

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 722 799**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.08.2011 PCT/US2011/048823**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2012 WO12027379**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2011 E 11820530 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 2608799**

54 Título: **Vacunas contra el cáncer de cerebro basadas en el péptido alfa 2 del receptor de interleuquina-13**

30 Prioridad:

24.08.2010 US 376582 P

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

16.08.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER
EDUCATION (100.0%)
200 Gardner Steel Conference Center
Pittsburgh, PA 15260, US**

72 Inventor/es:

OKADA, HIDEHO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 722 799 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

Vacunas contra el cáncer de cerebro basadas en el péptido alfa 2 del receptor de interleuquina-13

1. Introducción

5 En la presente memoria se proporcionan las vacunas contra el cáncer de cerebro basadas en el péptido $\alpha 2$ de interleuquina-13 y los procedimientos para tratar y vacunar contra el cáncer de cerebro que comprenden administrar a pacientes en necesidad del mismo las vacunas contra el cáncer de cerebro basadas en el péptido $\alpha 2$ de interleuquina-13. En la presente memoria también se proporcionan regímenes de vacunas que comprenden péptidos $\alpha 2$ del receptor de interleuquina-13 y por lo menos un péptido adicional y/o inmunoestimulante.

2. Antecedentes

10 Los tumores cerebrales son particularmente difíciles de tratar utilizando procedimientos convencionales, tales como cirugía, radioterapia o quimioterapia. Los factores tales como los patrones de crecimiento invasivo y la barrera hematoencefálica hacen que el tratamiento de los gliomas malignos sea más problemático que otros tumores. La falta de opciones de tratamiento efectivas para los pacientes ha llevado al desarrollo de terapias alternativas, tales como la inmunoterapia.

15 La inmunoterapia es una metodología nueva y prometedora en el tratamiento de los gliomas malignos. La eficacia de las inmunizaciones periféricas con células de glioma autólogas o células dendríticas (DC) pulsadas con péptidos sintéticos para epítomos de células T específicas de tumores y antígenos se ha demostrado en modelos de ratón preclínicos (Okada et al., 2001; Okada et al., 1998). Las vacunas basadas en epítomos de células T específicas son probablemente más seguras que las vacunas basadas en células de glioma completo debido a la falta de las respuestas autoinmunitarias teóricas contra componentes cerebrales normales. Tales metodologías específicas de antígeno también pueden ser más efectivas que las metodología de antígeno de tumor en masa debido a que la presentación de epítomos de células T inmunogénicas y la estimulación de precursores de células T específicas de antígeno pueden tener lugar de manera más eficiente con el uso de péptidos antigénicos específicos que los antígenos de tumor en masa

25 Se requiere la identificación de los inmunopéptidos de células T en antígenos asociados a glioma humano para el desarrollo de dichas vacunas contra los gliomas humanos. Se han identificado pocos inmunoepítomos de linfocitos T citotóxicos (CTL) para los gliomas malignos humanos. Sin embargo, recientemente se identificó un epítomo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA (antígeno leucocitario humano)-A2 derivado del receptor (R) $\alpha 2$ de interleuquina (IL)-13 (Okano et al., 2002). Se sabe que el IL-13R $\alpha 2$ se expresa en la mayoría de los gliomas malignos humanos pero no en tejidos normales (Debinski et al., 2000), lo que hace que el epítomo identificado (IL-13R $\alpha 2$ ₃₄₅₋₃₅₃) sea un componente atractivo de las vacunas basadas en péptidos para los gliomas. Al generar líneas de CTL únicas mediante la estimulación de células CD8+ con el péptido de IL-13R $\alpha 2$ ₃₄₅₋₃₅₃, se demostró que las células de glioma positivas a HLA-A2, positivas a IL-13R $\alpha 2$ se sometieron a lisis de manera efectiva de una forma específica de antígeno. Sin embargo, no está claro cuán eficientemente dichas vacunas basadas en péptidos pueden inducir CTL específicos y si se pueden utilizar análogos de péptidos para la expansión y activación óptimas de CTL restringidos a HLA-A2 específicos de IL-13R $\alpha 2$.

30 Se ha demostrado que ciertas sustituciones de aminoácidos en péptidos identificados como epítomos de CTL podrían aumentar considerablemente la afinidad de unión de dichos péptidos al complejo HLA (antígeno leucocitario humano) y, por lo tanto, aumentaría la inmunogenicidad del péptido (Bownds et al., 2001; Chen et al., 2000). El aumento de la inmunogenicidad de IL-13R $\alpha 2$ ₃₄₅₋₃₅₃ y otros epítomos similares podría conducir al desarrollo de vacunas potentes, basadas en péptidos específicos a tumores, lo que sería una mejora significativa en el régimen de tratamiento actual para los gliomas malignos. Sin embargo, sigue subsistiendo la necesidad de un epítomo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2 de polipéptido mejorado.

45 Como se discutió anteriormente, se han identificado pocos epítomos supervivencia de linfocitos T citotóxicos (CTL) para los gliomas malignos humanos. Sin embargo, dada la marcada heterogeneidad antigénica de los gliomas, la inmunoterapia con un solo epítomo de células T específico del tumor podría promover simplemente la estabilización transitoria de la enfermedad, antes de la progresión de las variantes de pérdida de antígeno. EphA2 es un miembro de la familia Eph de receptores tirosina quinasas, que consta de dos clases principales (EphA2 y EphB), que se distinguen por sus especificidades para los ligandos (efrina-A y efrina-B, respectivamente). El EphA2 es frecuentemente sobreexpresado y con frecuencia desregulado funcionalmente en cánceres avanzados, tales como las lesiones metastásicas (Kinch et al., 2003). Debido a la naturaleza agresiva e invasiva de los gliomas malignos, EphA2 podría expresarse en esta entidad tumoral y podría ser un objetivo potencial para las vacunas contra el glioma. Los inmunoepítomos de células T en EphA2 se han identificado y caracterizado como posibles objetivos y marcadores sustitutos para otras formas de inmunoterapia del cáncer (Alves et al., 2003, y Tatsumi et al., 2003). La identificación de epítomos CTL adicionales es una etapa necesaria en el desarrollo de vacunas basadas en múltiples epítomos para el glioma, lo que sería una mejora significativa en el régimen de tratamiento actual para los gliomas malignos.

El documento WO 2008/039969 A2 divulga vacunas para uso en el tratamiento del cáncer neural, que comprenden células que presentan antígenos tales como células dendríticas cargadas con IL-13R α 2 y otros antígenos que incluyen el adyuvante de Freund.

5 El documento WO 2005/012350 A2 divulga epítomos de células T EphA2, que incluyen el adyuvante de Freund para provocar una respuesta inmune en el tratamiento del cáncer.

El documento WO 2005/067460 A2 divulga vacunas contra EphA2.

El documento EP 2 172 211 A1 divulga péptidos que incluyen survivina y el adyuvante Montanide como vacunas para el tratamiento de glioblastomas.

10 El documento EP 2 228 072 A1, que es una solicitud anterior publicada posteriormente, divulga vacunas contra el cáncer que comprenden la proteína del tumor de Wilms 1 así como el adyuvante Montanide.

El documento US 2006/084609 A1 divulga vacunas que comprenden la proteína del tumor de Wilms 1 cargadas en células dendríticas, que presentan los péptidos sintéticos, así como un adyuvante.

El documento EP 1 835 027 A1 divulga el péptido YKL-40 presentado por las células que presentan antígenos, así como el adyuvante Montanide como vacuna para tumores cerebrales.

15 El documento WO 2005/028505 A2 divulga un epítomo GP100 presentado por las células que presentan antígenos, así como adyuvantes para conferir inmunidad contra el cáncer.

3. Sumario

20 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un péptido de IL-13R α 2 que comprende una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 4, un péptido EphA2 que comprende la SEQ ID NO:6, y un péptido de survivina que comprende la SEQ ID NO:7.

La invención también se refiere a esta composición farmacéutica como un medicamento para uso en el tratamiento, prevención, o manejo de cáncer de cerebro.

Las realizaciones preferidas de la invención, así como también las realizaciones no inventivas de las composiciones farmacéuticas, se proporcionan en la siguiente descripción.

25 En un aspecto, se proporciona en la presente memoria un péptido derivado de IL-13R α 2, que sirve como un epítomo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2. El péptido de IL-13R α 2 puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en una variante mutante de sustitución de WLPFGFILI (SEQ ID NO:1), en la que por lo menos uno de los residuos de aminoácido se puede sustituir por un aminoácido diferente del residuo indicado. Adicionalmente, el péptido de IL-13R α 2 puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en cualquiera de las siguientes secuencias: WLPFGFILV (SEQ ID NO:2), ALPFGFILV (SEQ ID NO:3), o ELPFGFILV (SEQ ID NO:4).

30 También se proporciona en la presente memoria el uso de cualquiera de los péptidos IL-13R α 2 anteriores como vacuna para el glioma. Adicionalmente, la invención proporciona un procedimiento para vacunar un paciente contra glioma, en el que el péptido se introduce en un paciente bajo condiciones suficientes para que el paciente desarrolle una respuesta de CTL. Adicionalmente, se proporciona en la presente memoria el uso de un péptido EphA2 que tiene la secuencia TLADFDPRV (SEQ ID NO:6) o una composición que comprende dicho péptido y un portador fisiológicamente aceptable, como vacuna para el glioma. También se proporciona en la presente memoria un procedimiento para vacunar un paciente contra glioma, en el que un péptido EphA2 que tiene la secuencia TLADFDPRV (SEQ ID NO:6) o una composición que comprende dicho péptido y un portador fisiológicamente aceptable, se introduce en un paciente bajo condiciones suficientes para que el paciente desarrolle una respuesta de CTL.

35 En otro aspecto, se presentan en la presente memoria las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 que comprenden un péptido de IL-13R α 2 y uno, dos, tres, o más péptidos asociados al cáncer de cerebro adicionales. En ciertas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 descritas en la presente memoria se administran concurrentemente con uno o más epítomos de célula T auxiliar y/o uno o más modificadores de respuesta inmunitaria. De acuerdo con dichas realizaciones, uno o más epítomos de célula T auxiliar y/o uno o más modificadores de respuesta inmunitaria se pueden administrar como parte de la vacuna (por ejemplo, en solución con el péptido de IL-13R α 2 y uno, dos, tres, o más péptidos asociados al cáncer de cerebro adicionales) o separados de la vacuna (es decir, los epítomos de célula T auxiliar y/o modificadores de respuesta inmunitaria se pueden administrar como una formulación que no es una parte de la formulación de vacuna). En algunas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 descritas en la presente memoria se administran como vacunas libres de células. En otra realización, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra con un adyuvante. En una realización preferida, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra en combinación con péptidos adicionales. En otra realización, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra con un agente inmunomodulador. En otra realización, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se

administra como una emulsión en Montanide ISA 51, como un componente de un régimen que incluye inyecciones con un agente inmunoestimulador. En una realización preferida, el agente inmunoestimulador es poli ICLC. En otras realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 descritas en la presente memoria se administran como vacunas de células dendríticas.

5 En una realización, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 comprende un péptido de IL-13R α 2, un péptido EphA2, un péptido YKL-40, y un péptido GP100. En una realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 comprende el péptido de IL-13R α 2 que corresponde a una cualquiera de las SEQ ID NOs:1-4, el péptido EphA2 que corresponde a la SEQ ID NO:6, el péptido YKL-40 que corresponde a la SEQ ID NO:10, y el péptido GP100 que corresponde a la SEQ ID NO:11. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 comprende el péptido de IL-13R α 2 que corresponde a la SEQ ID NO:3, el péptido EphA2 que corresponde a la SEQ ID NO:6, el péptido YKL-40 que corresponde a la SEQ ID NO:10, y el péptido GP100 que corresponde a la SEQ ID NO:11. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 comprende el péptido de IL-13R α 2 que corresponde a la SEQ ID NO:3, el péptido EphA2 que corresponde a la SEQ ID NO:6, el péptido YKL-40 que corresponde a la SEQ ID NO:10, y el péptido GP100 que corresponde a la SEQ ID NO:11. En algunas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con uno o más epítomos de célula T auxiliar. En una realización específica, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con un epítomo de célula T auxiliar, en la que el epítomo de célula T auxiliar es el péptido de PADRE. En algunas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con uno o más modificadores de respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 es una vacuna libre de células. En otras realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 es una vacuna de células dendríticas.

En otra realización, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 comprende un péptido de IL-13R α 2, un péptido EphA2, un péptido de survivina, y un péptido de WT1. En una realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 comprende el péptido de IL-13R α 2 que corresponde a una cualquiera de las SEQ ID NOs:1-4, el péptido EphA2 que corresponde a la SEQ ID NO:6, el péptido de survivina que corresponde a la SEQ ID NO:7, y el péptido de WT1 que corresponde a la SEQ ID NO:8. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 comprende el péptido de IL-13R α 2 que corresponde a la SEQ ID NO:3, el péptido EphA2 que corresponde a la SEQ ID NO:6, el péptido de survivina que corresponde a la SEQ ID NO:7, y el péptido de WT1 que corresponde a la SEQ ID NO:8. En algunas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con uno o más epítomos de célula T auxiliar. En una realización específica, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con un epítomo de célula T auxiliar, en la que el epítomo de célula T auxiliar es el toxoide tetánico. En algunas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con uno o más modificadores de respuesta inmunitaria. En una realización específica, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con un modificador de respuesta inmunitaria, en la que el modificador de respuesta inmunitaria es poli-ICLC. En una realización específica, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con un modificador de respuesta inmunitaria, en la que el modificador de respuesta inmunitaria es Montanide ISA-51. En algunas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 es una vacuna libre de células. En otras realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 es una vacuna de células dendríticas.

De acuerdo con la invención, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 comprende un péptido de IL-13R α 2, un péptido EphA2, y un péptido de survivina. En la realización de la invención, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 comprende el péptido de IL-13R α 2 que corresponde a una cualquiera de las SEQ ID NOs:1-4, el péptido EphA2 que corresponde a la SEQ ID NO:6, y el péptido de survivina que corresponde a la SEQ ID NO:7. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 comprende el péptido de IL-13R α 2 que corresponde a la SEQ ID NO:3, el péptido EphA2 que corresponde a la SEQ ID NO:6, y el péptido de survivina que corresponde a la SEQ ID NO:7. En algunas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con uno o más epítomos de célula T auxiliar. En una realización específica, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con un epítomo de célula T auxiliar, en la que el epítomo de célula T auxiliar es el toxoide tetánico. En algunas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con uno o más modificadores de respuesta inmunitaria. En una realización específica, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con un modificador de respuesta inmunitaria, en la que el modificador de respuesta inmunitaria es poli-ICLC. En una realización específica, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con un modificador de respuesta inmunitaria, en la que el modificador de respuesta inmunitaria es Montanide ISA-51. En algunas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 es una vacuna libre de células. En otras realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 es una vacuna de células dendríticas.

4. Definiciones

Como se utiliza en la presente memoria, los términos “alrededor de” o “aproximadamente” cuando se utilizan junto con un número se refieren a cualquier número dentro del 1, 5 o 10 % del número al que se hace referencia.

60 Como se utiliza en la presente memoria, el término “agente” se refiere a cualquier molécula, compuesto y/o sustancia que se puede utilizar en combinación con vacunas contra el cáncer de cerebro basadas en el péptido α 2

del receptor de interleuquina-13 descritas en la presente memoria. El término agente incluye, sin limitación, proteínas, inmunoglobulinas (por ejemplo, Ig multiespecíficas, Ig de cadena única, fragmentos de Ig, anticuerpos policlonales y sus fragmentos, anticuerpos monoclonales y sus fragmentos), péptidos (por ejemplo, receptores de péptidos, selectinas), proteínas de unión, agentes biológicos, quimioespecíficos, agentes quimiotóxicos, agentes antiangiogénicos y fármacos de moléculas pequeñas.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “identidad de secuencia de aminoácidos” se refiere al grado de identidad o similitud entre un par de secuencias de aminoácidos alineadas, generalmente expresadas como un porcentaje. Como se utiliza en la presente memoria, los términos “porcentaje de identidad”, “por ciento idéntico”, “% de identidad” y “% idéntico” con respecto a la secuencia de aminoácidos se refieren al porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos (es decir, los residuos de aminoácidos en una posición dada en la alineación son el mismo residuo al correspondiente residuo de aminoácidos en el péptido después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de homología de secuencia. Como se utiliza en la presente memoria, los términos “porcentaje de similitud”, “porcentaje similar”, “% de similitud” y “% similar” con respecto a la secuencia de aminoácidos se refieren al porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son similares (es decir, la sustitución de aminoácidos en una posición dada en la alineación es una sustitución conservadora, como se discute a continuación), al residuo de aminoácidos correspondiente en el péptido después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de homología de secuencia. La homología de secuencia, que incluye los porcentajes de identidad y similitud de secuencia, se determina utilizando técnicas de alineación de secuencias bien conocidas en la técnica, incluidos algoritmos informáticos diseñados para este fin, utilizando los parámetros predeterminados de dichos algoritmos informáticos o los paquetes de software que los contienen.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “sustitución conservadora” se refiere al reemplazo de un aminoácido de una clase con otro aminoácido de la misma clase. En realizaciones particulares, una sustitución conservadora no altera la estructura o función, o ambas, de un péptido. Las clases de aminoácidos para los propósitos de la sustitución conservadora incluyen hidrofóbicos (Met, Ala, Val, Leu, Ile), hidrofílicos neutros (Cys, Ser, Thr), ácidos (Asp, Glu), básicos (Asn, Gin, His, Lys, Arg), disruptores de conformación (Gly, Pro) y aromáticos (Trp, Tyr, Phe).

Como se utiliza en la presente memoria, el término “péptido” se refiere a un polímero de aminoácidos unidos por enlaces amida como es conocido por los expertos en la técnica. Un péptido puede ser un polímero de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más aminoácidos unidos por enlaces amida covalentes. En algunas realizaciones, el péptido es un polímero de 6 a 8, 8 a 10, 10 a 15, 10 a 20, 10 a 25, 10 a 30, 10 a 40, 10 a 50 o 25 a 25 aminoácidos unidos por enlaces amida covalentes. En ciertas realizaciones, el péptido es un polímero de 50 a 65, 50 a 75, 50 a 85, 50 a 95, 50 a 100, 75 a 100 aminoácidos unidos por enlaces amida covalentes. Como se utiliza en la presente memoria, el término puede referirse a una única cadena de péptidos unida por enlaces amida covalentes. El término también puede referirse a múltiples cadenas de péptidos asociadas por interacciones no covalentes, tales como contactos iónicos, enlaces de hidrógeno, contactos de Van der Waals y contactos hidrofóbicos. Aquellos expertos en la materia reconocerán que el término incluye péptidos que se han modificado, por ejemplo, mediante procesamiento posterior a la traducción, tales como la división del péptido señal, formación de enlaces disulfuro, glicosilación (por ejemplo, glicosilación ligada a N), división de proteasas y modificación de lípidos (por ejemplo, S-palmitoilación).

Como se utiliza en la presente memoria, los términos “purificado” y “aislado” cuando se utilizan en el contexto de un péptido que se obtiene de una fuente natural, por ejemplo, células, se refiere a un péptido que está sustancialmente libre de materiales contaminantes de la fuente natural, por ejemplo, partículas del suelo, minerales, sustancias químicas del medio ambiente y/o materiales celulares de la fuente natural, tales como pero no limitados a, restos celulares, materiales de la pared celular, membranas, orgánulos, la mayor parte de los ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas y/o lípidos presentes en las células. Por lo tanto, un péptido que está aislado incluye preparaciones de un polipéptido que tiene menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 2 % o 1 % (en peso seco) de materiales celulares y/o materiales contaminantes. Como se utiliza en la presente memoria, los términos “purificado” y “aislado” cuando se utilizan en el contexto de un péptido que se sintetiza químicamente se refieren a un péptido que está sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas que están involucrados en la síntesis del polipéptido.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “ácido nucleico” pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generado utilizando análogos de nucleótidos. El ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de cadena doble.

Como se utiliza en la presente memoria, la frase “vacuna profiláctica” se refiere a una vacuna descrita en la presente memoria que se utiliza con el propósito de prevenir el cáncer.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “régimen profilácticamente efectivo” se refiere a un régimen efectivo para la dosificación, programación, frecuencia y duración de la administración de una o más terapias para la prevención del cáncer de cerebro o un síntoma del mismo.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “vacuna terapéutica” se refiere a una vacuna descrita en la presente memoria que se utiliza con el propósito de tratar y/o manejar el cáncer de cerebro.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el término “régimen terapéuticamente efectivo” se refiere a un régimen para la dosificación, programación, frecuencia y duración de la administración de una o más terapias para el tratamiento y/o manejo del cáncer de cerebro o un síntoma del mismo.

10 Como se utiliza en la presente memoria, los términos “sujeto” o “paciente” se utilizan de manera intercambiable para referirse a un animal (por ejemplo, aves, reptiles y mamíferos). En una realización específica, un sujeto es un ave. En otra realización, un sujeto es un mamífero que incluye un no primate (por ejemplo, un camello, burro, cebra, vaca, cerdo, caballo, cabra, oveja, gato, perro, rata y ratón) y un primate (por ejemplo, un mono, chimpancé, y un humano). En ciertas realizaciones, un sujeto es un animal no humano. En algunas realizaciones, un sujeto es un animal de granja o una mascota. En otra realización, un sujeto es un humano. En otra realización, un sujeto es un lactante humano. En otra realización, un sujeto es un infante humano. En otra realización, un sujeto es un niño humano. En otra realización, un sujeto es un adulto humano. En otra realización, un sujeto es un humano anciano.

15 Como se utiliza en la presente memoria, el término “lactante humano” se refiere a un humano recién nacido a un humano de 1 año.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “infante humano” se refiere a un ser humano que tiene entre 1 y 3 años de edad.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “niño humano” se refiere a un humano que tiene entre 1 año y 18 años de edad.

20 Como se utiliza en la presente memoria, el término “adulto humano” se refiere a un humano que tiene 18 años o más.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “humano anciano” se refiere a un humano de 65 años o más.

25 Como se utiliza en la presente memoria, el término “cáncer de cerebro” se refiere a un tumor ubicado dentro del cráneo o en el canal medular central. El cáncer de cerebro se refiere tanto a los tumores primarios (es decir, a los tumores que se originan en la esfera intracraneal o al canal central de la columna vertebral) como a los tumores secundarios (es decir, a los tumores que invaden la esfera intracraneal o al canal central de la columna vertebral después de originarse en tumores ubicados principalmente en otros órganos).

30 Como se utiliza en la presente memoria, los términos “terapias” y “terapia” se pueden referir a cualquier protocolo(s), procedimiento(s), composición(es), formulación(es) y/o agente(s) que se pueden utilizar en la prevención o tratamiento del cáncer de cerebro o de una enfermedad o síntoma asociado con el mismo. En ciertas realizaciones, los términos “terapias” y “terapia” se refieren a terapia biológica, terapia de apoyo y/u otras terapias útiles en el tratamiento o prevención de cáncer de cerebro o una enfermedad o síntoma asociado con el mismo conocido por un experto en la técnica.

35 Como se utiliza en la presente memoria, la “cantidad efectiva” se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para evitar el desarrollo, recurrencia o aparición de cáncer de cerebro y/o uno o más de los síntomas del mismo, para mejorar o potenciar los efectos profilácticos de otra terapia, reducir la gravedad, la duración del cáncer de cerebro, mejorar uno o más síntomas del cáncer de cerebro, evitar el avance del cáncer de cerebro, provocar la regresión del cáncer de cerebro y/o mejorar o potenciar el efecto terapéutico de otra terapia.

40 Como se utiliza en la presente memoria, el término “en combinación” en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto se refiere al uso de más de una terapia (por ejemplo, profiláctica y/o terapéutica). El uso del término “en combinación” no restringe el orden en el que se administran las terapias (por ejemplo, una primera y segunda terapia) a un sujeto. Se puede administrar una terapia antes de (por ejemplo, 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), concomitantemente con o posterior a (por ejemplo, 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas después) la administración de una segunda terapia a un sujeto que tuvo, tiene o es susceptible al cáncer de cerebro. Las terapias se administran a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de tal manera que las terapias puedan actuar juntas. En una realización particular, las terapias se administran a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de tal manera que proporcionan un mayor beneficio que si se administraran de otra manera. Cualquier terapia adicional se puede administrar en cualquier orden con la otra terapia adicional.

55 Como se utiliza en la presente memoria, los términos “maneja”, “manejar” y “manejo” en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto se refieren a los efectos beneficiosos que un sujeto deriva de una terapia (por ejemplo, una vacuna profiláctica o terapéutica) o una combinación de terapias, mientras que no resulta en una cura para el cáncer de cerebro. En ciertas realizaciones, a un sujeto se le administra una o más terapias (por

ejemplo, una o más vacunas profilácticas o terapéuticas) para “manejar” el cáncer de cerebro a fin de prevenir la progresión o empeoramiento de la afección.

5 Como se utiliza en la presente memoria, los términos “evita”, “prevenir” y “prevención” en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto se refieren a la prevención o inhibición de la recurrencia, el inicio y/o el desarrollo de cáncer de cerebro o síntoma del mismo en un sujeto que resulta de la administración de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico), o una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos).

10 Como se utiliza en la presente memoria, el término “concurrentemente” significa un tiempo suficientemente cercano para producir un efecto combinado (es decir, concurrentemente puede ser simultáneamente, o pueden ocurrir dos o más eventos dentro de un periodo de tiempo anterior o posterior). Cuando se administra a otros agentes, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 proporcionadas en la presente memoria se pueden administrar concurrentemente con el otro agente activo. En algunas realizaciones una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 proporcionada en la presente memoria y uno o más agentes (por ejemplo, un epítipo de célula T auxiliar, un adyuvante, y/o un modificador de respuesta inmunitaria) se administran a un sujeto concurrentemente, en el que la administración de la vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 proporcionada en la presente memoria y uno o más agentes están en la misma composición. En otras realizaciones una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 proporcionada en la presente memoria y uno o más agentes (por ejemplo, un epítipo de célula T auxiliar, un adyuvante, y/o un modificador de respuesta inmunitaria) se administran a un sujeto concurrentemente, en la que la administración de la vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 proporcionada en la presente memoria y uno o más agentes no están en la misma composición. En una realización, el agente que se administra concurrentemente con la vacuna basada en el péptido IL13Rα2 se administra como una inyección separada. En ciertas realizaciones, una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 proporcionada en la presente memoria y uno o más agentes, por ejemplo, un epítipo de célula T auxiliar, un adyuvante, y/o un modificador de respuesta inmunitaria) se administran a un sujeto concurrentemente, en la que la administración concurrente se separa en por lo menos 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 10 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, o 2 semanas.

25 Como se utiliza en la presente memoria, el término “péptido asociado con cáncer de cerebro” se refiere a un péptido que se encuentra asociado con uno o más cánceres de cerebro y que sirve como un epítipo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2. En algunas realizaciones, un péptido asociado con cáncer de cerebro es un péptido asociado a glioma, es decir, el cáncer de cerebro al que se asocia el péptido es glioma. En una realización preferida, el péptido asociado con cáncer de cerebro se expresa por células de glioma. Los péptidos asociados con cánceres de cerebro de ejemplo incluyen, sin limitación, péptidos IL-13Rα2, péptidos EphA2, péptido YKL-40, péptido GP100, péptidos de survivina, y péptidos de WT1.

30 Como se utiliza en la presente memoria, el término “péptido de IL-13Rα2” se refiere a un péptido derivado de la proteína IL-13Rα2 y que sirve como un epítipo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2. En una realización específica la proteína IL-13Rα2 de la cual se deriva un péptido de IL-13Rα2 es la proteína IL-13Rα2 humana. En otra realización específica, un péptido de IL-13Rα2 comprende una cualquiera de las SEQ ID NOs:1-4. En algunas realizaciones, un péptido de IL-13Rα2 comprende una, dos, tres, o más mutaciones de aminoácido (por ejemplo, adiciones, sustituciones, o supresiones) en relación con el péptido de IL-13Rα2 cuando este existe en la forma nativa (por ejemplo, tipo silvestre) de la proteína IL-13Rα2.

40 Como se utiliza en la presente memoria, el término “péptido EphA2” se refiere a un péptido derivado de la proteína EphA2 y que sirve como un epítipo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2. En una realización específica la proteína EphA2 de la cual se deriva un péptido EphA2 es la proteína EphA2 humana. En otra realización específica, un péptido EphA2 comprende la SEQ ID NO:6. En algunas realizaciones, un péptido EphA2 comprende una, dos, tres, o más mutaciones de aminoácido (por ejemplo, adiciones, sustituciones, o supresiones) en relación con el péptido EphA2 cuando este existe en la forma nativa (por ejemplo, tipo silvestre) de la proteína EphA2.

45 Como se utiliza en la presente memoria, el término “péptido YKL-40” se refiere a un péptido derivado de la proteína YKL-40 y que sirve como un epítipo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2. En una realización específica la proteína YKL-40 de la cual se deriva un péptido YKL-40 es la proteína YKL-40 humana. En otra realización específica, un péptido YKL-40 comprende la SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, un péptido YKL-40 comprende una, dos, tres, o más mutaciones de aminoácido (por ejemplo, adiciones, sustituciones, o supresiones) en relación con el péptido YKL-40 cuando este existe en la forma nativa (por ejemplo, tipo silvestre) de la proteína YKL-40.

55 Como se utiliza en la presente memoria, el término “péptido GP100” se refiere a un péptido derivado de la proteína GP100 y que sirve como un epítipo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2. En una realización específica la proteína GP100 de la cual se deriva un péptido GP100 es la proteína GP100 humana. En otra realización específica, un péptido GP100 comprende la SEQ ID NO:11. En algunas realizaciones, un péptido GP100 comprende una, dos, tres, o más mutaciones de aminoácido (por ejemplo, adiciones, sustituciones, o supresiones) en relación con el péptido GP100 cuando este existe en la forma nativa (por ejemplo, tipo silvestre) de la proteína GP100.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “péptido de survivina” se refiere a un péptido derivado de la proteína survivina y que sirve como un epítipo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2. En una realización específica la proteína survivina de la cual se deriva un péptido de survivina es la proteína survivina humana. En otra realización específica, un péptido de survivina comprende la SEQ ID NO:7. En algunas realizaciones, un péptido de survivina comprende una, dos, tres, o más mutaciones de aminoácido (por ejemplo, adiciones, sustituciones, o supresiones) en relación con el péptido de survivina cuando este existe en la forma nativa (por ejemplo, tipo silvestre) de la proteína survivina.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “péptido WT1” se refiere a un péptido derivado de la proteína WT1 y que sirve como un epítipo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2. En una realización específica la proteína WT1 de la que se deriva un péptido de WT1 es la proteína WT1 humana. En otra realización específica, un péptido de WT1 comprende la SEQ ID NO:8. En algunas realizaciones, un péptido de WT1 comprende una, dos, tres, o más mutaciones de aminoácido (por ejemplo, adiciones, sustituciones, o supresiones) en relación con el péptido de WT1 cuando este existe en la forma nativa (por ejemplo, tipo silvestre) de la proteína WT1.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “vacuna libre de células” se refiere a una vacuna que comprende un péptido de IL-13R α 2, en la que el péptido de IL-13R α 2 no se carga sobre una célula (por ejemplo, una célula dendrítica) en la vacuna (por ejemplo, el péptido derivado de IL-13R α 2 está en solución). En una realización preferida, los péptidos se emulsifican en adyuvante. En otra realización preferida, el adyuvante es Montanide ISA 51.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “vacuna de células dendríticas” se refiere a una vacuna que comprende un péptido de IL-13R α 2, en el que el péptido de IL-13R α 2 se carga sobre células dendríticas en la vacuna.

5. Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 presenta gráficamente los datos que demuestran que el IL-13R α 2-V9 e IL-13R α 2-A 1V9 inducen una magnitud mayor de reactividad de CTL que IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ o IL-13R α 2-E 1V9 nativa contra células T2 cargadas con varias concentraciones de IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ nativo. Las células T CD8+ de un paciente con glioma HLA-A2+ se estimularon con DC cargadas con ya sea el péptido de IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ nativo (●), IL-13R α 2-V9 (○), IL-13R α 2-A1V9 (Δ), IL-13R α 2-E1V9 (X), gripa M1₅₈₋₆₆ (▼), o sin péptido (□) durante 10 días. Luego, las células T se probaron para actividad lítica contra células T2 cargadas con concentraciones indicadas de IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ o sin péptido mediante el ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas. La relación E/T fue 12,5. P<0,01 para IL-13R α 2-V9 versus nativo así como también IL-13R α 2-A 1V9 versus nativo a 0,1 y 1 nM por la prueba t de Student de dos colas. Estos datos demostraron los resultados de uno de tres experimentos separados con resultados similares.

La Figura 2 presenta gráficamente los datos que demuestran que la línea de CTL inducida por el péptido V9 (círculos abiertos) tuvo aumento de la actividad lítica contra células T2 cargadas con varias concentraciones del IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ tipo silvestre. Las líneas de CTL inducidas por cada uno de los 3 análogos agonistas (V9 (círculos abiertos), A1V9 (triángulos); E1V9 (X)) o el péptido tipo silvestre (círculos cerrados) se examinaron para las actividades de CTL contra concentraciones bajas de péptido de IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ con células T2 cargadas con varias concentraciones (1-100 nM) de IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ mediante el ensayo de liberación de ⁵¹C de 4 horas (relación E/T =50).

La Figura 3 presenta gráficamente los datos que demuestran que los péptidos modificados inducen una magnitud mayor de reactividad de CTL que el IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ nativo contra estirpes celulares de glioma humano. Las células CD8+ derivadas de un paciente con glioma HLA-A2+ se estimularon con IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ nativo (●), IL-13R α 2-V9 (○), IL-13R α 2-A1V9 (Δ), o IL-13R α 2-E1V9 (X). En el día 10, las células se probaron para capacidad lítica contra células SNB19 de glioma humano (A) y U-251 (B) (ambas son IL-13R α +/HLA-A2+) utilizando ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas. Contra las células SNB19 de glioma, p<0,05 en todas las relaciones E/T para IL-13R α 2-V9 vs. IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ nativo así como también IL-13R α 2-A1V9 vs. IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ nativo mediante las pruebas t de Student de dos colas. Contra células U251 de glioma, p<0,05 en la relación E/T de 10 y 40 para IL-13R α 2-V9 versus IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ nativo así como también IL-13R α 2-A1V9 versus IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ nativo mediante las pruebas t de Student de dos colas. El IL-13R α 2-E1V9 no mejora la reactividad de CTL para un nivel estadísticamente significativo en comparación con el nativo. Los datos presentados representan uno de tres experimentos con diferentes donantes con resultados similares.

La Figura 4 presenta gráficamente los datos que demuestran que la adición de células T2 “frías” impulsadas con IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ inhibió las actividades de CTL que indican la especificidad del antígeno de las líneas de CTL. Las líneas de CTL inducidas con cada péptido (control (A); Gripe (B); IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ (C); IL-13R α 2345-9V (D)) se incubaron durante 4 h con estirpes celulares marcadas con ⁵¹Cr de glioma humano SNB19 en las relaciones E:T indicadas para evaluación de la capacidad lítica específica (●). Para el ensayo de inhibición del objetivo frío, las células SNB19 objetivo marcadas con ⁵¹Cr (1x10³ células/pozo) y células T2 frías (1x10⁴ células/pozo) impulsadas con (Δ) o sin (○) péptido de IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ se incubaron con los CTL.

La Figura 5 presenta gráficamente los datos que demuestran que la adición del anticuerpo anti-HLA-A2 inhibió las actividades de CTL que indican reconocimiento restringido a HLA-A2 de las líneas de CTL. Las líneas de CTL

inducidas con cada péptido (control (A); Gripe (B); IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ (C); IL-13R α 2_{345-9V} (D)) se incubaron durante 4 h con estirpe celular SNB19 de glioma humano marcada con ⁵¹Cr en las relaciones E:T indicadas para evaluación de capacidad lítica específica (●). El anticuerpo anti-HLA-A2 (W6/32; 10 μ g/ml) se agregó para bloquear la función de reconocimiento mediado por HLA-A2 por las células T (○).

- 5 La Figura 6 presenta gráficamente los datos que demuestran que los péptidos modificados inducen mayor magnitud de reactividad de CTL que el IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ nativo contra EL4-HHD cargado con el IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ nativo. Los SPC obtenidos de ratones HHD que se habían inmunizado con ya sea MART-1₂₇₋₃₅ de control (●), IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ nativo (○), IL-13R α 2-V9 (Δ) o IL-13R α 2-A1V9 (X) se probaron para su actividad lítica específica contra células EL4-HHD impulsadas con el IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ nativo mediante ensayos de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas estándar.
- 10 La Figura 7 presenta gráficamente los datos que demuestran que los péptidos modificados inducen una magnitud mayor de reactividad de CTL que el IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ nativo contra EL4-HHD-IL-13R α 2. Los SPC obtenidos de ratones HHD que se habían inmunizado con ya sea MART-1₂₇₋₃₅ de control (A), IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ nativo (B), IL-13R α 2-V9 (C), o IL-13R α 2-A1V9 (D) se probaron por su actividad lítica específica contra EL4-HHD-IL-13R α 2 (○) o control EL4-HHD (●) mediante ensayos de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas estándar.
- 15 La Figura 8 representa la expresión de la proteína EphA2 en glioblastoma multiforme (GBM) y astrocitoma anaplásico (AA). Las secciones embebidas en parafina de muestras quirúrgicas obtenidas de pacientes con GBM (A-C) o AA (D) se desparafinaron y se tiñeron con anticuerpo policlonal anti-EphA2 (C-20: Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California), o control IgG de conejo (esquina superior derecha de la ventana para cada muestra). Se observó una tinción relativamente densa en endotelios y células tumorales que rodean el vaso (D). Nueve de catorce GBM y seis de nueve casos de AA examinados fueron positivos para EphA2 (no mostrados). Ampliación original; x 20.

La Figura 9 presenta gráficamente los datos que demuestran que las células CD8+ estimuladas con EphA2₈₈₃₋₈₉₁ provocaron respuestas de CTL contra células de glioma humano que expresan HLA-A2 y proteína EphA2. Las células T CD8+ de un paciente con gliomas HLA-A2+ se estimularon con DC cargadas con EphA2₈₈₃₋₈₉₁ durante 10 días. Estas células T luego se probaron para su actividad lítica contra células SNB19 de glioma humano (HLA-A2+, EphA2+) (\blacktriangle), U251 (HLA-A2+, EphA2+) (\blacksquare) y A172 (HLA-A2-, EphA2+) (\blacktriangledown) mediante el ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas.

25

Figura 10: Niveles de producción de IL-12 correlacionados positivamente con TTP. P = 0,0255 basado en la regresión de Cox seguida de una prueba de razón de verosimilitud. Los círculos cerrados indican pacientes que ya han progresado, mientras que los diamantes cerrados representan pacientes que no han vuelto a ocurrir hasta la fecha.

30

Figura 11: Respuestas células T a IL-13R α 2 (A), PADRE (B), EphA2 (C), YKL-40 (D) o gp100 (E) evaluadas por IFN- γ y ELISPOT. Curso de tiempo para los ensayos IFN- γ ESLIPOT para todos los pacientes evaluados con gráficos de recuadros (recuadros = percentiles 25 a 75; líneas verticales = mínimo a máximo). Los números al final de cada punto de tiempo en el panel para YKL-40 (D) son el número de pacientes evaluables en el momento indicado. Estos números también pertenecen a los otros GAA y PADRE.

35

Figura 12: Respuestas de células T a IL-13R α 2 (\blacksquare), PADRE (*), EphA2 (\blacktriangle), YKL-40 (\blacklozenge) o gp100 (\bullet) evaluadas mediante análisis IFN- γ ESLIPOT para el paciente 10.

Figura 13: El paciente 6 mostró respuestas de tetrámero duraderas, que se analizaron durante hasta 33 semanas (tetrámero de IL-13R α 2 + células (\blacksquare); tetrámero de EphA2 + células (\blacktriangle); tetrámero de gp100 + células (\bullet)) (C). Se muestran ejemplos de gráficos de puntos para respuestas de tetrámero positivos contra el epítipo IL-13R α 2 (A-B).

40

Figura 14: Inducción de las respuestas de citoquinas y quimioquinas tipo 1. Los gráficos de líneas representan la expresión génica relativa apareada de IFN α 1 (A), CXCL10 (B), CCL5 (C), IL-12 α (D), TLR3 (E) o CCL22 (F) mediante RT-PCR un día antes de la 1^a vacunación en comparación con 24 horas después de la 1^a vacuna para el número de caso 10 (\blacksquare), 11 (\square), 16 (Δ), 19 (\square) o 22 (\blacklozenge). Los ejes Y indican concentraciones de citoquinas/quimioquinas por pg/ml. Los números en los paneles de cada uno de (A)-(F) indican valores de p basados en la prueba t de Student pareada utilizando las medias del valor $\Delta\Delta C_T$ de cada paciente.

45

Figura 15: Inducción de las respuestas de citoquinas y quimioquinas tipo 1. Los gráficos de líneas representan la expresión génica relativa apareada de IFN α 1 (A), CXCL10 (B), IFN γ (C), TLR3 (D) mediante RT-PCR un día antes de la 1^a vacunación en comparación con 9 semanas después de la 1^a vacuna número de caso 9 (\bullet), 10 (\blacksquare), 12 (sin símbolo), 16 (Δ), 18 (○), 19 (\square) o 20 (\blacktriangle). Los ejes Y indican concentraciones de citoquinas/quimioquinas por pg/ml. Los números en los paneles de cada uno de (A)-(D) indican valores p basados en la prueba t de Student pareada utilizando las medias del valor $\Delta\Delta C_T$ de cada paciente.

50

Figura 16: Los análisis de Luminex se realizaron en muestras de suero previas a la 1^a vacunas y posteriores a la 4^a vacuna. Los ejes Y indican concentraciones de citoquinas/quimioquinas por pg/ml. Los números en los paneles de cada uno de (A)-(E) indican valores de p basados en la prueba t de Student pareada utilizando las medias de las concentraciones.

55

Figura 17: El paciente 1 demostró un aumento en el tamaño de la lesión potenciada con Gd después de dos vacunas de refuerzo y se sometió a una resección quirúrgica de la lesión. La hibridación in situ detectó ARNm para CXCL10 (puntos oscuros) en el tejido posterior a la vacuna (B) pero no en el tumor inicialmente resecado (prevacuna) (A). Control, (C). Ninguno de los otros dos tejidos previos a la vacuna mostró mensajes CXCL10 positivos. La barra de escala es igual a 100 µm. La tinción con hematoxilina y eosina se realizó para el fondo.

Figura 18: Pacientes con respuesta clínica. El paciente 20 demostró una respuesta radiológica completa del tumor que se potencia por Gd en IRM en las semanas 17 y 33 (se muestran tres cortes y empalmes consecutivos para la semana 0 (A-C), semana 17 (D-F) y semana 33 (G-I)). Después de dos vacunas de refuerzo, el paciente 1 demostró un agrandamiento de la lesión potenciada por Gd. El tejido resecado no reveló evidencia de tumor mitóticamente activo (J), pero sí una notable infiltración de macrófagos CD68⁺ (K) y células T CD8⁺ (L). Ampliaciones originales x 20 para J-L.

Figura 19: Diagrama de flujo para el ensayo. Véase la Sección 7.7 para detalles del tratamiento. La segunda fase de las vacunas de refuerzo podría comenzar en cualquier momento después de la semana 37 y administrarse cada 3 meses hasta 3 años a partir de la primera vacuna, a menos que los pacientes demuestren un AE importante o una progresión de la enfermedad. Las vacunas de αDCI se administraron mediante ultrasonido a los ganglios linfáticos inguinales (derecha e izquierda para la primera y segunda vacunas, respectivamente) y los ganglios linfáticos axilares (derecha e izquierda para la tercera y cuarta vacunas, respectivamente). El sitio se rotó en el mismo orden de las vacunas de refuerzo para minimizar los efectos potenciales del trauma inducido por la inyección en el microentorno de los ganglios linfáticos al repetir las inyecciones en cortos períodos de tiempo.

Figura 20: Tiempo hasta la progresión (A) y supervivencia general (B) para GBM (■) y AG (♦). Las TTP medianas son de 4 y 13 meses para GBM y AG, respectivamente.

Figura 21: las vacunas de péptido basadas en IFA inducen actividades CTL superiores a las vacunas basadas en DC combinadas con inyecciones intramusculares (i.m.) de poli-ICLC. Los ratones C57BL/6 recibieron dos inyecciones (en los días 0 y 7) de: 1) péptido ovalbumina₂₅₇₋₂₆₄ subcutáneo (s.c.) emulsionado en IFA (IFA-OVA) más inyección i.m. concurrente de poli-ICLC (50 µg/inyección); 2) s.c. IFA-OVA más i.m. salina; 3) DC derivadas de la médula ósea cargadas con péptido de ovalbumina₂₅₇₋₂₆₄ (DC-OVA) más i.m. poli-ICLC; o 4) DC-OVA más i.m. salina. Otros grupos de control incluyeron ratones que recibieron IFA o DC solo sin el péptido OVA. Las vacunas IFA-OVA combinadas con poli-ICLC demostraron el nivel más alto de CTL específicas de OVA in vivo. El uso de péptidos GAA no mutado auto emulsionado en IFA con poli-ICLC mejoró la supervivencia de ratones sin inducir autoinmunidad. Estos datos demuestran que las vacunas de péptido IFA asistidas por poli-ICLC representan una estrategia de vacunación efectiva y segura.

6. Descripción detallada

Se proporcionan en la presente memoria las vacunas basadas en péptido del receptor α2 de interleuquina-13 (IL-13Rα2) que comprenden un péptido de IL-13Rα2. Las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 proporcionadas en la presente memoria comprenden un péptido de IL-13Rα2 y por lo menos un péptido adicional asociado con cáncer de cerebro.

En un aspecto, se presentan en la presente memoria las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 que comprenden un péptido de IL-13Rα2 y uno, dos, tres, o más péptidos asociados al cáncer de cerebro adicionales. En ciertas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 descritas en la presente memoria se administran concurrentemente con uno o más epítomos de célula T auxiliar y/o uno o más modificadores de respuesta inmunitaria. De acuerdo con dichas realizaciones, uno o más epítomos de célula T auxiliar y/o uno o más modificadores de respuesta inmunitaria se pueden administrar como parte de la vacuna (por ejemplo, en solución con el péptido de IL-13Rα2 y uno, dos, tres, o más péptidos asociados al cáncer de cerebro adicionales) o separadas de la vacuna (es decir, los epítomos de célula T auxiliar y/o modificadores de respuesta inmunitaria se pueden administrar como una formulación que ni es una parte de la formulación de vacuna). En algunas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 descritas en la presente memoria se administran como vacunas libres de células. En otras realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 descritas en la presente memoria se administran como vacunas de células dendríticas.

En una realización, una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 comprende un péptido de IL-13Rα2, un péptido EphA2, un péptido YKL-40, y un péptido GP100. En una realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 comprende el péptido de IL-13Rα2 que corresponde a una cualquiera de las SEQ ID NOs:1-4, el péptido EphA2 que corresponde a la SEQ ID NO:6, el péptido YKL-40 que corresponde a la SEQ ID NO:10, y el péptido GP100 que corresponde a la SEQ ID NO:11. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 comprende el péptido de IL-13Rα2 que corresponde a la SEQ ID NO:3, el péptido EphA2 que corresponde a la SEQ ID NO:6, el péptido YKL-40 que corresponde a la SEQ ID NO:10, y el péptido GP100 que corresponde a la SEQ ID NO:11. En algunas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 se administra concurrentemente con uno o más epítomos de célula T auxiliar. En una realización específica, la vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 se administra concurrentemente con un epítomo de célula T auxiliar, en la que el epítomo de célula T auxiliar es el péptido de PADRE. En algunas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 se

administra concurrentemente con uno o más modificadores de respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 es una vacuna libre de células. En otras realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 es una vacuna de células dendríticas.

5 En otra realización, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 comprende un péptido de IL-13R α 2, un péptido EphA2, un péptido de survivina, y un péptido de WT1. En una realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 comprende el péptido de IL-13R α 2 que corresponde a una cualquiera de las SEQ ID NOs:1-4, el péptido EphA2 que corresponde a la SEQ ID NO:6, el péptido de survivina que corresponde a la SEQ ID NO:7, y el péptido de WT1 que corresponde a la SEQ ID NO:8. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 comprende el péptido de IL-13R α 2 que corresponde a la SEQ ID NO:3, el péptido EphA2 que
10 corresponde a la SEQ ID NO:6, el péptido de survivina que corresponde a la SEQ ID NO:7, y el péptido de WT1 que corresponde a la SEQ ID NO:8. En algunas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con uno o más epítomos de célula T auxiliar. En una realización específica, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con un modificador de respuesta inmunitaria, en la que el modificador de respuesta inmunitaria es poli-ICLC. En una realización específica, la vacuna
15 basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con un modificador de respuesta inmunitaria, en la que el modificador de respuesta inmunitaria es Montanide ISA-51. En algunas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 es una vacuna libre de células. En otras realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 es una vacuna de células dendríticas.

De acuerdo con la invención, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 comprende un péptido de IL-13R α 2, un péptido EphA2, y un péptido de survivina. En la realización de la invención, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 comprende el péptido de IL-13R α 2 que corresponde a una cualquiera de las SEQ ID NOs:1-4, el péptido
25 EphA2 que corresponde a la SEQ ID NO:6, y el péptido de survivina que corresponde a la SEQ ID NO:7. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 comprende el péptido de IL-13R α 2 que corresponde a la SEQ ID NO:3, el péptido EphA2 que corresponde a la SEQ ID NO:6, y el péptido de survivina que corresponde a la SEQ ID NO:7. En algunas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con uno o más epítomos de célula T auxiliar. En una realización específica, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con un epítomo de célula T auxiliar, en la que el epítomo de célula T auxiliar es el toxoide tetánico. En algunas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se
30 administra concurrentemente con uno o más modificadores de respuesta inmunitaria. En una realización específica, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con un modificador de respuesta inmunitaria, en la que el modificador de respuesta inmunitaria es poli-ICLC. En una realización específica, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se administra concurrentemente con un modificador de respuesta inmunitaria, en la que el modificador de respuesta inmunitaria es Montanide ISA-51. En algunas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 es una vacuna libre de células. En otras realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 es una vacuna de células dendríticas.

6.1 Péptidos

40 6.1.1 Péptido de IL-13R α 2

El IL-13R α 2 una glicoproteína de membrana que se une como un componente de un heterodímero a la citoquina Th2, IL-13, que induce monocitos y macrófagos para producir TGF β (véase, por ejemplo, Fichtner-Feigl et al., Nat. Med., 12: 99-106, 2006).

45 Las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 proporcionadas en la presente memoria comprenden un péptido de IL-13R α 2. Cualquier péptido de IL-13R α 2 capaz de servir como un epítomo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2 se puede utilizar en una vacuna descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, el péptido de IL-13R α 2 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una cualquiera de las SEQ ID NOs:1-4. En una realización específica, el péptido de IL-13R α 2 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende la SEQ ID NO:3.

50 En algunas realizaciones, el péptido de IL-13R α 2 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una versión mutada de la SEQ ID NO:1, en la que la versión mutada de la SEQ ID NO:1 comprende por lo menos 1, por lo menos 2, o por lo menos 3 sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), adiciones, o supresiones de aminoácido.

55 En algunas realizaciones, el péptido de IL-13R α 2 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % de identidad con la SEQ ID NO:1. En otras realizaciones, el péptido de IL-13R α 2 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 % a 60 %, 50 % a 70 %, 60 % a 70 %, 70 % a 80 %, 70 % a 90 %, o 80 % a 90 % de identidad con la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el péptido de IL-13R α 2 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por

lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % de similitud con la SEQ ID NO:1. En otras realizaciones, el péptido de IL-13R α 2 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 % a 60 %, 50 % a 70 %, 60 % a 70 %, 70 % a 80 %, 70 % a 90 %, o 80 % a 90 % de similitud con la SEQ ID NO:1.

