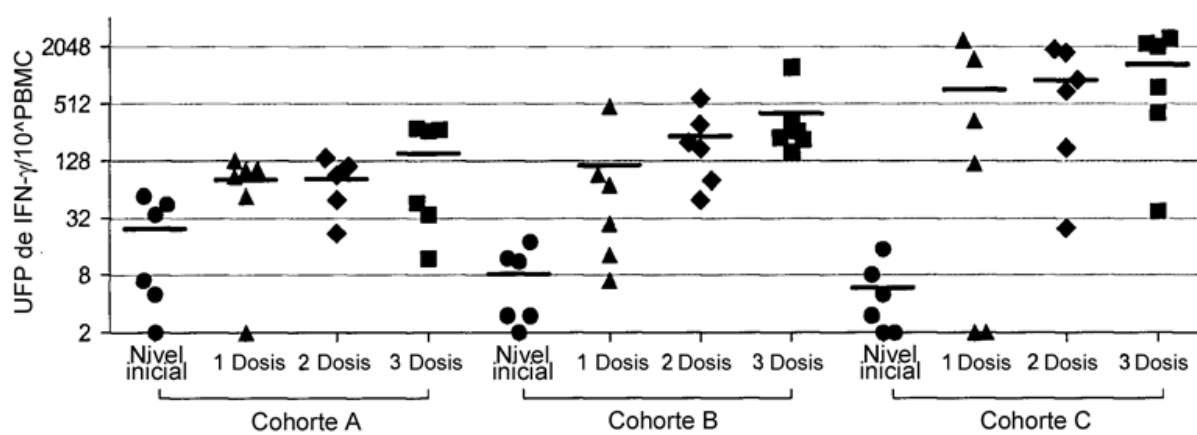


Figura 3

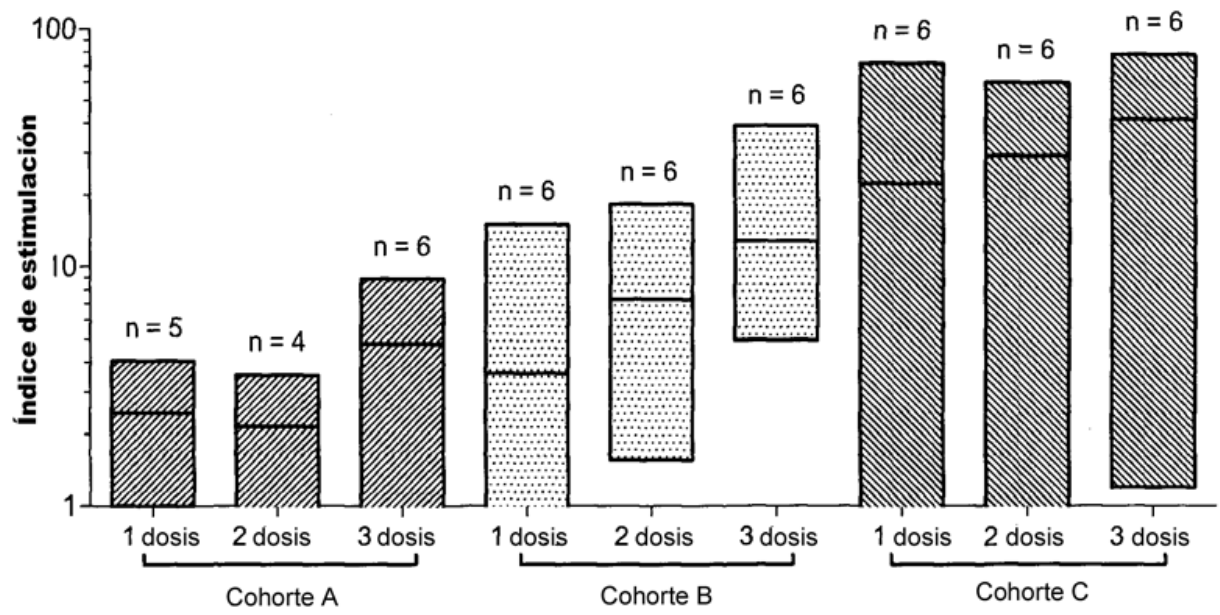