5 **6.1.2 Péptido EphA2**

El EphA2 es un receptor de tirosina quinasa que está involucrado en la formación de la notocorda a través de la interacción con ephrinA1. (véase, por ejemplo, Naruse-Nakajima et al., *Mech. Dev.*, 102: 95-105, 2001).

10 En algunas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 proporcionadas en la presente memoria comprenden un péptido EphA2. Cualquier péptido EphA2 capaz de servir como un epítipo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2 se puede utilizar en una vacuna descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, el péptido EphA2 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende la SEQ ID NO:6. En otras realizaciones, el péptido EphA2 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria es un péptido EphA2 descrito en la Patente de Estados Unidos No. 7,297,337.

15 En algunas realizaciones, el péptido EphA2 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una versión mutada de la SEQ ID NO:6, en la que la versión mutada de la SEQ ID NO:6 comprende por lo menos 1, por lo menos 2, o por lo menos 3 sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), adiciones, o supresiones de aminoácido.

20 En algunas realizaciones, el péptido EphA2 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % de identidad con la SEQ ID NO:6. En otras realizaciones, el péptido EphA2 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 % a 60 %, 50 % a 70 %, 60 % a 70 %, 70 % a 80 %, 70 % a 90 %, o 80 % a 90 % de identidad con la SEQ ID NO:6. En algunas realizaciones, el péptido EphA2 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % de similitud con la SEQ ID NO:6. En otras realizaciones, el péptido EphA2 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 % a 60 %, 50 % a 70 %, 60 % a 70 %, 70 % a 80 %, 70 % a 90 %, o 80 % a 90 % de similitud con la SEQ ID NO:6.

6.1.3 Péptido de survivina

30 El survivina es una proteína inhibidora de la apoptosis que se sobreexpresa en la mayoría de los cánceres humanos, y la inhibición de su función resulta en un aumento de la apoptosis (véase, por ejemplo, Blanc-Brude et al., *Nat. Med.*, 8: 987-994, 2002).

35 En algunas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 proporcionadas en la presente memoria comprenden un péptido de survivina. Cualquier péptido de survivina capaz de servir como un epítipo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2 se puede utilizar en una vacuna descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, el péptido de survivina utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende la SEQ ID NO:7. En una realización específica, el péptido de IL-13R α 2 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende la SEQ ID NO:7. En otras realizaciones, el péptido de survivina utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria es un péptido de survivina descrito en la Publicación de Solicitud de Estados Unidos No. 2009/0041732 o por Ciesielski et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 59:1211-1221, 2010.

40 En algunas realizaciones, el péptido de survivina utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una versión mutada de la SEQ ID NO:7, en la que la versión mutada de la SEQ ID NO:7 comprende por lo menos 1, por lo menos 2, o por lo menos 3 sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), adiciones, o supresiones de aminoácido.

45 En algunas realizaciones, el péptido de survivina utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % de identidad con la SEQ ID NO:7. En otras realizaciones, el péptido de survivina utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 % a 60 %, 50 % a 70 %, 60 % a 70 %, 70 % a 80 %, 70 % a 90 %, o 80 % a 90 % de identidad con la SEQ ID NO:7. En algunas realizaciones, el péptido de survivina utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % de similitud con la SEQ ID NO:7. En otras realizaciones, el péptido de survivina utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 % a 60 %, 50 % a 70 %, 60 % a 70 %, 70 % a 80 %, 70 % a 90 %, o 80 % a 90 % de similitud con la SEQ ID NO:7.

6.1.4 Péptido de WT1

55 El WT1, es un factor de transcripción, que se expresa durante el desarrollo renal y regula el desarrollo de los túbulos mesonéfricos caudales (véase, por ejemplo, Sainio, *Development*, 124: 1293-1299, 1997).

5 En algunas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 proporcionadas en la presente memoria comprenden un péptido de WT1. Cualquier péptido de WT1 capaz de servir como un epítipo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2 se puede utilizar en una vacuna descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, el péptido de WT1 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende la SEQ ID NO:8.

En algunas realizaciones, el péptido de WT1 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una versión mutada de la SEQ ID NO:8, en la que la versión mutada de la SEQ ID NO:8 comprende por lo menos 1, por lo menos 2, o por lo menos 3 sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), adiciones, o supresiones de aminoácido.

10 En algunas realizaciones, el péptido de WT1 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % de identidad con la SEQ ID NO:8. En otras realizaciones, el péptido de WT1 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 % a 60 %, 50 % a 70 %, 60 % a 70 %, 70 % a 80 %, 70 % a 90 %, o 80 % a 90 % de identidad con la SEQ ID NO:8. En algunas realizaciones, el péptido de WT1 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % de similitud con la SEQ ID NO:8. En otras realizaciones, el péptido de WT1 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 % a 60 %, 50 % a 70 %, 60 % a 70 %, 70 % a 80 %, 70 % a 90 %, o 80 % a 90 % de similitud con la SEQ ID NO:8.

6.1.5 Péptido GP100

20 El antígeno asociado al melanoma humano, GP100, es un antígeno de diferenciación de melanocitos que se expresa en células de mamíferos nucleadas. (véase, por ejemplo, Koch et al., FEBS Lett., 179: 294-298, 1985.

25 En algunas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 proporcionadas en la presente memoria comprenden un péptido GP100. Cualquier péptido GP100 capaz de servir como un epítipo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2 se puede utilizar en una vacuna descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, el péptido GP100 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende la SEQ ID NO:11.

30 En algunas realizaciones, el péptido GP100 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una versión mutada de la SEQ ID NO:11, en la que la versión mutada de la SEQ ID NO:11 comprende por lo menos 1, por lo menos 2, o por lo menos 3 sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), adiciones, o supresiones de aminoácido.

35 En algunas realizaciones, el péptido GP100 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % de identidad con la SEQ ID NO:11. En otras realizaciones, el péptido GP100 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 % a 60 %, 50 % a 70 %, 60 % a 70 %, 70 % a 80 %, 70 % a 90 %, u 80 % a 90 % de identidad con la SEQ ID NO:11. En algunas realizaciones, el péptido GP100 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % de similitud con la SEQ ID NO: 11. En otras realizaciones, el péptido GP100 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 % a 60 %, 50 % a 70 %, 60 % a 70 %, 70 % a 80 %, 70 % a 90 %, o 80 % a 90 % de similitud con la SEQ ID NO:11.

6.1.6 Péptido YKL-40

Se ha sabido que la YKL-40, una glicoproteína secretada, está involucrada en la degradación de la matriz extracelular y/o la angiogénesis, tales como en fibrosis hepática, artritis reumatoide y osteoartritis grave, (véase, por ejemplo, Bigg et al., (2006), J Biol Chem. 281, 21082-95).

45 En algunas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 proporcionadas en la presente memoria comprenden un péptido YKL-40. Cualquier péptido YKL-40 capaz de servir como un epítipo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A2 se puede utilizar en una vacuna descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, el péptido YKL-40 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende la SEQ ID NO:10.

50 En algunas realizaciones, el péptido YKL-40 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una versión mutada de la SEQ ID NO:10, en la que la versión mutada de la SEQ ID NO:10 comprende por lo menos 1, por lo menos 2, o por lo menos 3 sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), adiciones, o supresiones de aminoácido.

55 En algunas realizaciones, el péptido YKL-40 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % de identidad con la SEQ ID NO:10. En otras realizaciones, el péptido YKL-40 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria

comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 % a 60 %, 50 % a 70 %, 60 % a 70 %, 70 % a 80 %, 70 % a 90 %, u 80 % a 90 % de identidad con la SEQ ID NO:10. En algunas realizaciones, el péptido YKL-40 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % de similitud con la SEQ ID NO:10. En otras realizaciones, el péptido YKL-40 utilizado en una vacuna descrita en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50 % a 60 %, 50 % a 70 %, 60 % a 70 %, 70 % a 80 %, 70 % a 90 %, o 80 % a 90 % de similitud con la SEQ ID NO:10.

6.2 Modificadores de respuesta inmunitaria

En algunas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 proporcionadas en la presente memoria se administran concurrentemente con un modificador de respuesta inmunitaria. Los modificadores de respuesta inmunitaria incluyen agentes capaces de modificar la respuesta inmunitaria de un sujeto. En algunas realizaciones, un modificador de respuesta inmunitaria polariza la respuesta inmunitaria de un sujeto hacia una respuesta Th1. En otras realizaciones, un modificador de respuesta inmunitaria polariza la respuesta inmunitaria de un sujeto hacia una respuesta Th2. En una realización preferida, la respuesta inmunitaria modificada se une a un receptor similar a Toll, también conocido como un TLR, tal como TLR3. Los modificadores de respuesta inmunitaria de ejemplo que se pueden administrar concurrentemente con las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 proporcionadas en la presente memoria incluyen, sin limitación, poli-ICLC, imiquimod (Aldara®; Beselna®), y MIS-416 (Innate Therapeutics).

6.2.1 Poli-ICLC

El ácido poliinosínico-policutidílico estabilizado con polilisina y carboximetilcelulosa (poli-ICLC) es un ácido nucleico sintético, y funciona como un ligando del receptor-3 similar a Toll (TLR3). El poli-ICLC también se conoce como Hiltonol.

6.3 Adyuvantes

En algunas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 proporcionadas en la presente memoria se administran concurrentemente con un adyuvante. En algunas realizaciones, el término “adyuvante” se refiere a un agente que cuando se administra concurrentemente con o en la misma composición como vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 descrita en la presente memoria aumenta, acelera, prolonga, mejora y/o refuerza la respuesta inmunitaria para la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2. En algunas realizaciones, el adyuvante genera una respuesta inmunitaria a la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 y no produce una alergia u otra reacción adversa. Los adyuvantes pueden mejorar una respuesta inmunitaria mediante diversos mecanismos que incluyen, por ejemplo, reclutamiento de linfocitos, estimulación de células B y/o T, estimulación de células dendríticas y estimulación de macrófagos.

Ejemplos específicos de adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, Montanide ISA-51, Montanide ISA 50V, Montanide, ISA 206, Montanide IMS 1312, VaxImmune® (CpG7909; Coley Pharmaceuticals), sales de aluminio (alum) (tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, y sulfato de aluminio), lípido A de monofosforilo 3 De-O-acilado (MPL) (véase GB 2220211), MF59 (Novartis), AS03 (GlaxoSmithKline), AS04 (GlaxoSmithKline), polisorbato 80 (Tween 80; ICL Americas, Inc.), compuestos de imidazopiridina (véase Solicitud Internacional No. PCT/US2007/064857, publicada como Publicación Internacional No. WO2007/109812), compuestos de imidazoquinolina (véase Solicitud Internacional No. PCT/US2007/064858, publicada como Publicación Internacional No. WO2007/109813) y saponinas, tales como QS21 (véase Kensil et al., in Vaccine Design: The Subunit and adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); Patente de Estados Unidos No. 5,057,540). En algunas realizaciones, el adyuvante es adyuvante de Freund (completo o incompleto). Otros adyuvantes son emulsiones aceite en agua (tales como escualeno o aceite de maní), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunitarios, tales como lípido A de monofosforilo (véase Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)). Otro adyuvante es CpG (Bioworld Today, Nov. 15, 1998). Dichos adyuvantes se pueden utilizar con o sin otros agentes de estimulación específicos tales como MPL o 3-DMP, QS21, aminoácidos poliméricos o monoméricos tales como ácido poliglútamico o polilisina, u otros agentes inmunopotenciadores. Se debe entender que diferentes formulaciones de vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 pueden comprender diferentes adyuvantes o pueden comprender el mismo adyuvante.

6.4 Epítomos de célula T auxiliar

En algunas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 proporcionadas en la presente memoria se administran concurrentemente con un epítomo de célula T auxiliar. Los epítomos de las células T auxiliares incluyen agentes que son capaces de inducir una respuesta de células T auxiliares por parte del sistema inmunitario. Las células T auxiliares son células T CD4+. En algunas realizaciones, los epítomos de las células T auxiliares se presentan mediante moléculas MHC de clase II, y pueden ser reconocidos por el receptor de células T (TCR) de las células T auxiliares (células T CD4+), activando de esta manera las células T CD4+, haciendo que proliferen, secreten citoquinas como la IL2 y activen las células que presentan antígenos profesionales. A través de una variedad de mecanismos, las células T auxiliares activadas también estimulan los linfocitos T citotóxicos (también

conocidos como células T CD8+), lo que prolonga y aumenta la respuesta de las células T CD8+. Ejemplos de epítomos de células T auxiliares que se pueden administrar simultáneamente con las vacunas basadas en el péptido IL-13R α 2 que se proporcionan en la presente memoria incluyen, sin limitación, PADRE, HBVcore₁₂₈₋₁₄₀ y toxoide tetánico.

5 6.4.1 Péptido PADRE

PADRE es un epítomo no natural optimizado tanto para la unión de HLA-DR como para la estimulación del receptor de células T (véase, por ejemplo, Alexander et al, *Immunity*, 1: 751-761, 1994).

6.4.2 Toxoide tetánico

10 Se sabe que un epítomo Th bien caracterizado (SEQ ID NO: 9) de la proteína de toxoide tetánico (TT), a la cual la gran mayoría de la población ha sido sensibilizada, actúa como un epítomo de células T auxiliares.

6.4.2.1 VHB Core₁₂₈₋₁₄₀

Se sabe que un epítomo Th bien caracterizado (SEQ ID NO: 5) de la proteína HBV actúa como un epítomo de células T auxiliares.

6.5 Producción y purificación de péptidos.

15 Los péptidos descritos en la presente memoria se pueden producir mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para la síntesis de péptidos, en particular, mediante síntesis química o mediante técnicas de expresión recombinante. Los procedimientos proporcionados en la presente memoria abarcan, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales en biología molecular, microbiología, análisis genético, ADN recombinante, química orgánica, bioquímica, PCR, síntesis y modificación de oligonucleótidos, hibridación de ácidos nucleicos y campos relacionados dentro de la experiencia de la técnica. Estas técnicas se describen en las referencias citadas en la presente memoria y se explican en detalle en la literatura. Véase, por ejemplo, Maniatis et al. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren et al. (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

6.5.1.1 Producción sintética de péptidos

30 Los péptidos descritos en la presente memoria se pueden preparar utilizando solución en forma de etapas convencional o síntesis en fase sólida (véase, por ejemplo, *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, Williams et al., Eds., 1997, CRC Press, Boca Raton Fla., y referencias citadas en la misma; *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Atherton & Sheppard, Eds., 1989, IRL Press, Oxford, England, y referencias citadas en la misma).

35 Alternativamente, los péptidos descritos en la presente memoria se pueden preparar por medio de cualquier condensación segmento, como se describe, por ejemplo, en Liu et al., 1996, *Tetrahedron Lett.* 37(7):933-936; Baca, et al., 1995, *J. Am. Chem. Soc.* 117:1881-1887; Tam et al., 1995, *Int. J. Peptide Protein Res.* 45:209-216; Schnolzer and Kent, 1992, *Science* 256:221-225; Liu and Tam, 1994, *J. Am. Chem. Soc.* 116(10):4149-4153; Liu and Tam, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:6584-6588; Yamashiro and Li, 1988, *Int. J. Peptide Protein Res.* 31:322-334.

40 Otros procedimientos útiles para sintetizar los péptidos descritos en la presente memoria se describen en Nakagawa et al., 1985, *J. Am. Chem. Soc.* 107:7087-7092.

La formación de enlaces disulfuro, si se desea, se lleva a cabo generalmente en presencia de agentes oxidantes suaves. Se pueden utilizar agentes oxidantes químicos, o los compuestos se pueden exponer simplemente a oxígeno atmosférico para efectuar estos enlaces. Se conocen varios procedimientos en la técnica, que incluyen aquellos los descritos, por ejemplo, por Tam et al., 1979, *Synthesis* 955-957; Stewart et al., 1984, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d Ed., Pierce Chemical Company Rockford, Ill.; Ahmed et al., 1975, *J. Biol. Chem.* 250:8477-8482; and Pennington et al., 1991 *Peptides* 1990 164-166, Giralt and Andreu, Eds., ESCOM Leiden, Países Bajos. Una alternativa adicional se describe por Kamber et al., 1980, *Helv. Chim. Acta* 63:899-915. Un procedimiento conducido sobre soportes sólidos se describe por Albericio, 1985, *Int. J. Peptide Protein Res.* 26:92-97, cada una de las cuales se incorpora mediante referencia en la presente memoria en su totalidad.

6.5.1.2 Expresión recombinante de péptidos

La expresión recombinante de un péptido requiere la construcción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifica el péptido. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica un péptido, el vector para la producción del péptido se puede producir mediante tecnología de ADN recombinante utilizando

técnicas bien conocidas en el arte. Por lo tanto, los procedimientos para preparar un péptido mediante la expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido se describen en la presente memoria. Los procedimientos que son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica se pueden utilizar para construir vectores de expresión que contienen secuencias de codificación de péptidos y señales de control de transcripción y traducción apropiadas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vitro*. Por lo tanto, en la presente memoria se proporcionan vectores de expresión replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido unido operativamente a un promotor.

Un vector de expresión comprende un ácido nucleico que codifica un péptido en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula anfitriona. En realizaciones específicas, la célula anfitriona es una célula anfitriona aislada. En una realización específica, un vector de expresión incluye una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células anfitrionas que se utilizarán para la expresión, que está unida operativamente al ácido nucleico que se va a expresar. Dentro de un vector de expresión, "operativamente unido" pretende significar que un ácido nucleico de interés está unido a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de tal manera que permite la expresión del ácido nucleico (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula anfitriona cuando el vector se introduce en la célula anfitriona). Las secuencias reguladoras incluyen promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de un ácido nucleico en muchos tipos de células anfitrionas, aquellas que dirigen la expresión del ácido nucleico solo en ciertas células anfitrionas (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido) y aquellas que dirigen la expresión directa del ácido nucleico tras la estimulación con un agente particular (por ejemplo, secuencias reguladoras inducibles). Aquellos expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula anfitriona que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. El término "célula anfitriona" pretende incluir una célula sujeto particular transformada o transfectada con un ácido nucleico y la progenie o progenie potencial de dicha célula. La progenie de dicha célula puede no ser idéntica a la célula progenitora transformada o transfectada con el ácido nucleico debido a las mutaciones o influencias ambientales que pueden ocurrir en generaciones sucesivas o la integración del ácido nucleico en el genoma de la célula anfitriona. En realizaciones específicas, se aísla la célula anfitriona.

Se puede introducir un vector de expresión en las células anfitrionas mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Dichas técnicas incluyen, pero no se limitan a, co-precipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección y electroporación. Los procedimientos adecuados para transformar o transfectar células anfitrionas se pueden encontrar en Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, New York, y otros manuales de laboratorio. En ciertas realizaciones, una célula anfitriona se transfecta transitoriamente con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica un péptido. En otras realizaciones, una célula anfitriona se transfecta de manera estable con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica un péptido. Por lo tanto, en la presente memoria se proporcionan células anfitrionas que contienen un polinucleótido que codifica un péptido descrito en la presente memoria o generado de acuerdo con los procedimientos proporcionados en la presente memoria.

Se puede utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión de anfitrión para expresar un péptido. Dichos sistemas de expresión de anfitrión representan vehículos mediante los cuales las secuencias de codificación de interés se pueden producir y posteriormente purificar, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o se transfectan con las secuencias de codificación de nucleótidos apropiadas, expresar un péptido in situ. Estos incluyen pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o vectores de expresión de ADN cósmido que contienen secuencias de codificación de péptidos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias de codificación de péptidos; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias de codificación de péptidos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias de codificación de péptidos; o sistemas celulares de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, NS0 y 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7,5 K del virus vaccinia). Preferiblemente, las células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y más preferiblemente, las células eucariotas se utilizan para la expresión de un péptido. Por ejemplo, las células de mamíferos tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano es un sistema de expresión efectivo para péptidos (Foecking et al., 1986, *Gene* 45: 101, y Cockett et al, 1990, *Bio/Technology* 8:2). En una realización específica, la expresión de secuencias de nucleótidos que codifican los péptidos descritos en la presente memoria o generadas de acuerdo con los procedimientos proporcionados en la presente memoria se regulan por un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor específico de tejido.

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para el péptido que se está expresando. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de péptido, para la generación de composiciones farmacéuticas de un péptido, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de altos niveles de productos de proteínas de fusión que se purifiquen fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al, 1983, EMBO 12:1791), en el que la secuencia de codificación del péptido se puede unir individualmente en el vector en marco con la región de codificación lac Z con el fin de que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509); y similares. Los vectores pGEX también se pueden utilizar para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión 5-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a las perlas de glutatión agarosa de matriz, seguida de la elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de división de trombina o de proteasa de factor Xa de tal manera que el producto génico objetivo clonado se pueda liberar de la fracción GST.

En un sistema de insectos, el virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) se utiliza como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia de codificación del péptido se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina).

En células anfitrionas de mamíferos, se pueden utilizar varios sistemas de expresión basados en virus. En los casos en que se utiliza un adenovirus como vector de expresión, la secuencia de codificación de péptidos de interés se puede unir a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico luego se puede insertar en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar el péptido en huéspedes infectados (por ejemplo, véase Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl Acad Sci. USA 81: 355-359). También se pueden requerir señales de iniciación específicas para la traducción eficiente de secuencias de codificación de péptidos insertados. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. Adicionalmente, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control de traducción exógenas y codones de iniciación pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión se puede mejorar mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase, por ejemplo, Bittner et al, 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544).

Adicionalmente, se puede elegir una cepa de la célula anfitriona que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico en la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y el procesamiento (por ejemplo, división) de los productos de proteínas pueden ser importantes para la función del péptido. Diferentes células anfitrionas tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación post-traduccionales de proteínas y productos genéticos. Se pueden elegir estirpes celulares o sistemas anfitriones apropiados para garantizar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña expresada. Para este fin, se pueden utilizar células anfitrionas eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado de la transcripción primaria, la glicosilación y la fosforilación del producto génico. Dichas células anfitrionas de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, células CHO, VERY, BHK, Hela, COS, Vera, MDCK, 293, 3T3, W13S, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NS0 (una estirpe celular de mieloma murino que no producen endógenamente cualquier cadena de inmunoglobulina), CRL7030 y HsS78Bst.

Para la producción a largo plazo y de alto rendimiento de péptidos recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, se pueden diseñar mediante ingeniería las estirpes celulares que expresan de manera estable la molécula de péptidos. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, las células anfitrionas se pueden transformar con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, las células modificadas pueden crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido y luego cambiarse a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crecer para formar focos que a su vez se pueden clonar y se expandir en estirpes celulares. Este procedimiento se puede utilizar ventajosamente para diseñar mediante ingeniería estirpes celulares que expresan el péptido. Dichas estirpes celulares diseñadas mediante ingeniería pueden ser particularmente útiles en la selección y evaluación de composiciones que interactúan directa o indirectamente con el péptido. Los procedimientos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante se pueden aplicar rutinariamente para seleccionar el clon recombinante deseado, y dichos procedimientos se describen, por ejemplo, en Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); and in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1.

Los niveles de expresión de un péptido se pueden aumentar mediante la amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, el uso de vectores basados en la amplificación de genes para la expresión de genes clonados en células de mamíferos en la clonación de ADN, vol. 3 (Academic Press, New York, 1987). Cuando un marcador en el sistema vectorial que expresa el péptido es amplificable, el aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula anfitriona aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con el péptido, la producción del péptido también aumentará (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

Como alternativa a la expresión recombinante de un péptido utilizando una célula anfitriona, un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica un péptido se puede transcribir y traducir *in vitro* utilizando, por ejemplo, secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7. En una realización específica, se puede utilizar un sistema de transcripción/traducción acoplado, tal como Promega TNT®, o un lisado celular o extracto celular que comprende los componentes necesarios para la transcripción y traducción para producir un péptido.

De acuerdo con lo anterior, en la presente memoria se proporcionan procedimientos para producir un péptido. En una realización, el procedimiento comprende cultivar una célula anfitriona que contiene un ácido nucleico que codifica el péptido en un medio adecuado de tal manera que se produzca el péptido. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente aislar el péptido del medio o la célula anfitriona.

En ciertas realizaciones, las plantas (por ejemplo, plantas del género *Nicotiana*) se pueden diseñar mediante ingeniería para expresar un péptido descrito en la presente memoria. En realizaciones específicas, las plantas se diseñan para expresar un péptido descrito en la presente memoria mediante un procedimiento de agroinfiltración utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican un gen de interés, por ejemplo, un gen que codifica un péptido descrito aquí, se introducen en una cepa de *Agrobacterium*. Posteriormente, la cepa se cultiva en un cultivo líquido y las bacterias resultantes se lavan y suspenden en una solución tampón. Luego, las plantas se exponen (por ejemplo, mediante inyección o inmersión) al *Agrobacterium* que comprende los ácidos nucleicos que codifican un péptido descrito en la presente memoria de tal manera que el *Agrobacterium* transforma el gen de interés en una parte de las células de la planta. El péptido luego se expresa de forma transitoria por la planta y se puede aislar utilizando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria. (Para ejemplos específicos, véase Shoji et al., 2008, Vaccina, 26(23): 2930-2934; y D'Aoust et al., 2008, J. Plant Biotechnology, 6(9): 930-940). En una realización específica, la planta es una planta de tabaco (es decir, *Nicotiana tabacum*). En otra realización específica, la planta es un pariente de la planta de tabaco (por ejemplo, *Nicotiana benthamiana*).

En otras realizaciones, las algas (por ejemplo, *Chlamydomonas reinhardtii*) se pueden diseñar mediante ingeniería para expresar un péptido descrito aquí (véase, por ejemplo, Rasala et al., 2010, Plant Biotechnology Journal (Publicada en línea el 7 de marzo de 2010)).

6.5.1.3 Purificación de péptidos

Los péptidos descritos en la presente memoria y generados utilizando las metodologías descritas se pueden purificar por cualquier procedimiento conocido en la técnica para la purificación de un péptido, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de la proteína A y cromatografía en columna de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Adicionalmente, los péptidos se pueden fusionar con secuencias de péptidos heterólogas descritas en la presente memoria o conocidas de otro modo en la técnica para facilitar la purificación. Las condiciones reales utilizadas para purificar un péptido particular dependerán, en parte, de la estrategia de síntesis (por ejemplo, producción sintética vs producción recombinante) y de factores tales como la carga neta, hidrofobicidad y/o la hidrofiliidad del péptido, y será evidente para aquellos expertos en la técnica.

6.6 Composiciones farmacéuticas y rutas de administración

Se proporcionan en la presente memoria composiciones farmacéuticas que comprenden. En algunas realizaciones, una composición proporcionada en la presente memoria comprende una vacuna de cáncer de cerebro basada en el péptido del receptor de $\alpha 2$ de interleuquina-13. En otras realizaciones, una composición proporcionada en la presente memoria comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13R $\alpha 2$ y un epítipo de célula T auxiliar, un adyuvante, y/o un modificador de respuesta inmunitaria. En otras realizaciones, una composición proporcionada en la presente memoria comprende un modificador de respuesta inmunitaria. Se proporcionan en la presente memoria las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración veterinaria y/o humana.

Se proporcionan en la presente memoria composiciones farmacéuticas (por ejemplo, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13R $\alpha 2$, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13R $\alpha 2$ y un epítipo de célula T auxiliar, un adyuvante, y/o un modificador de respuesta inmunitaria, o una composición que comprende un modificador de respuesta inmunitaria) puede estar en cualquier forma que permita que la composición se administre a un sujeto, dicho sujeto preferiblemente es un animal, que incluye, pero no se limita a, un animal humano, mamífero o no humano, tal como una vaca, caballo, oveja, cerdo, ave, gato, perro,

ratón, rata, conejo, conejillo de indias, etc., y es más preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un humano.

En realizaciones específicas, las composiciones proporcionadas en la presente memoria (por ejemplo, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 y un epítipo de célula T auxiliar, un adyuvante, y/o un modificador de respuesta inmunitaria, o una composición que comprende un modificador de respuesta inmunitaria) están en forma de un líquido (por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión). Las rutas típicas de administración de las composiciones líquidas proporcionadas en la presente memoria pueden incluir, sin limitación, parenteral, intradérmica, intratumoral, intracerebral e intratecal. La administración parenteral incluye, sin limitación, técnicas de administración subcutánea, intranodal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal e intrapleural. En una realización específica, las composiciones se administran por vía parenteral. En una composición para administración por inyección, se pueden incluir uno o más de un surfactante, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizador y agente isotónico. En una realización específica, se puede utilizar una bomba para administrar las vacunas (véase, por ejemplo, Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 1987, 14, 201; Buchwald et al., Surgery 1980, 88: 507; Saudek et al., N. Engl. J. Med. 1989, 321: 574). En una realización específica, la bomba puede ser, pero no se limita a, una bomba similar a insulina.

Los materiales utilizados en la preparación de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria (por ejemplo, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 y un epítipo de célula T auxiliar, un adyuvante, y/o un modificador de respuesta inmunitaria, o una composición que comprende un modificador de respuesta inmunitaria) pueden ser no tóxicos en las cantidades utilizadas. Puede ser evidente para aquellos expertos en la técnica que la dosificación óptima del ingrediente(s) activo(s) en la composición farmacéutica dependerá de una variedad de factores. Los factores relevantes incluyen, sin limitación, el tipo de sujeto (por ejemplo, humano), la salud general del sujeto, el tipo de cáncer de cerebro para el que el sujeto necesita tratamiento, el uso de la composición como parte de un régimen de múltiples medicamentos, la forma particular de la vacuna que se administra, la forma de administración y la composición empleada.

Las composiciones líquidas de la invención, ya sean soluciones, suspensiones u otras formas similares, también pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferiblemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, ciclodextrina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. Una composición parenteral se puede incluir en una ampolla, una jeringa desechable o un frasco de dosis múltiple elaborado de vidrio, plástico u otro material. Una composición inyectable es preferiblemente estéril.

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria (por ejemplo, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 y un epítipo de célula T auxiliar, un adyuvante, y/o un modificador de respuesta inmunitaria, o una composición que comprende un modificador de respuesta inmunitaria) puede comprender un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en la presente memoria, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otras farmacopeas generalmente reconocidas para uso en animales, y más particularmente en humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra la composición farmacéutica. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, glicerol monoestearato, talco, cloruro de sodio, leche desnatada deshidratada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

En una realización, las composiciones proporcionadas en la presente memoria (por ejemplo, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 y un epítipo de célula T auxiliar, un adyuvante, y/o un modificador de respuesta inmunitaria, o una composición que comprende un modificador de respuesta inmunitaria) se formulan de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración parenteral a animales, particularmente seres humanos. Generalmente, los ingredientes en las composiciones se suministran por separado o se mezclan en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, tales como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado, tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. Cuando una composición descrita en la presente memoria se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril o solución salina para inyección para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración, si es necesario.

Las composiciones proporcionada en la presente memoria (por ejemplo, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 y un epítipo de célula T auxiliar, un adyuvante, y/o un modificador de respuesta inmunitaria, o una composición que comprende un modificador de respuesta inmunitaria) descrita puede comprender un agente activo adicional seleccionado de entre aquellos que incluyen, pero no se limitan a, un agente profiláctico adicional, un agente terapéutico adicional, un agente antiemético, un factor estimulante de colonias hematopoyéticas, una terapia adyuvante, un agente basado en anticuerpo/fragmento de anticuerpo, un antidepresivo y un agente analgésico.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria (por ejemplo, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 y un epítipo de célula T auxiliar, un adyuvante, y/o un modificador de respuesta inmunitaria, o una composición que comprende un modificador de respuesta inmunitaria) se pueden preparar utilizando una metodología bien conocida en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición que se pretende administrar por inyección se puede preparar al combinar los péptidos de una vacuna descrita en la presente memoria con agua y/u otros componentes líquidos para formar una solución. Se puede agregar un surfactante para facilitar la formación de una solución o suspensión homogénea.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden incluir en un recipiente, paquete o dispensador junto con instrucciones para la administración.

6.7 Usos profilácticos y terapéuticos

En un aspecto, se proporcionan en la presente memoria procedimientos para evitar, tratar, y/o manejar cáncer de cerebro en un sujeto en necesidad del mismo al administrar una cantidad efectiva de una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 descrita en la presente memoria.

En otro aspecto, se proporciona en la presente memoria un procedimiento para evitar, tratar, y/o manejar cáncer de cerebro en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), el procedimiento comprende administrar al paciente un régimen profilácticamente efectivo o un régimen terapéuticamente efectivo, el régimen comprende administrar al paciente una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 descrita en la presente memoria o una composición farmacéutica descrita en la presente memoria, en el que el paciente ha sido diagnosticado con cáncer de cerebro.

En otro aspecto, se proporciona en la presente memoria un procedimiento para evitar, tratar, y/o manejar cáncer de cerebro en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), el procedimiento comprende administrar al paciente un régimen profilácticamente efectivo o un régimen terapéuticamente efectivo, el régimen comprende administrar al paciente una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 descrita en la presente memoria o una composición farmacéutica descrita en la presente memoria, en el que el paciente ha sufrido una recaída de cáncer de cerebro.

En otro aspecto, se proporciona en la presente memoria un procedimiento para evitar, tratar, y/o manejar cáncer de cerebro en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), el procedimiento comprende administrar al paciente un régimen profilácticamente efectivo o un régimen terapéuticamente efectivo, el régimen comprende administrar al paciente una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 descrita en la presente memoria o una composición farmacéutica descrita en la presente memoria, en el que el paciente ha fallado o está fallando en la terapia contra el cáncer de cerebro que no comprende una vacuna descrita en la presente memoria.

En otro aspecto, se proporciona en la presente memoria un procedimiento para evitar, tratar, y/o manejar cáncer de cerebro en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), el procedimiento comprende administrar al paciente un régimen profilácticamente efectivo o un régimen terapéuticamente efectivo, el régimen comprende administrar al paciente una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 descrita en la presente memoria o una composición farmacéutica descrita en la presente memoria, en el que el paciente está en remisión de cáncer de cerebro.

En otro aspecto, se proporciona en la presente memoria un procedimiento para evitar, tratar, y/o manejar cáncer de cerebro en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), el procedimiento comprende administrar al paciente un régimen profilácticamente efectivo o un régimen terapéuticamente efectivo, el régimen comprende administrar al paciente una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 descrita en la presente memoria o una composición farmacéutica descrita en la presente memoria, en el que el paciente es resistente a terapia contra el cáncer de cerebro que no comprende una vacuna descrita en la presente memoria. En una realización de este aspecto, el paciente ha recibido o está recibiendo terapia contra el cáncer de cerebro que no comprende una vacuna descrita en la presente memoria. En otra realización de este aspecto, el paciente no ha recibido previamente una terapia contra el cáncer de cerebro que no comprende una vacuna descrita en la presente memoria para la prevención, tratamiento, y/o manejo del cáncer de cerebro.

En otro aspecto, se proporciona en la presente memoria un procedimiento para evitar, tratar, y/o manejar cáncer de cerebro en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), el procedimiento comprende administrar al paciente un régimen profilácticamente efectivo o un régimen terapéuticamente efectivo, el régimen comprende administrar al paciente una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 descrita en la presente memoria o una composición farmacéutica descrita en la presente memoria, en el que el paciente ha recibido otra terapia contra el cáncer de cerebro. En algunas realizaciones, la terapia contra el cáncer de cerebro anterior es, por ejemplo, quimioterapia,

radioterapia, terapia quirúrgica, terapia con moléculas pequeñas, terapia biológica, terapia con anticuerpos, terapia hormonal, inmunoterapia, terapia antiangiogénica o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la terapia anterior ha fallado en el paciente. En algunas realizaciones, el régimen terapéuticamente efectivo que comprende la administración de una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 descrita en la presente memoria se administra al paciente inmediatamente después de que el paciente se ha sometido a la terapia anterior. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el resultado de la terapia anterior puede ser desconocido antes de que al paciente se le administre la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2. En una realización, la quimioterapia anterior es temozolomida. En una realización, la terapia anterior es terapia de radiación. En otra realización, la terapia anterior es una combinación de temozolomida y terapia de radiación. En una realización preferida, la combinación de temozolomida y radiación se administran utilizando el régimen Stupp. En otra realización, la terapia anterior es cirugía. En algunas realizaciones, el paciente se somete a cirugía antes del inicio de la terapia de combinación. En algunas realizaciones, el paciente se somete a cirugía antes del tratamiento con temozolomida. En algunas realizaciones, el paciente se somete a cirugía antes del inicio de la terapia de radiación. En cada una de estas realizaciones que describen el uso de terapia de combinación, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se puede administrar antes, durante, y después del tratamiento del paciente con la terapia que está siendo combinada.

En algunas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 descritas en la presente memoria se administran como monoterapia para la prevención, tratamiento, y/o manejo de cáncer de cerebro. En otras realizaciones, se proporcionan en la presente memoria procedimientos que comprenden administrar a un sujeto en necesidad de los mismos una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 descrita en la presente memoria y uno o más agentes diferentes de la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 descrita en la presente memoria que se utilizan actualmente, se han utilizado, se sabe que son útiles, o pueden ser útiles en la prevención, tratamiento, y/o manejo de cáncer de cerebro o uno o más síntomas del mismo. Los agentes de las terapias de combinación se pueden administrar secuencialmente o concurrentemente. En ciertas realizaciones, las terapias de combinación mejoran el efecto profiláctico o terapéutico de una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 descrita en la presente memoria que funcionan junto a la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 descrita en la presente memoria tienen un efecto aditivo o sinérgico. En algunas realizaciones, las terapias de combinación se administran antes de, durante, o después de la administración de las composiciones descritas en la presente memoria.

En otro aspecto, se proporcionan en la presente memoria procedimientos para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto con cáncer de cerebro que comprende administrar una cantidad efectiva de una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria inducida en un sujeto por una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 descrita en la presente memoria o una composición descrita en la presente memoria es efectiva para evitar, tratar, y/o manejar cáncer de cerebro en el sujeto. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria inducida en un sujeto por una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 descrita en la presente memoria o una composición descrita en la presente memoria es efectiva para reducir los síntomas del cáncer de cerebro en el sujeto.

El médico puede diagnosticar al paciente utilizando cualquiera de los procedimientos convencionales de detección de cáncer de cerebro, que incluyen, pero no se limitan a, examen neurológico; procedimientos de formación de imagen (por ejemplo, tomografía computarizada (CT), imagen de resonancia magnética (IRM), ecografía, imágenes de rayos X y tomografía por emisión de positrones (PET)); y biopsia (por ejemplo, biopsia esterotáctica).

6.7.1 Dosificación y frecuencia de administración

La cantidad de una composición descrita en la presente memoria (por ejemplo, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 y un epítipo de célula T auxiliar, un adyuvante, y/o un modificador de respuesta inmunitaria, o una composición que comprende un modificador de respuesta inmunitaria) que será efectiva en el tratamiento, prevención, y/o manejo de cáncer de cerebro puede depender del estado del cáncer de cerebro, el paciente al que se le va a administrar la(s) composición(es), la ruta de administración, y/o el tipo de cáncer de cerebro. Dichas dosis se pueden determinar mediante técnicas clínicas estándar y se pueden decidir de acuerdo con el criterio del médico.

Por ejemplo, las dosis efectivas pueden variar dependiendo de los medios de administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del paciente (que incluye edad, peso corporal, salud), si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Por lo general, el paciente es un humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos, que incluyen mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento se valoran de manera óptima para optimizar la seguridad y eficacia.

En ciertas realizaciones, se emplea un ensayo *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de curvas de respuesta a las dosis derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o de modelos animales.

En ciertas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 es una vacuna libre de células, en la que la vacuna libre de células comprende un péptido de IL-13R α 2 y uno, dos, tres, o más péptidos asociados al cáncer de cerebro adicionales. En algunas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 libres de células de ejemplo comprenden aproximadamente 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400,

425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, o 800 µg de cada péptido asociado con cáncer de cerebro por dosis. En otras realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 libres de células de ejemplo comprenden aproximadamente 25 a 50, 25 a 75, 25 a 100, 50 a 100, 50 a 150, 50 a 200, 100 a 150, 100 a 200, 100 a 250, 100 a 300, 150 a 200, 150 a 250, 150 a 300, 200 a 250, 250 a 300, 250 a 350, 250 a 400, 300 a 350, 300 a 400, 300 a 450, 300 a 500, 350 a 400, 350 a 450, 400 a 500, 400 a 600, 500 a 600, 500 a 700, 600 a 700, 600 a 800, o 700 a 800 µg de cada péptido asociado con cáncer de cerebro por dosis. En otras realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 libres de células de ejemplo comprenden aproximadamente 5 µg a 100 mg, 15 µg a 50 mg, 15 µg a 25 mg, 15 µg a 10 mg, 15 µg a 5 mg, 15 µg a 1 mg, 15 µg a 100 µg, 15 µg a 75 µg, 5 µg a 50 µg, 10 µg a 50 µg, 15 µg a 45 µg, 20 µg a 40 µg, o 25 a 35 µg de cada péptido asociado con cáncer de cerebro por kilogramo del paciente.

En ciertas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 libres de células se administran concurrentemente con un epítipo de célula T auxiliar. En algunas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 libres de células de ejemplo se administran concurrentemente con aproximadamente 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, o 600 µg de un epítipo de célula T auxiliar. En otras realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 libres de células de ejemplo se administran concurrentemente con aproximadamente 25 a 50, 25 a 75, 25 a 100, 50 a 100, 50 a 150, 50 a 200, 100 a 150, 100 a 200, 100 a 250, 100 a 300, 150 a 200, 150 a 250, 150 a 300, 200 a 250, 250 a 300, 250 a 350, 250 a 400, 300 a 350, 300 a 400, 300 a 450, 300 a 500, 350 a 400, 350 a 450, 400 a 500, 400 a 600, o 500 a 600 µg de un epítipo de célula T auxiliar.

En ciertas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 libres de células se administran concurrentemente con un modificador de respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 libres de células de ejemplo se administran concurrentemente con aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, o 1800 µg de un modificador de respuesta inmunitaria. En otras realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 libres de células de ejemplo se administran concurrentemente con aproximadamente 100 a 300, 200 a 400, 400 a 800, 600 a 800, 800 a 1000, 800 a 1200, 1000 a 1200, 1000 a 1400, 1200 a 1400, 1200 a 1600, 1400 a 1600, 1400 a 1800, o 1600 a 1800 µg de un modificador de respuesta inmunitaria. En otras realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 libres de células de ejemplo se administran concurrentemente con aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, o 60 µg de un modificador de respuesta inmunitaria por kilogramo del paciente. En otras realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 libres de células de ejemplo se administran concurrentemente con aproximadamente 1 a 5, 1 a 10, 5 a 15, 10 a 15, 10 a 20, 15 a 20, 15 a 25, 15 a 30, 20 a 25, 20 a 30, 20 a 35, 25 a 30, 25 a 35, 25 a 40, 30 a 35, 30 a 40, 35 a 40, 35 a 45, 40 a 45, 40 a 50, 45 a 50, 50 a 55, o 50 a 60 µg de un modificador de respuesta inmunitaria por kilogramo del paciente.

En ciertas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 libres de células se administran concurrentemente con un adyuvante. En algunas realizaciones, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 libre de células se mezcla 0,5 a 1, 1 a 0,5, 1 a 1, 1 a 2, 1 a 3, 2 a 1, o 3 a 1 con un adyuvante.

En ciertas realizaciones, la vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 es una vacuna basada en células dendríticas, en la que la vacuna basada en células dendríticas comprende células dendríticas cargadas con un péptido de IL-13Rα2 y células dendríticas cargadas con uno, dos, tres, o más péptidos asociados al cáncer de cerebro adicionales. En algunas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 basadas en células dendríticas de ejemplo comprenden aproximadamente 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 3×10^7 , 5×10^7 , 7×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} o 10^{12} células dendríticas cargadas con péptido(s) asociado(s) con cáncer de cerebro por dosis. En otras realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 basadas en células dendríticas de ejemplo comprenden aproximadamente 10^3 a 10^4 , 10^3 a 10^5 , 10^4 a 10^5 , 10^4 a 10^6 , 10^5 a 10^6 , 10^5 a 10^7 , 10^6 a 10^7 , 10^6 a 10^8 , 10^7 a 10^8 , 10^7 a 10^9 , 10^8 a 10^9 , 10^9 a 10^{10} , 10^{10} a 10^{11} , o 10^{11} a 10^{12} células dendríticas cargadas con péptido(s) asociado(s) con cáncer de cerebro por dosis.

En ciertas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 basadas en células dendríticas se administran concurrentemente con un epítipo de célula T auxiliar. En algunas realizaciones, vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 basadas en células dendríticas de ejemplo se administran concurrentemente con aproximadamente 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, o 600 µg de un epítipo de célula T auxiliar. En otras realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 basadas en células dendríticas de ejemplo se administran concurrentemente con aproximadamente 25 a 50, 25 a 75, 25 a 100, 50 a 100, 50 a 150, 50 a 200, 100 a 150, 100 a 200, 100 a 250, 100 a 300, 150 a 200, 150 a 250, 150 a 300, 200 a 250, 250 a 300, 250 a 350, 250 a 400, 300 a 350, 300 a 400, 300 a 450, 300 a 500, 350 a 400, 350 a 450, 400 a 500, 400 a 600, o 500 a 600 µg de un epítipo de célula T auxiliar.

En ciertas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 basadas en células dendríticas se administran concurrentemente con un modificador de respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 basadas en células dendríticas de ejemplo se administran concurrentemente con aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, o 1800 µg de un modificador de respuesta inmunitaria. En otras realizaciones, vacunas basadas en el péptido de IL-

13Rα2 basadas en células dendríticas de ejemplo se administran concurrentemente con aproximadamente 100 a 300, 200 a 400, 400 a 800, 600 a 800, 800 a 1000, 800 a 1200, 1000 a 1200, 1000 a 1400, 1200 a 1400, 1200 a 1600, 1400 a 1600, 1400 a 1800, o 1600 a 1800 µg de un modificador de respuesta inmunitaria. En otras realizaciones, vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 basadas en células dendríticas de ejemplo se administran concurrentemente con aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, a 60 µg de un modificador de respuesta inmunitaria por kilogramo del paciente. En otras realizaciones, vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 basadas en células dendríticas de ejemplo se administran concurrentemente con aproximadamente 1 a 5, 1 a 10, 5 a 10, 5 a 15, 10 a 15, 10 a 20, 15 a 20, 15 a 25, 15 a 30, 20 a 25, 20 a 30, 20 a 35, 25 a 30, 25 a 35, 25 a 40, 30 a 35, 30 a 40, 35 a 40, 35 a 45, 40 a 45, 40 a 50, 45 a 50, 50 a 55, o 50 a 60 µg de un modificador de respuesta inmunitaria por kilogramo del paciente.

En ciertas realizaciones, las vacunas basadas en el péptido de IL-13Rα2 basadas en células dendríticas se administran concurrentemente con un adyuvante. En algunas realizaciones, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 basada en células dendríticas se mezcla 0,5 a 1, 1 a 0,5, 1 a 1, 1 a 2, 1 a 3, 2 a 1, o 3 a 1 con un adyuvante.

En ciertas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria (por ejemplo, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 y un epítipo de célula T auxiliar, un adyuvante, y/o un modificador de respuesta inmunitaria, o una composición que comprende un modificador de respuesta inmunitaria) se administra a un sujeto una vez como una dosis única. En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente memoria (por ejemplo, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2, una composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 y un epítipo de célula T auxiliar, un adyuvante, y/o un modificador de respuesta inmunitaria, o una composición que comprende un modificador de respuesta inmunitaria) se administra en múltiples dosis (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más de 10 dosis), en las que la dosis se puede separar en por lo menos 1 día, 2 días, 3 días, 4, días 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 15 días, o 30 días. En realizaciones específicas, la vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 se administra por vía intranodal o por vía subcutánea y el modificador de respuesta inmunitaria se administra por vía intramuscular.

En algunas realizaciones, cuando una composición descrita en la presente memoria comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 libre de células, la composición se puede administrar en el transcurso de 21 semanas, con administraciones que ocurren en las semanas 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21. En ciertas realizaciones, la composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 libre de células se administra concurrentemente con un epítipo de célula T auxiliar, un adyuvante, y/o un modificador de respuesta inmunitaria. En una realización específica, una composición descrita en la presente memoria que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 libre de células se administra en el transcurso de 21 semanas, con administraciones que ocurren en las semanas 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21, y la composición se administra concurrentemente con un modificador de respuesta inmunitaria, en la que el modificador de respuesta inmunitaria se administra en el día de cada administración de la vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 libre de células y en el día 4 después de cada administración de la vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 libre de células. En otra realización específica, una composición descrita en la presente memoria que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 libre de células se administra en el transcurso de 21 semanas, con administraciones que ocurren en las semanas 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21, y la composición se administra concurrentemente con un modificador de respuesta inmunitaria, en la que el modificador de respuesta inmunitaria se administra en el día de cada administración de la vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 libre de células. En realizaciones específicas, la vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 libre de células se administra por vía subcutánea y el modificador de respuesta inmunitaria se administra por vía intramuscular.

En algunas realizaciones, cuando una composición descrita en la presente memoria comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 basada en células dendríticas, la composición se puede administrar en el transcurso de 6 semanas, con administraciones que ocurren en las semanas 0, 2, 4, y 6. En ciertas realizaciones, la composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 libre de células se administra concurrentemente con un epítipo de célula T auxiliar, un adyuvante, y/o un modificador de respuesta inmunitaria. En una realización específica, una composición descrita en la presente memoria que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 basada en células dendríticas se administra en el transcurso de 6 semanas, con administraciones que ocurren en las semanas 0, 2, 4, y 6, y la composición se administra concurrentemente con un modificador de respuesta inmunitaria, en la que el modificador de respuesta inmunitaria se administra dos veces por semana iniciando el primer día de administración de la vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 basada en células dendríticas. En realizaciones específicas, la vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 basada en células dendríticas se administra por vía intranodal y el modificador de respuesta inmunitaria se administra por vía intramuscular.

En algunas realizaciones, cuando una composición descrita en la presente memoria comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 basada en células dendríticas, la composición se puede administrar en el transcurso de 26 semanas, con administraciones que ocurren en las semanas 0, 2, 4, 6, 10, 14, 18, 22, y 26. En ciertas realizaciones, la composición que comprende una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 libre de células se administra concurrentemente con un epítipo de célula T auxiliar, un adyuvante, y/o un modificador de respuesta inmunitaria. En una realización específica, una composición descrita en la presente memoria que comprende una

vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 basada en células dendríticas se administra en el transcurso de 26 semanas, con administraciones que ocurren en las semanas 0, 2, 4, 6, 10, 14, 18, 22, y 26, y la composición se administra concurrentemente con un modificador de respuesta inmunitaria, en la que el modificador de respuesta inmunitaria se administra dos veces por semana iniciando el primer día de administración de la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 basada en células dendríticas. En realizaciones específicas, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 basada en células dendríticas se administra por vía intranodal y el modificador de respuesta inmunitaria se administra por vía intramuscular.

6.7.2 Cánceres de cerebro

La vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 descrita en la presente memoria se puede utilizar en la prevención, tratamiento, y/o manejo de cáncer de cerebro. Se puede tratar cualquier tipo de cáncer de cerebro con las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 descritas en la presente memoria de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria. Cánceres de cerebro de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, gliomas (que incluyen astrocitoma (por ejemplo, astrocitoma pilocítico, astrocitoma difuso y astrocitoma anaplásico), glioblastoma, oligodendroglioma, glioma del tronco encefálico, glioma del tronco no encefálico, ependimoma y tumores mixtos que comprenden más de un tipo de células gliales), schwannoma acústico, craneofaringioma, meningioma, meduloblastoma, linfoma primario del sistema nervioso central y tumores de las glándulas pineal (por ejemplo, tumores astrocíticos pineales y tumores del parénquima pineal) y pituitarias. Los gliomas adicionalmente incluyen gliomas malignos recurrentes, astrocitomas grado II OMS de alto riesgo, astrocitomas oligoidales, gliomas grado II de OMS recurrentes, gliomas de tronco encefálico malignos o intrínsecos recién diagnosticados, gliomas no del tronco encefálico resecaos incompletamente, gliomas de bajo grado no resecaos recurrentes. Tipos adicionales de cáncer de cerebro que se pueden tratar con las vacunas basadas en el péptido IL-13R α 2 descritas en la presente memoria de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria incluyen astrocitoma/oligodendroglioma supratentorial infiltrativo adulto de bajo grado, astrocitoma supratentorial infiltrativo adulto de bajo grado, oligodendroglioma supratentorial infiltrativo de adulto de bajo grado, (excluyendo astrocitoma pilocítico) oligodendroglioma supratentorial infiltrativo de adulto (excluyendo astrocitoma pilocítico), ependimoma intracraneal de adulto (excluyendo subependimoma y mixopapilar), ependimoma anaplásico intracraneal de adulto, glioma anaplásico, glioblastoma anaplásico, astrocitoma pilocítico, subependimoma, mixopapilar, 1 a 3 lesiones metastásicas limitadas (intraparenquimatosas), más de 3 lesiones metastásicas (intraparenquimatosas), metástasis leptomeníngeas (meningitis neoplásica), linfoma primario del SNC, tumores metastásicos de la columna vertebral o meningiomas.

En una realización, el cáncer de cerebro tratado con las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 descritas en la presente memoria de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria es un glioma. En una realización específica, el cáncer de cerebro tratado con las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 descritas en la presente memoria de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria es un glioma maligno recurrente. En otra realización específica, el cáncer de cerebro tratado con las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 descritas en la presente memoria de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria es un glioma grado II OMS recurrente. En otra realización específica, el cáncer de cerebro tratado con las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 descritas en la presente memoria de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria es un glioma de tronco encefálico maligno o intrínseco recién diagnosticado. En otra realización específica, el cáncer de cerebro tratado con las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 descritas en la presente memoria de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria es glioma no del tronco encefálico resecao incompletamente. En otra realización específica, el cáncer de cerebro tratado con las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 descritas en la presente memoria de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria es glioma de bajo grado no resecao recurrente. En una realización, el paciente es un adulto con glioma maligno recurrente, glioblastoma recurrente, astrocitoma anaplásico, oligodendroglioma anaplásico, u oligoastrocitoma anaplásico mixto. En otra realización específica, el paciente es un adulto con glioma de bajo grado de alto riesgo recién diagnosticado. En otra realización específica, el paciente es un adulto con astrocitoma recién diagnosticado de bajo grado alto riesgo. En otra realización específica, el paciente es un adulto con oligoastrocitoma recién diagnosticado de alto riesgo y alto grado. En otra realización específica, el paciente es un adulto con astrocitoma debajo grado alto riesgo recurrente. En otra realización específica, el paciente es un adulto con oligoastrocitoma de bajo grado y alto riesgo recurrente. En otra realización específica, el paciente es un adulto con oligodendroglioma de bajo grado y alto riesgo recurrente. En otra realización específica, el paciente es un niño con glioma maligno recién diagnosticado. En otra realización específica, el paciente es un niño con glioma intrínseco del tronco encefálico. En otra realización específica, el paciente es un niño con glioma de alto grado no del tronco encefálico incompletamente resecao. En otra realización específica, el paciente es un niño con glioma de bajo grado no resecao recurrente. En otra realización específica, el paciente es un niño con glioma pontino intrínseco difuso recién diagnosticado. En otra realización específica, el paciente es un niño con cualquier glioma de alto grado que implica el tronco encefálico y tratado con RT o sin quimioterapia durante RT. En otra realización específica, el paciente es un niño con glioma de alto grado no del tronco encefálico recién diagnosticado tratado con RT con quimioterapia. En otra realización específica, el paciente es un niño con glioma de alto grado no del tronco encefálico recién diagnosticado tratado con RT sin quimioterapia. En otra realización específica, el paciente es un niño con glioma de alto grado no del tronco encefálico recurrente que ha recurrido después de tratamiento.

En otra realización, el cáncer de cerebro tratado con las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 descritas en la presente memoria de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria es un astrocitoma. En una realización específica, el cáncer de cerebro tratado con las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 descritas en la presente memoria de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria es astrocitoma grado II OMS de alto riesgo. En otra realización específica, el cáncer de cerebro tratado con las vacunas basadas en el péptido de IL-13R α 2 descritas en la presente memoria de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria es Astrocitoma Oligo.

6.7.3 Población de pacientes

En ciertas realizaciones, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se puede administrar a un sujeto nultratado, es decir, un sujeto que no tiene cáncer de cerebro. En una realización, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto nultratado que está en riesgo de adquirir cáncer de cerebro.

En ciertas realizaciones, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente que ha sido diagnosticado con cáncer de cerebro. En algunas realizaciones, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente con cáncer de cerebro antes de que se manifiesten los síntomas o éstos se vuelvan severos. En una realización preferida, el cáncer de cerebro es glioma.

En ciertas realizaciones, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un paciente que está en necesidad de tratamiento, prevención, y/o manejo de cáncer de cerebro. Dichos sujetos pueden o no haber sido tratados previamente por cáncer o pueden estar en remisión, en recaída o pueden haber fallado en el tratamiento. Dichos pacientes también pueden tener citogenética anormal. Las vacunas basadas en el péptido 13R α 2 y composiciones descritas en la presente memoria se pueden utilizar como cualquier línea de terapia contra el cáncer de cerebro, por ejemplo, una primera línea, segunda línea o tercera línea de terapia contra el cáncer de cerebro. En una realización específica, el sujeto recibe o que recibe una vacuna o composición farmacéutica descrita en la presente memoria está recibiendo o ha recibido otras terapias para el cáncer de cerebro. En una realización alternativa, el sujeto recibe o que recibe una vacuna o composición farmacéutica descrita en la presente memoria no ha recibido o no está recibiendo otras terapias contra el cáncer de cerebro.

En una realización específica, el sujeto ha sido diagnosticado con cáncer de cerebro utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, examen neurológico; procedimientos de formación imagen (por ejemplo, tomografía computarizada (CT), imagen de resonancia magnética (RMI), ultrasonido, formación de imágenes de rayos X, secuencias de recuperación de inversión atenuadas por líquido (FLAIR), imágenes T2 ponderadas y tomografía por emisión de positrones (PET)); y biopsia (por ejemplo, biopsia esterotáctica). La respuesta del tumor al tratamiento se puede evaluar según los criterios de McDonald o la evaluación de Respuesta en los criterios de neurooncología (RANO). El tamaño del tumor o la respuesta al tratamiento se pueden evaluar mediante diversas técnicas de formación de imágenes de resonancia magnética, que incluyen formación de imágenes ponderadas por difusión, formación de imágenes ponderadas por perfusión, formación de imágenes de permeabilidad de T1 mejoradas con contraste dinámico, contraste de susceptibilidad dinámica, formación de imágenes de tensor de difusión y espectroscopia de resonancia magnética, formación de ponderadas T2 con IRM anatómica, imágenes ponderadas en T2 de recuperación de inversión atenuada por líquidos (FLAIR) e imágenes ponderadas en T1 mejoradas con gadolinio. Estas técnicas de formación de imágenes se pueden utilizar para evaluar la celularidad del tumor, la invasión de la sustancia blanca, el trastorno metabólico que incluye hipoxia y necrosis, volumen neovascular de la sangre capilar o permeabilidad. La tecnología de tomografía por emisión de positrones (PET) también se puede utilizar para obtener imágenes de la respuesta del tumor, tales como la PET con 18F-fluoromisonidazol y la PET con 3'-desoxi-3'-18F-fluorotimidina.

En una realización, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto que se está sometiendo o se ha sometido terapia de radiación para tratar un tumor de cáncer de cerebro. En una realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto concurrentemente o luego de terapia de radiación para tratar un tumor de cáncer de cerebro. En otra realización, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto antes de terapia de radiación para tratar un tumor de cáncer de cerebro y, en algunas realizaciones, durante y/o después de la terapia de radiación. En algunas realizaciones preferidas, la terapia de radiación es radioterapia de haz externo fraccionada, radioterapia de haz externo fraccionada de campo limitado, radioterapia de cerebro completo, radiocirugía estereotáctica o radioterapia craneoespinal.

En una realización, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto que se está sometiendo o se ha sometido quimioterapia para tratar un tumor de cáncer de cerebro. En una realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto concurrentemente o luego de quimioterapia para tratar un tumor de cáncer de cerebro. En otra realización, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la

5 presente memoria se administra a un sujeto antes de quimioterapia para tratar un tumor de cáncer de cerebro y, en algunas realizaciones, durante y/o después de la quimioterapia. En algunas realizaciones preferidas, la quimioterapia es temozolomida (Temodar®), nitrosurea, regímenes a base de platino, etopósido, cisplatino, bevacizumab (Avastin®), irinotecan, ciclofosfamida, BCNU (carmustina), capecitabina, metotrexato en altas dosis, topotecan, ARA-C en altas dosis, hidroxurea, α -interferón, alalogo de somatostatina, quimioterapia intra-CSF (citarabina liposomal, metotrexato, citarabina, tiotepa, o rituximab (Rituxan®)).

10 En una realización, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto que ha fallado, se está sometiendo o se ha sometido más de una estrategia terapéutica, que incluye quimioterapia, terapia de radiación, o cirugía para tratar un tumor de cáncer de cerebro. En una realización preferida, el cáncer de cerebro es glioma. Por ejemplo, un paciente puede haber fallado, estar sometido o haber sido sometido tanto quimioterapia como cirugía. Alternativamente, un paciente puede haber sido sometido o está sometido tanto radiación como cirugía. Más aún, un paciente puede haber sido sometido o está sometido quimioterapia y radiación. En algunas realizaciones preferidas, las terapias combinadas que ha fallado el paciente, se está sometiendo, o se ha sometido son resección y temozolomida (Temodar®) esquemas 5/28 (150-200 mg/m²), resección y galletas de BCNU (Gliadel®), bevacizumab (Avastin®) y quimioterapia, combinación de PCV (CCNU (lomustina) y procarbazona y vincristina), metotrexato en altas dosis y vincristina, procarbazona, citarabina, o rituximab, quimioterapia en altas dosis con rescate de células madre, o rituximab (Rituxan®) y temozolomida (Temodar®).

20 En una realización, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto que se está sometiendo o se ha sometido cirugía para retirar un tumor de cáncer de cerebro. En una realización específica, una vacuna basada en péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto concurrentemente o luego de cirugía para retirar un tumor de cáncer de cerebro. En otra realización, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto antes de cirugía para retirar un tumor de cáncer de cerebro y, en algunas realizaciones, durante y/o después de cirugía.

25 En ciertas realizaciones, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto como una alternativa a otra terapia, por ejemplo, quimioterapia, terapia de radiación, terapia hormonal, cirugía, terapia de moléculas pequeñas, terapia antiangiogénica y/o terapia biológica, que incluye la inmunoterapia, cuando la terapia ha demostrado o puede resultar demasiado tóxica, es decir, produce efectos secundarios inaceptables o insoportables para el sujeto.

30 En una realización específica, una vacuna basada en el péptido IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a sujetos que tendrán, están recibiendo o han tenido terapia de radiación. Entre estos sujetos se encuentran aquellos que han recibido quimioterapia, terapia hormonal, terapia con moléculas pequeñas, terapia antiangiogénica y/o terapia biológica, que incluye la inmunoterapia, así como aquellos que se han sometido cirugía.

35 En otra realización, una vacuna basada en el péptido IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a sujetos que tendrán, se han sometido o han tenido terapia hormonal y/o terapia biológica, que incluye la inmunoterapia. Entre estos sujetos se encuentran aquellos que han recibido quimioterapia, terapia de molécula pequeña, terapia antiangiogénica y/o radioterapia, así como aquellos que se han sometido cirugía.

40 En ciertas realizaciones, una vacuna basada en el péptido IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto resistente a una o más terapias. En una realización, que un cáncer es resistente a una terapia significa que por lo menos una parte significativa de las células cancerosas no se destruyen o su división celular no se detiene. La determinación de si las células cancerosas son resistentes se puede hacer *in vivo* o *in vitro* por cualquier procedimiento conocido en la técnica para evaluar la efectividad de una terapia en células cancerosas, utilizando los significados aceptados en la técnica de "resistente" en dicho contexto. En diversas realizaciones, un cáncer es resistente cuando la cantidad de células cancerosas no se ha reducido significativamente, o ha aumentado.

50 En algunas realizaciones, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto que está en remisión de cáncer de cerebro. En una realización específica, el sujeto no tiene cáncer de cerebro detectable, es decir, el cáncer de cerebro no es detectable utilizando un procedimiento convencional descrito en la presente memoria (por ejemplo, IRM) o conocido por un experto en la técnica.

55 En una realización, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con glioma. En una realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con astrocitoma (por ejemplo, astrocitoma pilocítico, astrocitoma difuso, y astrocitoma anaplásico). En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con glioblastoma. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con oligodendroglioma. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con glioma de tronco encefálico. En otra realización específica, una

vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con ependimoma. En otra realización específica, una vacuna basada en péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con un tumor mezclado que comprende más de unos tipos de célula glial.

- 5 En una realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con glioma maligno recurrente. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con Astrocitomas grado II OMS de alto riesgo. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con Astrocitoma Oligo. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con glioma grado II OMS recurrente. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con glioma de tronco encefálico maligno o intrínseco recién diagnosticado. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con glioma no del tronco encefálico reseado incompletamente. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con glioma de bajo grado no reseado recurrente.

- 20 En una realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con schwannoma acústico. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con craneofaringioma. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con meningioma. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con meduloblastoma. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con linfoma primario del sistema nervioso central. En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con un tumor de la glándula pineal (por ejemplo, un tumor astrocítico pineal o un tumor parenquimatoso pineal). En otra realización específica, una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto diagnosticado con un tumor de la glándula pituitaria.

- 35 En ciertas realizaciones, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria es un adulto humano. En ciertas realizaciones, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria es un sujeto humano anciano. En ciertas realizaciones, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria es un niño humano. En ciertas realizaciones, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria es un lactante humano. En ciertas realizaciones, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria es un infante humano.

- 40 En ciertas realizaciones, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria es HLA-A2 positiva según se determina mediante, por ejemplo, citometría de flujo.

- 45 En ciertas realizaciones, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria tiene un estado de rendimiento de Karnofsky (KPS) de >60. El KPS se utiliza como una variable de estratificación y selección en ensayos aleatorios de agentes quimioterapéuticos y tiene un rango de 0-100. Los pacientes con una puntuación >60 no pueden trabajar, pueden vivir en el hogar y pueden atender la mayoría de sus necesidades personales con diversos grados de asistencia requerida. Los pacientes con una puntuación >70 realizan una actividad normal con esfuerzo y muestran algunos signos y síntomas de la enfermedad. Los pacientes con una puntuación >80 pueden llevar a cabo una actividad normal y solo muestran signos o síntomas menores de la enfermedad. Los pacientes con una puntuación >90 son normales, no tienen problemas de salud y no muestran signos o síntomas de la enfermedad.

- 50 En ciertas realizaciones, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria tiene un recuento de glóbulos blancos de aproximadamente 1000/mm³, 1500/mm³, 2000/mm³, 2500/mm³, 3000/mm³, o 3500/mm³ o aproximadamente 1000/mm³ a 1500/mm³, 1000/mm³ a 2000/mm³, 1500/mm³ a 2500/mm³, 1500/mm³ a 3000/mm³, 2000/mm³ a 3500/mm³, o 2500/mm³ a 3500/mm³. En una realización específica, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria tiene un recuento de glóbulos blancos mayor de o igual a 2500/mm³.

- 60 En ciertas realizaciones, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria tiene un recuento de linfocitos de aproximadamente 100/mm³,

200/mm³, 300/mm³, 400/mm³, 500/mm³, o 600/mm³ o aproximadamente 100/mm³ a 400/mm³, 200/mm³ a 400/mm³, 300/mm³ a 500/mm³, 300/mm³ a 600/mm³, 400/mm³ a 500/mm³, o 400/mm³ a 600/mm³. En una realización específica, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 o composición descrita en la presente memoria tiene un recuento de linfocitos mayor de o igual a 400/mm³.

5 En ciertas realizaciones, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 o composición descrita en la presente memoria tiene un recuento de plaquetas de aproximadamente 25.000/mm³, 50.000/mm³, 75.000/mm³, 100.000/mm³, 200.000/mm³, o 300.000/mm³ o aproximadamente 25.000/mm³ a 100.000/mm³, 50.000/mm³ a 100.000/mm³, 75.000/mm³ a 100.000/mm³, 100.000/mm³ a 200.000/mm³, 100.000/mm³ a 300.000/mm³, o 200.000/mm³ a 300.000/mm³. En una realización específica, un sujeto al que se va a administrar
10 una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 o composición descrita en la presente memoria tiene un recuento de plaquetas mayor de o igual a 100.000/mm³.

En ciertas realizaciones, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 o composición descrita en la presente memoria tiene un recuento de hemoglobina de aproximadamente 5 g/dL, 10 g/dL, 15 g/dL, o 20 g/dL, o aproximadamente 5 a 10 g/dL, 5 a 15 g/dL, 10 a 15 g/dL, o 10 a 20 g/dL. En una
15 realización específica, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 o composición descrita en la presente memoria tiene un recuento de hemoglobina mayor de o igual a 10 g/dL.

En ciertas realizaciones, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 o composición descrita en la presente memoria tiene niveles de AST, ALT, GGT, LDH y fosfatasa alcalina dentro de 1, 1,5, 2, 2,5, o 3 veces el límite normal superior. En una realización específica, un sujeto al que se va a administrar
20 una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 o composición descrita en la presente memoria tiene niveles de AST, ALT, GGT, LDH y fosfatasa alcalina dentro de 2,5 veces el límite normal superior.

En ciertas realizaciones, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 o composición descrita en la presente memoria tiene una bilirrubina total de aproximadamente 1 mg/dL, 1,5 mg/dL, 2 mg/dL, 2,5 mg/dL, o 3 mg/dL, o aproximadamente 1,5 a 2,5 mg/dL, 1,5 a 3 mg/dL, 2 a 2,5 mg/dL, o 2 a 3 mg/dL. En
25 una realización específica, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en péptido de IL-13Rα2 o composición descrita en la presente memoria tiene una bilirrubina total mayor de o igual a 2 mg/dL.

En ciertas realizaciones, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 o composición descrita en la presente memoria tiene niveles de creatinina en suero dentro de 0,5, 1, 1,5., 2, 2,5, o 3 veces el límite normal superior. En una realización específica, un sujeto al que se va a administrar una vacuna
30 basada en el péptido de IL-13Rα2 o composición descrita en la presente memoria tiene niveles de creatinina en suero dentro de 1,5 veces el límite normal superior.

En ciertas realizaciones, un sujeto al que se va a administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 o composición descrita en la presente memoria tiene pruebas de coagulación PT y PTT que están dentro de 0,5, 1, 1,5., 2, 2,5, o 3 veces los límites normales. En ciertas realizaciones, un sujeto al que se va a administrar una vacuna
35 basada en el péptido de IL-13Rα2 o composición descrita en la presente memoria tiene pruebas de coagulación PT y PTT que están dentro de los límites normales.

En algunas realizaciones, puede ser aconsejable no administrar una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 o composición descrita en la presente memoria a una o más de las siguientes poblaciones de pacientes: humanos
40 ancianos; lactantes menores de 6 meses de edad; personas embarazadas; lactantes menores de 1 año; niños menores de 2 años; niños menores de 3 años; niños menores de 4 años; niños menores de 5 años; adultos menores de 20 años; adultos menores de 25 años; adultos menores de 30 años; adultos menores de 35 años; adultos menores de 40 años; adultos menores de 45 años; adultos menores de 50 años; humanos ancianos sobre la edad de 70 años; humanos ancianos sobre la edad de 75 años; humanos ancianos sobre la edad de 80 años; humanos ancianos sobre la edad de 85 años; humanos ancianos sobre la edad de 90 años; humanos ancianos sobre la edad
45 de 95 años; quimioterapia; sujetos sometidos a terapia de radiación; sujetos sometidos a terapia biológica; sujetos sometidos a terapia de interferones; sujetos que reciben inyecciones desensibilizantes por alergia; sujetos que toman fármacos ilícitos; sujetos que reciben tratamientos de factor de crecimiento (por ejemplo, Procrit®, Aranesp®, Neulasta®); sujetos que reciben tratamientos con interleuquina (por ejemplo, Proleukin®); sujetos con enfermedad metastásica; sujetos femeninos que están amamantando; sujetos con infección vírica, bacteriana o micótica activa;
50 sujetos con antecedentes de presencia de enfermedad autoinmunitaria; sujetos con VIH; sujetos tratados con medicamentos en investigación que no comprenden una vacuna descrita en la presente memoria; sujetos con gliomatosis cerebral, enfermedad metastásica leptomenígea craneal o espinal; y/o sujetos sometidos a tratamiento inmunosupresor.

6.7.4 Terapias de combinación

55 En ciertas realizaciones, los procedimientos proporcionados en la presente memoria para evitar, tratar, y/o manejar cáncer de cerebro comprenden administrar a un paciente (por ejemplo, un paciente humano) en necesidad del mismo un régimen profilácticamente y/o terapéuticamente efectivo, el régimen comprende administrar al paciente una vacuna basada en el péptido de IL-13Rα2 o composición descrita en la presente memoria y una o más terapias

adicionales, dicha terapia adicional no es una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria. La vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria y la terapia adicional se pueden administrar separadamente, concurrentemente, o secuencialmente. Las terapias de combinación pueden actuar de forma aditiva o sinérgica.

- 5 Las terapias de combinación se pueden administrar a un sujeto en la misma composición farmacéutica. Alternativamente, las terapias de combinación se pueden administrar concurrentemente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas. Las terapias de combinación se pueden administrar a un sujeto por la misma o diferentes rutas de administración.

10 Cualquier terapia (por ejemplo, agente terapéutico o profiláctico) que es útil, se ha utilizado, o se está utilizando actualmente para la prevención, tratamiento, y/o manejo de cáncer (por ejemplo, cáncer de cerebro) se puede utilizar en combinación con una vacuna basada en péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria en los procedimientos descritos en la presente memoria. Las terapias incluyen, pero no se limitan a, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, conjugados, moléculas de ácido nucleico, moléculas pequeñas, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgánicas y moléculas orgánicas. Ejemplos no limitantes de terapias
15 contra el cáncer incluyen quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, cirugía, terapia de moléculas pequeñas, terapia antiangiogénica, terapia de diferenciación, terapia epigenética, radioinmunoterapia, terapia dirigida y/o terapia biológica, que incluye inmunoterapia. En ciertas realizaciones, un régimen profilácticamente y/o terapéuticamente efectivo de la invención comprende la administración de una combinación de terapias.

20 En una realización, la quimioterapia anterior es temolozimida. En una realización, la terapia anterior es terapia de radiación. En otra realización, la terapia anterior es una combinación de temozolomida y terapia de radiación. En una realización preferida, la combinación de temozolomida y radiación se administran utilizando el régimen Stupp. En otra realización, la terapia anterior es cirugía. En algunas realizaciones, el paciente se somete a cirugía antes del inicio de la terapia de combinación. En algunas realizaciones, el paciente se somete a cirugía antes del tratamiento con temozolomida. En algunas realizaciones, el paciente se somete a cirugía antes del inicio de la terapia de
25 radiación. En cada una de estas realizaciones que describen el uso de terapia de combinación, la vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 se puede administrar antes, durante, i después del tratamiento del paciente con la terapia que está siendo combinada.

Ejemplos de terapias contra el cáncer que se pueden utilizar en combinación con una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a: acivicina; aclarrubicina;
30 clorhidrato de imidazol; acronina; adozelesina; aldesleuquin; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antraciclina; antramincina; asparaginasa; asperlin; azacitidina (Vidaza); azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bisfosfonatos (por ejemplo, pamidronato (Aredria), clondronato de sodio (Bonefos), ácido zoledrónico (Zometa), alendronato (Fosamax), etidronato, ibandornato, cimadronato, risedromato, y tiludromato); bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sodio; bropirimina; busulfan; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino;
35 carmustina; clorhidrato de aclarrubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucil; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina (Ara-C); dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorrubicina; decitabina (Dacogen); agentes de desmetilación, dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; inhibidores de EphA2; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato de estramustina sodio; etanidazol; etopósido; etopósido fosfato; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxurridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sodio; gemcitabina; inhibidores de histona desacetilasa (HDACs) clorhidrato gemcitabina; hidroxurea; clorhidrato de idarrubicina;
40 ifosfamida; ilmofofina; mesilato de imatinib (Gleevec, Glivec); interleuquina II (que incluye interleuquina II recombinante, o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1 ; interferón alfa-n3; interferón beta-I a; interferón gamma-I b; iproplatino; clorhidrato de irinotecan; acetato de lanreotida; lenalidomida (Revlimid); letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol sodio; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; anticuerpos anti-CD2 (por ejemplo, siplizumab (MedImmune Inc.;
50 Publicación Internacional No. WO 02/098370, que se incorpora en la presente memoria mediante referencia en su totalidad)); acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalan; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sodio; metoprina; meturedpa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxaliplatino; oxisuran; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobroman; piposulfan; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfimer sodio; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; promicina; clorhidrato de puromicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sodio; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan sodio; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; teniposida; teroxirona; testolactona; thiamiprina;
60 tioguanina; tiotepa; tiazoferina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vaporeotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de

vinepidina; sulfato vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de virosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorrubicina.

Otros ejemplos de terapias contra el cáncer que se pueden utilizar en combinación con una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarrubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleuquin; antagonistas ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografolida; inhibidores de angiogenesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína morfogenética anti-dorsal-1; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplaston; oligonucleótidos antisentidos; glicinato de afidicolina; moduladores del gen de apoptosis; reguladores de apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetron; azatoxin; azatirosina; derivados de baccatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosorina; derivados de beta lactama; beta-aletina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinlespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfoestina C; derivados de camptotecina; canaripox IL-2; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado del cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína quinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; dehidrodidemina B; deslorelinea; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diaziquna; didemina B; didox; dietilnorspermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxifluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; episterida; análogo de estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de estrógeno; etanidazol; etopósido fosfato; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorrunicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texafrina gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; inhibidores de HMG CoA reductasa (por ejemplo, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lescol, lupitor, lovastatina, rosuvastatina, y simvastatina); hepsulfam; heregulin; hexametilene bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina; agonistas de interferón; interferones; interleuquinas; iobenguano; yododoxorrubicina; ipomeanol, 4-iroplact; isogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetron; jasplakinolida; kahalalida F; lamelarin-N triacetato; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinina; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de leucemia; interferón alfa de leucocitos; leuprolida+estrógeno+progesterona; leuprorelina; levamisol; LFA-3TIP (Biogen, Cambridge, MA; Publicación Internacional No. WO 93/0686 y Patente de Estados Unidos No. 6,162,432); liarozol; análogo poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos lipofílicos de platino; lissoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxorribina; lurtotecan; lutetium texafrina; lisofollina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspin; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinasas de matriz; menogaril; merbarona; meterelin; metioninasa; metoclopramida; inhibidor MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN de doble cadena de emparejamiento erróneo; mitoguaazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factor de crecimiento de fibroblastos mitotóxica-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; pared celular sk de micobacterias de lípido de monofosforilo A+m; mopidamol; inhibidor de genes de resistencia a múltiples fármacos; terapia basada en supresor de tumores múltiples 1; agente anticancerígeno mostaza; micaperóxido B; extracto de pared de célula micobacteriana; miriaporona; N-acetil-dinalina; benzamidas N sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavin; naphterpin; nartograstim; nedaplatino; nemorrubicina; ácido neridróico; endopeptidasa neutral; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; antioxidante nítróico; nitrolina; O6-bencilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrona; ondansetrona; oracina; inductor de citoquinas orales; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrhizoxina; ácido pamidróico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazelliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato de pentosan sodio; pentostatina; pentrozol; perflubron; perfosfamida; alcohol de perillilo; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanil; clorhidratote de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; plactina A; plactina B; inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfímero sodio; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores de proteasoma; modulador inmune basado en proteína A; inhibidor de la proteína quinasa C; inhibidores de proteína quinasa C, microalgal; inhibidores de fosfatasa de tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietileno de hemoglobina piridoxilada; antagonistas raf; raltitrexed; ramosetrona; inhibidores de proteína farnesil transferasa ras; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; retelliptina desmetilada;; renio Re 186 etidronato; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohitukina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcocitol A; sargramostima; imitadores de Sdi 1; semustina; inhibidor derivado de senescencia 1; oligonucleótidos con sentido; inhibidores de transducción de señales; moduladores de transducción de señales; proteína de unión a antígeno de cadena sencilla; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina;

espongistatina 1; esqualamina; inhibidor de célula madre; inhibidores de la división de células madre; estipiámid; inhibidores de estromelina; sulfosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; talimustina; 5-fluorouracilo; leucovorin; tamoxifen metiodida; tauromustina; tazaroteno; tecogalan sodio; tegafur; telurapirilia; inhibidores de telomerasa; temoporfina; temozolomida; teniposida; tetraclorodecaoxida; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; imitador de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinan; hormona estimulante de la tiroides; etiopurpurina de etil estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor totipotente de células madre; inhibidores de traducción; tretinoín; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelin; tropisetrona; turosterida; inhibidores de tirosina quinasa; tirfostinas; inhibidores de la UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de uroquinasa vapreotida; variolina B; sistema de vectores, terapia génica de eritrocitos; talidomida; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; VITAXIN™ (véase Publicación de Patente de Estados Unidos No. US 2002/0168360 A1, con fecha de 14 de noviembre de 2002, titulada "Methods of Preventing or Treating Inflammatory or Autoimmune Disorders by Administering Integrin $\alpha\beta 3$ Antagonists in Combination With Other Prophylactic or Therapeutic Agents"); vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y zinostatina estimulante.

En algunas realizaciones, la(s) terapia(s) utilizada(s) en combinación con una vacuna basada en el péptido de IL-13R $\alpha 2$ o composición descrita en la presente memoria es un agente inmunomodulador. Ejemplos no limitantes de agentes inmunomoduladores que se pueden utilizar en combinación con una vacuna basada en el péptido de IL-13R $\alpha 2$ o composición descrita en la presente memoria incluyen agentes proteínicos tales como citoquinas, imitadores de péptido, y anticuerpos (por ejemplo, fragmentos humanos, humanizados, quiméricos, monoclonales, policlonales, Fvs, ScFvs, Fab o F(ab)2 o fragmentos de unión al epítipo), moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico antisentido y hélices triples), moléculas pequeñas, compuestos orgánicos y compuestos inorgánicos. En particular, los agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, Citoxan, Immuran, ciclosporina A, minociclina, azatioprina, antibióticos (por ejemplo, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteroides, micofenolato de mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxiespergualina, brequinar, malononitriloamidas (por ejemplo, leflunamida), moduladores del receptor de células T, moduladores del receptor de citoquinas y moduladores de mastocitos. Se pueden encontrar otros ejemplos de agentes inmunomoduladores, por ejemplo, en la Publicación de Estados Unidos No. 2005/0002934 A1 en los párrafos 259-275. En una realización, el agente inmunomodulador es un agente quimioterapéutico. En una realización alternativa, el agente inmunomodulador es un agente inmunomodulador distinto de un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, la(s) terapia(s) utilizada(s) de acuerdo con la invención no es un agente inmunomodulador.

En algunas realizaciones, la(s) terapia(s) utilizada(s) en combinación con una vacuna basada en el péptido de IL-13R $\alpha 2$ o composición descrita en la presente memoria es un agente antiangiogénico. Ejemplos no limitantes de agentes antiangiogénicos que se pueden utilizar en combinación con una vacuna basada en el péptido de IL-13R $\alpha 2$ o composición descrita en la presente memoria incluyen proteínas, polipéptido, péptidos, conjugados, anticuerpos (por ejemplo, humanos, humanizados, quiméricos, monoclonales, policlonales, Fvs, ScFvs, fragmentos Fab, fragmentos F(ab)2, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos) tales como anticuerpos que se unen específicamente a TNF- α , moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas antisentido o hélices triple), moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas, y moléculas pequeñas que reducen o inhiben la angiogénesis. Se pueden encontrar otros ejemplos de agentes antiangiogénicos, por ejemplo, en la Publicación de Estados Unidos No. 2005/0002934 A1 en los párrafos 277-282. En una realización preferida, la terapia anti-angiogénica es bevacizumab (Avastin®). En otras realizaciones, la(s) terapia(s) utilizada(s) de acuerdo con la invención no es un agente antiangiogénico.

En algunas realizaciones, la(s) terapia(s) utilizada(s) en combinación con una vacuna basada en el péptido de IL-13R $\alpha 2$ o composición descrita en la presente memoria es un agente antiinflamatorio. Ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios que se pueden utilizar en combinación con una vacuna basada en el péptido de IL-13R $\alpha 2$ o composición descrita en la presente memoria incluyen cualquier agente antiinflamatorio, que incluye agentes útiles en terapias para trastornos inflamatorios, bien conocidos por un experto en la técnica. Ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroides (NSAIDs), fármacos antiinflamatorios esteroides, anticolinérgicos (por ejemplo, sulfato de atropina, metilnitrato de atropina, y bromuro de ipratropio (ATROVENT™)), agonistas beta2 (por ejemplo, abuterol (VENTOLIN™ y PROVENTIL™), bitolterol (TORNALATE™), levalbuterol (XOPONEX™), metaproterenol (ALUPENT™), pirbuterol (MAXAIR™), terbutaline (BRETAIRE™ y BRETHINE™), albuterol (PROVENTIL™, REPETABS™, y VOLMAX™), formoterol (FORADIL AEROLIZER™), y salmeterol (SEREVENT™ y SEREVENT DISKUS™)), y metilxantinas (por ejemplo, teofilina (UNIPHYL™, THEO-DUR™, SLOBID™, y TEHO-42™)). Ejemplos de NSAIDs incluyen, pero no se limitan a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenac (VOLTAREN™), etodolac (LODINE™), fenoprofen (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), ketoralac (TORADOL™), oxaprozina (DAYPRO™), nabumetona (RELAFEN™), sulindac (CLINORIL™), tolmentina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), cetoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Dichos NSAIDs funcionan al inhibir una enzima ciclooxigenasa (por ejemplo, COX-1 y/o COX-2). Ejemplos de fármacos esteroides antiinflamatorios incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRÓN™), corticosteroides (por ejemplo, metilprednisolona (MEDROL™)), cortisona, hidrocortisona, prednisona (PREDNISONA™ y DELTASONE™),

prednisolona (PRELONE™ y PEDIAPRED™), triamcinolona, azulfidina, y inhibidores de eicosanoides (por ejemplo, prostaglandinas, tromboxanos, y leucotrienos. Se pueden encontrar otros ejemplos de agentes antiinflamatorios, por ejemplo, en la Publicación de Estados Unidos No. 005/0002934 A1 en los párrafos 290-294, que se incorpora mediante referencia en su totalidad. En otras realizaciones, la(s) terapia(s) utilizada(s) de acuerdo con la invención no es un agente antiinflamatorio.

En ciertas realizaciones, la(s) terapia(s) utilizada(s) en combinación con una vacuna basada en el péptido de IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria es un agente de alquilación, una nitrosourea, un antimetabolito, y antraciclina, un inhibidor II de topoisomerasa, o un inhibidor mitótico. Los agentes de alquilación incluyen, pero no se limitan a, busulfan, cisplatino, carboplatino, colormbucil, ciclofosfamida, ifosfamida, decarbazina, mecloretamina, melfalan, y temozolomida. Las nitrosoureas incluyen, pero no se limitan a carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU). Los antimetabolitos incluyen, pero no se limitan a 5-fluorouracilo, capecitabina, metotrexato, gemcitabina, citarabina, y fludarabina. Las antraciclinas incluyen, pero no se limitan a daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, y mitoxantrona. Los inhibidores II de topoisomerasa incluyen, pero no se limitan a, topotecan, irinotecan, etoposido (VP-16), y teniposido. Los inhibidores mitóticos incluyen, pero no se limitan a taxanos (paclitaxel, docetaxel), y los alcaloides vinca (vinblastina, vincristina, y vinorelbina).

Las terapias para el cáncer disponibles actualmente y sus dosis, vías de administración y uso recomendado se conocen en la técnica y se han descrito en la literatura como el Physician's Desk Reference (60th ed., 2006). De acuerdo con la presente invención, las dosis y la frecuencia de administración de agentes quimioterapéuticos se describen supra.

6.7.5 Ensayos biológicos

Las vacunas basadas en péptidos IL-13R α 2 y composiciones descritas en la presente memoria se pueden probar para determinar su capacidad para tratar, evitar o manejar el cáncer de cerebro.

6.7.5.1 Ensayos *in vivo*

Las vacunas basadas en péptidos IL-13R α 2 y composiciones descritas en la presente memoria se pueden probar en sistemas de modelos animales adecuados antes de su uso en seres humanos. Dichos sistemas de modelos animales incluyen, pero no se limitan a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Se puede utilizar cualquier sistema animal bien conocido en la técnica. Varios aspectos del procedimiento pueden variar; dichos aspectos incluyen, pero no se limitan a, el régimen temporal de administración de los componentes de la vacuna, ya sea que dichos componentes de la vacuna se administren por separado o como una mezcla, y la frecuencia de administración de los componentes de la vacuna.

Los modelos animales para el cáncer se pueden utilizar para evaluar la eficacia de una vacuna basada en el péptido IL-13R α 2 o composición descrita en la presente memoria o una terapia de combinación descrita en la presente memoria. Ejemplos de modelos animales para el cáncer de cerebro incluyen, pero no se limitan a, estudios de xenoinjertos que utilizan estirpes celulares de cáncer de cerebro que expresan IL-13R α 2, o células tumorales humanas primarias que expresan IL-13R α 2. En estos modelos, los ratones se inmunizan para inducir una respuesta de células T específica para IL-13R α 2, que luego se evalúa por su capacidad para inhibir el crecimiento del tumor. En una realización, el xenoinjerto tumoral se forma antes de la inmunización para probar la capacidad de la respuesta de las células T específicas de IL-13R α 2 para inhibir el crecimiento del tumor preexistente. En otra realización, la respuesta de las células T específicas de IL-13R α 2 se induce antes de la inyección de las células tumorales, para evaluar la capacidad de la respuesta inmunitaria para evitar la formación de un tumor.

6.7.5.2 Ensayos de citotoxicidad

La toxicidad y/o eficacia de las vacunas basadas en el péptido IL-13R α 2 y composiciones descritas en la presente memoria se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar el LD₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren los regímenes terapéuticos que exhiben grandes índices terapéuticos. Si bien se pueden utilizar regímenes terapéuticos que muestran efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado para diseñar un sistema de administración que dirija dichos agentes al sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

6.8 Artículos de fabricación

En la presente memoria también se incluye un producto acabado farmacéutico etiquetado y empacado. Este artículo de fabricación incluye la forma de dosificación unitaria adecuada en un recipiente o contenedor adecuado, tal como un frasco de vidrio u otro contenedor herméticamente cerrado. El producto farmacéutico puede contener, por ejemplo, los componentes de una vacuna basada en el péptido IL-13R α 2 descrita en la presente memoria en una forma de dosificación unitaria.

En una realización específica, la forma de dosificación unitaria es adecuada para suministro parenteral, intravenoso, intramuscular, intranasal o subcutáneo. Por lo tanto, en la presente memoria se incluyen soluciones, preferiblemente estériles, adecuadas para cada ruta de suministro.

5 Al igual que con cualquier producto farmacéutico, el material de empaque y el contenedor se diseñan para proteger la estabilidad del producto durante el almacenamiento y envío. Adicionalmente, los productos proporcionados en la presente memoria incluyen instrucciones de uso u otro material informativo que aconseje al médico, técnico o paciente sobre cómo evitar o tratar adecuadamente el cáncer de cerebro en cuestión. En otras palabras, el artículo de fabricación incluye medios de instrucción que indican o sugieren un régimen de dosificación que incluye, pero no se limita a, dosis reales, procedimientos de monitorización y otra información.

10 Específicamente, se proporciona en la presente memoria un artículo de fabricación que comprende material de empaque, tal como una caja, botella, tubo, frasco, contenedor, pulverizador, insuflador, bolsa intravenosa (i.v.), envoltura y similares; y por lo menos una forma de dosificación unitaria de una vacuna o composición farmacéutica descrita en la presente memoria contenida dentro de dicho material de empaque, en el que dicha vacuna o composición farmacéutica descrita en la presente memoria comprende una vacuna basada en el péptido IL-13Rα2 descrita en la presente memoria, y en donde dicho material de empaque incluye medios de instrucción que indican que dicha vacuna basada en el péptido IL-13Rα2 descrita en la presente memoria se puede utilizar para evitar, manejar y/o tratar el cáncer de cerebro o uno o más de sus síntomas mediante la administración de dosis específicas y el uso de regímenes de dosificación específicos como se describe en la presente memoria.

7. EJEMPLOS

20 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero, por supuesto, no se deben interpretar como limitantes de ningún modo de su alcance.

7.1 Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra la identificación de péptidos modificados para IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ que mejora la inducción de la respuesta de CTL contra IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ nativo

25 se sintetizaron Tres péptidos modificados como se indica en la Tabla 1. La capacidad de unión de estos péptidos modificados se evaluó utilizando una estirpe celular T2 transfectada con HLA-A2. Las alícuotas de células T2 se incubaron con péptidos modificados o IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ a 1 nM durante la noche, y luego se examinaron los niveles de expresión en superficie de HLA-A2 en células T2 mediante citometría de flujo. Dado que la unión estable de HLA-A2 con epítomos de péptidos estabiliza aún más la expresión en superficie de HLA-A2 (Francini et al., 2002; Alves et al., 2003), los niveles de expresión cuantitativos de HLA-A2, que se indican mediante Intensidad de Fluorescencia Media (MFI) en la Tabla 1, se correlaciona con la afinidad de unión de los epítomos de péptido que se incuban conjuntamente con las células T2. Los péptidos modificados V9 y A1V9 poseen mayor afinidad de unión con el HLA-A2 que el IL-13 IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ nativo (Tabla 1), lo que sugiere la posibilidad de que estos péptidos modificados sean más inmunogénicos que el IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃.

TABLA 1

Péptido	Secuencia de aminoácidos	Índice de unión (MFI*)	Designación
IL-13Rα ₃₄₅₋₃₅₃ nativo	WLPFGFILI (SEQ ID NO:1)	237,4	Nativo
V9: I se reemplazo con V a P9	WLPFGFILV (SEQ ID NO:2)	375,6	V9
A1V9: W→A a P1, y I→V a P9	ALPFGFILV (SEQ ID NO:3)	462,8	A1V9
A1V9: W→E a P1, y I→V a P9	ELPFGFILV (SEQ ID NO:4)	241,6	E1V9
Control (sin péptido)	--	121,8	--

* Intensidad de fluorescencia media en la concentración de péptidos de 1 nM

7.2 Ejemplo 2

40 Este ejemplo demuestra que el CTL inducido por el análogo agonista V9 reconoció el péptido IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ presentado en HLA-A*0201 de manera más eficiente que el CTL inducido por el péptido de tipo silvestre.

Las células dendríticas (DC) derivadas de pacientes con glioma HLA-A*0201+ se impulsaron con V9, A1V9, E1V9, un control de influenza (gripe) o el péptido de tipo silvestre (10 µg/ml) y se utilizaron para estimular las células T CD8+ autólogas. En el día 7, los cultivos de células respondedoras individuales se reestimularon una vez con CD autólogas cargadas con el péptido correspondiente utilizado en la estimulación primaria. La actividad específica de CTL de las estirpes celulares T inducidas se probó primero con células T2 cargadas con IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ de tipo silvestre, o sin péptido en el día 10.

Como se representa en la FIGURA 1, las células T que se han estimuladas con cualquiera de (IL-13R) tipo silvestre o análogos de agonistas (V9, A1V9 y E1V9) sometieron a lisis eficazmente células objetivo T2 impulsadas con 100 ng/ml de IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ de tipo silvestre; mientras que solo se observó una baja lisis de fondo en ausencia del péptido en las células T2. Las células T que se han estimulado con el control de la gripe-péptido o no-péptido (control) no demostraron ninguna actividad lítica en los niveles de fondo. Estos resultados demostraron que las líneas de CTL inducidas con los análogos de tipo silvestre o agonistas reconocieron y sometieron a lisis las células que presentaban el epitopo de IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ de tipo silvestre específicamente. En particular, el péptido V9 indujo un nivel significativamente más alto de respuesta CTL específica de antígeno en comparación con el IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ de tipo silvestre en cada relación efector/objetivo (E/T) ($p = 0,018, 0,020$ y $0,011$ en una relación E/T de 50, 25 y 12,5, respectivamente). Se repitió el mismo conjunto de experimentos con por lo menos tres pacientes individuales con glioma HLA-A2+, y el péptido V9 demostró consistentemente mayores actividades de CTL que el IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ nativo en los cuatro donantes probados (datos no mostrados).

Posteriormente, se examinó la sensibilidad de las líneas CTL inducidas por los análogos de agonistas o el péptido de tipo silvestre con células T2 cargadas con diversas concentraciones (1-100 nM) del péptido IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ mediante un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas (FIGURA 2). Todas las líneas de CTL demostraron actividades líticas dependientes de la dosis de péptidos contra células T2 cargadas con péptidos. La línea CTL inducida por el análogo agonista V9 demostró mayores actividades de CTL que los IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ de tipo silvestre en todas las concentraciones de péptidos examinadas ($P = 0,029, 0,039$ y $0,018$ a 1, 10 y 100 nM, respectivamente). Cabe destacar que el porcentaje promedio del valor de lisis alcanzado por CTL inducido por V9 con 1 nM de IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ fue mayor que el demostrado con CTL inducido por péptidos de tipo silvestre con 100 nM de péptido, aunque esto no demostró una significación estadística debido a una gran variación estándar. Estos resultados indican que el péptido V9 es más eficiente que el péptido de tipo silvestre para inducir CTL que son capaces de reconocer concentraciones bajas del péptido IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ de tipo silvestre. Esta capacidad es importante porque las células tumorales humanas expresan niveles bajos de epitopos de CTL objetivo en sus moléculas HLA (Bakker et al., 1995; Lupetti et al., 1998).

7.3 Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra que los CTL inducidos por péptidos modificados lisaban células de glioma HLA-A2+ que expresan IL-13Rα2 más eficientemente que los CTL inducidos por el péptido nativo.

Se examinó la capacidad de los péptidos modificados, tales como IL-13Rα2-V9, para mejorar la actividad de CTL contra las células de glioma humano HLA-A2+ que expresaban endógenamente y presentaban epitopos derivados de IL-13Rα2. Las estirpes celulares de glioma humano U251 y SNB19 expresan HLA-A2 e IL-13Rα2, mientras que la estirpe celular de glioma humano A172 expresa IL-13Rα2, pero no HLA-A2 (Okano et al., 2002). Por lo tanto, U251 y SNB19 se utilizaron como células de glioma objetivo relevantes, mientras que A172 sirvió como una línea de control negativa para demostrar la restricción de HLA-A2 de la respuesta.

La capacidad lítica de las líneas de CTL inducidas por péptidos contra estas células de glioma se examinó utilizando ensayos de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas. Como se ilustra en la FIGURA 3, las estirpes celulares U-251 y SNB19 eran altamente susceptibles a la actividad citotóxica de todas las líneas CTL que se habían inducido con IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ o cada uno de sus péptidos modificados. Las células A172, en contraste, no se sometieron a lisis más allá del nivel de fondo (<10 %) por ninguna de las líneas de CTL probadas, lo que sugiere que las líneas de CTL inducidas por IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ o péptido modificado sometieron a lisis las células de glioma SNB19 y U-251 en una manera restringida a HLA-A2 (datos no mostrados). Las células T estimuladas con un epitopo de antígeno asociado al melanoma Mart-1₂₇₋₃₅ y las células T sin estimulación con péptidos mostraron solo un nivel de fondo (<10 %) de lisis en todas las relaciones Efector/Objetivo (E/T) probadas (datos no mostrados). En este paciente particular, tanto IL-13Rα2-V9 como -A1V9 indujeron niveles más altos de lisis de SNB19 y U-251 en cada relación E/T en comparación con el péptido IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ nativo.

Para determinar la especificidad de la actividad lítica, se realizaron experimentos de competición de objetivos fríos mediante la adición de células T2 no radiomarcadas (frías) impulsadas con péptido IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ en el ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas. Las actividades líticas celulares del glioma anti-SNB19 por las líneas de CTL inducidas por IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ nativo o IL-13Rα2-V9 se inhibieron casi completamente mediante la adición de IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃ impulsado por células T2 frías. Sin embargo, las actividades de CTL no se inhibieron por la adición de células T2 frías impulsadas sin péptidos, lo que demuestra que la capacidad lítica de los CTL era específica para el epitopo IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃.

Adicionalmente, se utilizó el anticuerpo anti-HLA-A2 (W6/32) para bloquear la señalización mediada por HLA-A2 en la reactividad de CTL. Como se ilustra en la FIGURA 5, la adición de este anticuerpo inhibió la lisis mediada por CTL, confirmando que la reactividad de CTL anti-glioma inducida por estos péptidos estaba restringida por HLA-A2.

7.4 Ejemplo 4

5 Este ejemplo demuestra la vacunación de ratones transgénicos HLA-A2 (HHD) con epítomos de CTL derivados de IL-13R α 2.

Con el fin de examinar si la inmunización con IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ y/o sus péptidos modificados pueden provocar respuestas de CTL in vivo, y también para examinar si las respuestas de CTL inducidas pueden mediar respuestas terapéuticas antitumorales contra tumores cerebrales que expresan IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃, los ratones con HHD Se
 10 obtuvieron del Dr. Francois A. Lemonnier (Instituto Pasteur, París). Los ratones HHD son nulos, y transgénicos de microglobulina D^bx β 2 (β 2M) para la cadena única de microglobulina HLA-A2.1- β 2 modificada (gen HHD) (Pascolo et al., 1997). Los experimentos in vivo mostraron que los ratones HHD exhiben respuestas restringidas a HLA-A2 para proteínas de múltiples epítomos tales como el virus de la gripa intacta (Pascolo et al., 1997) y nuevos antígenos asociados al cáncer, tales como EphA2 (Alves et al., 2003), HER 2/neu y hTERT (Scardino et al., 2002), MAGE
 15 (Graff-Dubois et al., 2002) y un carcinoma de mama novedoso asociado a BA46 (Carmon et al., 2002). Por lo tanto, estos ratones son una herramienta útil para la identificación y caracterización de posibles epítomos de CTL restringidos por HLA-A2 derivados de tumores.

Para crear una estirpe celular tumoral singénica de ratón HHD que exprese IL-13R α 2, se obtuvieron células de linfoma EL4 transfectadas con el gen HHD (EL4-HHD). Las células EL4-HHD se han generado a partir de EL4 por agotamiento de D^bx β 2MM e inserción de la cadena única HLA-A2.1- β 2M modificada (Pascolo et al., 1997), lo que
 20 permite el trasplante singénico en ratones HHD. Las células EL4-HHD se transfectaron de manera estable con un plásmido de expresión que codifica IL-13R α 2. La estirpe celular (EL4-HHD-IL-13R α 2) expresó la proteína IL-13R α 2 y formó tumores tanto en el espacio subcutáneo (s.c.) como en el intracraneal (i.c.) después de las inyecciones en ratones HHD singénicos.

25 7.5 Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra que la inmunización in vivo de ratones HHD con los péptidos modificados indujo mayores magnitudes de respuestas de CTL que el péptido nativo contra las células objetivo que expresan IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃.