Figura 4

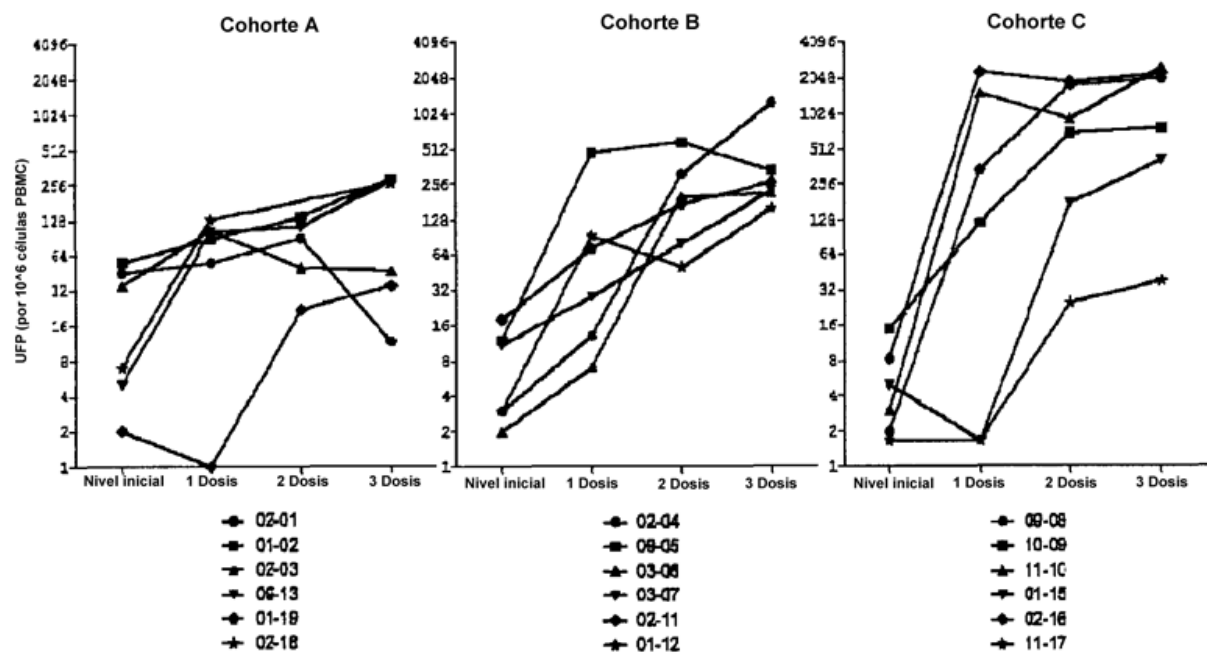


Figura 5