Los ratones HHD recibieron (en los días 7 y 14) inyecciones s.c. de 100 μ g de péptido IL-13R α 2-V9, -A1V9, IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ o MART-1₂₇₋₃₅ emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (IFA) en presencia de 140 μ g del epítomo T auxiliar de HBVcore₁₂₈₋₁₄₀ restringido a I-A^b (TPPAYRPPNAPIL) (SEQ ID NO: 5), que estimula una
 30 respuesta de células T auxiliares CD4⁺, promoviendo de esta manera la estimulación de CTLs CD8⁺. Los animales de control recibieron IFA que contenía únicamente péptido auxiliar de HBV. Once días después de la última inmunización, se sacrificaron los animales y se estimularon 5x10⁶ células de bazo (SPC) in vitro con el mismo péptido que se utilizó para la estimulación in vivo (10 μ M). En el día 6 del cultivo, la mayor parte de las poblaciones
 35 se analizaron para determinar la citotoxicidad específica contra las células EL4-HHD que expresan IL-13R α 2 o EL4-HHD impulsadas con IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃.

EL4-HHD-IL-13R α 2 y EL4-HHD se marcaron con 100 μ Ci de ⁵¹Cr durante 60 min, se sembraron en placas de 96 pozos con fondo en V (3x10³ células/pozo). Las EL4-HHD marcadas se impulsaron con IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ (1 μ M) a 37° C durante 2 h. Las células objetivo de control se impulsaron sin péptidos. Los SPC estimulados se agregaron luego
 40 como células efectoras y se incubaron a 37° C durante 4 h. Se recogieron cien μ l de sobrenadante y se midió la radioactividad en un contador gamma.

La FIGURA 6 demuestra que las respuestas de CTL inducidas por los péptidos modificados fueron capaces de lisar células T2 cargadas con IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ nativo. Las células de EL4-HHD no impulsadas de control no se lisaron por los CTL más allá de los niveles de fondo (mostrados en la Figura 7). Adicionalmente, la inmunización con IL-13R α 2-V9
 45 mostró una tendencia hacia niveles más altos de reactividad de CTL contra las células EL4-HHD impulsadas con el péptido IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ nativo que otros péptidos examinados, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa debido a la variación dentro de las muestras triplicadas. Estos datos apoyan el conjunto anterior de datos con células T derivadas de pacientes HLA-A2⁺ humanos, en las cuales los péptidos modificados indujeron niveles más altos de respuesta CTL anti-IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ que el péptido nativo.

La capacidad de los mismos CTL derivados de ratones HHD utilizados en la FIGURA 6 para lisar células EL4-HHD-IL-13R α 2 se examinaron para evaluar la capacidad de los CTL para reconocer el péptido IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ que se procesa de forma natural por las células que expresan endógenamente IL-13R α 2. La FIGURA 7 ilustra que la
 50 inmunización con IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃, IL-13R α 2-V9 o -A1V9 indujo una actividad específica de CTL contra células EL4-HHD-IL-13R α 2. Las actividades de CTL fueron específicas de antígeno porque el control EL4-HHD no se lisó más allá del nivel de fondo. Los péptidos modificados IL-13R α 2-V9 y -A1V9 indujeron una mayor magnitud de las actividades de CTL en comparación con el IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ nativo contra las células EL4-HHD-IL-13R α (p < 0,05 en
 55 todas las relaciones efectoras/objetivo). Actualmente se está evaluando el efecto antitumoral in vivo de las

vacunaciones con los péptidos IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ o IL-13R α 2 modificados en ratones HHD portadores de tumores EL4-HHD-IL-13R α 2.

7.6 Ejemplo 6

Este ejemplo demuestra que EphA2 tiene epítomos CTL restringidos por HLA-A2 disponibles.

5 EphA2 es un atractivo antígeno asociado al tumor y un objetivo para las vacunas contra el tumor, ya que se identificaron 5 epítomos de células T HLA-A2 y 3 DR4 (Tatsumi et al., 2003). Como se muestra en la FIGURA 8, 9 de 14 glioblastoma multiforme humano (GBM) y 6 de 9 casos de astrocitoma anaplásico (AA) expresan altos niveles de EphA2. Adicionalmente, se ha inducido reactividad de CTL anti-glioma en células CD8+ obtenidas de pacientes con glioma HLA-A2+ mediante estimulación con el epítomo EphA2₈₈₃₋₈₉₁ (Figura 9). Esta respuesta fue específica para el epítomo EphA2₈₈₃₋₈₉₁ porque el ensayo paralelo que utiliza células T2 cargadas con EphA2₈₈₃₋₈₉₁ demostró una respuesta específica de péptido en comparación con el objetivo T2 no cargado de control (no mostrado). Estos datos sugieren fuertemente que EphA2₈₈₃₋₈₉₁ puede servir como un epítomo de CTL.

7.7 Ejemplo 7

15 Este ejemplo describe un ensayo de fase I/II realizado para evaluar la seguridad y la inmunogenicidad de una vacunación novedosa con células dendríticas polarizadas α -tipo 1 (α DC1) cargadas con péptidos sintéticos para los epítomos de antígeno asociado a glioma (GAA) y la administración de poli-ICLC en pacientes (HLA)-A2+ con antígeno leucocitario humano con gliomas malignos recurrentes. Los GAA para estos péptidos son EphA2, receptor de interleuquina-13 (IL-13R) α 2, YKL-40 y gp100.

7.7.1 Pacientes y procedimientos

7.7.1.1 Pacientes

20 Los pacientes con glioma maligno recurrente fueron inscritos con consentimiento informado y aprobaciones por parte de la junta de revisión institucional (IRB) y la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) (BB-IND#12415). Las características clínicas de los pacientes se resumen en las Tablas 2 y 3A. Los criterios de inscripción incluyeron: diagnóstico histológico de glioblastoma multiforme (GBM) o glioma anaplásico (AG) que incluye astrocitoma anaplásico (AA), oligodendroglioma anaplásico (AO) u oligoastrocitoma anaplásico (AOA); hasta 25 2 recurrencias anteriores; >18 años; estado de rendimiento Karnofsky >60; función hepática y renal adecuada y HLA-A2+. Se permitieron dosis mínimas de corticosteroides (dexametasona hasta 4 mg/día). Veintidós pacientes fueron inscritos y recibieron por lo menos una vacuna. Diecinueve de los 22 pacientes completaron las 4 inmunizaciones iniciales programadas; tres pacientes (pacientes 4, 11 y 13) fueron retirados del protocolo debido a 30 la progresión temprana del tumor. Nueve pacientes completaron 5 vacunas de refuerzo adicionales. Se presentan datos inmunológicos y de seguridad en pacientes que recibieron por lo menos 4 vacunaciones (n=19) y por lo menos una vacunación (n=22), respectivamente.

TABLA 2: Demografía y características clínicas de los pacientes participantes

Características	Nivel de Dosis DC (No. de DC/dosis)		Total (n=22)	
	1 (1 x 10 ⁷)	2 (3 x 10 ⁷)	No. de pacientes	%
Recibió por lo menos una vacuna	11	11	22	
Completó por lo menos 4 vacunas	10	9	19	86
Hembra (recibió por lo menos 4 vacunas)	5	4	9	47
Mediana de edad, años	52	46	48	
Intervalo	37-71	28-63	28-71	
Histología de Tumor				
AA	3	2	5	23
AO	1	2	3	14
AOA	1	0	1	4
GBM	6	7	13	59
No. de Recurrencias previas				
0	7	4	11	50
1	2	5	7	32
2	2	2	4	18

TABLA 3A

ID pt	Edad/género	Histol. de tumor	Ubicación de tumor	Terapia anterior	No. de Rec. Prev.	DC IL-12 (pg)	ELISPOT (pos/neg) en semana 9					Tetrámero			RR en semana 9	TTP (Mo)	OS (Mo)
							I	E	Y	G	Pa	I	E	G			
1	57/M	GBM	Temp/Pa Der.	Res/RT/TMZ/Mol	1	10	N	N	N	N	N	P	P	P	PR	7	14
2	52/M	GBM	Temporal Der.	Res/RT/TMZ	1	25	P	N	P	N	N	P	P	P	PD	<2	12
3	37/M	AA	Parietal Der.	Resx2/RT/TMZ/Mol	2	25	N	N	N	N	N	N	N	N	SD	5	10
4	68/F	AA	Frontal Der.	SB/RT/TMZ	0	<10	No probado					No probado			ND*	<2	>37
5	63/M	GBM	Parietal Der.	SB/RT/TMZ	0	26	N	N	N	N	N	N	N	N	PD	<2	5
6	56/M	AOA	Temporal Izq.	SB/RT/TMZ	0	27	N	P	N	P	P	P	P	P	SD	>30	>30
7	37/F	AA	Temporal Der.	SB/RT/TMZ	0	919	N	N	N	N	N	P	P	P	SD	25	>33
8	45/F	GBM	Frontal Der.	SB/RT/TMZ/Mol	0	480	N	N	N	N	N	P\$	P\$	N	SD	16	>30
9	43/F	AO	Frontal Der.	Res/RT/TMZ/SR	0	24	P	N	N	P	P	N	N	N	PD	<2	23
10	71/F	GBM	Parietal Izq.	Resx2/RT/TMZ/CE	2	<10	P	N	N	P	P	N	N	N	SD	5	>27
14	40/M	GBM	Frontal/Temporal Izq.	Res/RT/TMZ	0	551	N	N	N	N	N	N	N	N	SD	18	>18

Nivel de dosis 1 (1 x 10⁷ DC/dosis)

(continuación)

ID pt	Edad/género	Histol. de tumor	Ubicación de tumor	Terapia anterior	No. de Recu brimi ento. Prtev.	DC IL-12 (pg)	ELISPOT (pos/neg) en semana 9						Tetrámero	RR en semana 9	TTP (Mo)	OS (Mo)
							I	E	Y	G	Pa	I				
11	54/M	GBM	Temporal Der.	Res/RT/TMZ/Mol	2	38	No probado						No probado	ND*	<2	3
12	35/F	AO	Frontal Izq.	SB/TMZ	0	111	N	N	P	N	P	N	N	SD	13	>25
13	461M	AA	Parietal Der.	Res/RT/TMZ	1	151	No probado						No probado	ND*	<2	4
15	51/M	GBM	Múltiple	Res/RT/TMZ	0	35	N	N	N	N	N	N	N	SD	4	12
16	33/M	AO	Frontal Der.	Res/RT/TMZ/Mol	2	985	P	N	N	P	P	N	P	SD	>14	>14
17	30/F	GBM	Parietal Izq.	Res2/RT/TMZ/CW	1	123	N	N	N	N	N	N	No probado	PD	<2	6
18	611F	GBM	Occipital Bil.	Res/RT/TMZ/Bil	1	125	N	N	N	P	P	N	N	PD	<2	5
19	63/M	GBM	Temporal Izq.	Res/RT/TMZ/SR	1	199	N	N	N	N	N	P	P	SD	>13	>13
20	62/M	GBM	Temporal Der.	Res/RT/TMZ	0	287	N	N	N	N	N	N	P	PR	>13	>13
21	38/F	GBM	Hemi Der.	Res/RT/TMZ/CPT-Bev	1	27	N	N	N	P	N	No probado	PD	<2	12	
22	28/M	AA	Tronco encefálico	SB/RT/TMZ/Res	0	779	N	N	N	N	P	N	N	SD	>12	>12

Nivel de dosis 2 (3 x 10⁷ DC/ dosis)

Abreviaturas: M, hombre; F, mujer; GBM, glioblastoma multiforme; AO, astrocitoma anaplásico; AA, astrocitoma anaplásico; AOA, oligodendroglioma anaplásico; Temp, temporal; Pa, parietal; Bil, bilateral; Hemi, hemisférico; Res, resección; RT, radioterapia; TMZ, temozolomida; Mol, terapia dirigida molecularmente; SB, biopsia estereotáctica; SR, radiocirugía estereotáctica; CE, carboplatino y etoposido; CW, galleta liberadora de carmustina; BI, bevacizumab e irinotecan; No. Prev. Rec, número de recurrencias anteriores; DC IL-12, producción de IL-12 p70 por (XDCI) (pg. 10⁵ células/24 horas); I, IL-13Rα2; E, EphA2; Y, YKL-40; G, gp100; Pa, PADRE; P, positivo; N, negativo; PR, respuesta parcial; SD, enfermedad estable; PD, enfermedad progresiva; ND*, no determinado debido a la progresión temprana antes de la semana 9; TTP, tiempo hasta progresión.

TABLA 3B

	Pt ID	ELISPOT (mejor respuesta)				
		I	E	Y	G	Pa
Nivel de dosis 1 (1 x 10 ⁷ DC/dosis)	1	25-49	<25	25-49	25-49	100-199 @
	2	50-99	25-49	25-49	>200	50-99 @
	3	<25	<25	<25	25-49	25-49
	4	No probado				
	5	<25	25-49	25-49	25-49	25-49
	6	100-199 §	100-199	50-99 §	100-199	>200
	7	50-99 §	<25	<25	100-199 §	<25
	8	50-99 §	<25	50-99 §	100-199 §	25-49
	9	50-99	<25	50-99 @	100-199	50-99
	10	>200	100-199 @	50-99 @	>200	>200
	14	<25	50-99 @	50-99 @	50-99 @	<25
Nivel de dosis 2 (3 x 10 ⁷ DC/dosis)	11	No probado				
	12	50-99 §	50-99 §	50-99 §	50-99	<25
	13	No probado				
	15	<25	<25	<25	100-199 @	25-49
	16	100-199	25-49	<25	>200	>200
	17	50-99 @	<25	50-99 @	25-49	50-99
	18	25-49	<25	25-49	>200	100-199
	19	<25	<25	<25	<25	<25
	20	<25	<25	<25	25-49	<25
	21	25-49	25-49	50-99 @	50-99	<25
	22	100-199 §	<25	25-49	>200 §	100-199

Abreviaturas: §, positivo solo después de vacunas de refuerzo; @, solo un punto, pero no dos o más puntos consecutivos demostraron 50 o más puntos/10⁵ células (por lo tanto, no son positivos); I, IL-13Rα2; E, EphA2; Y, YKL-40; G, gp100; Pa, PADRE.

7.7.1.2 Diseño de ensayo clínico

5 Este estudio se diseñó para evaluar la toxicidad y la inducción de respuestas clínicas inmunitarias y preliminares de vacunaciones con aDC1 cargado con GAA y la administración de poli-ICLC (HiltonoI®, Oncovir, Inc.). El primer curso de vacunas consistió en 4 administraciones intranodales (i.n.) guiadas por ultrasonido de 1 o 3 x 10⁷ αDC1/inyecciones cada 2 semanas (Figura 19) rotando cada uno de los grupos de ganglios linfáticos inguinales y axilares para minimizar los efectos potenciales de Traumatismo inducido por inyección en el microentorno de los ganglios linfáticos al repetir inyecciones en períodos cortos. Los primeros 10 pacientes evaluables recibieron 1 x 10⁷ αDC1/inyección (Nivel de dosis 1), luego 9 recibieron 3 x 10⁷ αDC1/inyección (Nivel de dosis 2). Todos los pacientes recibieron inyecciones intramusculares (i.m.) con poli-ICLC (20 µg/kg) dos veces por semana durante 8 semanas a partir del día 1. Los pacientes que presentaban enfermedad estable o regresión de la enfermedad sin eventos adversos importantes (AE) después de la 4^a vacunación fueron elegibles para recibir vacunas adicionales. A partir de

la Semana 13, estos pacientes se trataron con la misma dosis de vacunación adicional cada 4 semanas hasta un máximo de 5 inyecciones de vacuna y poli-ICLC i.m. a partir del día de la primera vacuna adicional y dos veces por semana (1 fase de refuerzo). A los pacientes que no mostraron AE mayor o progresión tumoral después de la 1ª fase de refuerzo se les ofreció la misma dosis de vacunas adicionales (cada 3 meses) y poli-ICLC (cada semana) por hasta tres años desde la primera vacunación (2ª fase de refuerzo).

7.7.1.3 Evaluación de toxicidad y reglas de parada

El ensayo se controló de forma continua para el AE relacionado con el tratamiento con los Criterios de toxicidad comunes del National Cancer Institute versión 3.0. Los siguientes se consideraron como toxicidad limitante de la dosis (DLT) si se consideraron como posibles, probablemente o definitivamente asociados con el tratamiento: ≥Hipersensibilidad de grado 2; ≥Toxicidad no hematológica/metabólica de grado 3; ≥Toxicidad hematológica (excepto linfopenia) o metabólica de grado 3 que no disminuyó después de 4 semanas de cese temporal de poli-ICLC. Las reglas de detención se implementaron de tal manera que un nivel de dosis se consideró excesivamente tóxico, lo que justifica que se detenga la acumulación, si en algún momento la tasa observada de DLT era ≥33 % y se habían observado por lo menos 2 DLT.

7.7.1.4 Péptidos

Los péptidos restringidos de HLA-A2 utilizados en estos estudios incluyeron: ALPFGFILV (SEQ ID NO:3; IL-13Rα2₃₄₅₋₃₅₃:1A9V); TLADFDPRV (SEQ ID NO:6; EphA2₈₈₃₋₈₉₁); IMDQVPFSV (SEQ ID NO:11; GP100₂₀₉₋₂₁₇:M2); y SIMTYDFHGA (SEQ ID NO:10; YKL-40₂₀₁₋₂₁₀). αDC1 también se cargó con un epítipo pan-DR (PADRE), que es un epítipo no natural optimizado para la respuesta de las células T auxiliares (véase, por ejemplo, Alexander et al, Immunity, 1: 751-761, 1994). Los péptidos se sintetizaron mediante síntesis automatizada de péptidos en fase sólida. Los péptidos se probaron en múltiples estudios de garantía de calidad que incluyen pureza, esterilidad, identidad, potencia, pirogenicidad y estabilidad.

7.7.1.5 Preparación de vacuna

Para el cultivo de DC, los monocitos se obtuvieron del producto de leucoféresis y se purificaron mediante el Sistema Elutra™. Los monocitos se cultivaron en medio de cultivo libre de antibióticos CellGenix suplementado con 1000 U/ml de GM-CSF y 1000 U/ml de IL-4 en cartuchos estériles, utilizando el sistema Aastrom Replicell. Los (i) DC inmaduros se recolectaron el día 6 y se crioconservaron. Antes de cada vacunación, se descongelaron alícuotas de iDC congeladas, se maduraron más y se polarizaron con grado clínico de IL-1β (10 ng/ml), TNF-α (10 ng/ml), IFN-α (3000 U/ml), IFN-γ (1000 U/ml) y poli-I:C (20 µg/ml) a 37° C en CO₂ al 5 % durante 48 horas y cargados con péptidos GAA (10 ng/ml) durante 4-6 horas. Dos horas antes de la cosecha, se agregó el péptido PADRE a los cultivos. Los criterios para la liberación de αDC1 incluyeron: esterilidad por tinción de Gram y cultivo bacteriológico; Micoplasma negativo; endotoxina <5,0 E.U./kg de peso corporal; más del 70 % de expresión tanto de CD86 como de HLA-DR en αDC1.

7.7.1.6 Recolección de PBMCs

Se extrajo sangre periférica (50-60 ml) en cada visita para la vacuna (antes de la vacuna), así como las semanas 0, 9 y 33. Las PBMC aisladas con Ficoll se crioconservaron en dimetilsulfóxido al 10 %/FBS al 90 %.

7.7.1.7 Ensayos ELISPOT

Los ensayos por inmunoadsorción ligados a enzima de puntos (ELISPOT) se realizaron como se describió anteriormente (véase, por ejemplo, Kirkwood et al, Clin. Cancer Res., 15: 1443-1451, 2009) con ligeras modificaciones. Brevemente, las muestras de PBMC agrupadas se evaluaron simultáneamente después de la estimulación *in vitro* con PBMC irradiadas autólogas cargadas con IL-13Rα₃₄₅₋₃₅₃, EphA2₈₈₃₋₈₉₁, GP 100₂₀₉₋₂₁₇ y YKL-40₂₀₂₋₂₁₁ de tipo silvestre durante una semana. Una respuesta ELISPOT positiva se definió como un aumento de 2 veces en las células T formadoras de puntos sobre el nivel de pre-vacuna y por lo menos 10 puntos/20.000 células en por lo menos dos puntos de tiempo a la vacuna consecutivos posteriores contra cualquier antígeno.

7.7.1.8 Ensayos de tetrámero

HLA-A*0201/ALPFGFILV conjugada con ficoeritrina (PE) (SEQ ID NO: 3) (tetrámero IL-13Rα2), HLA-A*0201/IMDQVPFSV (SEQ ID NO: 11) (tetrámero de gp100) y HLA-A*0201/TLADFDPRV (SEQ ID NO: 6) (tetrámero EphA2) fueron producidos por las instalaciones de tetrámeros del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas dentro del Centro de Vacunas de la Universidad de Emory (Atlanta, GA) utilizando el péptido sintetizado por Planta de producción de péptidos de la Universidad de Pittsburgh. CD8 antihumano conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se obtuvo de BD Biosciences. Se definió que una única respuesta positiva de punto temporal para un péptido (0,1+B) % de todas las células CD8+ positivas por ensayo tetrámero (véase, por ejemplo, Weber et al, J Immunother., 31: 215-23, 2008 y Celis, Cancer, 110: 203-14, 2007), en el que B es el porcentaje positivo al inicio del estudio, que fue inferior al 0,01 % en todos los casos. Se consideró que un paciente había respondido si tenía 2 respuestas de puntos de tiempo individuales consecutivas para cualquier péptido.

7.7.1.9 Ensayos de **citoquinas y quimioquinas**

Se obtuvieron muestras de ARN total de PBMC utilizando el sistema de ARN de sangre PAXgene (PreAnalytix, Suiza). La RT-PCR se realizó por triplicado, y los valores se estandarizaron para GAPDH y la expresión relativa de los ARNm se calculó utilizando el procedimiento $\Delta\Delta C_T$ (véase, por ejemplo, Livak and Schmittgen, *Methods*, 25: 402-8, 2001). El ensayo basado en Luminex se realizó en muestras de suero como se describió anteriormente (véase, por ejemplo, Zczepanski et al, *Cancer Res.*, 69: 3105-3113, 2009). Las placas multiplexadas previamente probadas (Invitrogen) incluían curvas estándar y estándares de citoquinas (R&D Systems). En la hibridación in situ con sonda de ARNc radiomarcada para CXCL10 se realizó como se describe (véase, por ejemplo, Fallert and Reinhart, *J. Virol Methods*, 99: 23-32, 2002), con tiempos de exposición autorradiográficos de 14 días.

10 **7.7.1.10 Monitorización de respuesta radiológica**

El tamaño del tumor se evaluó en las semanas 9, 17, 25 y 33, y cada 3 meses a partir de ese momento se utilizaron IRM con mejora de contraste. La respuesta se evaluó según los criterios de McDonald por imágenes potenciadas en T1 potenciadas con gadolinio (Gd), área de prolongación de la señal en imágenes ponderadas en T2 o una combinación de ambas, en base a la aparición de la RMN de pretratamiento.

15 **7.7.1.11 Otros criterios de valoración clínicos**

La supervivencia general se definió por el intervalo desde el ingreso al estudio hasta la fecha de la muerte. Las imágenes de IRM se utilizaron para evaluar el tiempo hasta la progresión (TTP).

7.7.2 RESULTADOS**7.7.2.1 Resumen de toxicidades clínicas**

20 Los AE relacionados con el tratamiento se enumeran para los 22 pacientes en la Tabla 4. No hubo toxicidades de grado 3 o 4, no hubo muertes en el estudio ni DLT en ninguna dosis a través de la 1ª fase de refuerzo. No se encontraron incidencias de autoinmunidad. Los perfiles de toxicidad fueron comparables en todos los niveles de dosis. Las reacciones en el lugar de inyección de grado 1 o 2 fueron las más comunes (82 %). Los síntomas similares a los de la gripe de grado 1, que incluyen fatiga (73 %), mialgia (32 %), fiebre (23 %), escalofríos/rigores (18 %) y dolor de cabeza (32 %), fueron frecuentes y generalmente se limitaron a 24 horas después de cada vacuna. La linfopenia de grado 2 se registró en un paciente (5 %).

Tabla 4

Acontecimiento adverso	Grado 1		Grado 2	
	No.	%	No.	%
Sangre/médula ósea				
Leucocitopenia			1	5
Reacciones en el lugar de inyección.				
Enrojecimiento, induración, prurito, dolor.	17	77	1	5
Síntomas constitucionales				
Fatiga (letargo, malestar, astenia)	16	73		
Fiebre	5	23		
Escalofríos/Rigores	4	18		
Náusea	7	32		
Vómito	1	5		
Dolor de cabeza	5	23	2	9
Insomnio	1	5		
Mareo/vértigo	2	9		

(continuación)

Acontecimiento adverso	Grado 1	Grado 2	Acontecimiento adverso	Grado 1
	No.	%		No.
Mialgia	7	32		
Dolor corporal	6	27		
Dermatológico				
Erupción cutánea	3	14		
Piel seca	1	5		
Moretones	2	9		
Urticaria	1	5		
Pulmonar/respiratorio superior				
Rinitis/secreción nasal	1	5		

Todos los AE que se enumeraron fueron posiblemente, probablemente o definitivamente relacionados con la vacuna y/o la administración de poli ICLC. Los números representan el número de pacientes (de 22) que se sometieron a un evento particular en cualquier momento durante el período de tratamiento, con el grado más alto reportado para cualquier individuo. No se observaron eventos de grado 3 o grado 4 relacionados con el tratamiento hasta la 1ª fase de refuerzo. Un paciente (paciente 6) demostró urticaria sistémica de grado 2 después de la inyección número 154 de poli-ICLC durante la 2ª fase de refuerzo; esto fue considerado como DLT. Sin embargo, debido a que la relación no estaba clara y el paciente estaba libre de progresión durante 22 meses en ese momento, según la aprobación del IRB, el paciente fue tratado nuevamente con vacunas de refuerzo y poli-ICLC después de la medicación previa con clorhidrato de difenhidramina oral, y nunca demostró reacciones similares de nuevo.

7.7.2.2 Producción de IL-12 por α DC1

5 Como se muestra en las Tablas 3A-3B, los niveles de producción de IL-12 p70 inducida por CD40L por α DC1 variaron sustancialmente entre los pacientes, y se correlacionaron positivamente con la TTP ($p = 0,0255$; Figura 10) pero no con la respuesta ELISPOT de IFN- γ , la edad de los pacientes o tipos de tumores

7.7.2.3 Inducción de respuestas inmunitarias específicas de epítipo contra GAAs

10 Los 19 pacientes que completaron el curso inicial de 4 vacunas tenían PBMC disponibles para la monitorización inmunológica. No se obtuvieron PBMC suficientes de los pacientes 17, 21 y 22 para realizar los ensayos ELISPOT y tetrámero; y se priorizaron los ensayos ELISPOT funcionales. Las primeras 4 vacunas programadas indujeron reactividad inmune a por lo menos una de las GAA dirigidas a la vacuna en 6 de 10 y 5 de 9 en los niveles de dosis 1 y 2, respectivamente, ya sea por IF- γ ELISPOT o ensayos de tetrámero (Tablas 3A-3B). En los pacientes 6, 7, 8, 16, 19, 20 y 22, algunas lecturas alcanzaron los criterios de respuesta positiva después de vacunas de refuerzo (indicadas por § en la Tabla 3B). En resumen, 11 de 19 (58 %) pacientes evaluables mostraron respuesta positiva después de las 4 vacunas iniciales, y 3 de 19 (Pacientes 8, 19 y 20; 16 %) mostraron respuesta positiva solo después de vacunas de refuerzo.

15 Las tasas de respuesta positiva (ya sea por tetrámero o ELISPOT) no mostraron diferencias significativas entre las dos dosis de α DC1 según la prueba exacta de Fisher. Adicionalmente, las magnitudes de la respuesta de ELISPOT, en base a la suma de puntos positivos de la semana 3 a la 9, fueron comparables en los dos niveles de dosis de α DC1 (prueba de Wilcoxon). Por lo tanto, el curso temporal de las respuestas de IFN- γ ELISPOT se presenta combinando los resultados de ambos niveles de dosis (Figura 11). El epítipo gp100 demostró la mayor magnitud de respuesta entre los péptidos GAA analizados ($p=0.0001$, 0.0003 y 0.0005 contra los péptidos derivados de IL-13R α 2, EphA2 y YKL-40, respectivamente, mediante la prueba de Wilcoxon). Para los otros epítipos, las vacunas de refuerzo parecían mejorar la inducción de respuestas específicas. En general, se observó una disminución temporal de las respuestas en la semana 13, lo que puede reflejar que algunos pacientes que demostraron respuestas positivas en la semana 9 no participaron en la fase de refuerzo debido a la progresión del tumor (pacientes 2, 9, 18 y 21) o linfopenia (paciente 10), lo que resulta en una reducción general de la respuesta cuando los datos se agrupan para todos los pacientes. El paciente 10 demostró la mayor magnitud de las respuestas ELISPOT de IFN- γ frente a los epítipos derivados de IL-13R α 2 y gp 100, así como PADRE (Figura 12), pero los análisis de tetrámeros en este

paciente no dieron respuestas (Tabla 3A). El paciente 6, que demostró una enfermedad estable durante más de 30 meses, desarrolló respuestas duraderas y de alto nivel en los ensayos de tetrámero (Figura 13) y ELISPOT.

7.7.2.4 Inducción de las respuestas de citoquinas y quimioquinas tipo 1

5 Los análisis de RT-PCR de PBMC (Figura 14 y 15) revelaron una regulación en aumento de la expresión del ARNm para varias citoquinas y quimioquinas de tipo 1, específicamente IFN- α 1, CXCL10 y TLR3, tanto en la 1ª vacuna posteriormente como en la 4ª vacuna posterior. Se encontró que el IFN- γ estaba regulado en aumento después de la 4ª vacuna, pero no después de la 1ª vacuna, lo que sugiere que la regulación en aumento de IFN- γ puede estar asociada con la inducción de adaptación, en lugar de respuesta inmunitaria innata. El CCL22, que se sabe que atrae células T reguladoras (véase, por ejemplo, Muthuswamy et al., Cancer Res. 68: 5972-5978, 2008), y los niveles de CCL5 disminuyeron en los análisis pareados de muestras de 1ª vacuna posterior. Los niveles de *Perforin*, *Granzyme B*, *COX-2* y *Foxp3* no cambiaron significativamente.

15 Se evaluó un panel de citoquinas y quimioquinas a niveles de proteína en muestras de suero disponibles previas a la vacuna y posteriores a la vacuna de 5 pacientes (Figura 16). Entre ellos, IFN- α , CXCL10, IL-15, MCP-1 y MIP-1 β fueron significativamente regulados el aumento en sueros posterior a vacuna. La IL-17 estaba bajo intervalos detectables tanto en la RT-PCR como en los análisis de suero.

20 Adicionalmente, tres de los cinco tumores disponibles resecados debido a la progresión de la radiografía posterior a la vacuna expresaron el ARNm para CXCL10, que es una quimioquina crítica para el tráfico efectivo de células T CD8+ a sitios de tumores cerebrales (véase, por ejemplo, Nishimura et al., Cancer Res 66: 4478-4487, 2006 y Fujita et al., Cancer Res 69: 1587-1595, 2009) (Figura 17 para un caso representativo). Estos datos sugieren que el régimen actual induce respuestas inmunitarias sistémicas y multifuncionales en pacientes generalmente inmunodeprimidos con glioma maligno.

7.7.2.5 Datos de inmunohistoquímica

25 Los datos de inmunohistoquímica para 7 casos de GAA se resumen en la Tabla 5. Estos datos sugieren que la expresión de gp 100 puede ser muy baja en los gliomas primarios de grado alto. Para la inmunohistoquímica, se utilizaron los siguientes anticuerpos policlonales (Ab) y el Ab secundario correspondiente: IL-13R2 anti-humano (h) (IgG de cabra; R&D Systems); EphA2 antihumano (H-77) (IgG de conejo; Santa Cruz Biotechnology); YKL-40 antihumano (IgG de conejo; Quidel) y gp100 antihumano (IgG de cabra; Santa Cruz Biotechnology).

TABLA 5

Caso #	Vacuna previa versus posterior	IL-13R α 2	EphA2	YKL-40	gp100
1 (GBM)	Pre	2*	3*	2	0*
	Post	2*	1*	2	0*
2 (GBM)	Pre	1*	2*	1	0*
5 (GBM)	Post	1	2	2	1
9 (AO)	Pre	1*	2	1	0*
	Post	1*	1	1	0*
10 (GBM)	Post	2*	1	2	0*
12 (AO)	Pre	2	2	1	1*
14 (GBM)	Pre	3	2	2	0

La expresión de cada GAA se calificó de la siguiente manera: grado 0, negativo; 1, débilmente positivo; 2, moderadamente positivo; 3, muy positivo. Los números con asteriscos indican que el paciente se demostró respuesta positiva a ELISPOT o tetrámero contra el antígeno. La vacuna previa no significa que los tejidos tumorales se obtuvieron inmediatamente antes de la vacunación, sino que se obtuvieron en puntos de tiempo variables antes de la vacuna, incluyendo la biopsia de diagnóstico inicial o la resección. Del mismo modo, los tejidos posteriores a la vacuna se obtuvieron en puntos de tiempo variables después de la última vacuna porque no siempre estaba indicada la resección.

7.7.2.6 Resultados clínicos

30 Dos pacientes (pacientes 1 y 20) se sometieron a regresiones clínicas objetivas de tumores (tasa de respuesta = 9 %). Ambos pacientes fueron no respondedores por ELISPOT, pero respondieron al tetrámero. El paciente 20 con

GBM recurrente demostró una respuesta completa basada en la desaparición de la masa potenciada con Gd en la semana 17 después de la vacuna en comparación con la IRM de referencia, que fue duradera y continua durante por lo menos 13 meses desde el inicio del tratamiento (Figura 18A-I). El paciente 1 con GBM recurrente exhibió una respuesta parcial en la semana 9. Después de dos vacunas de refuerzo, la lesión aumentada con Gd aumentó. Sin embargo, la biopsia de la lesión reveló una infiltración intensiva de células T CD8+ y macrófagos CD68+ y no hay evidencia de tumor mitóticamente activo (Figura 18J-L). Luego, este paciente recibió una vacuna adicional antes de la recurrencia a los 7 meses después de la vacuna inicial. Nueve pacientes (41 %; 4 y 5 con GBM y AG, respectivamente) estuvieron libres de progresión durante por lo menos 12 meses. Cinco pacientes permanecieron libres de progresión (Tabla 3A) y continuaron recibiendo vacunas de refuerzo. La TTP mediana es de 4 y 13 meses para GBM y AG, respectivamente (Figura 20).

7.7.3 Conclusión

El estudio descrito en este Ejemplo evaluó otras vacunas basadas en α DC1 cargadas con nuevos péptidos derivados de GAA, en combinación con poli-ICLC. Los resultados demuestran la seguridad y la inmunogenicidad, así como la eficacia preliminar de la metodología.

15 7.8 Ejemplo 8

Este ejemplo describe un estudio de la seguridad y la eficacia de un régimen terapéutico para adultos con gliomas recurrentes grado II OMS que comprende la vacunación con antígeno-péptidos de glioma restringido por HLA-A2 en combinación con poli-ICLC.

7.8.1 Argumentos

Este ejemplo describe un régimen de vacunación que se diseña para inducir eficazmente respuestas de células T antitumorales en pacientes con glioma recurrente grado II OMS. El régimen combina las inyecciones subcutáneas de péptidos-epitopo de linfocitos T citotóxicos (CTL) derivados del antígeno asociado a glioma (GAA) con la administración intramuscular simultánea (i.m.) de poli-ICLC.

Los adultos con glioma supratentorial de bajo grado (LGG) tienen un riesgo significativo (24 %) de progresión tumoral 2 años después del tratamiento con cirugía o cirugía seguida de terapia de radiación (RT). El estudio descrito en este Ejemplo tiene un potencial inmunoproláctico e inmunoterapéutico para reducir el riesgo de recurrencia del tumor, lo que puede traducirse en una mejora de supervivencia. Terapéuticamente, la metodología de inmunoterapia puede suprimir la expansión de las células tumorales neoplásicas de bajo grado II de crecimiento indolente. Profilácticamente, la metodología puede evitar la transformación anaplásica, que se produce en aproximadamente la mitad de los LGG recurrentes. La tasa de crecimiento más lenta de LGG (en contraste con los gliomas malignos) debería permitir suficiente tiempo para repetir las inmunizaciones múltiples, lo que puede conducir a la inducción de altos niveles de inmunidad específica para GAA. Adicionalmente, se ha demostrado que el poli-ICLC aumenta los efectos de la vacuna en modelos de tumores cerebrales preclínicos (véase, por ejemplo, Zhu et al., *J. Transl. Med.*, 5: 10, 2007), y para ser seguro en pacientes con glioma maligno (véase, por ejemplo, Salazar et al., *Neurosurgery*, 38: 1096-1 103, 1996). Por lo tanto, suponemos que esta forma de vacuna en combinación con el tratamiento con poli-ICLC inducirá una potente respuesta inmunitaria anti-glioma, y será segura.

7.8.2 Objetivos

Este ejemplo describe un estudio de vacunas en adultos con glioma recurrente grado II OMS. Los objetivos de este ejemplo incluyen la recolección de datos inmunológicos y de seguridad que se pueden utilizar en estudios adicionales. Los pacientes en el estudio descrito en este Ejemplo pueden seguirse durante un mínimo de 2 años, de tal manera que se puedan determinar las tasas reales de supervivencia general (OS) a los 2 años y supervivencia libre de progresión (PFS) a los 6 meses y 2 años de manera exploratoria.

7.8.2.1 Inducción de respuesta de células T específicas de GAA

La tasa de respuesta y la magnitud de la respuesta inmunitaria en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) después de la vacuna contra los péptidos GAA en respuesta a esta forma de vacuna se pueden determinar utilizando el sistema inmunológico unido a enzimas IFN- γ (ELISPOT) y los ensayos de tetrámero.

7.8.2.2 Seguridad

La incidencia y la gravedad de los eventos adversos asociados con el régimen de la vacuna se pueden evaluar, con una regla de interrupción temprana basada en la frecuencia de Toxicidad que Limita el Régimen (RLT).

50 7.8.2.3 Respuesta clínica

La respuesta radiológica se puede determinar utilizando los criterios estándar de respuesta de la OMS. La supervivencia libre de progresión (PFS) de 6 meses y 2 años se puede evaluar de manera exploratoria, en base a las exploraciones de imágenes de resonancia magnética (IRM) en serie.

7.8.2.4 Tejidos tumorales para correlatos biológicos.

Para los pacientes que desarrollan progresión, se puede recomendar una biopsia/resección. Siempre que haya tejidos tumorales disponibles después de la vacuna, se pueden analizar el estado de expresión de GAA y la infiltración de células T específicas de GAA.

5 7.8.3 Selección de pacientes

7.8.3.1 Criterio de elegibilidad

10 Criterios patológicos: Los pacientes tienen astrocitoma, oligoastrocitoma u oligodendroglioma supratentorial recurrente grado II de la OMS que se confirma histológicamente ya sea por la biopsia o la resección previas, o en el momento de la reoperación (se permite la reintervención antes de ingresar al estudio actual; sin embargo, el Decadrón después de cirugía debe estar apagado durante por lo menos 4 semanas antes de la administración de la primera vacuna). Los pacientes en este estudio deben haber recibido radioterapia de haz externo y/o quimioterapia. Con respecto a la terapia anterior, los pacientes en este estudio deben haber recibido tratamiento por no más de 2 recaídas previas. La recaída se define como la progresión después de la terapia inicial (es decir, radiación +/- quimio si se utilizó como terapia inicial). Por lo tanto, la intención es que los pacientes en este estudio hayan tenido 3 15 terapias previas (terapia inicial y tratamiento para 2 recaídas). Si el paciente tuvo una resección quirúrgica por enfermedad recurrente y no se instituyó una terapia anticancerosa hasta por 12 semanas, y el paciente se somete a otra resección quirúrgica, esto se considera como 1 recaída.

Los pacientes en este estudio deben ser positivos para HLA-A2 en base a la citometría de flujo.

20 Los pacientes en este estudio deberían haberse recuperado de los efectos tóxicos de la terapia previa: 4 semanas a partir de cualquier agente en investigación, 4 semanas de la terapia citotóxica previa y/o por lo menos dos semanas de vincristina, 4 semanas de nitrosoureas, 3 semanas de la administración de procarbazona y 1 semana para agentes no citotóxicos, por ejemplo, interferón, tamoxifeno, talidomida, ácido cis-retinoico, etc. (el radiosensibilizador no cuenta). Con respecto a la terapia de radiación (RT) anterior, debe haber por lo menos 6 meses desde la finalización de la RT (o radiocirugía).

25 Los pacientes en este estudio deben ser mayores de 18 años.

Los pacientes en este estudio deben tener un estado de rendimiento de Karnofsky de >60 (Apéndice I).

Las pacientes mujeres en este estudio en edad fértil deben haber documentado β HCG en suero negativo.

30 Los pacientes en este estudio deben estar libres de infección sistémica. Los pacientes con infecciones activas (ya sea que requieran o no terapia con antibióticos) pueden ser elegibles después de la resolución completa de la infección. Los pacientes en tratamiento con antibióticos deben dejar de tomar antibióticos durante por lo menos 7 días antes de comenzar el tratamiento.

35 Los pacientes en este estudio deben tener una función orgánica adecuada, medida por un recuento de glóbulos blancos $\geq 2500/\text{mm}^3$; linfocitos $\geq 400/\text{mm}^3$; plaquetas $\geq 100.000/\text{mm}^3$, hemoglobina $\geq 10,0$ g/dL, AST, ALT, GGT, LDH, fosfatasa alcalina dentro de 2,5 x límite normal superior y bilirrubina total $\leq 2,0$ mg/dL, y creatinina en suero dentro de 1.5 X límite superior de límite normal. Los pacientes en este estudio deben realizarse pruebas de coagulación y el PT y el PTT deben estar dentro de los límites normales.

7.8.3.2 Criterio de exclusión

Los pacientes en este estudio deben ser excluidos si tienen presencia de gliomatosis cerebral, enfermedad metastásica leptomeningea craneal o espinal.

40 Incluso si el diagnóstico inicial fue el glioma grado II OMS, si el diagnóstico patológico de la enfermedad recurrente demuestra una transformación a un grado más alto (es decir, Gliomas grado III o IV de la OMS), los pacientes deben ser excluidos de este estudio.

45 Los pacientes en este estudio deben ser excluidos si se someten a un tratamiento o medicamentos concurrentes que incluyen: terapia de radiación; quimioterapia; interferón (por ejemplo, Intron-A®); inyecciones desensibilizantes de alergia; factores de crecimiento (por ejemplo, Procrit®, Aranesp®, Neulasta®); interleuquinas (por ejemplo, Proleukin®); y/o cualquier medicamento terapéutico en investigación.

50 Los pacientes en este estudio no deben haber tenido trastornos autoinmunitarios previos que requieran terapia citotóxica o inmunosupresora, o trastornos autoinmunitarios con compromiso visceral. Los pacientes en este estudio con un trastorno autoinmunitario activo que requiere estas terapias también deben ser excluidos. La artritis leve que requiere medicamentos NSAID no debe ser excluyente.

Los pacientes en este estudio deben ser excluidos si han utilizado inmunosupresores dentro de las cuatro semanas previas al ingreso al estudio o si anticipan el uso de agentes inmunosupresores. Dexametasona u otros

medicamentos corticosteroides, si se utilizan durante el período perioperatorio y/o durante la radioterapia, deben ser reducidos por los pacientes y ser suspendidos por lo menos cuatro semanas antes de la administración de la primera vacuna en el estudio. Los corticosteroides tópicos y los esteroides inhalados (por ejemplo: Advair®, Flovent®, Azmacort®) deben ser aceptables.

5 Los pacientes en este estudio deben ser excluidos si tienen otro diagnóstico de cáncer, excepto que pueden permitirse los siguientes diagnósticos: cáncer de células epidermoides de la piel sin metástasis conocida; cáncer de células basales de la piel sin metástasis conocida; carcinoma in situ de la mama (DCIS o LCIS); carcinoma in situ del cuello uterino; y/o cualquier cáncer sin metástasis a distancia que haya sido tratado con éxito, sin evidencia de recurrencia o metástasis durante más de 5 años.

10 Los pacientes en este estudio deben ser excluidos si tienen una adicción conocida al alcohol o fármacos ilícitos.

Debido a que no se espera que los pacientes con deficiencia inmunitaria respondan a esta terapia, los pacientes positivos a VIH deben ser excluidos del estudio.

7.8.4 Vacuna de péptidos

7.8.4.1 Péptidos

15 Los siguientes péptidos se pueden incluir en la formulación de la vacuna: IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ 1A9V (ALPFGFILV; SEQ ID NO:3); EphA2₈₈₃₋₈₉₁ (TLADFDPRV; SEQ ID NO:6); Survivin₉₆₋₁₀₄: M2 (LMLGEFLKL; SEQ ID NO:7); WT1₁₂₆₋₁₃₄:Y1 (YMFNPAPYL; SEQ ID NO:8); y toxoide tetánico (TetA830) (AQYIKANSKFIGITEL; SEQ ID NO:9).

20 Todos los péptidos se pueden sintetizar y los péptidos sintéticos se pueden purificar por HPLC. La identidad de los péptidos sintéticos se puede confirmar al verificar su masa y secuencias de aminoácidos por espectrometría de masas. Cada lote de péptido se puede evaluar según lo requiera la FDA para determinar su identidad, pureza, esterilidad y pirogenicidad.

Los péptidos se pueden depositar bajo condiciones de GMP y guardarse a -70 °C. La estabilidad de los péptidos liofilizados se puede probar anualmente mediante espectroscopia de masas.

7.8.4.2 Otros agentes

25 Se puede utilizar Montanide ISA-51 (SEPPIC Inc., Fairfield, NJ) como un agente adicional en las vacunas de péptidos.

7.8.4.3 Dosificación y preparación

30 Una solución acuosa (500 μ L) que contiene cada uno de los cuatro péptidos GAA restringidos por HLA-A2 (300 μ g/péptido) y el péptido tetánico (Péptido-tet; 200 μ g) se puede mezclar 1/1 con Montanide ISA-51 para formar una emulsión de agua en aceite (es decir, el volumen/inyección total es de 1 ml).

7.8.4.4 Administración

35 Los pacientes en este estudio pueden vacunarse por vía subcutánea en la parte superior derecha o izquierda de los brazos con nódulos axilares de drenaje intactos. En caso de que los pacientes no posean nódulos linfáticos axilares intactos como nódulos de drenaje, las vacunas se pueden administrar en la parte superior del muslo del mismo lado con nódulos linfáticos inguinales intactos.

La vacuna se puede administrar en las semanas 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21.

7.8.5 Poli-ICLC

40 El Poli-ICLC se puede preparar y empaquetar en las instalaciones GMP de Bioserv, Corporation (San Diego, California). El Poli-ICLC se puede suministrar en frascos que contengan 1 cc de solución translúcida con una concentración de 2 mg por cc. El Poli-ICLC es estable a temperatura ambiente durante varios días, pero se puede almacenar refrigerado a aproximadamente 4,44 °C.

7.8.5.1 Dosificación y administración

El poli-ICLC se puede administrar por vía intramuscular en dosis de 20 μ g/kg y hasta 1640 μ g/inyección), con dos inyecciones en los días 0 y 4 después de cada vacunación.

45 El primer ciclo de administración de poli-ICLC (20 μ g/kg i.m. y hasta 1640 μ g/inyección) se puede administrar el día de la primera vacuna de GAA/TT y el día 4 después de la vacuna. Para cada una de las siguientes vacunas repetidas (en las semanas 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21), se puede administrar poli-ICLC (20 μ g/kg i.m. y hasta 1640 μ g/inyección) en el día de la vacuna y en el día 4 después de la vacuna.

Con respecto a los sitios de inyección, dado que se espera que el poli-ICLC mejore el proceso de presentación del antígeno en los ganglios linfáticos de drenaje, el poli-ICLC se debe administrar i.m. en la vecindad del sitio de inyección de péptidos anterior (por ejemplo, a menos de 3 cm del centro de los sitios de inyección de péptidos anteriores).

- 5 El poli-ICLC se debe administrar por vía intramuscular (i.m.) utilizando una técnica estéril, que se suministra del frasco, y en la cantidad prescrita para el peso del paciente (hasta 1640 µg/inyección). Los signos vitales se pueden controlar antes y durante por lo menos 20 minutos después del primer tratamiento.

7.8.6 Plan de tratamiento

- 10 El estudio descrito en este Ejemplo puede emplear dos cohortes de pacientes para evaluar la inmunogenicidad, la seguridad y la eficacia clínica de la vacuna con péptido GAA/TT y poli-ICLC en pacientes HLA-A2+ con gliomas recurrentes grado II OMS. Debido a que la vacuna de péptido está secuestrada localmente, y la respuesta inmunitaria se produce principalmente localmente y en los ganglios linfáticos de drenaje, la dosis de la vacuna no se debe ampliar proporcionalmente al tamaño (por peso o área de superficie corporal) del receptor, como se podría hacer para un fármaco cuyo efecto está relacionado con su distribución en los fluidos corporales. Respecto a la
15 dosis de poli-ICLC, se puede emplear una dosis fija (20 µg/kg/inyección y hasta 1640 µg/inyección), que se ha demostrado que es seguro e induce respuestas biológicas en pacientes con glioma maligno (véase, por ejemplo, Salazar et al., Neurosurgery, 38: 1096-1 103, 1996).

7.8.6.1 Programación

- 20 Los pacientes se pueden tratar con inyecciones subcutáneas de vacunas de GAA TT en las semanas 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21. Se puede administrar poli-ICLC i.m. (20 µg/kg i.m. y hasta 1640 µg) en el día de y el día 4 después de cada vacuna (por ejemplo, si se administra la vacuna el jueves, se puede administrar poli-ICLC el día de la vacuna y el lunes siguiente). Cada vacuna se puede administrar dentro de 2 horas antes o después de la administración de poli-ICLC i.m.

- 25 Los pacientes se pueden evaluar por cualquier posible evento adverso, Toxicidad que Limita el Régimen (RLT), así como respuestas clínicas/radiológicas mediante visitas clínicas y exploraciones de IRM. Las exploraciones de IRM se pueden realizar en las semanas 0, 12 y 24. Si la exploración en la semana 12 demuestra una progresión tumoral inequívoca, el paciente puede ser retirado.

- 30 Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas antes de la vacuna inicial se pueden utilizar como muestra de referencia. Si los pacientes demuestran alguna respuesta positiva en los dos ensayos inmunológicos (ELISPOT o Tetrámero sin RLT o progresión tumoral, a estos pacientes se les pueden ofrecer vacunas de GAA/TT adicionales (véase, por ejemplo, la Sección 7.8.6.2) comenzando en cualquier momento entre la Semana 34-40, y cada 3 meses a partir de entonces hasta que los pacientes demuestren progresión de tumores, pérdida de respuesta inmunitaria o RLT.

7.8.6.2 Terapia adicional

- 35 En las Semanas 0 (valor de referencia), 12, 15, 18, 21 y 24, las PBMC de pacientes se pueden evaluar para detectar la presencia de respuestas de células T específicas de GAA contra los péptidos de GAA. Si se observa una respuesta de este tipo para cualquiera de los péptidos GAA, el paciente puede someterse a vacunaciones adicionales con el (los) GAA que demostraron la respuesta persistente, así como el poli-ICLC comenzando en cualquier momento entre la semana 34-40 y cada 12 semanas a partir de entonces hasta 2 años desde la
40 vacunación inicial. Se pueden obtener muestras de PBMC adicionales cada 12 semanas (en las mismas visitas para las administraciones de vacunas) para la monitorización inmunológica. Las vacunas adicionales se pueden terminar en cualquiera de las siguientes condiciones: 1) progresión del tumor; 2) RLT; o 3) respuesta inmunológica negativa en dos puntos de tiempo consecutivos.

7.8.6.3 Modificación de dosis

7.8.6.3.1 Modificación de dosis de poli-ICLC

- 50 Para cualquier síntoma similar a la gripe de Grado 2 o superior, que incluye la fiebre y la fatiga, la poli-ICLC se puede suspender hasta que los síntomas regresen al Grado 0. Si se presentan síntomas de Grado 2 o superior similares a los de la gripe el día de la vacunación, y si los síntomas no regresan al Grado 0 el día 4 después de la vacunación, se puede omitir la siguiente administración de poli-ICLC el día 4 después de la vacunación. Si el
55 paciente no tiene síntomas el día 4 (grado 0), la poli-ICLC se puede reanudar al 50 % de la dosis original. Si se presentan síntomas de grado 2 o superior similares a los de la gripe después de la administración de poli-ICLC en el día 4 después de la vacunación, en el siguiente ciclo de la vacuna, se pueden proporcionar dos administraciones de poli-ICLC (en los días 0 y 4 después de las vacunas) al 50 % de la dosis original. Se puede administrar un tratamiento previo con acetaminofén 650-1000 mg o con cualquier NSAID. Si la dosis adicional es bien tolerada, la dosis original se puede volver a instituir posteriormente.

En el caso de la elevación de la enzima hepática >4x valor de referencia, o cualquier otro efecto secundario intolerable imprevisto de grado 2 o mayor, el poli-ICLC se puede suspender hasta que la toxicidad se haya reducido a grado 1 o menos. El poli-ICLC se puede volver a administrar a la mitad de la dosis original y el paciente puede ser observado de cerca. Si el poli-ICLC no puede reiniciarse en el próximo ciclo de la vacuna, el paciente puede ser retirado para el RLT.

Para los pacientes que demostraron grado 3 o menor grado de linfopenia en su ingreso al estudio (nuestro criterio de elegibilidad requiere 400 células/ μ L), la ocurrencia o presencia continuada de linfopenia de grado 3 durante el estudio no obliga a la suspensión de poli-ICLC. Sin embargo, el poli-ICLC puede suspenderse en caso de linfopenia de grado 4. También, si la atribución de poli-ICLC se sospecha fuertemente incluso para la linfopenia de grado 3, se pueden suspender las administraciones de poli-ICLC. En estos casos, se puede permitir la re-administración a la mitad de la dosis original cuando los recuentos de linfocitos absolutos regresen a por lo menos 400/ μ L.

Los pacientes pueden permanecer en la dosis original para toxicidades de grado 1. Sin embargo, la dosis puede reducirse al 50 % para la toxicidad hematológica o no hematológica de grado 2 (excepto para la fiebre transitoria y la fatiga como se describió anteriormente en esta sección). Si al nivel de dosis del 50 % no hay toxicidad durante un mínimo de 2 semanas, la dosis puede escalar nuevamente a la dosis inicial. Las toxicidades posteriores, en caso de que ocurran, pueden requerir una reducción de la dosis al 50 %, y no se pueden permitir más escalas. Si la toxicidad vuelve a ocurrir a la dosis reducida, el paciente puede ser retirado del tratamiento.

7.8.6.3.2 Retraso en la dosificación de las vacunas de péptidos

En circunstancias en la que la administración de poli-ICLC se suspende, si el evento no es atribuible a la vacuna de péptidos/ISA-51, las administraciones de vacunas no se pueden suspender. Si el evento es atribuible tanto a las vacunas de poli-ICLC como a las de péptidos, ambas se pueden suspender. Si se considera que un evento adverso se debe únicamente a las vacunas de péptidos/ISA-51, pero no a poli-ICLC, se pueden suspender las administraciones de vacuna y poli-ICLC. En circunstancias donde la evaluación de un evento adverso es limitada, tales como por enfermedad intercurrente, o cuando se requieren estudios de laboratorio para evaluar otras causas de toxicidad, el programa de vacunación se puede interrumpir hasta 4 semanas. El retraso en la administración de una vacuna hasta 4 semanas no se considerará una violación del protocolo si se debe a un evento adverso, independientemente de la atribución. Si una o más vacunas se retrasan 4 semanas debido a un evento adverso, independientemente de la atribución, el tratamiento se debe interrumpir.

Los pacientes pueden ser observados por una toxicidad que limita el régimen (RLT) a lo largo del estudio. Se considera que los siguientes son RLT si se los juzga posiblemente, probablemente o definitivamente asociados con el tratamiento. En caso de que ocurran, los pacientes individuales pueden ser retirados del estudio y no se pueden proporcionar más inyecciones.

Broncoespasmo o urticaria generalizada (hipersensibilidad) \geq grado 2 o superior.

Reacción alérgica \geq Grado 2 o superior, tal como eritoderma exfoliativa, anafilaxia o colapso vascular.

Enfermedad autoinmunitaria de (por ejemplo, hipotiroidismo, encefalitis autoinmunitaria) \geq grado 2 o superior.

Cualquier toxicidad \geq de grado 3 posiblemente, probablemente o definitivamente relacionada con la vacuna, con especial atención a los siguientes eventos.

Reacción en el lugar de inyección \geq grado 3 debido a la administración de péptido-vacuna o poli-ICLC.

Toxicidad hepática o hepática \geq grado 3.

Neurotoxicidad \geq grado 3: signos y síntomas que pueden indicar una progresión tumoral o una respuesta inmunitaria inflamatoria (es decir, una progresión pseudo-tumoral) que requiere una biopsia o resección con hallazgos patológicos de infiltración inflamatoria/linfocítica.

Las náuseas y vómitos \geq grado 3 sin suficiente profilaxis antiemética no se consideran RLT.

Retrasos en la dosificación > 4 semanas para las vacunas de poli-ICLC o péptidos.

La terapia se puede interrumpir por los siguientes motivos: (i) Toxicidad que limita el régimen, como se definió anteriormente; (ii) progresión de la enfermedad - por lo menos un aumento del 20 % en la suma del diámetro más largo de la lesión objetivo o la aparición de mejora de contraste en un tumor que anteriormente no había mejorado. Sin embargo, si se sospecha una progresión pseudo-tumoral, entonces se puede colocar al paciente en tratamiento con dexametasona, hasta 4 mg/día, y volver a tomar la imagen 4-8 semanas después. Si requieren >4 mg/día de dexametasona, o si su estudio de formación de imagen repetida continúa cumpliendo con los criterios de progresión de la enfermedad, el paciente puede ser retirado del estudio y puede suspenderse el tratamiento adicional. Sin embargo, si su dosis de esteroides es <4 mg/día y si su formación de imagen repetida no cumple con los criterios para la progresión de la enfermedad, el paciente puede continuar en el estudio y recibir el tratamiento del estudio tal como se prescribe en la presente memoria. Todos los casos de sospecha de progresión tumoral o pseudo-tumor se

deben revisar para determinar si el sujeto debe permanecer en el estudio, (iii) Enfermedad intercurrente que evita la administración adicional de la vacuna o la administración de poli-ICLC, (iv) Embarazo: se continuará siguiendo a las pacientes embarazadas durante la duración del embarazo.

7.8.6.4 Duración del tratamiento

- 5 En ausencia de retrasos en el tratamiento debido a eventos adversos, el tratamiento puede continuar durante 21 semanas (8 vacunaciones) o hasta que se aplique uno de los siguientes criterios: Toxicidad que limita el régimen (RLT); progresión de la enfermedad; y/o enfermedad intercurrente que evita la administración adicional del tratamiento.

7.8.6.5 Tratamiento concomitante

10 7.8.6.5.1 Aceptable

Para la fiebre, se puede utilizar acetaminofén (comprimidos de 325 mg, 1 o 2 p.o. cada 4 horas). El tratamiento previo de los pacientes con acetaminofén puede ser instituido como justificado por los efectos secundarios del poli-ICLC. Las fiebres que duran más de 8 horas después del tratamiento se pueden evaluar en términos de infección potencial.

- 15 Para el dolor local leve, se pueden planificar opiáceos orales (oxicodona, 5-10 mg p.o. cada 3-4 horas). El dolor que es más del grado leve a moderado se puede investigar para buscar otras fuentes distintas a la terapia y controlarse de acuerdo con lo anterior.

20 La dexametasona (o medicamentos corticosteroides similares) no se debe utilizar durante por lo menos 4 semanas antes del inicio de la terapia de vacuna/poli-ICLC (Semana 0). Se puede utilizar dexametasona (hasta 4 mg/día) en el contexto de progresión de pseudo-tumor, y se reduce/descontinúa tan pronto como sea posible.

Los medicamentos anticonvulsivos se deben utilizar como se indica.

Se pueden administrar antieméticos, si es necesario.

- 25 Otros medicamentos aceptables pueden incluir: Corticosteroides tópicos; agentes antiinflamatorios no esteroideos; antihistamínicos (por ejemplo, Claritin®, Allegra®); medicamentos crónicos, excepto aquellos enumerados en la Sección 7.8.6.5.2; Vacunas contra la gripa (se deben administrar por lo menos dos semanas antes del inicio de las vacunas del estudio o por lo menos dos semanas después de la 8ª vacuna (última)); y/o medicamentos corticosteroides administrados por vía parenteral o por inhalación (por ejemplo: Advair®, Flovent®, Azmacort®).

7.8.6.5.2 Inaceptable

- 30 Los medicamentos inaceptables pueden incluir terapia con interferón (por ejemplo, Intrón-A®); quimioterapia; inyecciones desensibilizantes de alergia; factores de crecimiento (por ejemplo, Procrit®, Aranesp®, Neulasta®); interleuquinas (por ejemplo Proleukin®); otros medicamentos de investigación; y/o fármacos ilícitos.

7.8.7 Estudios correlativos/especiales

7.8.7.1 Monitorización inmunológica

7.8.7.1.1 Ensayos por inmunoadsorción ligados a enzima de puntos (ELISPOT)

- 35 Las frecuencias de los precursores de linfocitos T sensibles a antígenos asociados a glioma (GAA): en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) antes y después de la administración de la vacuna basada en el péptido GAA se puede medir mediante el ensayo ELISPOT. Las respuestas biológicas medidas por ELISPOT pueden realizarse en el mismo punto de tiempo por lo menos para un paciente individual para evitar la variabilidad inter-ensayos. La vacunación exitosa estimula poblaciones clonales de células T que son capaces de secretar citoquinas de una manera restringida por MHC específica de antígeno. El ensayo ELISPOT se puede utilizar para
- 40 evaluar las respuestas inmunitarias específicas de GAA de poblaciones de células T CD8+, así como las células T CD4+ que reaccionan contra el péptido TT auxiliar. Luego se puede evaluar la producción de IFN-γ para evaluar la respuesta de las células T tipo 1.

- 45 Se puede considerar que un sujeto ha respondido, si en cualquiera de los dos puntos de tiempo consecutivos posteriores a la vacuna contra el mismo antígeno[s] (semanas 12, 15, 18, 21 y 24), el número de puntos es el doble que en el valor de referencia, y hay por lo menos 10 puntos/20.000 células, y si el número de puntos después de la vacuna es por lo menos tres veces la desviación estándar del valor de la vacuna previa. La respuesta puede ser para cualquier antígeno.

7.8.7.1.2 Análisis de tetrámeros de células T reactivas a GAA en PBMC de pacientes

Los análisis de tetrámero permiten la evaluación de la presencia de células T CD8+ específicas de GAA en sangre periférica con una gran sensibilidad sin reestimulación *in vitro* de las células. Se espera, en base a los datos previos disponibles de pacientes con glioma maligno, que se pueda observar un aumento significativo (un registro o más) en la frecuencia de células T CD8+ sensibles a péptidos en algunos pacientes, pero no en todos, inmunizados con vacunas basadas en antígeno tumoral. De manera exploratoria, estas PBMC también se pueden evaluar para determinar la expresión en la superficie de un antígeno muy tardío del receptor de integrina(VLA)-4, que se ha implicado en conferir el retorno de células T en tumores del SNC (véase, por ejemplo, Zhu et al., J.Transl. Med., 5: 10, 2007) y receptores de quimioquinas (por ejemplo, CXCR3 y CCR5). Los procedimientos para el análisis de tetrámeros están bien establecidos.

Los ensayos de tetrámero se pueden realizar al inicio del estudio y en los 5 puntos de tiempo después de las vacunas (semanas 12, 15, 18, 21 y 24). Se puede definir una única respuesta positiva en el punto de tiempo para que un péptido sea (1 + B) % de todas las células CD8+ positivas por tetrámero, en el que B es el porcentaje positivo de referencia, que generalmente es menor que 0,1 %. En analogía con la definición de respuesta ELISPOT, se puede considerar que un paciente ha respondido si tiene dos respuestas de punto de tiempo consecutivas únicas para cualquier péptido.

7.8.7.1.3 Análisis citométricos de flujo de subconjuntos de linfocitos

Se pueden evaluar los números de células T CD4+ y CD8+, así como las células T reguladoras CD4+/Foxp3+ en los puntos de tiempo en serie antes y después de las vacunas.

7.8.7.1.4 Análisis de autoinmunidad en sueros.

Los sueros depositados se pueden evaluar para detectar la presencia de autoanticuerpos.

7.8.7.2 Evaluación de tejidos tumorales primarios y recurrentes

La expresión de GAA en los tejidos tumorales disponibles de los pacientes se puede evaluar (ya sea antes de la vacuna o después de la progresión después de las vacunas; o ambos) mediante inmunohistoquímica (IHC) y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

Si los tumores recurren después de las vacunas, puede ser crítico evaluar cómo los tumores escapan a los efectos de las vacunas. Con este fin, se pueden evaluar los siguientes problemas específicos tanto como lo permita la disponibilidad de tejido: (i) Pérdida de antígeno: se puede utilizar IHC y RT-PCR para evaluar si los tumores recurrentes expresan los GAA específicos, HLA-A2, y componentes de la maquinaria de procesamiento de antígenos, tales como el transportador asociado con el procesamiento de antígenos; (ii) regulación por aumento de las moléculas antiapoptóticas: aunque el survivina puede ser un objetivo, otras moléculas antiapoptóticas pueden estar reguladas en aumento, por ejemplo, cFLIP (proteína inhibidora FLICE celular (enzima convertidora IL-1 β similar al dominio de la muerte asociada a Fas)); y (iii) infiltración de células inmunitarias: una de las razones por las cuales los tumores pueden escapar a una respuesta inmunitaria inducida por la vacuna es la falla de las células T reactivas para infiltrarse en el tumor. Para examinar esto, siempre que se disponga de tejidos tumorales recientemente resecados (no fijados o congelados), se pueden aislar linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) y se puede caracterizar su número, fenotipo y especificidad de antígeno utilizando tetrámeros HLA-A2 para cada uno de los GAA. Utilizando la citometría de flujo de varios colores, la función y la viabilidad de los TILs de tetrámero* se pueden determinar mediante tinción para perforina/IFN- γ y Anexina-V, respectivamente. Los tejidos de control pueden incluir tumores previos a la vacuna (si están disponibles) y tumores recurrentes de pacientes que no están en el estudio. Estos estudios pueden permitir la evaluación de si las células T inducidas por la vacuna trafican eficientemente al sitio del tumor cerebral y mantienen su función y viabilidad.

7.8.8 Parámetros de estudio

Este estudio se puede realizar de forma ambulatoria, y los pacientes se evaluarán en las semanas 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24. Después de este período, si los pacientes no reciben vacunas adicionales, es posible que los pacientes se retiren del estudio y que se les haga un seguimiento clínico cada 2 a 4 meses a partir de entonces, como se suele hacer para los pacientes con el mismo tipo de tumor. Si se encuentra que los pacientes tienen tumores en progreso, se pueden ofrecer otras terapias, tales como quimioterapia o resección. Si los pacientes reciben vacunas adicionales, dichas vacunas adicionales se pueden administrar cada 12 semanas, y se puede realizar una monitorización clínica, inmunológica y radiológica (IRM) en cada visita (ql2 semanas) hasta que los pacientes se retiren. Los sujetos con una respuesta completa pueden volver a tratarse con dos vacunas adicionales, con intervalos de 12 semanas, y luego seguirlos. Las vacunas se pueden interrumpir para cualquier paciente con enfermedad progresiva o toxicidad inaceptable en cualquier momento durante las vacunaciones programadas.

7.8.8.1 Pretratamiento (datos de referencia y cribado)

Se pueden realizar los siguientes procedimientos antes de proceder con el tratamiento: Se debe obtener el consentimiento informado antes de iniciar el cribado; Tipificación de HLA (evaluación de citometría de flujo para la positividad de HLA-A2); documentación de diagnóstico (patológico); Historial completo y examen físico (con signos

vitales y peso), que incluyen exámenes neurológicos y estado de rendimiento; los sitios de la vacuna se deben designar con la confirmación de los ganglios linfáticos de drenaje intactos; se debe registrar la información demográfica; se deben evaluar los CBC y plaquetas con diferencial; se debe evaluar PT/PTT; Se debe evaluar la química, que incluye electrolitos, creatinina, nitrógeno ureico en sangre, glucosa, AST, ALT, Alk phos, bilirrubina total, LDH, calcio y albúmina; Se debe evaluar la GGT, el fósforo y el magnesio; se debe extraer sangre para los ensayos *in vitro*; se debe realizar HGBA1C para pacientes con diabetes mellitus; se debe realizar ECG y ecocardiograma en pacientes con síntomas cardíacos, antecedentes o enfermedad actual; se debe realizar un análisis de orina; se debe realizar una IRM del cerebro para evaluar el estado de referencia de la enfermedad; y/o mujeres en edad fértil se les debe administrar una prueba de embarazo de beta-HCG en suero.

10 7.8.8.2 Evaluación durante el tratamiento

Los siguientes procedimientos se pueden llevar a cabo a medida que avanza el tratamiento. La pre-administración (Semanas 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 antes de la administración de la vacuna el día de la vacunación): historia y examen físico, que incluyen signos vitales, peso, estado funcional de Karnofsky y función neurológica; se debe extraer sangre para los ensayos *in vitro*; Se debe evaluar la química, que incluye electrolitos, creatinina, nitrógeno ureico en sangre, glucosa, AST, ALT, Alk phos, bilirrubina total, LDH, calcio y albúmina (excepto en la semana 0); los niveles de AED se deben evaluar si se indican clínicamente; los pacientes deben ser seleccionados para detectar eventos adversos de dosis anteriores, que incluyan la evaluación neurológica y el examen de piel (sitios de inyección); y/o se debe realizar una IRM (solo en la Semana 12 entre estas visitas de inyección de vacunas).

Después de la administración de la vacuna, todos los pacientes deben ser observados de cerca para detectar eventos adversos durante por lo menos 20 minutos después de cada administración de la vacuna de GAA-péptido. El mismo día, se puede administrar poli-ICLC (i.m. 20 mg/kg) dentro de las 2 horas antes o después de la vacuna, y monitorearse por lo menos 20 minutos después de la inyección de poli-ICLC.

20 7.8.8.3 Evaluación de la semana 24 (después de 8 vacunaciones)

Una vez que se completa el ciclo de vacunación, se pueden llevar a cabo los siguientes procedimientos: historial y físico, que incluyen los signos vitales, el peso, el estado de rendimiento de Karnofsky y la función neurológica; se debe extraer sangre para los ensayos *in vitro* (excepto en las semanas 3, 6 y 9); se debe evaluar el CBC y las plaquetas con diferencial (excepto en la semana 0); se debe evaluar la química, que incluye electrolitos, creatinina, nitrógeno ureico en sangre, glucosa, AST, ALT, Alk phos, bilirrubina total, LDH, calcio y albúmina (excepto en la semana 0); los niveles de AED se deben evaluar si se indican clínicamente; los pacientes deben ser seleccionados para detectar eventos adversos de dosis anteriores, que incluyan la evaluación neurológica y el examen de piel (sitios de inyección); y/o se debe realizar una IRM.

30 7.8.8.4 Evaluación con vacunas adicionales (casos con vacunas adicionales)

Antes de la administración con vacunas adicionales, se pueden llevar a cabo los siguientes procedimientos: historial y físico, que incluye los signos vitales, el peso, el estado de rendimiento de Karnofsky y la función neurológica; se debe extraer sangre para los ensayos *in vitro* (excepto en las semanas 3, 6 y 9); se debe evaluar el CBC y las plaquetas con diferencial (excepto en la semana 0); se debe evaluar la química, que incluye electrolitos, creatinina, nitrógeno ureico en sangre, glucosa, AST, ALT, Alk phos, bilirrubina total, LDH, calcio y albúmina (excepto en la semana 0); los niveles de AED se deben evaluar si se indican clínicamente; los pacientes deben ser seleccionados para detectar eventos adversos de dosis anteriores, que incluyan la evaluación neurológica y el examen de piel (sitios de inyección); y/o se debe realizar una IRM.

Después de la administración con vacunas adicionales, todos los pacientes deben ser observados de cerca para detectar eventos adversos durante por lo menos 20 minutos después de cada vacunación. Las vacunas adicionales se pueden terminar en cualquiera de las siguientes condiciones: 1) progresión del tumor; 2) RLT; o 3) respuesta inmunológica negativa en dos puntos de tiempo consecutivos después del inicio de vacunas adicionales.

TABLA 6: Calendario de estudio

Tabla de manejo de estudios y pruebas	Pre-vacunación		Tratamiento (Semana)								Cada 12 semanas para vacunas adicionales		
	Consentimiento o/Tipificación HLA/patología	Dentro de 4 semanas	0	3	6	9	12	15	18	21		24	
Consentimiento informado para Tipificación HLA	X												
Tipificación HLA	X												
Consentimiento informado para tratamiento (si HLA-A2 es positivo)	X	-----X											
Revisión de patología	X												
Vacunación [¶]			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CBC y Plaquetas con diferencial			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Pruebas de coagulación (PT y PTT)													
Química ^{¶¶}			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
GGT, Fósforo, Magnesio													
AED si se indica clínicamente			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Demografía													
Medicamentos concurrentes													
Análisis de orina													
β-HCG (mujeres en edad fértil)													
EKG o ecocardiograma ^{¶¶¶} (si se indica clínicamente)													
Hgb A1c ^{¶¶¶¶}													
IRM de cerebro													
Historia, examen físico, y KPS	X (solo historia)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Muestras de sangre de Investigación 8 x 10 cc tubos de tapa verde y un tubo de tapa roja			X										
Medicamento diario													

(continuación)

Tabla de manejo de estudios y pruebas	Pre-vacunación		Tratamiento (Semana)								Cada 12 semanas para vacunas adicionales
	Consentimiento/Tipificación HLA/patología	Dentro de 4 semanas	0	3	6	9	12	15	18	21	
Informe de evento adverso	←-----→										
<p>#Poli-ICLC (20 µg/Kg i.m. y hasta 1640 µg) se puede administrar el día de la vacuna y el día 4 después de cada vacuna. *Incluye electrolitos, creatinina, nitrógeno ureico en sangre, glucosa, AST, ALT, Alk phos, bilirrubina total, LDH, calcio y albúmina ### Pruebas requeridas para participantes con enfermedad cardíaca pasada o actual, que incluye los síntomas. ### Las pruebas solo son necesarias para los participantes con diabetes. < Terapias adicionales> Los sujetos se pueden someter a vacunaciones adicionales hasta 2 años después de la administración de la primera vacuna (ver sección 4.2.2), si se observa un estado libre de progresión con base en la IRM, falta de RLT y respuesta inmunitaria anti-GAA después de 8 vacunaciones iniciales. Las vacunas adicionales (y poli-ICLC en el día de y el día 4 después de cada vacuna) se pueden proporcionar cada 12 semanas, comenzando cualquier semana entre las semanas 34-40. Las vacunas adicionales se pueden terminar si se observa una progresión tumoral, RLT o respuesta negativa de GAA en dos puntos de tiempo consecutivos. Se pueden obtener exámenes físicos y neurológicos, análisis de sangre para verificar los recuentos sanguíneos y la química de sangre y muestras de PBMC cada 12 semanas (en las mismas visitas para las administraciones de vacunas). Se puede realizar una exploración de IRM en las semanas 12 y 24 para verificar su respuesta tumoral (ya sea que su tumor responda o no a las vacunas e inyecciones). ** Para los participantes que se sometan a vacunas adicionales, se puede realizar una IRM en la cabeza y una recolección de muestras de sangre para el monitoreo inmunológico cada 12 semanas a partir de la primera vacunación adicional.</p>											

7.8.9 Medición de efecto

7.8.9.1 Objetivos

7.8.9.1.1 Inmunogenicidad

5 La tasa y magnitud de respuesta de las respuestas de célula T CD8+ contra el péptido de GAA en PBMC posterior a vacuna se puede evaluar utilizando análisis de IFN-γ- ELISPOT, y tetrámero citometría de flujo como el segundo ensayo.

10 Los ensayos de ELISPO indican el estado funcional de las células T específicas de antígeno como expresión de citoquina. Los análisis de citometría de flujo utilizando tetrámeros permiten una estimación relativamente precisa de la frecuencia de células T de unión a antígeno sin una mayor manipulación in vitro del PBMC derivado de paciente, y análisis de fenotipo, tales como la expresión del receptor de retorno (integrinas) sobre células T específicas de antígeno.

Los ensayos biológicos para medir la respuesta en sangre periférica se pueden llevar a cabo en el mismo punto de tiempo para evitar variabilidad interensayo.

15 Utilizando citometría de flujo, la cantidad de subconjuntos de linfocitos tales como células T CD4+, CD4+/células T reguladoras de Foxp3+ también se puede evaluar. Adicionalmente, en pacientes sometidos a desinfección quirúrgica de la progresión del tumor, si el tejido tumoral está disponible, se puede evaluar la infiltración de los CTL específicos de antígeno mediante citometría de flujo de linfocitos infiltrantes de tumores con tetrámeros de MHC específicos de epítipo.

7.8.9.1.2 Seguridad

20 Se puede determinar la seguridad de la administración de los cuatro epítipos-péptido de antígeno asociado a glioma restringido a HLA-A2 en conjunto con epítipo derivado de tetánico (TT) restringido a MHC de clase II de célula T auxiliar y poli-ICLC i.m. en pacientes con gliomas grado II recurrentes.

25 Los criterios de valoración pueden incluir incidencia y severidad de eventos adversos, utilizando criterios estándar, así como también seguimiento clínico cercano como se realizaría normalmente en este grupo de pacientes luego de las vacunas. El régimen se puede considerar inaceptablemente tóxico si >33 % de pacientes en una cohorte dada desarrollan RLT.

7.8.9.1.3 Respuesta y supervivencia libre de progresión

30 La recurrencia del tumor se puede evaluar mínimamente en las semanas 12 y 24, y cada 3 meses después de esto utilizando exploraciones de IRM con mejora de contraste. Dado que los gliomas de bajo grado son tumores infiltrativos que normalmente no mejoran con la administración de contraste, para evaluación de respuesta y supervivencia libre de progresión, el tumor (es decir, lesión objetivo) se puede medir de las imágenes T2 o FLAIR MRI. En caso de que haya una lesión que mejora en el valor de referencia, se puede hacer una discusión cuidadosa sobre si la información de patología como tumor grado II OMS representa realmente el estado del tumor. Si aún se considera que el tumor de mejora es de grado II, se puede utilizar el tamaño de la lesión que mejora para evaluación. Adicionalmente, como se indica a continuación, se considera que la aparición de mejora en tumores que previamente no aumentan por ser una enfermedad progresiva (PD).

(A) Respuesta (de acuerdo con los criterios RECIST)

Respuesta Completa (CR): desaparición de todas las lesiones objetivo.

40 Respuesta Parcial (PR): Por lo menos una disminución del 30 % en la suma del diámetro más largo (LD) de lesiones objetivo, tomando como referencia la suma de referencia LD.

Enfermedad progresiva (PD): Por lo menos un aumento del 20 % en la suma del LD de lesiones objetivo, tomando como referencia la suma más pequeña que LD ha registrado desde que inició el tratamiento o la aparición de mejora de contraste en un tumor que previamente no mejora. Debido a la posibilidad de progresión pseudo-tumoral, los pacientes pueden recibir esteroides en dosis bajas y volver a tomar una imagen antes de declarar que tienen PD.

45 Enfermedad estable (SD): Ni una contracción suficiente para calificar para PR ni un aumento suficiente para calificar PD, tomando como referencia la suma más pequeña LD desde que inicia el tratamiento.

(B) Supervivencia global (OS) y Supervivencia libre de progresión (PFS)

50 La PFS se define como la duración de tiempo desde el inicio del tratamiento hasta el tiempo de progresión o muerte. Se puede dar seguimiento a todos los pacientes durante un mínimo de 2 años, para que se pueda determinar su OS y PFS real a 2 años.

7.8.9.1.4 Análisis de tejidos tumorales luego de vacunaciones

5 Los tejidos tumorales pueden no estar disponibles en todos los pacientes en el estudio. Sin embargo, los siguientes aspectos se pueden evaluar de forma exploratoria en todos los tejidos tumorales disponibles obtenidos antes y/o después de las vacunas: (i) Pérdida de antígeno; (ii) regulación por aumento de moléculas antiapoptóticas; e (iii) infiltración de célula inmunitaria.

7.8.10 Consideraciones estadísticas**7.8.10.1 Evaluación de respuestas inmunológicas**

La evaluación de la respuesta inmunitaria puede emplear ambos ensayos IFN- γ ELISPOT y tetrámero

10 Un respondedor se puede definir como un paciente que ha respondido a cualquiera de los ensayos IFN- γ ELISPOT o de tetrámero. Una cohorte se puede considerar digna de investigación adicional si hay por lo menos 4 respuestas en los 9 sujetos. Este criterio tiene la propiedad de que si la tasa de respuesta verdadera es $<17\%$, hay $<5\%$ de probabilidad de observar 4 o más respuestas, y que si la tasa de respuesta verdadera es $>66\%$, hay $<5\%$ de probabilidad de observar 3 o menos respuestas.

7.8.10.2 Documentación y evaluación de seguridad

15 Los criterios de terminología común del NCI para eventos adversos (EA) (CTCAE 3.0) se pueden utilizar para evaluar la toxicidad; la toxicidad se puede considerar como un evento adverso que posiblemente, probablemente o definitivamente esté relacionado con el tratamiento. El grado máximo de toxicidad para cada categoría de interés se puede registrar para cada paciente y los resultados del resumen se pueden tabular por categoría y grado.

20 Por razones de seguridad, se puede considerar que el régimen es excesivamente tóxico si, en cualquier momento, la tasa observada de Toxicidad que Limita el Régimen (RLT) $\geq 33\%$ y por lo menos se han observado 2 RLT.

El diseño del estudio tiene las siguientes propiedades: si la tasa real de RLT es $\geq 45\%$, hay por lo menos 90 % de probabilidad de que la acumulación se detenga; Si la tasa real de RLT es $\leq 9\%$, hay un 90 % de probabilidad de que la acumulación no se detenga, y que el régimen se pueda considerar seguro.

7.8.10.3 Evaluación de los criterios de valoración clínicos

25 Se puede dar seguimiento a todos los pacientes durante un mínimo de 2 años, de tal manera que su supervivencia global (OS) de 2 años real, su supervivencia libre de progresión (PFS) y sus tasas de respuesta se puedan tabular como criterios de valoración exploratorios. PFS se define como el intervalo de tiempo desde el inicio de la terapia hasta la progresión, en base a las exploraciones de IRM en serie. Si es apropiado, los análisis exploratorios pueden investigar la relación de la respuesta inmunitaria con la respuesta de formación imágenes y OS/PFS (utilizando la prueba exacta de Fisher y la prueba de log rank, respectivamente).

30

7.8.10.4 Datos demográficos

35 Se pueden proporcionar estadísticas descriptivas de referencia de todos los pacientes evaluables para las variables demográficas (edad, sexo, raza/etnia), el estado de rendimiento de Karnofsky, la etapa de la enfermedad y el estado en el momento de la inscripción (enfermedad estable, enfermedad progresiva) y/o regímenes de tratamiento previamente utilizados.

7.9 EJEMPLO 9

Este ejemplo describe un estudio para evaluar los efectos de las vacunaciones con péptidos de antígeno de glioma restringidos por HLA-A2 en combinación con la administración de poli-ICLC para pacientes con Astrocitomas grado II OMS de alto riesgo y oligoastrocitomas.

7.9.1 Argumentos

45 Este ejemplo describe un estudio de un régimen de vacunación diseñado para inducir eficazmente respuestas de células T antitumorales en pacientes con astrocitoma y oligoastrocitoma grado II OMS de "alto riesgo"; es decir, pacientes con una probabilidad $>50\%$ de progresión 5 años después de la cirugía sola o la cirugía más terapia de radiación postoperatoria. El régimen descrito en el estudio proporcionado en este Ejemplo combina inyecciones subcutáneas de epítipo-péptido de linfocitos T citotóxicos (CTL) derivados de glioma (GAA) con administración intramuscular (i.m.) simultánea de poli-ICLC.

50 Los adultos con LGG supratentorial tienen un riesgo significativo (24 %) de progresión tumoral 2 años después de tratamiento con cirugía o cirugía seguida por RT. Para los subconjuntos desfavorables de estos pacientes, el riesgo de progresión a 2 años es del 40-50 %. El estudio descrito en este Ejemplo tiene un potencial inmunoproliférico e inmunoterapéutico para reducir el riesgo de recurrencia del tumor, lo que se puede traducir en una mejor supervivencia. Terapéuticamente, la metodología de inmunoterapia puede suprimir la expansión de las células

tumorales neoplásicas de bajo grado II de crecimiento indolente. Profilácticamente, la metodología puede evitar la transformación anaplásica, que se produce en aproximadamente la mitad de los LGG recurrentes. La tasa de crecimiento más lenta de LGG (en contraste con los gliomas malignos) debería permitir suficiente tiempo para repetir las inmunizaciones múltiples, lo que puede conducir a la inducción de altos niveles de inmunidad específica de GAA. Adicionalmente, se ha demostrado que el poli-ICLC aumenta los efectos de la vacuna en modelos de tumores cerebrales preclínicos (véase, por ejemplo, Zhu et al., J. Transl. Med., 5: 10, 2007), y para ser seguro en pacientes con glioma maligno (véase, por ejemplo, Salazar et al., Neurosurgery, 38: 1096-1103, 1996). Por lo tanto, suponemos que esta forma de vacuna en combinación con el tratamiento con poli-ICLC inducirá una potente respuesta inmunitaria anti-glioma, y será segura.

7.9.2 Objetivos

Este ejemplo describe un estudio de vacunas en adultos con astrocitoma u oligoastrocitoma grado II OMS. Los objetivos de este ejemplo incluyen la recolección de datos inmunológicos y de seguridad que se pueden utilizar en estudios adicionales. Los pacientes en el estudio descrito en este Ejemplo pueden seguirse durante un mínimo de 2 años, de tal manera que se puedan determinar las tasas reales de supervivencia general (SG) a los 2 años, la supervivencia a la progresión libre a los 6 meses y 2 años de manera exploratoria.

7.9.2.1 Inducción de la respuesta de células T específicas de GAA

La tasa de respuesta y la magnitud de la respuesta inmunitaria en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) después de la vacuna contra los péptidos GAA en respuesta a esta forma de vacuna se pueden determinar utilizando el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima de puntos IFN- γ (ELISPOT) y el ensayo de tetrámero.

7.9.2.2 Seguridad

La incidencia y la gravedad de los eventos adversos asociados con el régimen de la vacuna se pueden evaluar, con una regla de interrupción temprana basada en la frecuencia de la Toxicidad que Limita el Régimen (RLT).

7.9.2.3 Respuesta clínica

La respuesta radiológica se puede determinar utilizando los criterios estándar de respuesta de la OMS. La supervivencia libre de progresión (SSP) de 2 años se puede evaluar de forma exploratoria, en base a las exploraciones de formación de imagen de resonancia magnética (IRM) en serie.

7.9.2.4 Tejidos tumorales para correlatos biológicos.

Para los pacientes que desarrollan progresión, se puede recomendar una biopsia/resección. Siempre que haya tejidos tumorales disponibles después de la vacuna, se pueden analizar el estado de expresión de GAA y la infiltración de células T específicas de GAA.

7.9.2.5 Influencia de RT en la inducción de respuesta inmunitaria específica de GAA

La tasa y la magnitud de las respuestas inmunitarias específicas de GAA en las dos cohortes se pueden comparar utilizando los ensayos de IFN- γ -ELISPOT y los ensayos de tetrámero.

7.9.3 Selección de pacientes

7.9.3.1 Criterio de elegibilidad

Criterios patológicos: los pacientes deben tener un diagnóstico patológico documentado de un astrocitoma u oligoastrocitoma supratentorial grado II de la OMS.

Los pacientes en este estudio deben ser positivos a HLA-A2 en base a la citometría de flujo.

Los pacientes en este estudio deberían haberse recuperado de los efectos tóxicos de la terapia previa: 4 semanas de cualquier agente en investigación, 4 semanas de la terapia citotóxica previa y/o por lo menos dos semanas de vincristina, 4 semanas de nitrosoureas, 3 semanas de la administración de procarbazona y 1 semana para agentes no citotóxicos, por ejemplo, interferón, tamoxifeno, talidomida, ácido cis-retinoico, etc. (el radiosensibilizador no cuenta). Con respecto a la terapia de radiación (RT) anterior, debe haber por lo menos 6 meses desde la finalización de la RT (o radiocirugía).

Se deben analizar dos cohortes de pacientes, en función de si los pacientes han recibido RT previa. Cohorte 1: los pacientes se deben haber sometido solo a cirugía o biopsia (sin radiación o quimioterapia postoperatoria) y se deben realizar una exploración de IRM de referencia (dentro de las 4 semanas de la primera vacuna) que muestre enfermedad o regresión estable (no avance de la cirugía/biopsia inicial). Cohorte 2: los pacientes se deben haber sometido a cirugía o biopsia y terapia de radiación (RT) (que incluye la terapia de radiación de haz externo fraccionada y/o radiocirugía estereotáctica), que se completó ≥ 6 meses antes de la inscripción, y tener una

exploración de IRM de referencia dentro de las 4 semanas anteriores a la primera vacuna que muestra enfermedad estable o regresión.

- 5 Los pacientes en este estudio deben ser (i) \geq 40 años con resección en cualquier grado; (ii) mayores de 18-39 años con resección incompleta (IRM postoperatoria que muestra >1 cm de enfermedad residual, según la dimensión máxima de la anomalía residual de T2 o FLAIR desde el borde de la cavidad quirúrgica ya sea lateralmente, antero-posteriormente o supero-inferiormente) o (iii) 18-39 años con GTR definida por neurocirujano, pero el tamaño del tumor es ≥ 4 cm (el diámetro máximo del tumor preoperatorio, en base a las imágenes MR axiales y/o coronales de T2 o FLAIR). Todos los pacientes deben ser \geq 18 años.

Los pacientes en este estudio deben tener un estado de rendimiento de Karnofsky de >60 (Apéndice I).

- 10 Las pacientes mujeres en este estudio en edad fértil deben haber documentado β HCG en suero negativo.

Los pacientes en este estudio deben estar libres de infección sistémica. Los pacientes con infecciones activas (ya sea que requieran o no terapia con antibióticos) pueden ser elegibles después de la resolución completa de la infección. Los pacientes en tratamiento con antibióticos deben dejar de tomar antibióticos durante por lo menos 7 días antes de comenzar el tratamiento.

- 15 Los pacientes en este estudio deben tener una función orgánica adecuada, medida por un recuento de glóbulos blancos $\geq 2500/\text{mm}^3$; linfocitos $\geq 400/\text{mm}^3$; plaquetas $\geq 100.000/\text{mm}^3$, hemoglobina $\geq 10,0$ g/dL, AST, ALT, GGT, LDH, fosfatasa alcalina dentro de 2,5 x límite normal superior y bilirrubina total $\leq 2,0$ mg/dL, y creatinina en suero dentro de 1,5 X límite superior de límite normal. Los pacientes en este estudio deben realizar pruebas de coagulación y el PT y el PTT deben estar dentro de los límites normales.

20 7.9.3.2 Criterio de exclusión

Los pacientes en este estudio se deben excluir si tienen presencia de gliomatosis cerebral, enfermedad metastásica leptomeníngea craneal o espinal.

Los pacientes en este estudio se deben excluir si han sido sometidos a quimioterapia previa o terapia anti-glioma de cualquier tipo que no sea terapia de radiación.

- 25 Los pacientes en este estudio se deben excluir si se someten a un tratamiento o medicamentos concurrentes que incluyen: terapia de radiación; quimioterapia; interferón (por ejemplo, Intron-A®); inyecciones desensibilizantes de alergia; factores de crecimiento (por ejemplo, Procrit®, Aranesp®, Neulasta®); interleuquinas (por ejemplo, Proleukin®); y/o cualquier medicamento terapéutico en investigación.

- 30 Los pacientes en este estudio no deben haber tenido trastornos autoinmunitarios previos que requieran terapia citotóxica o inmunosupresora, o trastornos autoinmunitarios con compromiso visceral. Los pacientes en este estudio con un trastorno autoinmunitario activo que requieren estas terapias también se deben excluir. La artritis leve que requiere medicamentos NSAID no debe ser excluyente.

- 35 Los pacientes en este estudio se deben excluir si han utilizado inmunosupresores dentro de las cuatro semanas previas al ingreso al estudio o si anticipan el uso de agentes inmunosupresores. Dexametasona u otros medicamentos corticosteroides, si se utilizan durante el período perioperatorio y/o durante la radioterapia, deben ser reducidos por los pacientes y suspendidos por lo menos cuatro semanas antes de la administración de la primera vacuna en el estudio. Los corticosteroides tópicos y los esteroides inhalados (por ejemplo: Advair®, Flovent®, Azmacort®) deben ser aceptables.

- 40 Los pacientes en este estudio se deben excluir si tienen otro diagnóstico de cáncer, excepto que se pueden permitir los siguientes diagnósticos: cáncer de células epidermoides de la piel sin metástasis conocida; cáncer de células basales de la piel sin metástasis conocida; carcinoma in situ de la mama (DCIS o LCIS); carcinoma in situ del cuello uterino; y/o cualquier cáncer sin metástasis a distancia que haya sido tratado con éxito, sin evidencia de recurrencia o metástasis durante más de 5 años.

Los pacientes en este estudio se deben excluir si tienen una adicción conocida al alcohol o fármacos ilícitos.

- 45 Debido a que no se espera que los pacientes con deficiencia inmunitaria respondan a esta terapia, los pacientes positivos a VIH se deben excluir del estudio.

7.9.4 Vacuna de péptidos

7.9.4.1 Péptidos

- 50 Los siguientes péptidos se pueden incluir en la formulación de la vacuna: IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ 1A9V (ALPFGFILV; SEQ ID NO:3); EphA2₈₈₃₋₈₉₁ (TLADFDPRV; SEQ ID NO:6); Survivin₉₆₋₁₀₄:M2 (LMLGEFLKL; SEQ ID NO:7); WT1₁₂₆₋₁₃₄:Y1 (YMFNPAPYL; SEQ ID NO:8); y toxoide tetánico (TetA830) (AQYIKANSKFIGITEL; SEQ ID NO:9).

Todos los péptidos pueden sintetizarse y los péptidos sintéticos se pueden purificar por HPLC. La identidad de los péptidos sintéticos se puede confirmar al verificar su masa y secuencias de aminoácidos por espectrometría de masas. Cada lote de péptido se puede evaluar según lo requiera la FDA para determinar su identidad, pureza, esterilidad y pirogenicidad.

- 5 Los péptidos se pueden depositar bajo condiciones de GMP y guardarse a -70 °C. La estabilidad de los péptidos liofilizados se puede probar anualmente mediante espectroscopia de masas.

7.9.4.2 Otros agentes

Montanide ISA-51 (SEPPIC Inc., Fairfield, NJ) se puede utilizar como un agente adicional en las vacunas de péptidos.

10 7.9.4.3 Dosificación y preparación

Una solución acuosa (500 µL) que contiene cada uno de los cuatro péptidos GAA restringidos por HLA-A2 (300 µg/péptido) y el péptido tetánico (Péptido-tet; 200 µg) se puede mezclar 1/1 con Montanide ISA-51 para formar una emulsión de agua en aceite (es decir, el volumen/inyección total es de 1 ml).

7.9.4.4 Administración

- 15 Los pacientes en este estudio se pueden vacunar por vía subcutánea en la parte superior derecha o izquierda de los brazos con nódulos axilares de drenaje intactos. En caso de que los pacientes no posean nódulos linfáticos axilares intactos como nódulos de drenaje, las vacunas se pueden administrar en la parte superior del muslo del mismo lado con nódulos linfáticos inguinales intactos.

La vacuna se puede administrar en las semanas 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21.

20 7.9.5 Poli-ICLC

El Poli-ICLC se puede preparar y envasarse en las instalaciones GMP de Bioserv, Corporation (San Diego, California). El Poli-ICLC se puede suministrar en frascos que contengan 1 cc de solución translúcida con una concentración de 2 mg por cc. El Poli-ICLC es estable a temperatura ambiente durante varios días, pero se puede almacenar refrigerado a aproximadamente 4,44 °C.

25 7.9.5.1 Dosificación y administración

el Poli-ICLC se puede administrar por vía intramuscular en dosis de 20 µg/kg y hasta 1640 µg/inyección, con dos inyecciones en los días 0 y 4 después de cada vacunación.

- 30 El primer curso de administración de poli-ICLC (20 µg/kg i.m. y hasta 1640 µg/inyección) se puede administrar el día de la primera vacuna de GAA/TT y el día 4 después de la vacuna. Para cada una de las siguientes vacunas repetidas (en las semanas 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21), se puede administrar poli-ICLC (20 µg/kg i.m. y hasta 1640 µg/inyección) el día de la vacuna y el día 4 después de la vacuna.

- 35 Con respecto a los sitios de inyección, dado que se espera que el poli-ICLC mejore el proceso de presentación del antígeno en los ganglios linfáticos de drenaje, el poli-ICLC se debe administrar i.m. en la vecindad del sitio de inyección de péptidos anterior (por ejemplo, a menos de 3 cm del centro de los sitios de inyección de péptidos anteriores).

El Poli-ICLC se debe administrar por vía intramuscular (i.m.) utilizando una técnica estéril, tal como se suministra del frasco, y en la cantidad prescrita para el peso del paciente (hasta 1640 µg/inyección). Los signos vitales se pueden monitorizar antes y durante por lo menos 20 minutos después del primer tratamiento.

7.9.6 Plan de tratamiento

- 40 El estudio descrito en este Ejemplo puede emplear dos cohortes de pacientes para evaluar la inmunogenicidad, seguridad y eficacia clínica de la vacuna de GAA/TT-péptido y poli-ICLC en pacientes HLA-A2+ con astrocitoma grado II de la OMS u oligo-astrocitoma con factores de pronóstico desfavorable. Debido a que la vacuna de péptido está secuestrada localmente, y la respuesta inmunitaria se produce principalmente localmente y en los ganglios linfáticos de drenaje, la dosis de la vacuna no se debe ampliar proporcionalmente al tamaño (por peso o área de superficie corporal) del receptor, como se podría hacer para un fármaco cuyo efecto está relacionado con su distribución en los fluidos corporales. Con respecto a la dosis de poli-ICLC, se puede emplear una dosis fija (20 µg/kg/inyección y hasta 1640 µg/inyección), que se ha demostrado que es segura y que induce respuestas biológicas en pacientes con glioma maligno (ver, por ejemplo, Salazar et al., Neurosurgery, 38: 1096-1 103, 1996).

7.9.6.1 Programación

Los pacientes elegibles en la cohorte 1 se deben haber sometido solo a cirugía o biopsia (sin radiación o quimioterapia postoperatoria) y se deben realizar una exploración de IRM de referencia (dentro de las 4 semanas de la primera vacuna) que muestre enfermedad o regresión estable (no avance de la cirugía/biopsia inicial) ; los pacientes de la cohorte 2 deben haber completado la RT ≥ 6 meses antes de la inscripción, y se deben realizar una exploración de IRM de referencia (dentro de las 4 semanas anteriores a la 1ª vacuna) que muestre una enfermedad o regresión estable. Todos los pacientes deben haber suspendido dexametasona o corticosteroides similares por lo menos 4 semanas antes de la primera vacuna.

Los pacientes se pueden tratar con inyecciones subcutáneas de vacunas de GAA/TT en las semanas 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21. El poli-ICLC i.m. se puede administrar (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.m. y hasta 1640 μg) el día de y el día 4 después de cada vacuna (por ejemplo, si la vacuna se administra el jueves, el poli-ICLC se puede administrar el día de la vacuna y el lunes siguiente). Cada vacuna se puede administrar dentro de 2 horas antes o después de la administración de poli-ICLC i.m.

Los pacientes se pueden evaluar para detectar cualquier posible evento adverso, RLT, así como respuestas clínicas/radiológicas mediante visitas clínicas y exploraciones de IRM.

Las PBMC obtenidas antes de la vacuna inicial se pueden utilizar como muestra del valor de referencia. Si los pacientes demuestran alguna respuesta positiva en los dos ensayos inmunológicos (ELISPOT o Tetrámero sin RLT o progresión tumoral, a estos pacientes se les pueden ofrecer vacunas de GAA/TT adicionales (véase, por ejemplo, la Sección 7.9.6.2) comenzando en cualquier momento entre la semana 34-40, y cada 3 meses a partir de entonces hasta que los pacientes muestren progresión tumoral, pérdida de respuesta inmunitaria o RLT.

7.9.6.2 Terapia adicional

En las semanas 0 (valor de referencia), 12, 15, 18, 21 y 24, las PBMC de los pacientes se pueden evaluar para detectar la presencia de respuestas de células T específicas de GAA contra los péptidos de GAA. Si se observa dicha respuesta para cualquiera de los péptidos GAA, el paciente se puede someter a vacunaciones adicionales con el (los) GAA que demostraron la respuesta persistente y el poli-ICLC comenzando en cualquier momento entre la semana 34-40 y cada 12 semanas a partir de entonces hasta 2 años desde la vacunación inicial. Se pueden obtener muestras de PBMC adicionales cada 12 semanas (en las mismas visitas para las administraciones de vacunas) para la monitorización inmunológica. Las vacunas adicionales se pueden terminar en cualquiera de las siguientes condiciones: 1) progresión del tumor; 2) RLT; o 3) respuesta inmunológica negativa en dos puntos de tiempo consecutivos.

7.9.6.3 Modificación de dosis

7.9.6.3.1 Modificación de dosis de poli-ICLC

Para cualquier síntoma similar a la gripe de Grado 2 o superior, incluyendo fiebre y fatiga, el poli-ICLC se puede suspender hasta que los síntomas vuelvan a Grado 0. Si se presentan síntomas de Grado 2 o superior similares a los de la gripe el día de la vacunación, y si los síntomas no regresan al Grado 0 el día 4 después de la vacunación, se puede omitir la siguiente administración de poli-ICLC el día 4 después de la vacunación. Si el paciente no tiene síntomas el día 4 (grado 0), el poli-ICLC se puede reanudar al 50 % de la dosis original. Si se presentan síntomas de Grado 2 o superior similares a los de la gripe después de la administración de poli-ICLC el día 4 después de la vacunación, en el siguiente ciclo de la vacuna, se pueden proporcionar dos administraciones de poli-ICLC (en los días 0 y 4 después de las vacunas) al 50 % de la dosis original. Se puede proporcionar un tratamiento previo con acetaminofén 650-1000 mg o con cualquier NSAID. Si la dosis adicional es bien tolerada, la dosis original se puede volver a instituir posteriormente.

En el caso de la elevación de la enzima hepática $>4x$ valor de referencia, o cualquier otro efecto secundario intolerable imprevisto de grado 2 o superior, el poli-ICLC se puede suspender hasta que la toxicidad se haya reducido a grado 1 o inferior. El poli-ICLC se puede volver a administrar a la mitad de la dosis original y el paciente puede ser observado de cerca. Si el poli-ICLC no puede reiniciarse en el próximo ciclo de la vacuna, el paciente puede ser retirado para el RLT.

Los pacientes pueden permanecer con la dosis original de poli-ICLC para toxicidad hematológica de grado 1 o 2, o toxicidad no hematológica de grado 1. Si al nivel de dosis del 50 % no hay toxicidad durante un mínimo de 2 semanas, la dosis se puede escalar nuevamente a la dosis inicial a discreción del investigador. Las toxicidades posteriores, en caso de que ocurran, pueden requerir una reducción de la dosis al 50 %, y no se pueden permitir más escalas. Si la toxicidad vuelve a ocurrir a la dosis reducida, el paciente puede ser retirado del tratamiento.