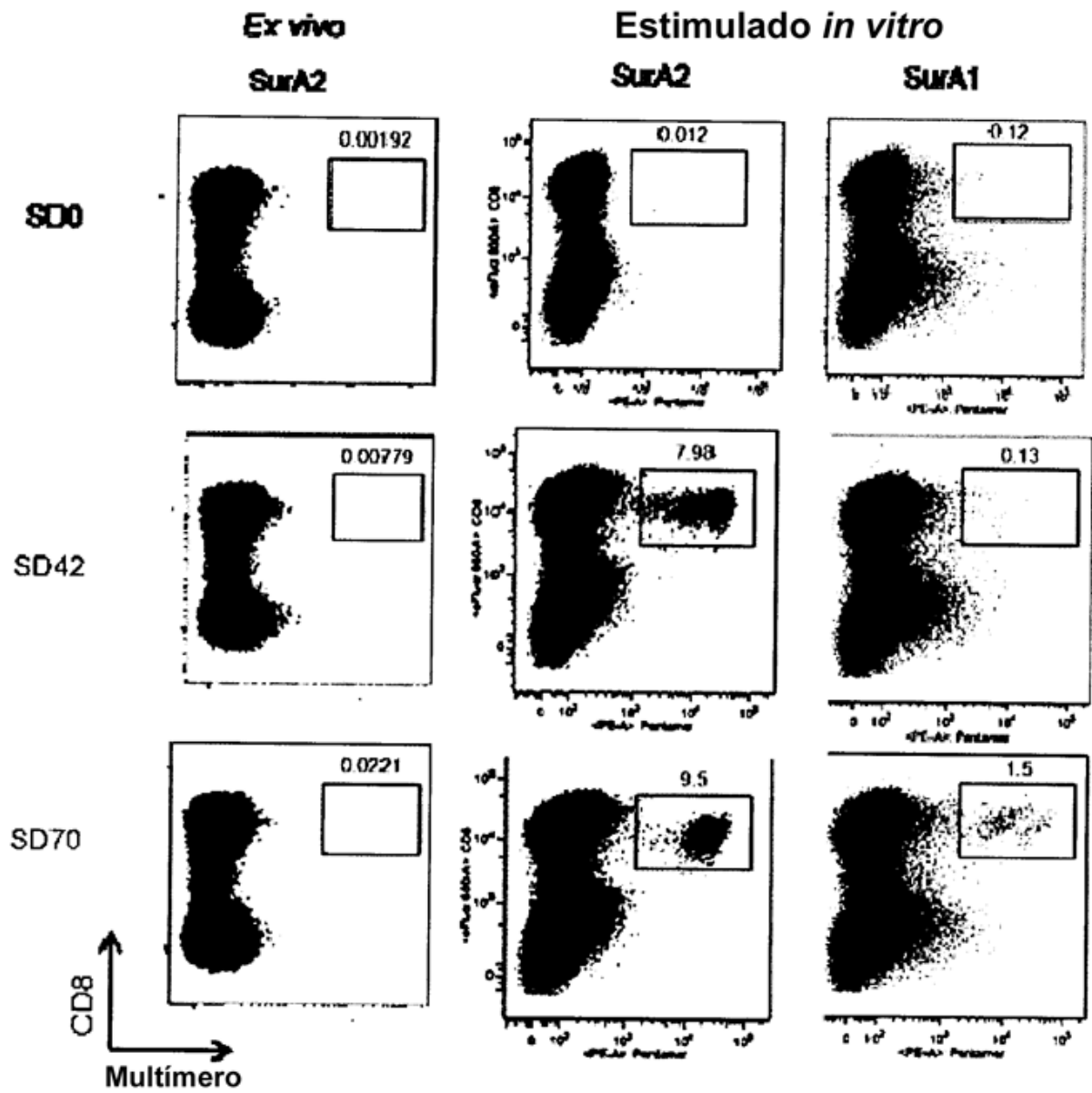


Figura 6

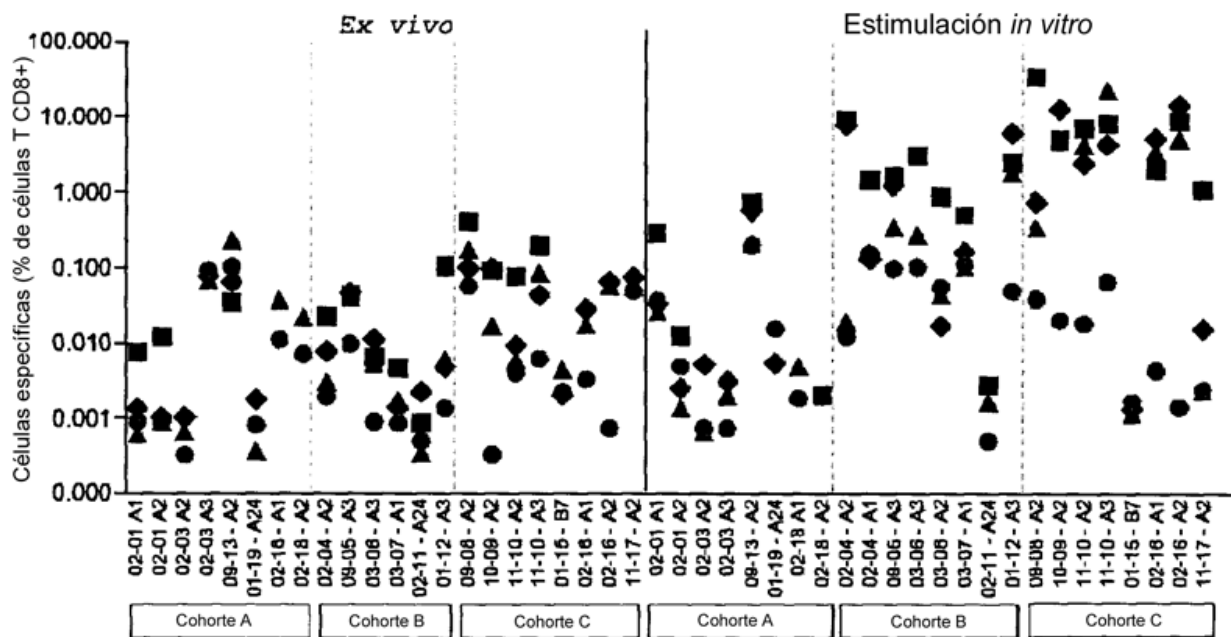


Figura 7