7.9.6.3.2 Retraso en la dosificación de las vacunas de péptidos

En circunstancias donde la administración de poli-ICLC se suspende, si el evento no es atribuible a la vacuna de péptidos/ISA-51, las administraciones de vacunas no se pueden suspender. Si el evento es atribuible tanto a las vacunas de poli-ICLC como a las de péptidos, ambas se pueden suspender. Si se considera que un evento adverso se debe únicamente a las vacunas de péptidos/ISA-51, pero no a poli-ICLC, las administraciones de vacuna y poli-

ICLC se pueden suspender. En circunstancias en las que la evaluación de un evento adverso es limitada, tales como por enfermedad intercurrente, o cuando se requieren estudios de laboratorio para evaluar otras causas de toxicidad, el programa de vacunación se puede interrumpir hasta 4 semanas. El retraso en la administración de una vacuna hasta 4 semanas no se considerará una violación del protocolo si se debe a un evento adverso, independientemente de la atribución. Si una o más vacunas se retrasan 4 semanas debido a un evento adverso, independientemente de la atribución, se debe interrumpir el tratamiento.

Los pacientes pueden ser observados por una toxicidad que limita el régimen (RLT) a lo largo del estudio. Se considera que los siguientes son RLT si se los juzga posiblemente, probablemente o definitivamente asociados con el tratamiento. En caso de que ocurran, los pacientes individuales pueden ser retirados del estudio y no se pueden proporcionar más inyecciones.

Broncoespasmo o urticaria generalizada (hipersensibilidad) \geq grado 2 o superior.

Reacción alérgica \geq Grado 2 o superior, tal como eritoderma exfoliativa, anafilaxia o colapso vascular.

Enfermedad autoinmunitaria de \geq (por ejemplo, hipotiroidismo, encefalitis autoinmunitaria) grado 2 o superior.

Cualquier toxicidad \geq de grado 3 posiblemente, probablemente o definitivamente relacionada con la vacuna, con especial atención a los siguientes eventos.

Reacción en el lugar de inyección \geq grado 3 debido a la administración de péptido-vacuna o poli-ICLC.

Toxicidad hepática o hepática \geq grado 3.

Neurotoxicidad \geq grado 3: signos y síntomas que pueden indicar una progresión tumoral o una respuesta inmunitaria inflamatoria (es decir, una progresión pseudo-tumoral) que requiere una biopsia o resección con hallazgos patológicos de infiltración inflamatoria/linfocítica.

Náuseas y vómitos \geq grado 3 sin suficiente profilaxis antiemética no se consideran RLT.

Retrasos en la dosificación $>$ 4 semanas para las vacunas de poli-ICLC o péptidos.

La terapia se puede interrumpir por los siguientes motivos: (i) Toxicidad que limita el régimen, como se definió anteriormente; (ii) progresión de la enfermedad - por lo menos un aumento del 20 % en la suma del diámetro más largo de la lesión objetivo o la aparición de mejora de contraste en un tumor que anteriormente no había mejorado. Sin embargo, si se sospecha una progresión pseudo-tumoral, entonces se puede colocar al paciente en tratamiento con dexametasona, hasta 4 mg/día, y volver a tomar la imagen 4-8 semanas después. Si requieren $>$ 4 mg/día de dexametasona, o si su estudio de formación de imagen repetida continúa cumpliendo con los criterios de progresión de la enfermedad, el paciente puede ser retirado del estudio y puede suspenderse el tratamiento adicional. Sin embargo, si su dosis de esteroides es $<$ 4 mg/día y si su formación de imagen repetida no cumple con los criterios para la progresión de la enfermedad, el paciente puede continuar en el estudio y recibir el tratamiento del estudio tal como se prescribe en la presente memoria. Todos los casos de sospecha de progresión tumoral o pseudo-rumor se deben revisar para determinar si el sujeto debe permanecer en el estudio, (iii) Enfermedad intercurrente que evita la administración adicional de la vacuna o la administración de poli-ICLC, (iv) Embarazo: se continuará siguiendo a las pacientes embarazadas durante la duración del embarazo.

7.9.6.4 Duración del tratamiento

En ausencia de retrasos en el tratamiento debido a eventos adversos, el tratamiento puede continuar durante 21 semanas (8 vacunaciones) o hasta que se aplique uno de los siguientes criterios: Toxicidad que limita el régimen (RLT); progresión de la enfermedad; y/o enfermedad intercurrente que evita la administración adicional del tratamiento.

7.9.6.5 Tratamiento concomitante

7.9.6.5.1 Aceptable

Para la fiebre, se puede utilizar acetaminofén (comprimidos de 325 mg, 1 o 2 p.o. cada 4 horas). El tratamiento previo de los pacientes con acetaminofén puede ser justificado por los efectos secundarios del poli-ICLC. Las fiebres que duran más de 8 horas después del tratamiento se pueden evaluar en términos de infección potencial.

Para el dolor local leve, se pueden planificar opiáceos orales (oxicodona, 5-10 mg p.o. cada 3-4 horas). El dolor que es más del grado leve a moderado se puede investigar para buscar otras fuentes distintas a la terapia y controlarse de acuerdo con lo anterior.

La dexametasona (o medicamentos corticosteroides similares) no se debe utilizar durante por lo menos 4 semanas antes del inicio de la terapia de vacuna/poli-ICLC (Semana 0). Se puede utilizar dexametasona (hasta 4 mg/día) en el contexto de progresión de pseudo-tumor, y se reduce/descontinúa tan pronto como sea posible.

Los medicamentos anticonvulsivos se deben utilizar como se indica.

5 Se pueden administrar antieméticos, si es necesario.

Otros medicamentos aceptables pueden incluir: Corticosteroides tópicos; agentes antiinflamatorios no esteroides; antihistamínicos (por ejemplo, Claritin®, Allegra®); medicamentos crónicos, excepto aquellos enumerados en la Sección 7.8.6.5.2; Vacunas contra la gripa (se deben administrar por lo menos dos semanas antes del inicio de las vacunas del estudio o por lo menos dos semanas después de la 8ª vacuna (última)); y/o medicamentos corticosteroides administrados por vía parenteral o por inhalación (por ejemplo: Advair®, Flovent®, Azmacort®).

7.9.6.5.2 Inaceptable

Los medicamentos inaceptables pueden incluir terapia con interferón (por ejemplo, Intrón-A®); quimioterapia; inyecciones desensibilizantes de alergia; factores de crecimiento (por ejemplo, Procrit®, Aranesp®, Neulasta®); interleuquinas (por ejemplo Proleukin®); otros medicamentos de investigación; y/o fármacos ilícitos.

15 7.9.7 Estudios correlativos/especiales

7.9.7.1 Monitorización inmunológica

7.9.7.1.1 Ensayos ELISPOT

Las frecuencias de los precursores de linfocitos T sensibles a antígenos asociados a glioma (GAA): en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) antes y después de la administración de la vacuna basada en el péptido GAA se puede medir mediante el ensayo ELISPOT. Las respuestas biológicas medidas por ELISPOT pueden realizarse en el mismo punto de tiempo por lo menos para un paciente individual para evitar la variabilidad inter-ensayos. La vacunación exitosa estimula poblaciones clonales de células T que son capaces de secretar citoquinas de una manera restringida por MHC específica de antígeno. El ensayo ELISPOT se puede utilizar para evaluar las respuestas inmunitarias específicas de GAA de poblaciones de células T CD8+, así como las células T CD4+ que reaccionan contra el péptido TT auxiliar. Luego se puede evaluar la producción de IFN-γ para evaluar la respuesta de las células T tipo 1.

Se puede considerar que un sujeto ha respondido, si en cualquiera de los dos puntos de tiempo consecutivos posteriores a la vacuna contra el mismo antígeno[s] (semanas 12, 15, 18, 21 y 24), el número de puntos es el doble que en el valor de referencia, y hay por lo menos 10 puntos/20.000 células, y si el número de puntos después de la vacuna es por lo menos tres veces la desviación estándar del valor de la vacuna previa. La respuesta puede ser para cualquier antígeno.

7.9.7.1.2 Análisis de tetrámeros de células T reactivas a GAA en PBMC de pacientes

Los análisis de tetrámero permiten la evaluación de la presencia de células T CD8+ específicas de GAA en sangre periférica con una gran sensibilidad sin reestimulación *in vitro* de las células. Se espera, en base a los datos previos disponibles de pacientes con glioma maligno, que se pueda observar un aumento significativo (un registro o más) en la frecuencia de células T CD8+ sensibles a péptidos en algunos pacientes, pero no en todos, inmunizados con vacunas basadas en antígeno tumoral. De manera exploratoria, estas PBMC también se pueden evaluar para determinar la expresión en la superficie de un antígeno muy tardío del receptor de integrina(VLA)-4, que se ha implicado en conferir el retorno de células T en tumores del SNC (véase, por ejemplo, Zhu et al., J.Transl. Med., 5: 10, 2007) y receptores de quimioquinas (por ejemplo, CXCR3 y CCR5). Los procedimientos para el análisis de tetrámeros están bien establecidos.

Los ensayos de tetrámero se pueden realizar al inicio del estudio y en los 5 puntos de tiempo después de las vacunas (semanas 12, 15, 18, 21 y 24). Se puede definir una única respuesta positiva en el punto de tiempo para que un péptido sea (1 + B) % de todas las células CD8+ positivas por tetrámero, en el que B es el porcentaje positivo de referencia, que generalmente es menor que 0,1 %. En analogía con la definición de respuesta ELISPOT, se puede considerar que un paciente ha respondido si tiene dos respuestas de punto de tiempo consecutivas únicas para cualquier péptido.

7.9.7.1.3 Análisis citométricos de flujo de subconjuntos de linfocitos.

Se pueden evaluar los números de células T CD4+ y CD8+, así como las células T reguladoras CD4+/Foxp3+ en los puntos de tiempo en serie antes y después de las vacunas.

7.9.7.1.4 Análisis de autoinmunidad en sueros.

Los sueros depositados se pueden evaluar para detectar la presencia de autoanticuerpos.

7.9.7.2 Evaluación de tejidos tumorales primarios y recurrentes

La expresión de GAA en los tejidos tumorales disponibles de los pacientes se puede evaluar (ya sea antes de la vacuna o después de la progresión después de las vacunas; o ambos) mediante inmunohistoquímica (IHC) y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

- 5 Si los tumores recurren después de las vacunas, puede ser crítico evaluar cómo los tumores escapan a los efectos de las vacunas. Con este fin, se pueden evaluar los siguientes problemas específicos tanto como lo permita la disponibilidad de tejido: (i) Pérdida de antígeno: se puede utilizar IHC y RT-PCR para evaluar si los tumores recurrentes expresan los GAA específicos, HLA-A2, y componentes de la maquinaria de procesamiento de antígenos, tales como el transportador asociado con el procesamiento de antígenos; (ii) regulación por aumento de las moléculas antiapoptóticas: aunque el survivina puede ser un objetivo, otras moléculas antiapoptóticas pueden estar reguladas en aumento, por ejemplo, cFLIP (proteína inhibidora FLICE celular (enzima convertidora IL-1 β similar al dominio de la muerte asociada a Fas)); y (iii) infiltración de células inmunitarias: una de las razones por las cuales los tumores pueden escapar a una respuesta inmunitaria inducida por la vacuna es la falla de las células T reactivas para infiltrarse en el tumor. Para examinar esto, siempre que se disponga de tejidos tumorales recientemente resecados (no fijados o congelados), se pueden aislar linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) y se puede caracterizar su número, fenotipo y especificidad de antígeno utilizando tetrámeros HLA-A2 para cada uno de los GAA. Utilizando la citometría de flujo de varios colores, la función y la viabilidad de los TILs de tetrámero⁺ se pueden determinar mediante tinción para perforina/IFN- γ y Anexina-V, respectivamente. Los tejidos de control pueden incluir tumores previos a la vacuna (si están disponibles) y tumores recurrentes de pacientes que no están en el estudio. Estos estudios pueden permitir la evaluación de si las células T inducidas por la vacuna trafican eficientemente al sitio del tumor cerebral y mantienen su función y viabilidad.

7.9.8 Parámetros de estudio

- Este estudio se puede realizar de forma ambulatoria, y los pacientes se evaluarán en las semanas 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24. Después de este período, si los pacientes no reciben vacunas adicionales, es posible que los pacientes se retiren del estudio y que se les haga un seguimiento clínico cada 2 a 4 meses a partir de entonces, como se suele hacer para los pacientes con el mismo tipo de tumor. Si se encuentra que los pacientes tienen tumores en progreso, se pueden ofrecer otras terapias, tales como quimioterapia o resección. Si los pacientes reciben vacunas adicionales, dichas vacunas adicionales se pueden administrar cada 12 semanas, y se puede realizar una monitorización clínica, inmunológica y radiológica (IRM) en cada visita (q12 semanas) hasta que los pacientes se retiren. Los sujetos con una respuesta completa pueden volver a tratarse con dos vacunas adicionales, con intervalos de 12 semanas, y luego seguirlos. Las vacunas se pueden interrumpir para cualquier paciente con enfermedad progresiva o toxicidad inaceptable en cualquier momento durante las vacunaciones programadas.

7.9.8.1 Pretratamiento (datos de referencia y cribado)

- Se pueden realizar los siguientes procedimientos antes de proceder con el tratamiento: Se debe obtener el consentimiento informado antes de iniciar el cribado; Tipificación de HLA (evaluación de citometría de flujo para la positividad de HLA-A2); documentación de diagnóstico (patológico); Historial completo y examen físico (con signos vitales y peso), que incluyen exámenes neurológicos y estado de rendimiento; los sitios de la vacuna se deben designar con la confirmación de los ganglios linfáticos de drenaje intactos; se debe registrar la información demográfica; se deben evaluar los CBC y plaquetas con diferencial; se debe evaluar PT/PTT; Se debe evaluar la química, que incluye electrolitos, creatinina, nitrógeno ureico en sangre, glucosa, AST, ALT, Alk phos, bilirrubina total, LDH, calcio y albúmina; Se debe evaluar la GGT, el fósforo y el magnesio; se debe extraer sangre para los ensayos *in vitro*; se debe realizar HGBA1C para pacientes con diabetes mellitus; se debe realizar ECG y ecocardiograma en pacientes con síntomas cardíacos, antecedentes o enfermedad actual; se debe realizar un análisis de orina; se debe realizar una IRM del cerebro para evaluar el estado de referencia de la enfermedad; y/o mujeres en edad fértil se les debe administrar una prueba de embarazo de beta-HCG en suero.

7.9.8.2 Evaluación durante el tratamiento

- Los siguientes procedimientos se pueden llevar a cabo a medida que avanza el tratamiento. La pre-administración (Semanas 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 antes de la administración de la vacuna el día de la vacunación): historia y examen físico, que incluye signos vitales, peso, estado funcional de Karnofsky y función neurológica; se debe extraer sangre para los ensayos *in vitro*; Se debe evaluar la química, que incluye electrolitos, creatinina, nitrógeno ureico en sangre, glucosa, AST, ALT, Alk phos, bilirrubina total, LDH, calcio y albúmina (excepto en la semana 0); los niveles de AED se deben evaluar si se indican clínicamente; los pacientes deben ser seleccionados para detectar eventos adversos de dosis anteriores, que incluyan la evaluación neurológica y el examen de piel (sitios de inyección); y/o se debe realizar una IRM (solo en la Semana 12 entre estas visitas de inyección de vacunas).
- 55 Después de la administración de la vacuna, todos los pacientes deben ser observados de cerca para detectar eventos adversos durante por lo menos 20 minutos después de cada administración de la vacuna de GAA-péptido. El mismo día, se puede administrar poli-ICLC (i.m. 20 mg/kg) dentro de las 2 horas antes o después de la vacuna, y monitorearse por lo menos 20 minutos después de la inyección de poli-ICLC.

7.9.8.3 Evaluación de la semana 24 (después de 8 vacunaciones)

5 Una vez que se completa el ciclo de vacunación, se pueden llevar a cabo los siguientes procedimientos: historial y físico, que incluyen los signos vitales, el peso, el estado de rendimiento de Karnofsky y la función neurológica; se debe extraer sangre para los ensayos *in vitro* (excepto en las semanas 3, 6 y 9); se debe evaluar el CBC y las plaquetas con diferencial (excepto en la semana 0); se debe evaluar la química, que incluye electrolitos, creatinina, nitrógeno ureico en sangre, glucosa, AST, ALT, Alk phos, bilirrubina total, LDH, calcio y albúmina (excepto en la semana 0); los niveles de AED se deben evaluar si se indican clínicamente; los pacientes deben ser seleccionados para detectar eventos adversos de dosis anteriores, que incluyan la evaluación neurológica y el examen de piel (sitios de inyección); y/o se debe realizar una IRM.

10 **7.9.8.4 Evaluación con vacunas adicionales (casos con vacunas adicionales)**

15 Antes de la administración con vacunas adicionales, se pueden llevar a cabo los siguientes procedimientos: historial y físico, que incluye los signos vitales, el peso, el estado de rendimiento de Karnofsky y la función neurológica; se debe extraer sangre para los ensayos *in vitro* (excepto en las semanas 3, 6 y 9); se debe evaluar el CBC y las plaquetas con diferencial (excepto en la semana 0); se debe evaluar la química, que incluye electrolitos, creatinina, nitrógeno ureico en sangre, glucosa, AST, ALT, Alk phos, bilirrubina total, LDH, calcio y albúmina (excepto en la semana 0); los niveles de AED se deben evaluar si se indican clínicamente; los pacientes deben ser seleccionados para detectar eventos adversos de dosis anteriores, que incluyan la evaluación neurológica y el examen de piel (sitios de inyección); y/o se debe realizar una IRM.

20 Después de la administración con vacunas adicionales, todos los pacientes deben ser observados de cerca para detectar eventos adversos durante por lo menos 20 minutos después de cada vacunación. Las vacunas adicionales se pueden terminar en cualquiera de las siguientes condiciones: 1) progresión del tumor; 2) RLT; o 3) respuesta inmunológica negativa en dos puntos de tiempo consecutivos después del inicio de vacunas adicionales.

TABLA 7: Calendario de estudio

Tabla de manejo de estudios y pruebas	Pre-Vacunación		Tratamiento (Semana)											
	Consentimiento/Tipificación HLA/ patología	dentro de 4 semanas	0	3	6	9	12	15	18	21	24	Cada 12 semanas para vacunas adicionales		
Consentimiento informado para Tipificación HLA	X													
Tipificación HLA	X													
Consentimiento informado para tratamiento (si HLA-A2 es positivo)	X	X												
Revisión de patología	X													
Vacunación [#]			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
CBC y Plaquetas con diferencial		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Pruebas de coagulación (PT y PTT)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Química [#]		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
GGT, Fósforo, Magnesio		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
AED si se indica clínicamente		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Demografía		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Medicamentos concurrentes		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Análisis de orina		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
β-HCG (mujeres en edad fértil)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
EKG o ecocardiograma ^{***} (si se indica clínicamente)		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Hgb A1c ^{***}		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
IRM de cerebro		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Historia, examen físico y KPS	X (solo historia)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Muestras de sangre de Investigación 8 x 10 cc tubos de tapa verde y un tubo de tapa roja		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Medicamento diario		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		

(continuación)

Tabla de manejo de estudios y pruebas	Pre-vacunación		Tratamiento (Semana)							Cada 12 semanas para vacunas adicionales	
	Consen timiento o/Tipificación HLA/pat ología	Dentro de 4 semanas	0	3	6	9	12	15	18		21
<p>Informe de evento adverso</p> <p>#Poli-I/CLC (20 µg/kg i.m. y hasta 1640 µg) se puede administrar el día de la vacuna y el día 4 después de cada vacuna.</p> <p>## Incluye electrolitos, creatinina, nitrógeno ureico en sangre, glucosa, AST, ALT, Aik phos, bilirrubina total, LDH, calcio y albúmina</p> <p>### Pruebas requeridas para participantes con enfermedad cardíaca pasada o actual, que incluye los síntomas.</p> <p>#### Las pruebas solo son necesarias para los participantes con diabetes.</p> <p><* Terapia adicional> Los sujetos se pueden someter a vacunaciones adicionales hasta 2 años después de la administración de la primera vacuna (ver sección 4.2.2), si se observa un estado libre de progresión con base en la IRM, falta de RLT y respuesta inmunitaria anti-GAA después de 8 vacunaciones iniciales. Las vacunas adicionales (y poli-I/CLC en el día de y el día 4 después de cada vacuna) se pueden proporcionar cada 12 semanas, comenzando cualquier semana entre las semanas 34-40. Las vacunas adicionales se pueden terminar si se observa una progresión tumoral, RLT o respuesta negativa de GAA en dos puntos de tiempo consecutivos. Se pueden obtener exámenes físicos y neurológicos, análisis de sangre para verificar los recuentos sanguíneos y la química de sangre y muestras de PBMC cada 12 semanas (en las mismas visitas para las administraciones de vacunas). Se puede realizar una exploración de IRM en las semanas 12 y 24 para verificar su respuesta tumoral (ya sea que su tumor responda o no a las vacunas e inyecciones).</p> <p>** Para los participantes que se sometan a vacunas adicionales, se puede realizar una IRM en la cabeza y una recolección de muestras de sangre para el monitoreo inmunológico cada 12 semanas a partir de la primera vacunación adicional.</p>											

7.9.9 Medición de efecto

7.9.9.1 Objetivos

7.9.9.1.1 Inmunogenicidad

5 La tasa y magnitud de respuesta de las respuestas de célula T CD8+ contra el péptido de GAA en PBMC posterior a vacuna se puede evaluar utilizando Análisis de IFN-γ- ELISPOT, y tetrámero citometría de flujo como el segundo ensayo.

10 Los ensayos de ELISPO indican el estado funcional de las células T específicas de antígeno como expresión de citoquina. Los análisis de citometría de flujo utilizando tetrámeros permiten una estimación relativamente precisa de la frecuencia de células T de unión a antígeno sin una mayor manipulación in vitro del PBMC derivado de paciente, y análisis de fenotipo, tales como la expresión del receptor de retorno (integrinas) sobre células T específicas de antígeno.

Los ensayos biológicos para medir la respuesta en sangre periférica se pueden llevar a cabo en el mismo punto de tiempo para evitar variabilidad interensayo.

15 Utilizando citometría de flujo, la cantidad de subconjuntos de linfocitos tales como células T CD4+, CD4+/células T reguladoras de Foxp3+ también se puede evaluar. Adicionalmente, en pacientes sometidos a desinfección quirúrgica de la progresión del tumor, si el tejido tumoral está disponible, se puede evaluar la infiltración de los CTL específicos de antígeno por citometría de flujo de linfocitos infiltrantes de tumores con tetrámeros de MHC específicos de epítipo.

20 7.9.9.1.2 Seguridad

Se puede determinar la seguridad de la administración de los cuatro epítomos-péptido de antígeno asociado a glioma restringido a HLA-A2 en conjunto con epítipo derivado de tetánico (TT) restringido a MHC de clase II de célula T auxiliar y poli-ICLC i.m. en pacientes con astrocitoma y oligoastrocitoma grado II.

25 Los criterios de valoración pueden incluir incidencia y severidad de eventos adversos, utilizando criterios estándar, así como también seguimiento clínico cercano como se realizaría normalmente en este grupo de pacientes luego de las vacunas. El régimen se puede considerar inaceptablemente tóxico si >33 % de pacientes en una cohorte dada desarrollan RLТ.

7.9.9.1.3 Respuesta y supervivencia libre de progresión

30 La recurrencia del tumor se puede evaluar mínimamente en las semanas 12 y 24, y cada 3 meses después de esto utilizando exploraciones de IRM con mejora de contraste. Dado que los gliomas de bajo grado son tumores infiltrativos que normalmente no mejoran con la administración de contraste, para evaluación de Respuesta y supervivencia libre de progresión, el tumor (es decir, lesión objetivo) se puede medir de las imágenes T2 o FLAIR. En caso de que haya una lesión que mejora en el valor de referencia, se puede hacer una discusión cuidadosa sobre si la información de patología como tumor grado II OMS representa realmente el estado del tumor. Si aún se considera que el tumor de mejora es de grado II, se puede utilizar el tamaño de la lesión que mejora para evaluación. Adicionalmente, como se indica a continuación, se considera que la emergencia de la mejora en el tumor que previamente no mejora es la enfermedad progresiva (PD).

(A) Respuesta (de acuerdo con los criterios RECIST)

Respuesta Completa (CR): desaparición de todas las lesiones objetivo.

40 Respuesta Parcial (PR): Por lo menos una disminución del 30 % en la suma del diámetro más largo (LD) de lesiones objetivo, tomando como referencia la suma de referencia LD.

45 Enfermedad progresiva (PD): Por lo menos un aumento del 20 % en la suma del LD de lesiones objetivo, tomando como referencia la suma más pequeña que LD ha registrado desde que inició el tratamiento o la aparición de mejora de contraste en un tumor que previamente no mejora. Debido a la posibilidad de progresión pseudo-tumoral, los pacientes pueden recibir esteroides en dosis bajas y volver a tomar una imagen antes de declarar que tienen PD.

Enfermedad estable (SD): Ni una contracción suficiente para calificar para PR ni un aumento suficiente para calificar PD, tomando como referencia la suma más pequeña LD desde que inicia el tratamiento.

(B) Supervivencia global (OS) y Supervivencia libre de progresión (PFS)

La PFS se define como la duración de tiempo desde el inicio del tratamiento hasta el tiempo de progresión o muerte. Se puede dar seguimiento a todos los pacientes durante un mínimo de 2 años, para que se pueda determinar su OS y PFS real a 2 años.

7.9.9.1.4 Análisis de tejidos tumorales luego de vacunaciones

- 5 Los tejidos tumorales pueden no estar disponibles en todos los pacientes en el estudio. Sin embargo, los siguientes aspectos se pueden evaluar de forma exploratoria en todos los tejidos tumorales disponibles obtenidos antes y/o después de las vacunas: (i) Pérdida de antígeno; (ii) regulación por aumento de moléculas antiapoptóticas; e (iii) infiltración de célula inmunitaria.

7.9.10 Consideraciones estadísticas

10 7.9.10.1 Evaluación de respuestas inmunológicas

La evaluación de la respuesta inmunitaria puede emplear ambos ensayos IFN- γ ELISPOT y tetrámero

- 15 Un respondedor se puede definir como un paciente que ha respondido a cualquiera de los ensayos IFN- γ ELISPOT o de tetrámero. Una cohorte se puede considerar digna de investigación adicional si hay por lo menos 4 respuestas en los 9 sujetos. Este criterio tiene la propiedad de que si la tasa de respuesta verdadera es $<17\%$, hay $<5\%$ de probabilidad de observar 4 o más respuestas, y que si la tasa de respuesta verdadera es $>66\%$, hay $<5\%$ de probabilidad de observar 3 o menos respuestas.

7.9.10.2 Documentación y evaluación de seguridad

- 20 Los criterios de terminología común del NCI para eventos adversos (EA) (CTCAE 3.0) se pueden utilizar para evaluar la toxicidad; la toxicidad se puede considerar como un evento adverso que posiblemente, probablemente o definitivamente esté relacionado con el tratamiento. El grado máximo de toxicidad para cada categoría de interés se puede registrar para cada paciente y los resultados del resumen se pueden tabular por categoría y grado.

Por razones de seguridad, se puede considerar que el régimen es excesivamente tóxico si, en cualquier momento, la tasa observada de Toxicidad que Limita el Régimen (RLT) $\geq 33\%$ y por lo menos se han observado 2 RLT.

- 25 El diseño del estudio tiene las siguientes propiedades: si la tasa real de RLT es $\geq 45\%$, hay por lo menos 90 % de probabilidad de que la acumulación se detenga; Si la tasa real de RLT es $\leq 9\%$, hay un 90 % de probabilidad de que la acumulación no se detenga, y que el régimen se pueda considerar seguro.

7.9.10.3 Evaluación de los criterios de valoración clínicos

- 30 Se puede dar seguimiento a todos los pacientes durante un mínimo de 2 años, de tal manera que su supervivencia global (OS) de 2 años real, su supervivencia libre de progresión (PFS) y sus tasas de respuesta se puedan tabular como criterios de valoración exploratorios. PFS se define como el intervalo de tiempo de un diagnóstico patológico del paciente de astrocitoma u oligastrocitoma grado II OMS para progresión en base a exploraciones de IRM en serie. Si es apropiado, los análisis exploratorios pueden investigar la relación de la respuesta inmunitaria con la respuesta de formación imágenes y OS/PFS (utilizando la prueba exacta de Fisher y la prueba de log rank, respectivamente).

35 7.9.10.4 Datos demográficos

Se pueden proporcionar estadísticas descriptivas de referencia de todos los pacientes evaluables para las variables demográficas (edad, sexo, raza/etnia), el estado de rendimiento de Karnofsky, la etapa de la enfermedad y el estado en el momento de la inscripción (enfermedad estable, enfermedad progresiva) y/o regímenes de tratamiento previamente utilizados.

40 7.10 Ejemplo 10

Este ejemplo describe un estudio para evaluar los efectos de las vacunas con péptidos de antígeno de glioma restringido a HLA-A2 en combinación con poli-ICLC para niños con gliomas de tronco encefálico malignos o intrínsecos recién diagnosticados (BSG) o gliomas de alto grado no del tronco encefálico incompletamente resecaados (HGG) o gliomas de bajo grado no resecaados recurrentes (LGG).

45 7.10.1 Argumentos

- 50 Actualmente, no existen modalidades terapéuticas efectivas para los gliomas malignos pediátricos. La inmunoterapia, particularmente las vacunas activas, tienen el potencial de desarrollarse como una modalidad efectiva y segura. Las vacunas que utilizan péptidos específicos de GAA, en comparación con los antígenos derivados de glioma completo, pueden ser más factibles porque estas vacunas pueden inducir respuestas inmunitarias específicas de glioma sin preocupaciones teóricas de encefalitis autoinmunitaria. La evidencia de estudios recientes sugiere que los gliomas pediátricos y los gliomas intrínsecos del tronco encefálico tienen un

5 patrón similar de expresión de antígenos asociados a glioma (GAA), que puede ser dirigido por la terapia basada en vacunas. En vista del pronóstico sombrío para los niños con gliomas intrínsecos del tronco encefálico, gliomas malignos con resección incompleta, es apropiado evaluar la actividad y la seguridad de la inmunización después de la radioterapia en estos tumores. Del mismo modo, los gliomas profundos de bajo grado también expresan un espectro similar de GAA. Debido a que estas lesiones comúnmente se vuelven resistentes a la terapia convencional, con un aumento de la morbilidad y la mortalidad, es apropiado evaluar la eficacia potencial de la terapia con vacunas en aquellos pacientes que han tenido una progresión de la enfermedad después de por lo menos dos regímenes de quimioterapia o terapia biológica o irradiación.

10 La administración de poli-ICLC junto con los péptidos GAA mejora notablemente la inducción de respuestas CTL anti-GAA y el tráfico de células T específicas de antígeno a los sitios de tumores de cerebro. En el estudio descrito en este ejemplo, los pacientes pediátricos con glioma maligno recién diagnosticado o gliomas de grado bajo resistentes al tratamiento se pueden vacunar con múltiples epítomos de CTL restringidos a HLA-A2 derivados de GAA en combinación con la administración intramuscular de poli-ICLC.

7.10.2 Objetivos

15 Este ejemplo describe un estudio de vacunación en niños con gliomas del tronco encefálico malignos o intrínsecos (BSG) o gliomas de alto grado no del tronco encefálico no resecados incompletamente recién diagnosticados (HGG) o gliomas de bajo grado no resecados recurrentes (LGG).

7.10.2.1 Inducción de la respuesta de células T específicas de GAA

20 La tasa de respuesta y la magnitud de la respuesta inmunitaria en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) después de la vacuna contra los péptidos GAA en respuesta a esta forma de vacuna se puede determinar utilizando el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima de puntos IFN- γ (ELISPOT) y los ensayos de tetrámeros.

7.10.2.2 Seguridad

25 Se pueden evaluar la incidencia y la gravedad de los eventos adversos asociados con el régimen de la vacuna, con una regla de interrupción temprana basada en la frecuencia de Toxicidad que limita el régimen (RLT) en niños con gliomas de tronco encefálico malignos recién diagnosticados (BSG), y en niños con gliomas de alto grado no del tronco encefálico no resecados incompletamente recién diagnosticados (HGG). La incidencia y la gravedad de los eventos adversos asociados con el régimen de la vacuna también se pueden evaluar en pacientes con gliomas de bajo grado no resecados, resistentes al tratamiento, que han progresado después de dos regímenes de quimioterapia o terapia biológica o irradiación.

7.10.2.3 Respuesta clínica

30 La respuesta radiológica se puede determinar utilizando los criterios estándar de respuesta de la OMS. La supervivencia libre de progresión (SLP) de 2 años se puede evaluar de forma exploratoria, en base a las exploraciones de formación de imágenes de resonancia magnética (IRM) en serie.

7.10.2.4 Tejidos tumorales para correlatos biológicos.

35 Para los pacientes con tumores no del tronco encefálico que desarrollan progresión, se puede alentar la biopsia/reducción de tumores. Cada vez que se dispone los tejidos tumorales después de la vacuna, se pueden analizar el estado de la expresión de GAA y la infiltración de células T específicas de GAA.

7.10.3 Selección de pacientes

7.10.3.1 Criterio de elegibilidad

40 Criterios patológicos - Los pacientes tendrán glioma. En algunas realizaciones, el paciente con glioma se encuentra en uno de los siguientes estratos: (i) Estrato A: Gliomas pontinos intrínsecos difusos recién diagnosticados o cualquier glioma de alto grado con biopsia comprobada que afecte al tronco encefálico; (ii) Estrato B: glioma de alto grado novel tronco encefálico, resecado incompletamente recién diagnosticado (es decir, tumor residual definido visible en la imagen); o (iii) Estrato C: glioma progresivo de bajo grado no resecado de cualquier subtipo que haya recurrido a pesar de dos regímenes anteriores de quimioterapia o terapia biológica y/o terapia de radiación; (iv) Estrato D: Gliomas pontinos intrínsecos difusos recién diagnosticados (DIPG) O cualquier glioma* de alto grado probado en biopsia que involucre el tronco encefálico tratado con terapia de radiación con o sin quimioterapia durante irradiación; (v) Estrato E: Gliomas* de alto grado no del tronco encefálico recién diagnosticados (HGG) tratados con terapia de radiación con o sin quimioterapia durante irradiación; (vi) Estrato F: gliomas* de alto grado no recurrentes del tronco encefálico que han recurrido después del tratamiento. Los pacientes se deben haber recuperado de los efectos tóxicos de la terapia previa. Las histologías elegibles para el glioma de alto grado incluyen glioblastoma (GBM), astrocitoma anaplásico (AA) o gliosarcoma. Los pacientes con cualquier componente de oligodendroglioma pueden no ser elegibles para el protocolo particular descrito en este ejemplo.

Los pacientes en este estudio deben ser positivos a HLA-A2 en base a la citometría de flujo.

Los pacientes en el Estrato A y B deberían haber recibido una RT de campo involucrada estándar definida como radioterapia de haz externo fraccionada con dosis totales entre 5000-6000 cGy. Los pacientes en estos estratos deben registrarse dentro de las 4 a 12 semanas de completar la RT.

- 5 Los pacientes en este estudio deben ser clínicamente estables y estar ausentes o en dosis bajas de corticosteroides (no más de 0,1 mg/kg/día, máximo 4 mg/día de dexametasona) durante por lo menos una semana antes del registro del estudio.

Los pacientes en este estudio deben tener ≥ 3 y <21 años de edad al momento del estudio.

Los pacientes en este estudio deben tener un estado de rendimiento de ≥ 50 ; (Karnofsky si > 16 años y Lansky si < 16 años).

- 10 Las pacientes femeninas en este estudio que son posmenárquicas deben haber documentado β HCG en suero negativo.

Los pacientes en este estudio deben estar libres de infección sistémica. Los pacientes en terapia con antibióticos deben dejar de tomar antibióticos durante por lo menos 7 días antes de comenzar el tratamiento.

- 15 Los pacientes en este estudio deben tener una función orgánica adecuada, medida por: (i) Médula ósea: ANC $>1.000/\mu\text{l}$; Plaquetas $>100.000/\mu\text{l}$ (transfusión independiente); Hemoglobina >8 g/dl (puede ser transfundida); (ii) Hepático: bilirrubina $\leq 1,5$ x normal institucional para la edad; SGPT (ALT) <3 x normal institucional y albúmina >2 g/dl; (iii) Renal: creatinina sérica basada en la edad o la depuración de creatinina o radioisótopos GFR ≥ 70 ml/min/1,73 m² Los pacientes en este estudio se deben someter a pruebas de coagulación y PT y PTT dentro de los límites normales para su edad.

- 20 Los pacientes en este estudio no deben tener una enfermedad cardíaca, gastrointestinal, pulmonar o psiquiátrica manifiesta.

Para los pacientes en el estrato C, puede ser necesaria la recuperación de los efectos de la quimioterapia previa.

7.10.3.2 Criterio de exclusión

- 25 Los pacientes en el estrato A y el estrato B de este estudio se deben excluir si tienen presencia de enfermedad metastásica leptomeníngea.

Los pacientes en este estudio se deben excluir si tienen tumores gruesos totalmente resecados, es decir, no hay una enfermedad residual visible definida en la exploración por IRM en el momento del estudio.

- 30 Los pacientes en el estrato A y el estrato B de este estudio se deben excluir si han recibido alguna quimioterapia previa o terapia antiglioma de cualquier tipo que no sea terapia de radiación. (Los pacientes en el estrato C de este estudio deberían haber recibido por lo menos dos regímenes de quimioterapia o terapia biológica y/o terapia de radiación).

- 35 Los pacientes en este estudio se deben excluir si se someten a un tratamiento o medicamentos concurrentes que incluyen: terapia de radiación; interferón (por ejemplo, Intron-A®); inyecciones desensibilizantes de alergia; esteroides inhalados (por ejemplo: Advair®, Flovent®, Azmacort®); factores de crecimiento (por ejemplo, Procrit®, Aranesp®, Neulasta®); interleuquinas (por ejemplo, Proleukin®); y/o cualquier medicamento terapéutico en investigación.

Los pacientes en este estudio no deben haber tenido trastornos autoinmunitarios previos que requieran terapia citotóxica o inmunosupresora, o trastornos autoinmunitarios con compromiso visceral. La artritis leve que requiere medicamentos NSAID no debe ser excluyente.

- 40 Los pacientes en este estudio se deben excluir si han utilizado inmunosupresores dentro de las cuatro semanas previas al ingreso al estudio o si anticipan el uso de agentes inmunosupresores. Dexametasona u otros medicamentos corticosteroides, si se utilizan durante el período perioperatorio y/o durante la radioterapia, deben ser reducidos por los pacientes (no más de 0,1 mg/kg/día, máximo 4 mg/día de dexametasona) durante por lo menos una semana antes del registro del estudio. Los corticosteroides tópicos deben ser aceptables.

- 45 Los pacientes en este estudio se deben excluir si tienen una adicción conocida al alcohol o fármacos ilícitos.

Debido a que no se espera que los pacientes con deficiencia inmunitaria respondan a esta terapia, los pacientes positivos a VIH se deben excluir del estudio.

7.10.4 Vacuna de péptido

7.10.4.1 Péptidos

Los siguientes péptidos se pueden incluir en la formulación de la vacuna; IL-13R α 2₃₄₅₋₃₅₃ 1A9V (ALPFGFILV; SEQ ID NO:3); EphA2₈₈₃₋₈₉₁ (TLADFDPRV; SEQ ID NO:6); Survivin₉₆₋₁₀₄:M2 (LMLGEFLKL; SEQ ID NO:7); y toxoide tetánico (TetA830) (AQYIKANSKFIGITEL; SEQ ID NO:9).

5 Todos los péptidos se pueden sintetizar y los péptidos sintéticos se pueden purificar por HPLC. La identidad de los péptidos sintéticos se puede confirmar al verificar su masa y secuencias de aminoácidos por espectrometría de masas. Cada lote de péptido se puede evaluar según lo requiera la FDA para determinar su identidad, pureza, esterilidad y pirogenicidad.

Los péptidos se pueden depositar bajo condiciones de GMP y guardarse a -70 °C. La estabilidad de los péptidos liofilizados se puede probar anualmente mediante espectroscopia de masas.

10 7.10.4.2 Otros agentes

Se puede utilizar Montanide ISA-51 (SEPPIC Inc., Fairfield, NJ) como un agente adicional en las vacunas de péptidos.

7.10.4.3 Dosificación y preparación

15 Una solución acuosa (400 μ L) que contiene cada uno de los cuatro péptidos GAA restringidos por HLA-A2 (300 μ g/péptido) y el péptido tetánico (Péptido-tet; 200 μ g) se puede mezclar 1/1 con Montanide ISA-51 para formar una emulsión de agua en aceite (es decir, el volumen/inyección total es de 800 μ L).

7.10.4.4 Administración

Los pacientes en este estudio pueden ser vacunados subcutáneamente en la parte superior del brazo o en el muslo.

La vacuna se puede administrar Q3Wk comenzando 4-12 semanas después de completar RT (Semana 1).

20 7.10.5 Poli-ICLC

El Poli-ICLC se puede preparar y empacar en las instalaciones GMP de Bioserv, Corporation (San Diego, California). El Poli-ICLC se puede suministrar en frascos que contengan 1 cc de solución translúcida con una concentración de 2 mg por cc. El Poli-ICLC es estable a temperatura ambiente durante varios días, pero se puede almacenar refrigerado a aproximadamente 4,44° C.

25 7.10.5.1 Dosificación y administración

El primer curso de administración de poli-ICLC (30 μ g/kg i.m.) se puede administrar el día de la primera vacuna de GAA/TT. Para cada una de las siguientes vacunas repetidas (Q3W), se puede administrar poli-ICLC (30 μ g/kg i.m.) el día de la vacuna.

30 Con respecto a los sitios de inyección, dado que se espera que el poli-ICLC mejore el proceso de presentación del antígeno en los ganglios linfáticos de drenaje, el poli-ICLC se debe administrar i.m. en la vecindad del sitio de inyección de péptidos anterior (por ejemplo, a menos de 3 cm del centro de los sitios de inyección de péptidos anteriores).

35 Se debe administrar Poli-ICLC por vía intramuscular (i.m.) utilizando una técnica estéril, tal como se suministra en el frasco, y en la cantidad prescrita para el peso del paciente. Los tratamientos con poli-ICLC se pueden administrar el mismo día que la vacuna. Los signos vitales se pueden monitorizar antes y durante por lo menos 20 minutos después del primer tratamiento.

7.10.6 Plan de tratamiento

40 El estudio descrito en este Ejemplo puede emplear tres estratos para evaluar la inmunogenicidad, la seguridad y la eficacia clínica preliminar de la vacuna de GAA/TT-péptido y el poli-ICLC en niños HLA-A2+ con gliomas de tronco encefálico intrínsecos recién diagnosticados (BSG) o GBM, AA o gliosarcoma que involucra el tronco encefálico (Estrato A) probado con biopsia; o GBM no del tronco encefálico resecado incompletamente, AA o gliosarcoma (Estrato B); o gliomas de bajo grado progresivos recurrentes (estrato C).

7.10.6.1 Programación

45 Después del diagnóstico (para el Estrato A y B) o después de la progresión de la enfermedad (para el Estrato C), el tratamiento de acuerdo con el estudio descrito en este Ejemplo se puede discutir con pacientes potencialmente elegibles. Todos los pacientes en los estratos A y B pueden recibir terapia de radiación de haz externo fraccionada (FEBRT). Los pacientes se pueden evaluar para el estado HLA-A2. El cribado de elegibilidad y la exploración de IRM de referencia y los estudios de laboratorio deben completarse dentro de las 2 semanas de haberse registrado para participar en el estudio y dentro de las 3 semanas de recibir la primera vacuna. Los pacientes en el Estrato A y
50 B deben registrarse para participar en el estudio dentro de las 4-12 semanas posteriores a la finalización de FEBRT.

El momento del registro en el estudio para estos pacientes dependerá de si la IRM posterior a RT (normalmente realizada en la semana 4) muestra evidencia de aumento del efecto de masa o masa y si el paciente es clínicamente sintomático/se empeora. Si es así, el registro en el estudio se producirá cuando el paciente haya estado clínicamente estable/mejorado y en dosis bajas (0,1 mg/kg/día, máximo 4 mg de decadrón) o sin esteroides por una semana.

Los pacientes se pueden tratar con inyecciones subcutáneas de vacunas de GAA/TT que comienzan en la semana 1 y cada 3 semanas a partir de entonces hasta 8 ciclos. El poli-ICLC i.m. se puede administrar (30 µg/kg i.m.) el mismo día de la vacuna. Cada vacuna se puede administrar justo antes de la administración de poli-ICLC i.m. El Poli-ICLC se debe administrar i.m. cerca de la vecindad del sitio de inyección de péptidos anterior (por ejemplo, a menos de 3 cm del centro de los sitios de inyección de péptidos anteriores).

Los pacientes se pueden evaluar para detectar cualquier posible evento adverso, RLT, así como respuestas clínicas/radiológicas mediante visitas clínicas y exploraciones de IRM. Las IRM de seguimiento se pueden realizar cada 9 semanas a partir de la semana 7 (semanas 7, 16 y 25).

Las PBMC obtenidas antes de la vacuna inicial se pueden utilizar como muestra del valor de referencia. En las semanas 7, 16 y 25, se pueden obtener PBMC como muestras posteriores a la vacuna. Se pueden realizar ensayos inmunológicos para todas las muestras de PBMC obtenidas de por lo menos un participante a la vez, de tal manera que se evitará la variabilidad inter-ensayos.

7.10.6.2 Terapia de “continuación” adicional

Después de la 8ª vacunación programada, si el paciente demuestra una respuesta radiológica (es decir, una respuesta completa o parcial) o una enfermedad estable sin RLT, el paciente puede recibir vacunas adicionales con péptidos junto con el poli-ICLC iniciando 6 semanas después de la 8ª vacunación, y cada 6 semanas a partir de entonces hasta 2 años después de la vacunación inicial, siempre que no haya progresión tumoral ni RLT. Se pueden obtener muestras de PBMC adicionales en las mismas visitas para las administraciones de vacunas para la monitorización inmunológica. Las vacunas adicionales se pueden terminar en cualquiera de las siguientes condiciones: 1) progresión del tumor; 2) RLT; o 3) retiro del paciente.

7.10.6.3 Modificación de dosis

7.10.6.3.1 Modificación de dosis de poli-ICLC

El tratamiento previo con acetaminofén o con cualquier NSAID se debe administrar antes de cada dosis de poli-ICLC. Para los síntomas constitucionales de Grado 2 o superior es que persisten por más de 48 horas después de la inyección, la siguiente dosis de poli-ICLC se debe administrar al 67 % de la dosis original (es decir, 20 µg/kg). Si la dosis adicional es bien tolerada, la dosis original se puede volver a instituir posteriormente. Si los síntomas de grado 2 o superior vuelven a aparecer a pesar de una reducción de la dosis y duran más de 48 horas, el paciente puede ser retirado por RLT.

En el caso de la elevación de la enzima hepática >5x valor de referencia (Grado 3), o cualquier toxicidad no hematológica de grado 2 intolerable que dura ≥7 días, la poli-ICLC se puede mantener hasta que la toxicidad se haya reducido a Grado 1 o inferior. El poli-ICLC se puede volver a administrar a las dos terceras partes de la dosis original (es decir, 20 µg/kg), y el participante puede ser observado de cerca. Si la misma toxicidad limitante de la dosis se repite nuevamente a pesar de la reducción de la dosis, el participante puede ser retirado por RLT.

Para toxicidad hematológica de grado 3 o mayor, la siguiente dosis se debe reducir a 67 % (es decir, 20 µg/kg) siempre que la toxicidad se haya resuelto en grado 1 o inferior en el momento en que se deba la siguiente dosis. Si la toxicidad no se ha resuelto en el momento de la próxima dosis, el paciente está fuera del tratamiento. Si se producen nuevamente las mismas toxicidades hematológicas limitantes de la dosis a pesar de la reducción de la dosis, se puede retirar al paciente del tratamiento para RLT.

7.10.6.3.2 Retraso en la dosificación de las vacunas de péptidos

En circunstancias en las que se suspende la administración de poli-ICLC, si el evento no es atribuible a la vacuna de péptidos/ISA-51, la administración de la vacuna debe continuar en el programa. En circunstancias donde la evaluación de un evento adverso es limitada, tales como por enfermedad intercurrente, o cuando se requieren estudios de laboratorio para evaluar otras causas de toxicidad, el programa de vacunación se puede interrumpir hasta 6 semanas. Si la administración de la vacuna se retrasa por más de 6 semanas debido a un evento adverso que no sea por la progresión de un pseudotumor, independientemente de la atribución, se debe interrumpir el tratamiento.

Se pueden observar los pacientes por una toxicidad que limita el régimen (RLT) a lo largo del estudio. Se considera que los siguientes son RLT si se los juzga posiblemente, probablemente o definitivamente asociados con el tratamiento. En caso de que ocurran, los pacientes individuales pueden ser retirados del estudio y no se pueden administrar más inyecciones.

Broncoespasmo o urticaria generalizada (hipersensibilidad) \geq grado 2 o superior.

Reacción alérgica, tal como eritoderma exfoliativa, anafilaxia o colapso vascular \geq grado 2 o superior.

5 Cualquier toxicidad no hematológica (que excluye la toxicidad hepática) \geq grado 3 posiblemente, probablemente o definitivamente relacionada con el régimen de tratamiento, incluye la reacción en el lugar de inyección de \geq Grado 3 debido a la administración de péptido-vacuna o poli-ICLC. Toxicidad hematológica o hepática \geq grado 3 que se repite a pesar de una reducción de la dosis del 33 % o que no se resuelve en grado 1 o inferior en el momento se debe a la próxima dosis.

Toxicidad no hematológica intolerable de grado 2 que dura ≥ 7 días y se repite a pesar de una reducción de la dosis del 33 % o no se resuelve en grado 1 o inferior al momento se debe a la próxima dosis.

10 Síntomas constitucionales de grado 2 o superior que persisten durante >48 horas a pesar de una reducción de la dosis.

Neurotoxicidad de \geq grado 3 debido a una respuesta inmunitaria inflamatoria relacionada con el régimen (es decir, progresión pseudo-tumoral que no responde a un ensayo de 7 días de 0,3 mg/kg/día de decadrón (máximo 12 mg/día) y/o requiere cirugía de reducción de masa, si es posible.

15 Náuseas y vómitos \geq grado 3 a pesar de una profilaxis antiemética suficiente.

La dosificación se retrasa >6 semanas para las vacunas de poli-ICLC o péptidos debido a una toxicidad distinta de la PTP.

20 La terapia se puede interrumpir por los siguientes motivos: (i) Toxicidad que limita el régimen distinta de la PTP, tales como se definió anteriormente; (ii) progresión de la enfermedad - por lo menos un aumento del 25 % en el producto del diámetro del tumor más largo y su diámetro perpendicular en la resonancia magnética, (iii) Enfermedad intercurrente que evita la administración adicional de la vacuna o la administración de poli-ICLC durante más de 6 semanas, (iv) Embarazo: las pacientes embarazadas continuarán siendo atendidas durante el embarazo.

7.10.6.4 Duración del tratamiento

25 En ausencia de retrasos en el tratamiento debido a eventos adversos, el tratamiento puede continuar durante 25 semanas (8 vacunaciones y la visita de seguimiento en la Semana 25) o hasta que se produzca uno de los criterios de No tratamiento en la Sección 7.10.6.3.2.

7.10.6.5 Tratamiento concomitante

7.10.6.5.1 Aceptable

30 Los pacientes deben recibir una dosis de acetaminofén (15 mg/kg hasta un máximo de 1000 mg) 30-60 minutos antes de cada administración de poli-ICLC. Para la fiebre después de la inyección, se puede proporcionar acetaminofén (15 mg/kg hasta un máximo de 1000 mg q 4-6 horas por día, sin exceder 4 g/día). Los pacientes con fiebres que duran más de 48 horas deben ser evaluados para una posible infección.

35 Para el dolor local leve, se pueden utilizar opiáceos orales (tilenol y codeína 0,5 mg/kg p.o. cada 4 horas). El dolor que es más del grado leve a moderado se investigará por causas no relacionadas con la terapia y se tratará de acuerdo con lo anterior.

Dexametasona: no más de 0,1 mg/kg/día, máximo 4 mg/día durante por lo menos una semana antes del inicio de la terapia de vacuna/poli-ICLC (semana 0). La dosis de dexametasona puede incrementarse en el contexto de la progresión de pseudo-tumor y se reduce/interrumpe lo antes posible.

Los medicamentos anticonvulsivos se deben utilizar como se indica.

40 Se pueden administrar antieméticos, si es necesario.

Otros medicamentos aceptables pueden incluir: Corticosteroides tópicos; agentes antiinflamatorios no esteroideos; antihistamínicos (por ejemplo, Claritin®, Allegra®); medicamentos crónicos, excepto aquellos enumerados en la Sección 7.10.6.5.2; y/o vacunas contra la gripa (deben administrarse por lo menos dos semanas antes del inicio de las vacunas del estudio o por lo menos dos semanas después de la 8ª (última) vacuna).

45 7.10.6.5.2 Inaceptable

Los medicamentos inaceptables pueden incluir terapia con interferón (por ejemplo, Intron-A®); quimioterapia; inyecciones desensibilizantes de alergia; medicamentos corticosteroides administrados por vía parenteral o por inhalación (por ejemplo: Advair®, Flovent®, Azmacort®); factores de crecimiento (por ejemplo, Procrit®, Aranesp®, Neulasta®); interleuquinas (por ejemplo, Proleukin®); otros medicamentos de investigación; y/o fármacos ilícitos.

7.10.7 Estudios correlativos/especiales

7.10.7.1 Monitorización inmunológica

7.10.7.1.1 Ensayos ELISPOT

5 Las frecuencias de los precursores de linfocitos T sensibles a antígenos asociados a glioma (GAA): en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) antes y después de la administración de la vacuna basada en el péptido GAA se puede medir mediante el ensayo ELISPOT. Las respuestas biológicas medidas por ELISPOT pueden realizarse en el mismo punto de tiempo por lo menos para un paciente individual para evitar la variabilidad inter-ensayos. La vacunación exitosa estimula poblaciones clonales de células T que son capaces de secretar citoquinas de una manera restringida por MHC específica de antígeno. El ensayo ELISPOT se puede utilizar para evaluar las respuestas inmunitarias específicas de GAA de poblaciones de células T CD8+, así como las células T CD4+ que reaccionan contra el péptido TT auxiliar. Luego se puede evaluar la producción de IFN- γ para evaluar la respuesta de las células T tipo 1.

15 Se puede considerar que un sujeto ha respondido, si en cualquiera de los dos puntos de tiempo consecutivos posteriores a la vacuna contra el mismo antígeno[s] (semanas 12, 15, 18, 21 y 24), el número de puntos es el doble que en el valor de referencia, y hay por lo menos 10 puntos/20.000 células, y si el número de puntos después de la vacuna es por lo menos tres veces la desviación estándar del valor de la vacuna previa. La respuesta puede ser para cualquier antígeno.

7.10.7.1.2 Análisis de tetrámeros de células T reactivas a GAA en PBMC de pacientes

20 Los análisis de tetrámero permiten la evaluación de la presencia de células T CD8+ específicas de GAA en sangre periférica con una gran sensibilidad sin reestimulación *in vitro* de las células. Se espera, en base a los datos previos disponibles de pacientes con glioma maligno, que se pueda observar un aumento significativo (un registro o más) en la frecuencia de células T CD8+ sensibles a péptidos en algunos pacientes, pero no en todos, inmunizados con vacunas basadas en antígeno tumoral. De manera exploratoria, estas PBMC también se pueden evaluar para determinar la expresión en la superficie de un antígeno muy tardío del receptor de integrina(VLA)-4, que se ha implicado en conferir el retorno de células T en tumores del SNC (véase, por ejemplo, Zhu et al., J.Transl. Med., 5: 10, 2007) y receptores de quimioquinas (por ejemplo, CXCR3 y CCR5). Los procedimientos para el análisis de tetrámeros están bien establecidos.

30 Los ensayos de tetrámero se pueden realizar al inicio del estudio y en los 5 puntos de tiempo después de las vacunas (semanas 12, 15, 18, 21 y 24). Se puede definir una única respuesta positiva en el punto de tiempo para que un péptido sea (1 + B) % de todas las células CD8+ positivas por ensayo tetrámero, en el que B es el porcentaje positivo de referencia, que generalmente es menor que 0,1 %. En analogía con la definición de respuesta ELISPOT, se puede considerar que un paciente ha respondido si tiene dos respuestas de punto de tiempo consecutivas únicas para cualquier péptido.

7.10.7.1.3 Análisis citométricos de flujo de subconjuntos de linfocitos.

35 Se pueden evaluar los números de células T CD4+ y CD8+, así como las células T reguladoras CD4+/Foxp3+ en los puntos de tiempo en serie antes y después de las vacunas.

7.10.7.2 Evaluación de tejidos tumorales primarios y recurrentes

40 La expresión de GAA en los tejidos tumorales disponibles de los pacientes se puede evaluar (ya sea antes de la vacuna o después de la progresión después de las vacunas; o ambos) mediante inmunohistoquímica (IHC) y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

45 Si los tumores recurren después de las vacunas, puede ser crítico evaluar cómo los tumores escapan a los efectos de las vacunas. Con este fin, se pueden evaluar los siguientes problemas específicos tanto como lo permita la disponibilidad de tejido: (i) Pérdida de antígeno: se puede utilizar IHC y RT-PCR para evaluar si los tumores recurrentes expresan los GAA específicos, HLA-A2, y componentes de la maquinaria de procesamiento de antígenos, tales como el transportador asociado con el procesamiento de antígenos; (ii) regulación en aumento de las moléculas antiapoptóticas: aunque el survivina puede ser un objetivo, otras moléculas antiapoptóticas pueden estar reguladas en aumento, por ejemplo, cFLIP (proteína inhibidora FLICE celular (enzima convertidora IL-1 β similar al dominio de la muerte asociada a Fas)); y (iii) infiltración de células inmunitarias: una de las razones por las cuales los tumores pueden escapar a una respuesta inmunitaria inducida por la vacuna es la falla de las células T reactivas para infiltrarse en el tumor. Para examinar esto, siempre que se disponga de tejidos tumorales recientemente resecados (no fijados o congelados), se pueden aislar linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) y se puede caracterizar su número, fenotipo y especificidad de antígeno utilizando tetrámeros HLA-A2 para cada uno de los GAA. Utilizando la citometría de flujo de varios colores, la función y la viabilidad de los TILs de tetrámero+ se pueden determinar mediante tinción para perforina/IFN- γ y Anexina-V, respectivamente. Los tejidos de control pueden incluir tumores previos a la vacuna (si están disponibles) y tumores recurrentes de pacientes que no están

en el estudio. Estos estudios pueden permitir la evaluación de si las células T inducidas por la vacuna trafican eficientemente al sitio del tumor cerebral y mantienen su función y viabilidad.

7.10.8 Parámetros de estudio

5 Este estudio se puede realizar de forma ambulatoria, con pacientes programados para ser evaluados cada 3 semanas hasta un máximo de 8 vacunaciones. Si los pacientes reciben vacunas adicionales, administradas cada 6 semanas como parte de la fase de continuación, se puede realizar una monitorización clínica, inmunológica y radiológica (IRM) en cada visita (Q6Wk) hasta que se cumpla uno de los criterios para finalizar el tratamiento. Las vacunas pueden interrumpirse para cualquier paciente con enfermedad progresiva o toxicidad inaceptable en cualquier momento durante las vacunaciones programadas.

10 7.10.8.1 Pretratamiento (datos de referencia y cribado)

Se pueden realizar los siguientes procedimientos antes de proceder con el tratamiento: Se debe obtener el consentimiento informado antes de iniciar el cribado; Tipificación de HLA (evaluación de citometría de flujo para la positividad de HLA-A2); y documentación del diagnóstico (histológico para primarios con tronco encefálico (es decir, Estrato B); patológico o de imágenes para primarios con tronco encefálico); historial completo y examen físico (con signos vitales y peso), incluidos exámenes neurológicos y estado de rendimiento; la información demográfica de la medicamento concurrente debe ser registrada; se deben evaluar los CBC y plaquetas con diferencial; se debe evaluar PT/PTT; se debe evaluar un panel metabólico completo, que incluya electrolitos, creatinina, nitrógeno ureico en sangre, glucosa, AST, ALT, Alk phos, bilirrubina total, LDH, calcio y albúmina; Se debe evaluar la GGT, el fósforo y el magnesio; Se debe extraer sangre para los ensayos *in vitro*; se debe realizar un análisis de orina; Se debe realizar IRM del cerebro; y/o a las mujeres en edad fértil se les debe administrar una prueba de embarazo de beta-HCG en suero.

7.10.8.2 Evaluación durante el tratamiento

25 Los siguientes procedimientos se pueden llevar a cabo a medida que avanza el tratamiento. Pre-Administración: historial y físico, incluidos signos vitales, peso, estado de rendimiento, medicamento concurrente y función neurológica; se debe extraer sangre para los ensayos *in vitro*; Se debe evaluar la química, que incluye electrolitos, creatinina, nitrógeno ureico en sangre, glucosa, AST, ALT, Alk phos, bilirrubina total, LDH, calcio y albúmina; los pacientes deben ser seleccionados para detectar eventos adversos de dosis anteriores, que incluyan la evaluación neurológica y el examen de piel (sitios de inyección); y/o se debe realizar una IRM (cada 9 semanas a partir de la semana 6; es decir, semanas 6, 15 y 24).

30 Después de la administración de la vacuna, todos los pacientes deben ser observados de cerca para detectar eventos adversos durante por lo menos 20 minutos después de cada administración de la vacuna de GAA-péptido. El mismo día, se administrará poli-ICLC (i.m. 30 mg/kg) después de cada vacuna, y los pacientes serán monitoreados durante por lo menos 20 minutos después de la inyección de poli-ICLC.

7.10.8.3 Evaluación de la semana 24 (después de 8 vacunaciones)

35 Una vez que se completa el ciclo de vacunación, se pueden llevar a cabo los siguientes procedimientos: historial y examen físico incluyendo signos vitales, peso, estado de rendimiento, medicamento concurrente y función neurológica; Se debe extraer sangre para los ensayos *in vitro*; se deben evaluar los CBC y plaquetas con diferencial; Se debe evaluar la química, que incluye electrolitos, creatinina, nitrógeno ureico en sangre, glucosa, AST, ALT, Alk phos, bilirrubina total, LDH, calcio y albúmina (excepto en la semana 0); y/o los pacientes deben ser seleccionados para detectar eventos adversos de dosis anteriores, que incluyan la evaluación neurológica y el examen de piel (sitios de inyección).

7.10.8.4 Evaluación con vacunas “continuación” adicionales

45 Antes de la administración con vacunas adicionales, se pueden llevar a cabo los siguientes procedimientos: historial y examen físico incluyendo signos vitales, peso, estado de rendimiento, medicamento concurrente y función neurológica; Se debe extraer sangre para los ensayos *in vitro*; se deben evaluar los CBC y plaquetas con diferencial; Se debe evaluar la química, que incluye electrolitos, creatinina, nitrógeno ureico en sangre, glucosa, AST, ALT, Alk phos, bilirrubina total, LDH, calcio y albúmina (excepto en la semana 0); los pacientes deben ser seleccionados para detectar eventos adversos de dosis anteriores, que incluyan la evaluación neurológica y el examen de piel (sitios de inyección); y/o se debe realizar IRM.

50 Después de la administración con vacunas adicionales, todos los pacientes deben ser observados de cerca para detectar eventos adversos durante por lo menos 20 minutos después de cada vacunación. Las vacunas adicionales se pueden terminar en cualquiera de las siguientes condiciones: 1) progresión del tumor; 2) RLT; o 3) respuesta inmunológica negativa en dos puntos de tiempo consecutivos después del inicio de vacunas adicionales.

TABLA 8: Calendario de estudios

Tabla de manejo de estudios y pruebas	Pre-vac@	0	3	6	9	12	15	18	21	24	cada 12 semanas para vacunas adicionales*
Consentimiento informado	X										
Tipificación HLA	X										
Revisión de patología	X										
Vacunación #	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X (Q6Wks)
CBC con diferencial	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X (Q6Wks)
Química exhaustiva que incluye LDH, ALT y AST	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X (Q6Wks)
Demografía	X										
Medicamentos concurrentes	X										
Análisis de orina	X										
β-HCG (mujeres en edad fértil)	X										
IRM de cerebro	X						X			X	X**
Historia, examen físico, y KPS	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X (Q6Wks)
Tubos de tapa verde 35 cc (7 tubos)	X						X			X	X**

←-----→

@ Dentro de las 2 semanas de registro (semana -2 a 0) para H&P, IRM y pruebas de laboratorio. La tipificación HLA se realiza en cualquier momento después de firmar la Parte 1 del formulario de consentimiento.

Se puede administrar poli-ICLC (30 µg/kg i.m.) después de cada vacuna.

<* Terapia adicional> Los sujetos se pueden someter a vacunas adicionales, si se observa un estado libre de progresión basado en la RMN y la falta de RL T después de las 8 vacunas iniciales. Las vacunas adicionales y el poli-ICLC se pueden proporcionar cada 6 semanas, comenzando 6 semanas después de la 8ª vacunación y hasta 2 años después de la vacunación inicial. Las vacunaciones adicionales se pueden dar por terminadas si se cumplen los criterios de tratamiento fuera del tratamiento.

** Para pacientes que se someten a vacunas adicionales, se puede realizar una IRM cerebral y una recolección de muestras de sangre para la monitorización inmunológica cada 6 semanas.

7.10.9 Medición de efecto

7.10.9.1 Objetivos

7.10.9.1.1 Inmunogenicidad

- 5 **La tasa y magnitud de respuesta** de las respuestas de célula T CD8+ contra el péptido de GAA en PBMC posterior a vacuna se puede evaluar utilizando Análisis de IFN- γ - ELISPOT, y tetrámero citometría de flujo como el segundo ensayo.

10 Los ensayos de ELISPO indican el estado funcional de las células T específicas de antígeno como expresión de citoquina. Los análisis de citometría de flujo utilizando tetrámeros permiten una estimación relativamente precisa de la frecuencia de células T de unión a antígeno sin una mayor manipulación in vitro del PBMC derivado de paciente, y análisis de fenotipo, tales como la expresión del receptor de retorno (integrinas) sobre células T específicas de antígeno.

Los ensayos biológicos para medir la respuesta en sangre periférica se pueden llevar a cabo en el mismo punto de tiempo para evitar variabilidad interensayo.

- 15 Utilizando citometría de flujo, la cantidad de subconjuntos de linfocitos tales como células T CD4+, CD4+/células T reguladoras de Foxp3+ también se puede evaluar. Adicionalmente, en pacientes sometidos a desinfección quirúrgica de la progresión del tumor, si el tejido tumoral está disponible, se puede evaluar la infiltración de los CTL específicos de antígeno por citometría de flujo de linfocitos infiltrantes de tumores con tetrámeros de MHC específicos de epítipo.

20 7.10.9.1.2 Seguridad

- Se puede determinar la seguridad de la administración de los cuatro epítopos-péptido de antígeno (GAA) asociado a glioma restringido a HLA-A2 en conjunto con epítipo derivado de tetánico (TT) restringido a MHC de clase II de célula T auxiliar y poli-ICLC i.m. en pacientes con gliomas malignos de tronco encefálico y no de tronco encefálico recién diagnosticados inmediatamente luego de irradiación (Estrato A y B, respectivamente) y en pacientes con glioma de bajo grado no resecado resistente a tratamiento (Estrato C).

25 Los criterios de valoración pueden incluir incidencia y severidad de eventos adversos, utilizando criterios estándar, así como también seguimiento clínico cercano como se realizaría normalmente en este grupo de pacientes luego de las vacunas. El régimen se puede considerar inaceptablemente tóxico si >33 % de pacientes en una cohorte dada desarrollan RLT.

30 7.10.9.1.3 Respuesta y supervivencia libre de progresión

Para la evaluación de la respuesta y la supervivencia libre de progresión, el tumor (es decir, la lesión objetivo) se puede medir a partir de imágenes de RMN T1 potenciadas con gadolinio (Gd) o, para tumores con componentes que no mejoran, a partir de imágenes ponderadas en T2.

(A) Respuesta (de acuerdo con los criterios RECIST)

- 35 Respuesta completa (CR): desaparición completa sobre IRM de todo tumor visible y efecto de masa, en una dosis estable o decreciente de corticosteroides (o solo en dosis de reemplazo suprarrenal), acompañada de un examen neurológico estable o en mejoría, y se mantiene durante por lo menos 6 semanas.

40 Respuesta parcial (PR): reducción mayor o igual al 50 % en el tamaño del tumor mediante la medición bidimensional en una dosis estable o decreciente de corticosteroides, acompañada de un examen neurológico estable o en mejoría, y se mantiene durante por lo menos 6 semanas.

45 Enfermedad progresiva (PD): anomalías neurológicas o empeoramiento del estado neurológico que no se explican por causas no relacionadas con la progresión tumoral (por ejemplo, toxicidad anticonvulsiva o corticosteroide, alteraciones electrolíticas, sepsis, hiperglucemia, etc.) o un aumento mayor del 25 % en la medición bidimensional, o dosis crecientes de corticosteroides requeridos para mantener un estado neurológico o formación de imágenes estable.

Enfermedad estable (SD): el examen neurológico es por lo menos estable y la dosis de corticosteroides de mantenimiento no aumenta, y la formación de imágenes de IRM no cumple con los criterios de PR ni con los criterios de enfermedad progresiva. Si esta categoría se debe informar como un posible beneficio clínico, el estado de enfermedad estable se debe mantener durante por lo menos 12 semanas.

Enfermedad pseudo-progresiva (pseudo-PD) Los pacientes con pseudo-progresión, que permanecen en estudio y finalmente se someten a SD, PR o CR se pueden clasificar como pseudo-PD y SD, PR o CR, respectivamente, para determinaciones de respuesta.

(B) Supervivencia global (OS) y Supervivencia libre de progresión (PFS)

- 5 La PFS se define como la duración de tiempo desde el inicio del tratamiento hasta el tiempo de progresión o muerte. Se seguirán todos los pacientes para determinar OS y PFS.

7.10.9.1.4 Análisis de tejidos tumorales luego de vacunaciones

- 10 Los tejidos tumorales pueden no estar disponibles en todos los pacientes en el estudio. Sin embargo, los siguientes aspectos se pueden evaluar de forma exploratoria en todos los tejidos tumorales disponibles obtenidos antes y/o después de las vacunas: (i) Pérdida de antígeno; (ii) regulación por aumento de moléculas antiapoptóticas; e (iii) infiltración de célula inmunitaria.

7.10.10 Consideraciones estadísticas

7.10.10.1 Evaluación de respuestas inmunológicas

La evaluación de la respuesta inmunitaria puede emplear ambos ensayos IFN- γ ELISPOT y tetrámero

- 15 Un respondedor se puede definir como un paciente que ha respondido en cualquiera de los ensayos IFN- γ ELISPOT o de tetrámero. Cada uno de los tres estratos debe ser evaluado independientemente. Se considerará que un estrato merece una investigación adicional si hay por lo menos 5 respuestas en los 12 sujetos. Este criterio tiene la propiedad de que si la tasa de respuesta verdadera es $<18\%$, hay $<5\%$ de probabilidad de observar 5 o más respuestas, y que si la tasa de respuesta verdadera es $>68\%$, hay $<5\%$ de probabilidad de observar 4 o menos respuestas.

7.10.10.2 Documentación y evaluación de seguridad

- 25 Los criterios de terminología común del NCI para eventos adversos (EA) (CTCAE 3.0) se pueden utilizar para evaluar la toxicidad; la toxicidad se puede considerar como un evento adverso que posiblemente, probablemente o definitivamente esté relacionado con el tratamiento. El grado máximo de toxicidad para cada categoría de interés se puede registrar para cada paciente y los resultados del resumen se pueden tabular por categoría y grado.

Por razones de seguridad, se puede considerar que el régimen es excesivamente tóxico si, en cualquier momento, la tasa observada de Toxicidad que Limita el Régimen (RLT) $\geq 33\%$ y por lo menos se han observado 2 RLT.

- 30 El diseño del estudio tiene las siguientes propiedades: si la tasa real de RLT en esta población de pacientes es $\geq 42\%$, hay por lo menos 90 % de probabilidad de que la acumulación se detenga; Si la tasa real de RLT es $\leq 8,7\%$, hay un 90 % de probabilidad de que la acumulación no se detenga, y que el régimen se considere seguro.

7.10.10.3 Evaluación de los criterios de valoración clínicos

- 35 Las respuestas clínicas se pueden documentar, y se calcula la tasa de respuesta y sus límites de confianza del 95 %. Se puede dar seguimiento a todos los pacientes para evaluar la supervivencia global (OS) y la supervivencia libre de progresión (PFS). La PFS se define para el Estrato A y B como el intervalo de tiempo desde el diagnóstico de un paciente hasta la muerte o la progresión, y para el Estrato C desde el momento en que se registró el estudio hasta la muerte o la progresión, en base a exploraciones de IRM en serie. Si es apropiado, los análisis exploratorios pueden investigar la relación de la respuesta inmunitaria con la respuesta clínica y la OS/SSP (utilizando la prueba exacta de Fisher y la prueba de log rank, respectivamente).

7.10.10.4 Datos demográficos

- 40 Se pueden proporcionar estadísticas descriptivas de referencia de todos los pacientes evaluables para las variables demográficas (edad, sexo, raza/etnia), el estado de rendimiento de Karnofsky o Lansky, el estadio de la enfermedad y el estado en el momento de la inscripción (enfermedad estable, enfermedad progresiva) y regímenes de tratamiento previamente utilizado (para el estrato C).

- 45 Alexander J, Sidney J, Southwood S, et al. Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. *Immunity*. 1: 751-761, 1994.

Alves PM, Faure O, Graff-Dubois S, Gross DA, Cornet S, Chouaib S, Miconnet I, Lemonnier FA, Kosmatopoulos K. (2003). EphA2 as target of anticancer immunotherapy: identification of HLA-A*0201-restricted epitopes. *Cancer Res* 63: 8476-8480, 2003.

- Bakker AB, Marland G, de Boer AJ, Huijbens RJ, Danen EH, Adema GJ, Figdor CG. Generation of antimelanoma cytotoxic T lymphocytes from healthy donors after presentation of melanoma-associated antigen-derived epitopes by dendritic cells in vitro. *Cancer Res.* 55: 5330-5334, 1995.
- 5 Bedrosian I, Mick R, Xu S, et al. Intranodal administration of peptide-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8+ T-cell function in melanoma patients. *J.Clin.Oncol.* 21: 3826-3835, 2003.
- Bigg HF, Wait R, Rowan AD, Cawston TE. The mammalian chitinase-like lectin, YKL-40, binds specifically to type I collagen and modulates the rate of type I fibril formation. *J Biol Chem.* 281: 21082-95, 2006.
- Bigner DD, Pitts OM, Wikstrand CJ. Induction of lethal experimental allergic encephalomyelitis in non-human primates and guinea pigs with human glioblastoma multiforme tissue. *J Neurosurg* 55: 32-42, 1981.
- 10 Blanc-Brude OP, Yu J, Simosa H, Sessa WC, Altieri DC. Inhibitor of apoptosis protein survivin regulates vascular injury. *Nat. Medicine* 8: 987-994, 2002.
- Bownds S, Tong-On P, Rosenberg SA, Parkhurst, M. Induction of tumor-reactive cytotoxic T-lymphocytes using a peptide from NY-ESO-1 modified at the carboxy-terminus to enhance HLA-A2.1 binding affinity and stability in solution. *J. Immunother.* 24: 1-9, 2001.
- 15 Butowski N, Chang SM, Junck L, et al. A phase II clinical trial of poly-ICLC with radiation for adult patients with newly diagnosed supratentorial glioblastoma: a North American Brain Tumor Consortium (NABTC01-05). *J Neurooncol.* 91: 175-182, 2009.
- Butowski N, Lamborn KR, Lee BL, et al. A North American brain tumor consortium phase II study of poly-ICLC for adult patients with recurrent anaplastic gliomas. *J Neurooncol* 91: 183-189, 2009.
- 20 Carmon L, Bobilev-Priel I, Brenner B, Bobilev D, Paz A, Bar-Haim E, Tirosh B, Klein T, Fridkin M, Lemonnier F, Tzehoval E, Eisenbach L. Characterization of novel breast carcinoma-associated BA46-derived peptides in HLA-A2.1/D(b)-beta2m transgenic mice. *J. Clin. Invest* 110: 453-462, 2002.
- Chen JL, Dunbar PR, Gileadi U, Jager E, Gnjjatic S, Nagata Y, Stockert E, Panicali DL, Chen YT, Knuth A, Old LJ, Cerundolo V. Identification of NY-ESO-1 peptide analogues capable of improved stimulation of tumor-reactive CTL. *J Immunol* 165: 948-955, 2000.
- 25 Chianese-Bullock KA, Pressley J, Garbee C, et al. MAGE-A1-, MAGE-A10-, and gp100-derived peptides are immunogenic when combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and montanide ISA-51 adjuvant and administered as part of a multi-peptide vaccine for melanoma. *J.Immunol.* 174: 3080-3086, 2005.
- Cohen MH, Shen YL, Keegan P, et al. FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab (Avastin(R)) as Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme. *Oncologist* 14: 1131-1138, 2009.
- 30 De Vleeschouwer S, Fieuws S, Rutkowski S, et al. Postoperative adjuvant dendritic cell-based immunotherapy in patients with relapsed glioblastoma multiforme. *Clin.Cancer.Res.* 14: 3098-3104, 2008.
- Debinski W, Gibo DM, Hulet SW, et al. Receptor for interleukin 13 is a marker and therapeutic target for human high-grade gliomas. *Clin.Cancer Res.* 5: 985-990, 1999.
- 35 Debinski W, Gibo DM, Slagle B, Powers SK, Gillespie GY. (1999). Receptor for interleukin 13 is abundantly and specifically over-expressed in patients with glioblastoma multiforme. *Int. J. Oncol.* 75: 481-486, 1999.
- Debinski W, Gibo DM. (2000). Molecular expression analysis of restrictive receptor for interleukin 13, a brain tumor-associated cancer/testis antigen. *Mol. Med.* 6: 440-449, 2000.
- 40 Debinski W, Gibo DM. Molecular expression analysis of restrictive receptor for interleukin 13, a brain tumor-associated cancer/testis antigen. *Mol Med* 6: 440-449, 2000.
- Debinski W, Slagle B, Gibo DM, Powers SK, Gillespie GY. (2000). Expression of a restrictive receptor for interleukin 13 is associated with glial transformation. *J. Neurooncol.* 48: 103-111, 2000.
- Eguchi J, Hatano M, Nishimura F, et al. Identification of interleukin-13 receptor alpha2 peptide analogues capable of inducing improved anti-glioma CTL responses. *Cancer Res* 66: 5883-5891, 2006.
- 45 Fallert BA, Reinhart TA. Improved detection of simian immunodeficiency virus RNA by in situ hybridization in fixed tissue sections: combined effects of temperatures for tissue fixation and probe hybridization. *J Virol Methods* 99: 23-32, 2002.
- Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A: IL-13 signaling through the IL-13a2 receptor is involved in induction of TGF-b1 production and fibrosis. *Nat. Medicine* 12: 99-106, 2006.

- Francini G, Scardino A, Kosmatopoulos K, Lemonnier FA, Campoccia G, Sabatino M, Pozzessere D, Petrioli R, Lozzi L, Neri P, Fanetti G, Cusi MG, Correale P. (2002). High-affinity HLA-A(*)02.01 peptides from parathyroid hormone-related protein generate in vitro and in vivo antitumor CTL response without autoimmune side effects. *J. Immunol.* 169: 4840-4849, 2002.
- 5 Fujita M, Zhu X, Ueda R, et al Effective Immunotherapy against Murine Gliomas Using Type 1 Polarizing Dendritic Cells--Significant Roles of CXCL10. *Cancer Res* 69: 1587-1595, 2009.
- Gilliet M, Kleinhans M, Lantelme E, et al. Intranodal injection of semimature monocyte-derived dendritic cells induces T helper type 1 responses to protein neoantigen. *Blood* 102: 36-42, 2003.
- 10 Graff-Dubois S, Faure O, Gross DA, Alves P, Scardino A, Chouaib S, Lemonnier FA, Kosmatopoulos K. Generation of CTL recognizing an HLA-A*0201-restricted epitope shared by MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, and -A12 tumor antigens: implication in a broad-spectrum tumor immunotherapy. *J. Immunol.* 169: 575-580, 2002.
- Greten TF, Korangy F, Neumann G, Wedemeyer H, Schlote K, Heller A, Scheffer S, Pardoll DM, Garbe AI, Schneck JP, Manns MP. Peptide-beta2-microglobulin-MHC fusion molecules bind antigen-specific T cells and can be used for multivalent MHC-Ig complexes. *J. Immunol. Methods* 277: 125-135, 2002.
- 15 Gross DA, Graff-Dubois S, Opolon P, Cornet S, Alves P, Naceur-Griscelli O, Faure O, Guillaume P, Firat H, Chouaib S, et al. (2004). High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest* 113: 425-433, 2004.
- Hatano M, Eguchi J, Tatsumi T, et al. EphA2 as a Glioma-Associated Antigen: A Novel Target for Glioma Vaccines. *Neoplasia* 7: 717-722, 2005.
- 20 Hatano M, Kuwashima N, Tatsumi T, Dusak JE, Nishimura F, Reilly KM, Storkus WJ, Okada H. Vaccination with EphA2-derived T cell-epitopes promotes immunity against both EphA2-expressing and EphA2-negative tumors. *J Transl Med* 2: 40, 2004.
- Hatano M, Kuwashima N, Tatsumi T, et al. Vaccination with EphA2-derived T cell-epitopes promotes immunity against both EphA2-expressing and EphA2-negative tumors. *J Transl Med.* 2: 40, 2004.
- 25 Herrem CJ, Tatsumi T, Olson KS, Shirai K, Finke JH, Bukowski RM, Zhou M, Richmond AL, Derweesh I, Kinch MS, et al. Expression of EphA2 is prognostic of disease-free interval and overall survival in surgically treated patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 11: 226-231, 2005.
- Izumoto S, Tsuboi A, Oka Y, et al. Phase II clinical trial of Wilms tumor 1 peptide vaccination for patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J.Neurosurg.* 108:963-971, 2008.
- 30 Kalinski P, Hilkens CM, Snijders A, et al. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol.* 159: 28-35, 1997.
- Kalinski P, Okada H. Polarized dendritic cells as cancer vaccines: Directing effector-type T cells to tumors. *Semin. Immunol.* In Press, 2010.
- 35 Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, et al. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J.Immunol.* 162: 3231-3236, 1999.
- Kikuchi T, Akasaki Y, Abe T, et al. Vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells and recombinant human interleukin 12. *J.Immunother.* 27: 452-459, 2004.
- 40 Kinch MS, Carles-Kinch K. Overexpression and functional alterations of the EphA2 tyrosine kinase in cancer. *Clin Exp Metastasis* 20: 59-68, 2003.
- Kirkwood JM, Lee S, Moschos SJ, et al. Immunogenicity and antitumor effects of vaccination with peptide vaccine+/-granulocyte-monocyte colony-stimulating factor and/or IFN-alpha2b in advanced metastatic melanoma: Eastern Cooperative Oncology Group Phase II Trial E1696. *Clin Cancer Res.* 15: 1443-1451, 2009.
- 45 Koch GLE, Smith MJ, Mortara RA. An abundant ubiquitous glycoprotein (GP100) in nucleated mammalian cells. *FEBS Lett.* 179: 294-298, 1985.
- Liau LM, Prins RM, Kiertscher SM, et al. Dendritic cell vaccination in glioblastoma patients induces systemic and intracranial T-cell responses modulated by the local central nervous system tumor microenvironment. *Clin Cancer Res.* 11: 5515-5525, 2005.
- 50 Liu F, Park PJ, Lai W, et al. A genome-wide screen reveals functional gene clusters in the cancer genome and identifies EphA2 as a mitogen in glioblastoma. *Cancer Res* 66: 10815-10823,2006.

- Liu G, Ying H, Zeng G, et al. HER-2, gp100, and MAGE-1 are expressed in human glioblastoma and recognized by cytotoxic T cells. *Cancer Res.* 64: 4980-4986, 2004.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method *Methods* 25: 402-8, 2001.
- 5 Lupetti R, Pisarra P, Verrecchia A, Farina C, Nicolini G, Anichini A, Bordignon C, Sensi M, Parmiani G, Traversari C. Translation of a retained intron in tyrosinase-related protein (TRP) 2 mRNA generates a new cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined and shared human melanoma antigen not expressed in normal cells of the melanocytic lineage. *J. Exp. Med.* 188, 1005-1016, 1998.
- 10 Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, et al. Alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res.* 64: 5934-5937, 2004.
- Melanoma Study Group of the Mayo Clinic Cancer C, Celis E. Overlapping human leukocyte antigen class I/II binding peptide vaccine for the treatment of patients with stage IV melanoma: evidence of systemic immune dysfunction. *Cancer* 110: 203-14, 2007
- 15 Monsurro V, Nagorsen D, Wang E, et al. Functional heterogeneity of vaccine-induced CD8(+) T cells. *J. Immunol* 168: 5933-5942, 2002.
- Muthuswamy R, Urban J, Lee JJ, et al. Ability of mature dendritic cells to interact with regulatory T cells is imprinted during maturation. *Cancer Res.* 68: 5972-5978, 2008.
- Naruse-Nakajima C, Asano M, Iwakura Y. Involvement of EphA2 in the formation of the tail notochord via interaction with ephrinA1. *Mech. Develop.* 102: 95-105, 2001.
- 20 Nishimura F, Dusak JE, Eguchi J, et al. Adoptive transfer of Type 1 CTL mediates effective anti-central nervous system tumor response: critical roles of IFN-inducible protein-10. *Cancer Res* 66: 4478-4487, 2006.
- Nutt CL, Betensky RA, Brower MA, et al. YKL-40 is a differential diagnostic marker for histologic subtypes of highgrade gliomas. *Clin Cancer Res.* 11: 2258-2264, 2005.
- 25 O'Connell KA, Bailey JR, Blankson JN. Elucidating the elite: mechanisms of control in HIV-1 infection. *Trends in Pharmacological Sciences* 30: 631-637, 2009.
- Ogawa K, Pasqualini R, Lindberg R A, Kain R, Freeman AL, Pasquale EB. The ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization. *Oncogene* 19: 6043-6052, 2000.
- Ogden AT, Horgan D, Waziri A, et al. Defective receptor expression and dendritic cell differentiation of monocytes in glioblastomas. *Neurosurgery* 59: 902-909, 2006.
- 30 Okada H, Kohanbash G, Zhu X, et al. Immunotherapeutic approaches for glioma. *Crit Rev Immunol.* 29: 1-42, 2009.
- Okada H, Lieberman FS, Edington HD, et al. Autologous glioma cell vaccine admixed with interleukin-4 gene transfected fibroblasts in the treatment of recurrent glioblastoma: preliminary observations in a patient with a favorable response to therapy. *J. Neurooncol.* 64: 13-20, 2003.
- 35 Okada H, Lieberman FS, Edington HD, Witham TF, Wargo MJ, Cai Q, Elder EH, Whiteside TL, Schold SC Jr, Pollack IF. Autologous glioma cell vaccine admixed with interleukin-4 gene transfected fibroblasts in the treatment of recurrent glioblastoma: preliminary observations in a patient with a favorable response to therapy. *J Neuro-Oncol* 64: 13-20, 2003.
- Okada H, Lieberman FS, Walter KA, et al. Autologous glioma cell vaccine admixed with interleukin-4 gene transfected fibroblasts in the treatment of patients with malignant gliomas. *J. Transl. Med.* 5: 67, 2007
- 40 Okada H, Pollack IF, Lieberman F, Lunsford LD, Kondziolka D, Schiff D, Attanucci J, Edington H, Chambers W, Kalinski P, et al. Gene therapy of malignant gliomas: a pilot study of vaccination with irradiated autologous glioma and dendritic cells admixed with IL-4 transduced fibroblasts to elicit an immune response. *Hum Gene Ther* 12: 575-595, 2001.
- 45 Okada H, Tahara H, Shurin MR, Attanucci J, Giezeman-Smiths KM, Fellows KW, Lotze MT, Chambers WH, Bozik ME. Bone marrow derived dendritic cells pulsed with a tumor specific peptide elicit effective anti-tumor immunity against intracranial neoplasms. *Int. J. Cancer* 78: 196-201, 1998.
- Okada H, Villa LA, Attanucci J, Erff M, Fellows WK, Lotze MT, Pollack IF, and Chambers WH. Cytokine Gene Therapy of Gliomas: Effective Induction of Therapeutic Immunity to Intracranial Tumors by Peripheral Immunization with Interleukin-4 Transduced Glioma Cells. *Gene Ther.* 8: 1157-1166, 2001.

- Okano F, Storkus WJ, Chambers WH, et al. Identification of a novel HLA-A*0201 restricted cytotoxic T lymphocyte epitope in a human glioma associated antigen, interleukin-13 receptor 2 chain. *Clin Cancer Res.* 8: 2851-2855, 2002.
- Okano F, Storkus WJ, Chambers WH, Pollack IF, Okada H. Identification of a novel HLA-A*0201 restricted cytotoxic T lymphocyte epitope in a human glioma associated antigen, interleukin-13 receptor 2 chain. *Clin. Cancer Res.* 8: 2851-2855, 2002.
- Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Perarnau B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2 Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med* 185: 2043-2051, 1997.
- Pelloski CE, Mahajan A, Maor M, et al. YKL-40 expression is associated with poorer response to radiation and shorter overall survival in glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 11: 3326-3334, 2005.
- Pollack IF, Finkelstein SD, Woods J, et al. Expression of p53 and prognosis in children with malignant gliomas. *N.Engl.J Med.* 346: 420-427, 2002.
- Riker A, Cormier J, Panelli M, Kammula U, Wang E, Abati A, Fetsch P, Lee KH, Steinberg S, Rosenberg S, et al. Immune selection after antigen-specific immunotherapy of melanoma. *Surgery* 126: 112-120, 1999.
- Rodrigues JC, Gonzalez GC, Zhang L, et al. Normal human monocytes exposed to glioma cells acquire myeloidderived suppressor cell-like properties. *Neuro Oncol* 12: 351-365, 2010.
- Saikali S, Avril T, Collet B, et al. Expression of nine tumour antigens in a series of human glioblastoma multiforme: interest of EGFRvIII, IL-13Ralpha2, gp100 and TRP-2 for immunotherapy. *J.Neurooncol.* 81: 139-148, 2007
- Sainio K, Hellstedt P, Kriedberg JA, Saxen L, Sariola H. Differential regulation of two sets of mesonephric tubules by WT-1. *Development* 124: 1293-1299, 1997.
- Salazar AM, Levy HB, Ondra S, et al. Long-term treatment of malignant gliomas with intramuscularly administered polyinosinic-polycytidylic acid stabilized with polylysine and carboxymethylcellulose: an open pilot study. *Neurosurgery* 38: 1096-1103, 1996.
- Salgaller ML, Marincola FM, Cormier JN, et al. Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res.* 56: 4749-4757, 1996.
- Sampson JH, Archer GE, Mitchell DA, et al. An epidermal growth factor receptor variant III-targeted vaccine is safe and immunogenic in patients with glioblastoma multiforme. *Molecular Cancer Therapeutics* 8: 2773-2779, 2009.
- Sasaki K, Zhu X, Vasquez C, et al. Preferential expression of very late antigen-4 on type 1 CTL cells plays a critical role in trafficking into central nervous system tumors. *Cancer Res* 67: 6451-6458, 2007
- Scardino A, Gross DA, Alves P, Schultze JL, Graff-Dubois S, Faure O, Tourdot S, Chouaib S, Nadler LM, Lemonnier FA, Vonderheide RH, Cardoso AA, Kosmatopoulos K. HER-2/neu and hTERT cryptic epitopes as novel targets for broad spectrum tumor immunotherapy. *J. Immunol.* 168: 5900-5906, 2002.
- Slingluff CL, Jr., Petroni GR, Olson W, et al. Helper T-cell responses and clinical activity of a melanoma vaccine with multiple peptides from MAGE and melanocytic differentiation antigens. *J Clin Oncol* 26: 4973-80, 2008.
- Smith JS, Tachibana I, Passe SM, et al. PTEN Mutation, EGFR Amplification, and Outcome in Patients With Anaplastic Astrocytoma and Glioblastoma Multiforme. *J. Natl. Cancer Inst.* 93: 1246-1256, 2001.
- Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, et al. Triggering of Toll-like Receptor 4 Expressed on Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Promotes Tumor Development and Protects the Tumor from Immune Attack. *Cancer Res* 69: 3105-3113, 2009.
- Tatsumi T, Herrem CJ, Olson WC, Finke JH, Bukowski RM, Kinch MS, Ranieri E, Storkus WJ. Disease stage variation in CD4+ and CD8+ T-cell reactivity to the receptor tyrosine kinase EphA2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Res* 63: 4481-4489, 2003.
- Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J.Clin.Oncol.* 25: 4722-4729, 2007
- Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, et al. Phase II Trial of Bevacizumab and Irinotecan in Recurrent Malignant Glioma. *Clinical Cancer Research* 13: 1253-1259, 2007
- Watchmaker PB, Berk E, Muthuswamy R, et al. Independent Regulation of Chemokine Responsiveness and Cytolytic Function versus CD8+ T Cell Expansion by Dendritic Cells. *J Immunol* 184: 591-597, 2010.

Weber J, Boswell W, Smith J, et al. Phase 1 trial of intranodal injection of a Melan-A/MART-1 DNA plasmid vaccine in patients with stage IV melanoma. *J Immunother* 31: 215-23, 2008.

Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep* 4: 218-227, 2004.

5 Wheeler CJ, Black KL, Liu G, et al. Vaccination elicits correlated immune and clinical responses in glioblastoma multiforme patients. *Cancer Res.* 68: 5955-5964, 2008.

Yamanaka R, Homma J, Yajima N, et al. Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: results of a clinical phase I/II trial. *Clin.Cancer Res.* 11: 4160-4167, 2005.

Yu JS, Liu G, Ying H, Yong WH, Black KL, Wheeler CJ. Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res* 64: 4973-4979, 2004.

10 Zelinski DP, Zantek ND, Stewart JC, Irizarry AR, Kinch MS. EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer Res* 61: 2301-2306, 2001.

Zhu X, Fallert-Junecko B, Fujita M, et al. Poly-ICLC promotes the infiltration of effector T cells into intracranial gliomas via induction of CXCL10 in IFN- α and IFN- γ dependent manners. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 59: 1401-1409, 2010.

15 Zhu X, Fallert-Junecko BA, Fujita M, et al. Poly-ICLC promotes the infiltration of vaccine-induced T cells into intracranial gliomas via induction of CXCL10 in IFN- α and IFN- γ dependent manners. *Cancer Immunol. Immunother.* In Press, 2010.

Zhu X, Nishimura F, Sasaki K, et al. Toll like receptor-3 ligand poly-ICLC promotes the efficacy of peripheral vaccinations with tumor antigen-derived peptide epitopes in murine CNS tumor models. *J.Transl.Med.* 5: 10, 2007.

20 Listado de secuencias

<110> University of Pittsburgh – of the Commonwealth System of Higher Education Okada, Hideho

<120> Vacunas contra el cáncer de cerebro basadas en el péptido alfa 2 del receptor de interleuquina-13

<130> 708849

<150> 61/376,582

25 <151> 2010-08-24

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Residuos de Aminoácido ₃₄₅₋₃₅₃ del receptor alfa de interleuquina-13

<400> 1

Trp Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu Ile
1 5

35

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

ES 2 722 799 T3

<223> Residuos de Aminoácido ³⁴⁵⁻³⁵³ del receptor alfa de interleuquina-13 2 con mutación de I a V en la posición 353

<400> 2

Trp Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu Val
1 5

5 <210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Residuos de Aminoácido ³⁴⁵⁻³⁵³ del receptor alfa de interleuquina-13 con mutación de W a A en la posición 345 y I a V en la posición 353

<400> 3

Ala Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu Val
1 5

<210> 4

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Residuos de Aminoácido ³⁴⁵⁻³⁵³ del receptor alfa de interleuquina-13 con mutación de W a E en la posición 345 y I a V en la posición 353

<400> 4

Glu Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu Val
1 5

<210> 5

<211> 13

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Residuos de Aminoácido 128-140 de HBV

<400> 5

Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu
1 5 10

30

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

ES 2 722 799 T3

<223> Residuos de Aminoácido 883-891 de EphA2

<400> 6

Thr Leu Ala Asp Phe Asp Pro Arg Val
1 5

<210> 7

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Residuos de Aminoácido 96-104 de Survivin

10 <400> 7

Leu Met Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Residuos de Aminoácido 126-134 de WT1

<400> 8

Tyr Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

20 <210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Péptido toxoide tetánico

<400> 9

Ala Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
1 5 10 15

<210> 10

<211> 10

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Residuos de Aminoácido 201-210 de YKL-40

ES 2 722 799 T3

<400> 10

Ser Ile Met Thr Tyr Asp Phe His Gly Ala
1 5 10

<210> 11

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Residuos de Aminoácido 209-217 de GP100 con mutación de T a M en la posición 210

<400> 11

Ile Met Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un péptido de IL-13R α 2 que comprende una cualquiera de las SEQ ID NOs:1-4, un péptido EphA2 que comprende la SEQ ID NO:6, y un péptido de survivina que comprende la SEQ ID NO:7.
- 5 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un péptido de WT1.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en la que la composición farmacéutica está libre de células.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en la que uno o más de los péptidos se cargan sobre células dendríticas.
- 10 5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la composición farmacéutica se formula para administración subcutánea o intranodal.
6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende adicionalmente un adyuvante.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que el adyuvante es Montanide ISA-51.
- 15 8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende adicionalmente un epítipo de célula T auxiliar.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en la que el epítipo de célula T auxiliar es el péptido de PADRE, un péptido toxoide tetánico, o el péptido central HBV₁₂₈₋₁₄₀.
- 20 10. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende adicionalmente un modificador de respuesta inmunitaria.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en la que el modificador de respuesta inmunitaria es poli-ICLC o imiquimod.
12. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 como un medicamento para su uso en el tratamiento, prevención, o manejo de cáncer de cerebro.
- 25 13. Un conjunto que comprende (i) una primera composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende adicionalmente un epítipo de célula T auxiliar y un adyuvante; y (ii) una segunda composición farmacéutica que comprende un modificador de respuesta inmunitaria, como un medicamento para su uso en el tratamiento, prevención, o manejo de cáncer de cerebro en un sujeto en necesidad del mismo.
14. El conjunto de la reivindicación 13, que comprende adicionalmente bevacizumab.
- 30 15. El conjunto de la reivindicación 13 o 14, en el que el modificador de respuesta inmunitaria es poli-ICLC.

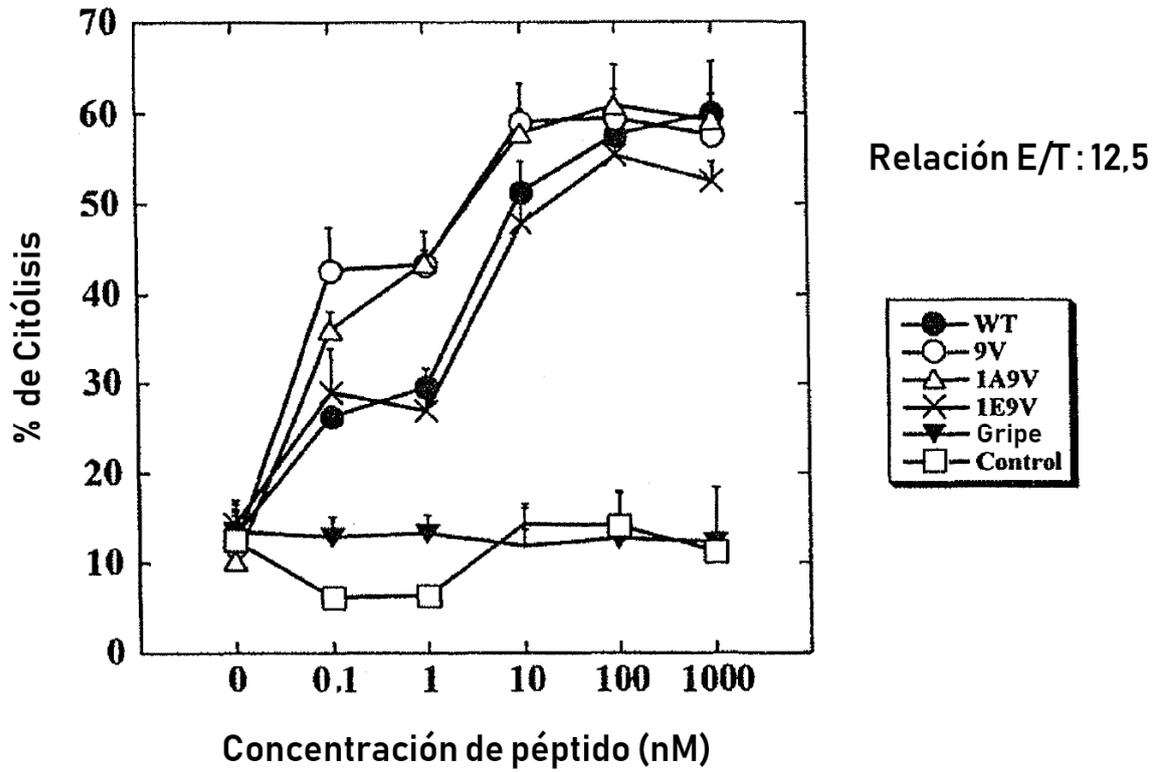


FIG. 1

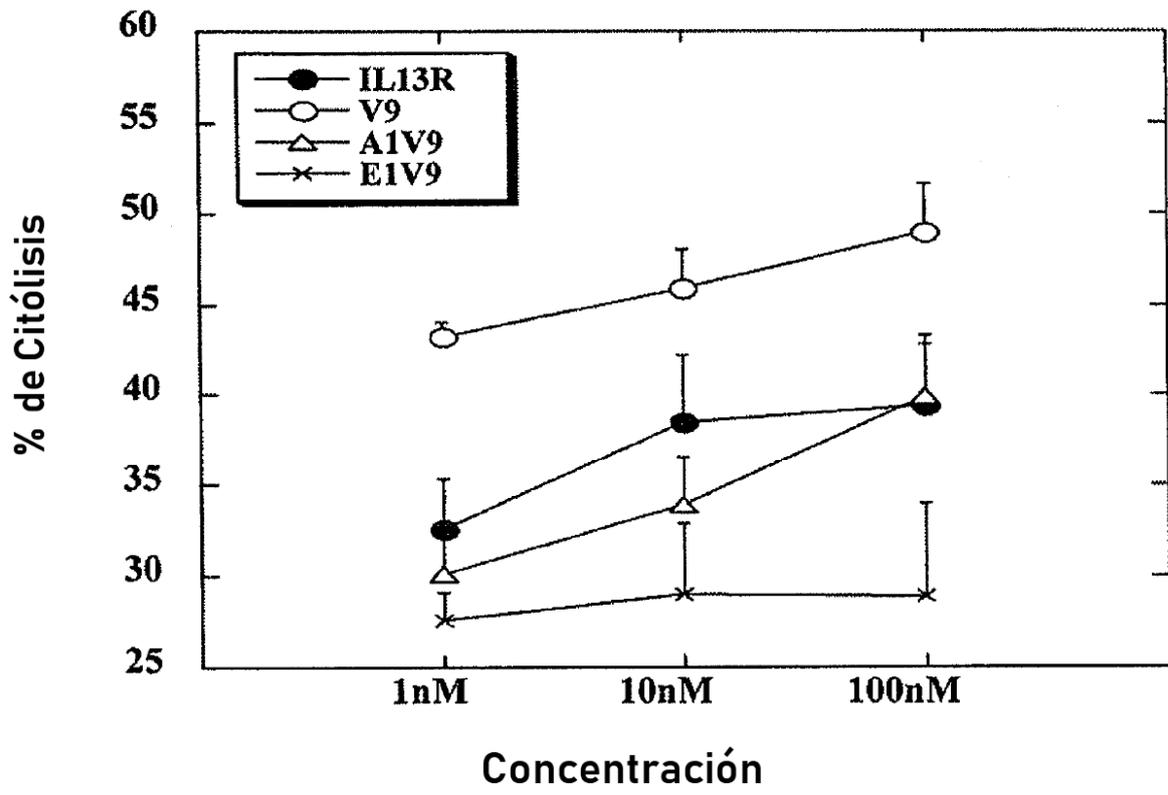


FIG. 2

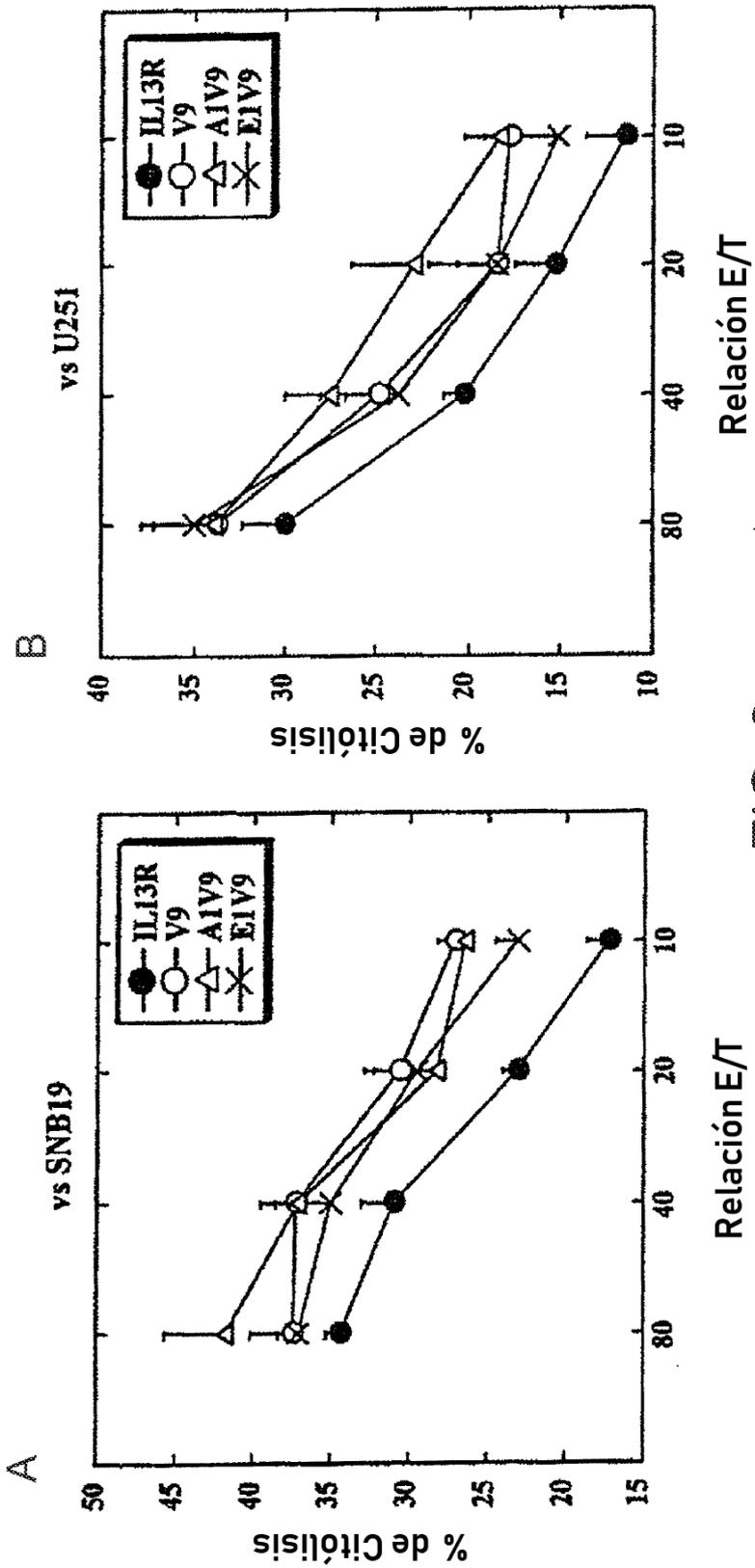


FIG. 3

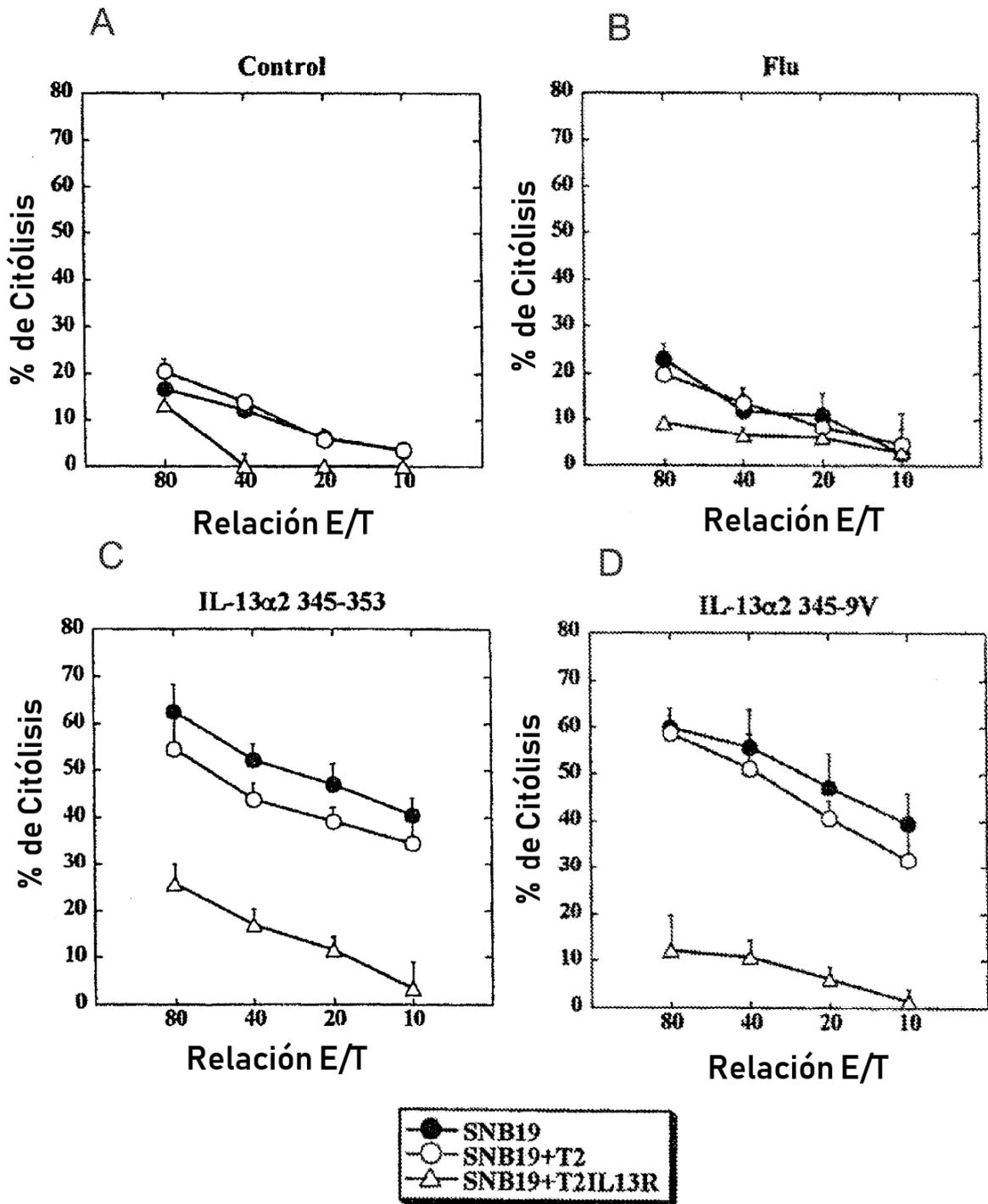


FIG. 4

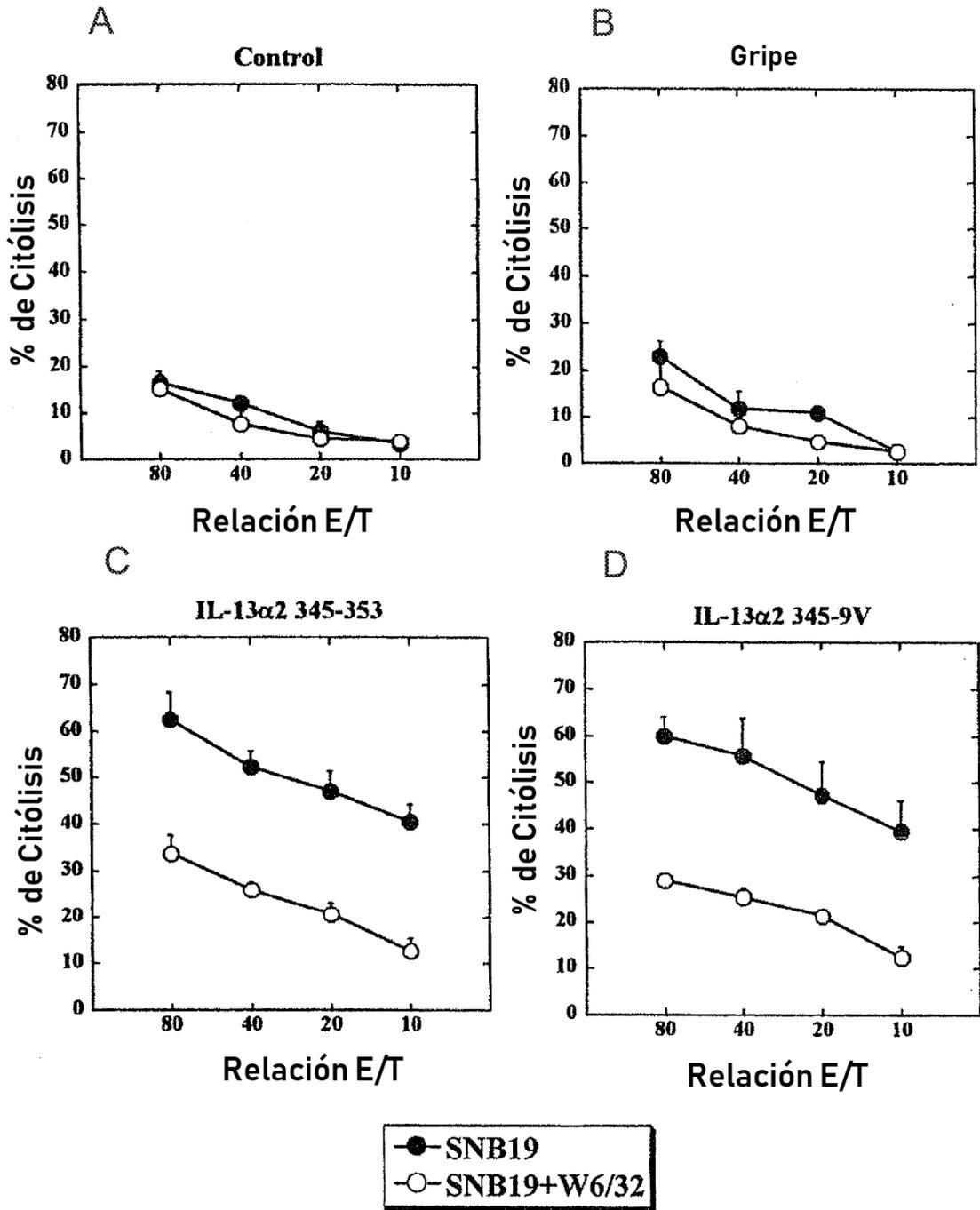


FIG. 5

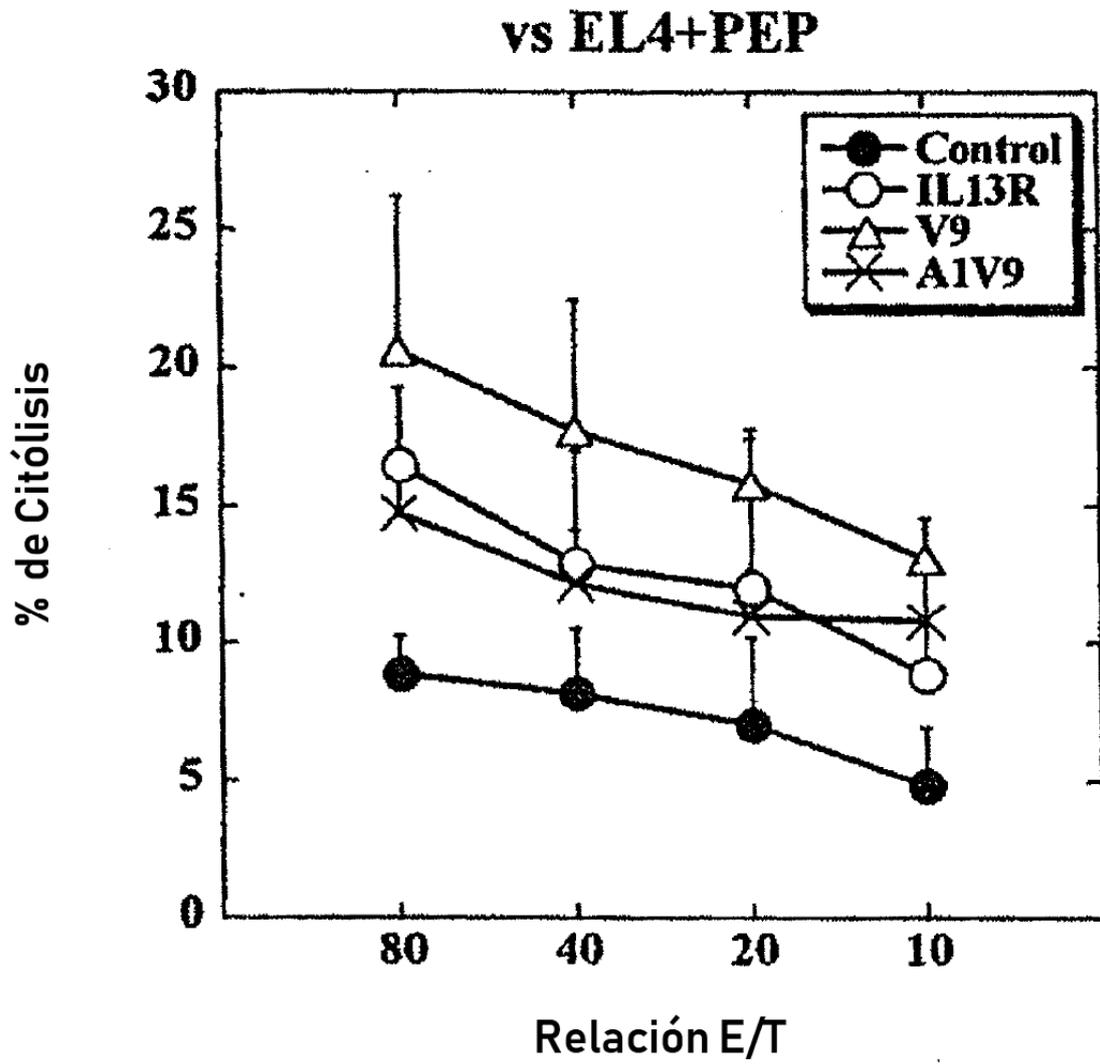


FIG. 6

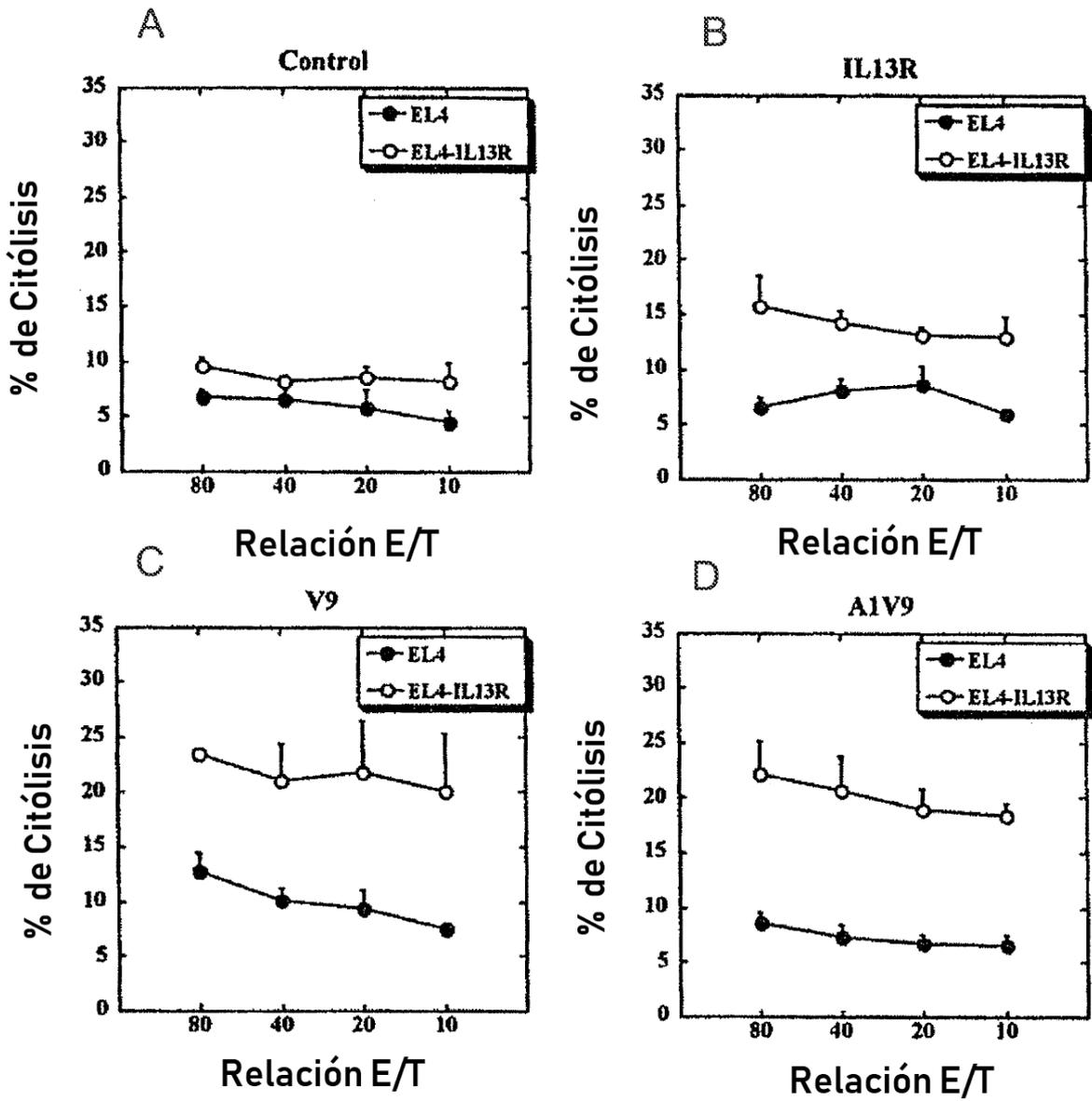


FIG. 7

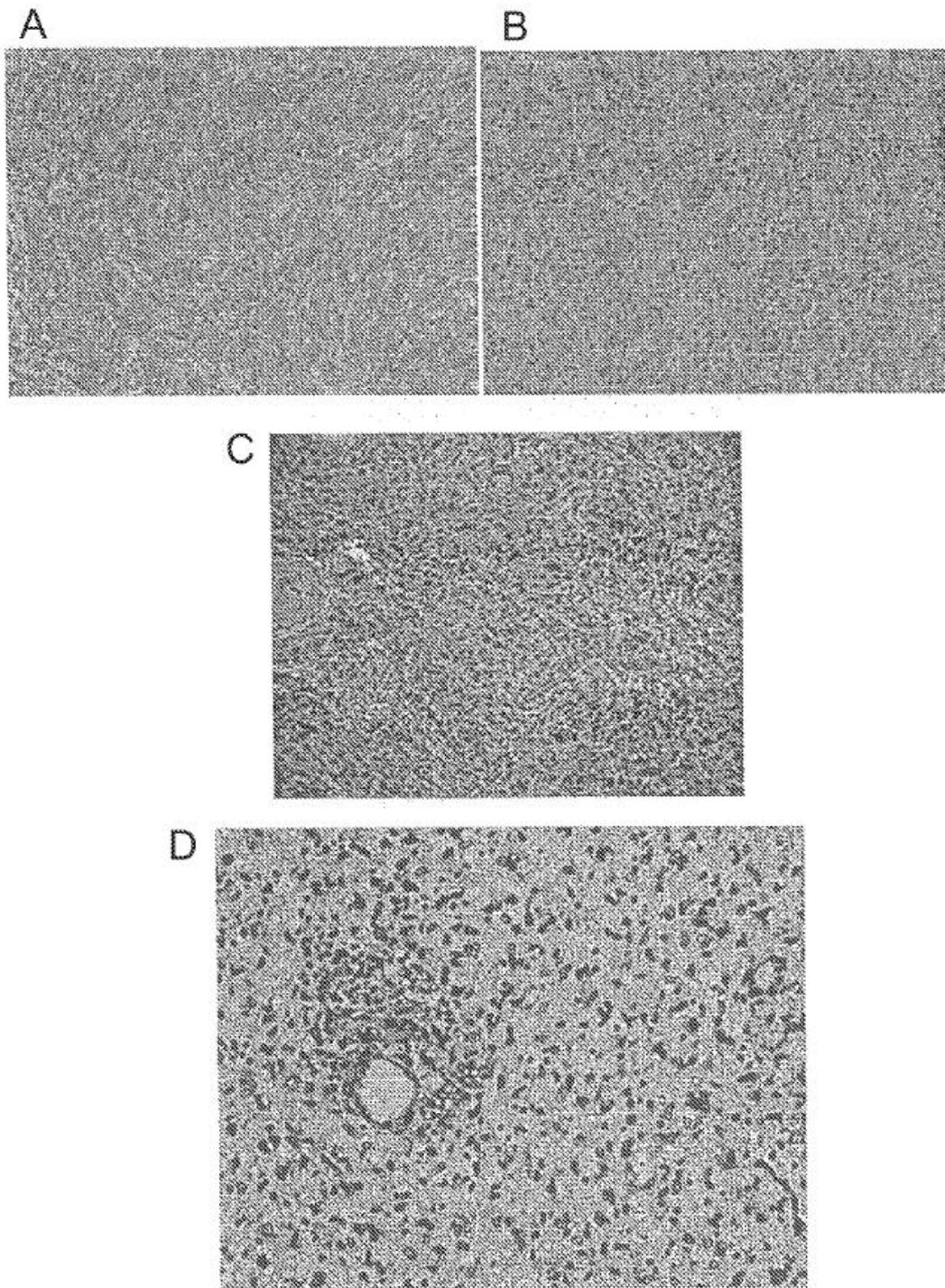


FIG. 8

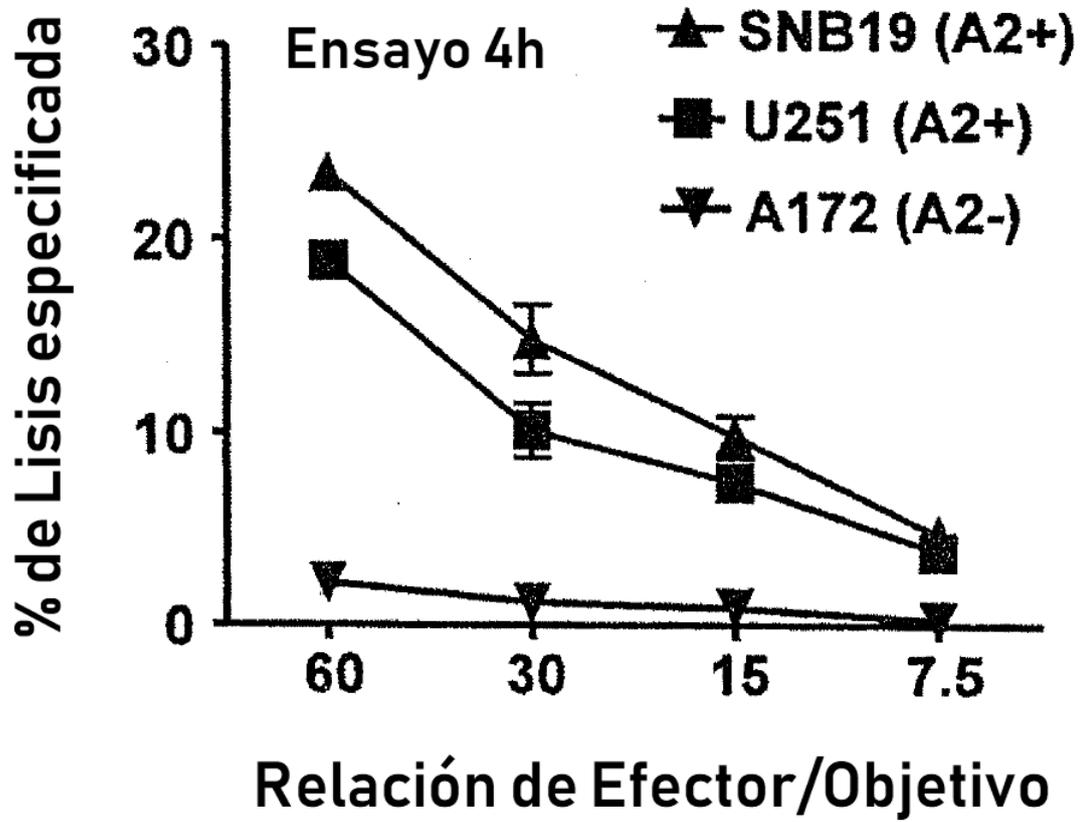


FIG. 9

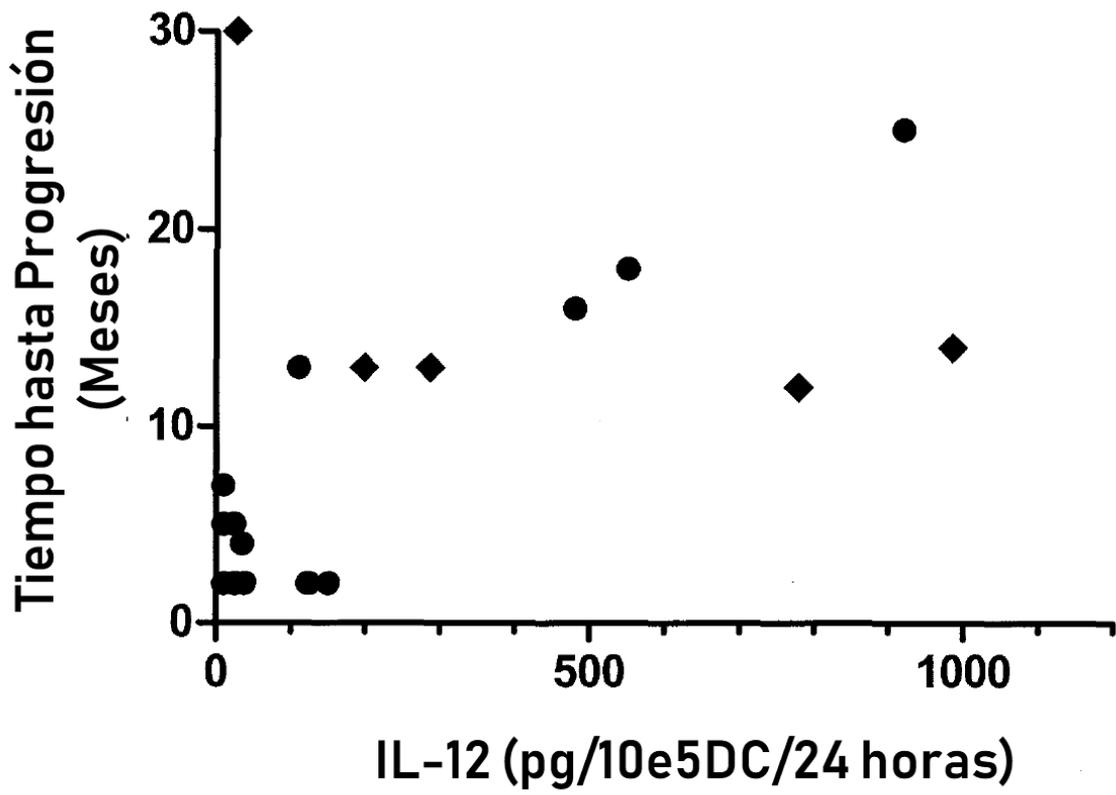


FIG. 10

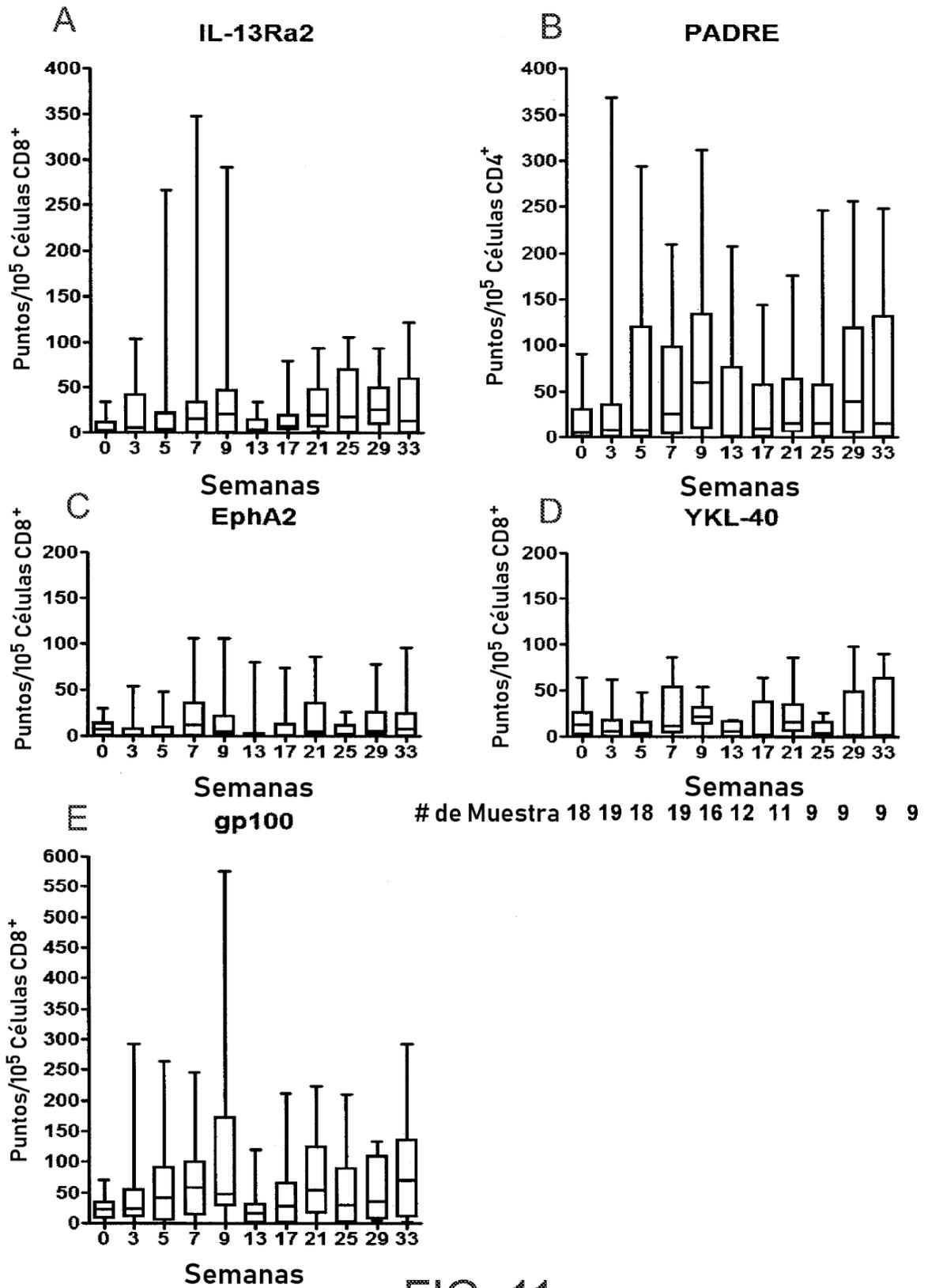


FIG. 11

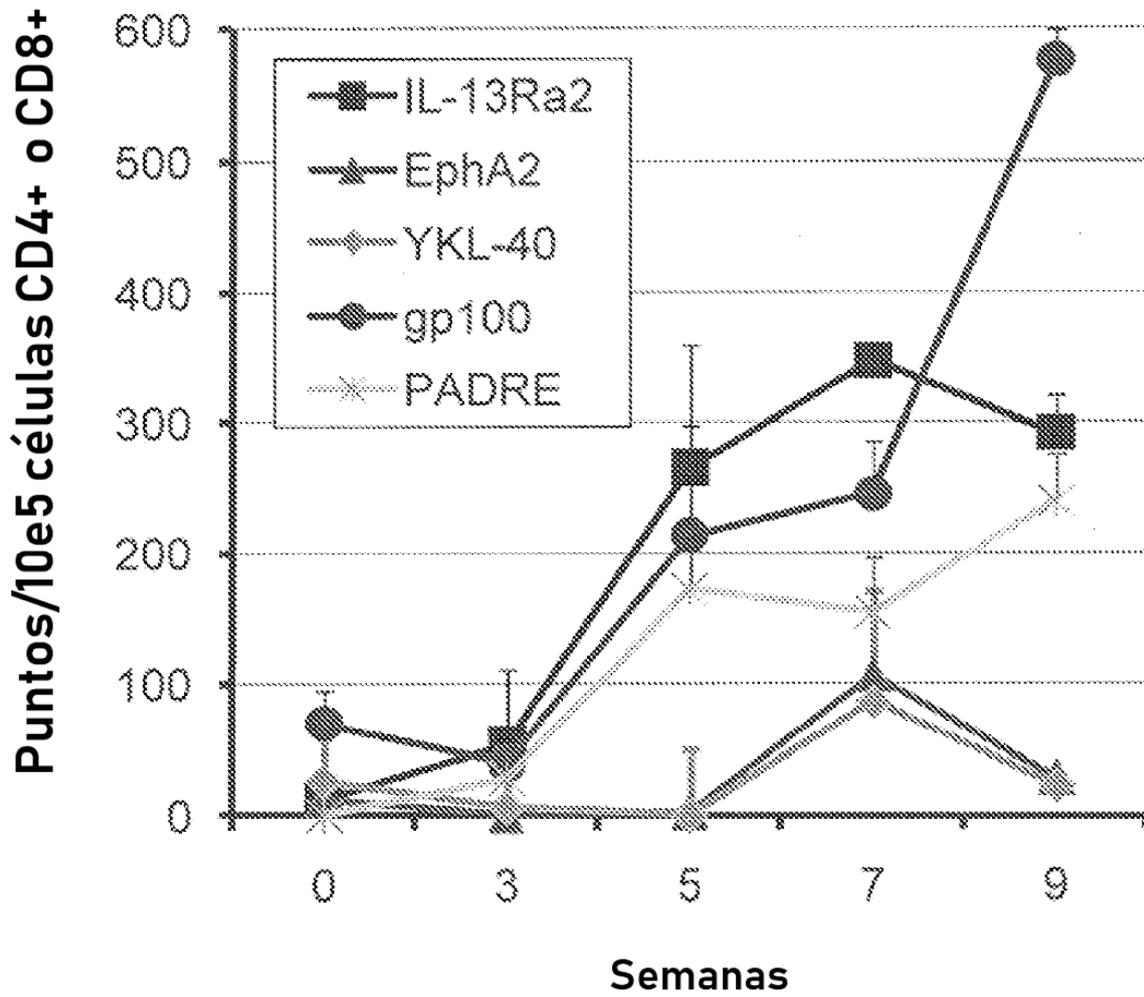
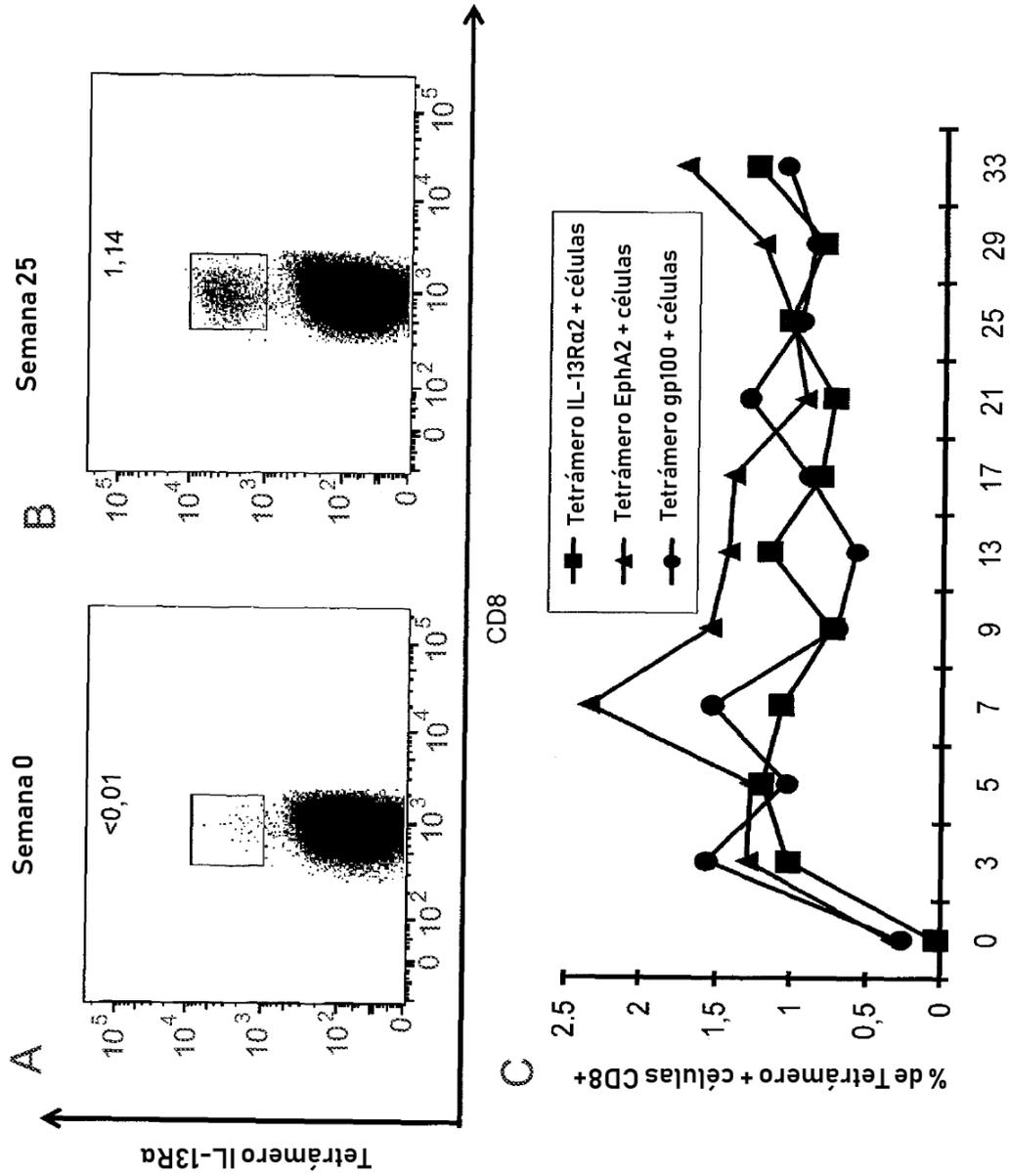
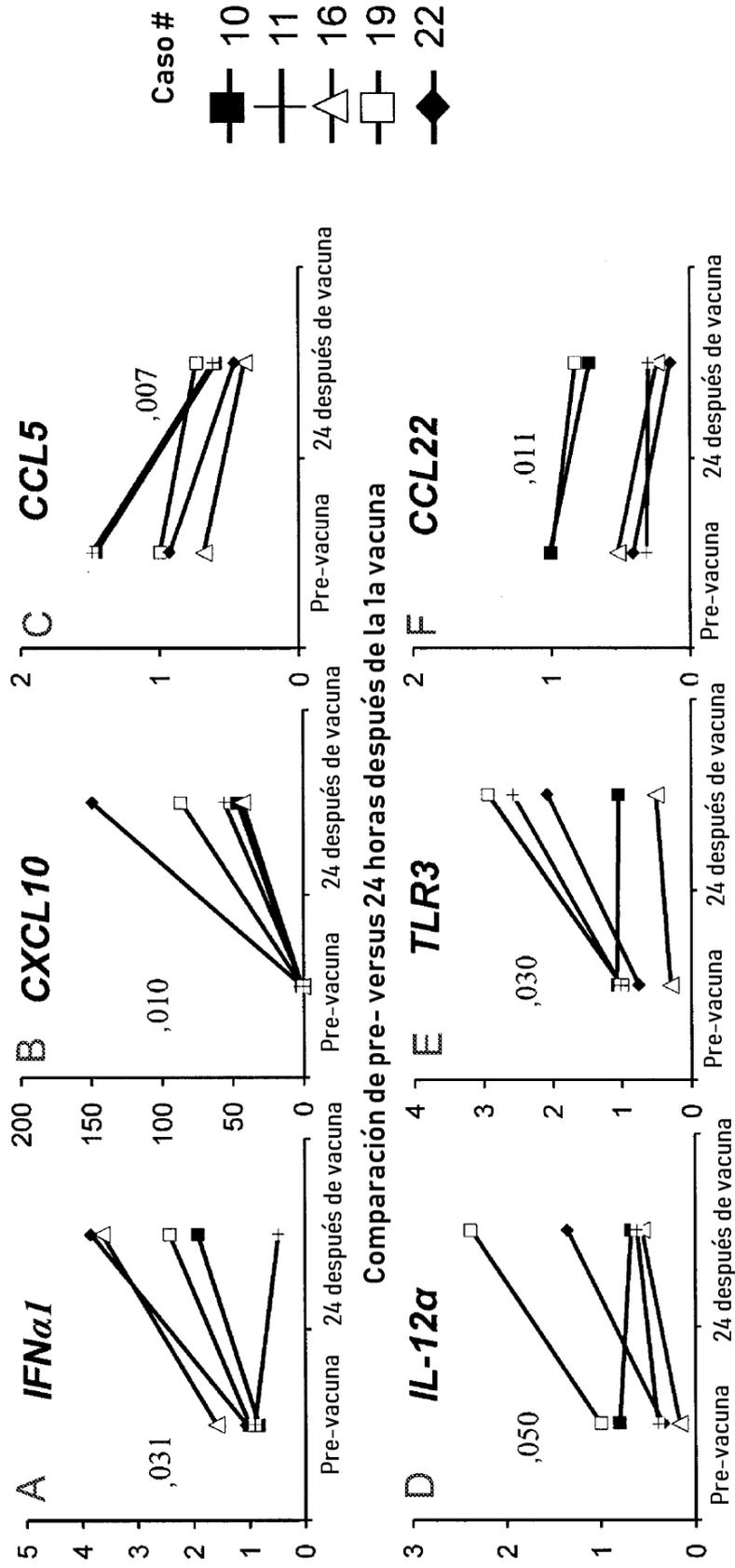


FIG. 12

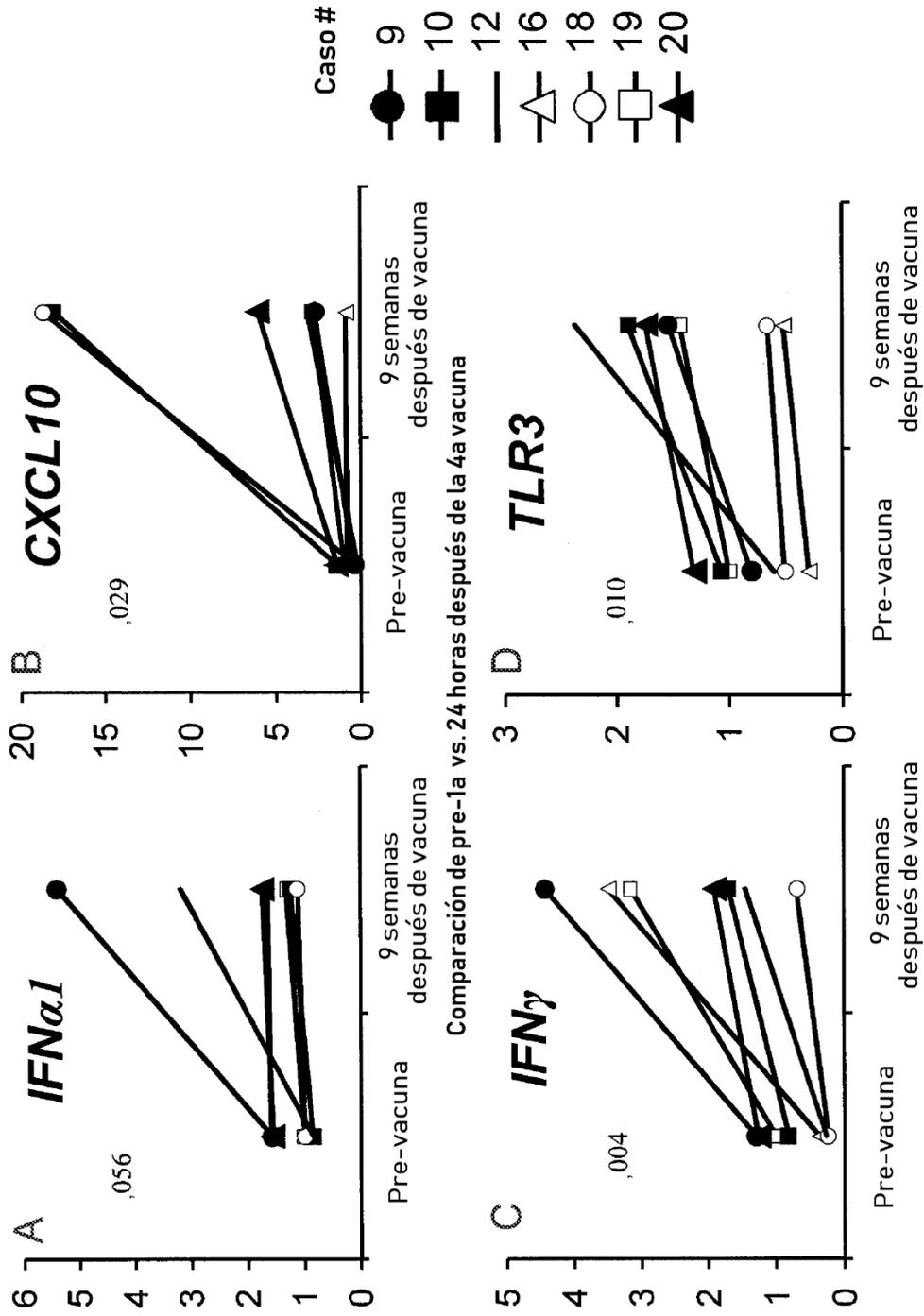


Semanas
FIG. 13



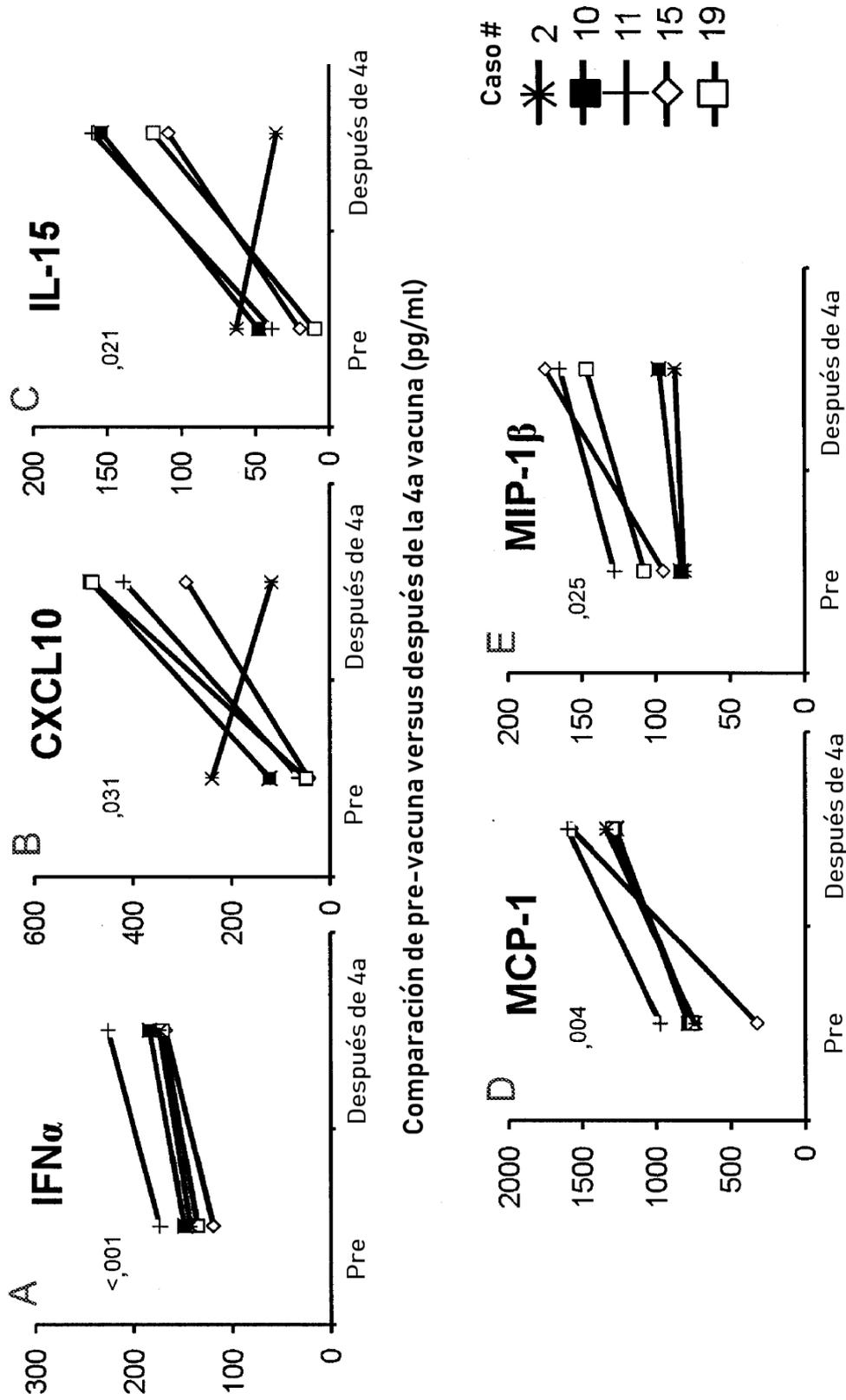
Comparación de pre- versus 24 horas después de la 1a vacuna

FIG. 14



Comparación de pre-1a vs. 24 horas después de la 4a vacuna

FIG. 15



Comparación de pre-vacuna versus después de la 4a vacuna (pg/ml)

FIG. 16

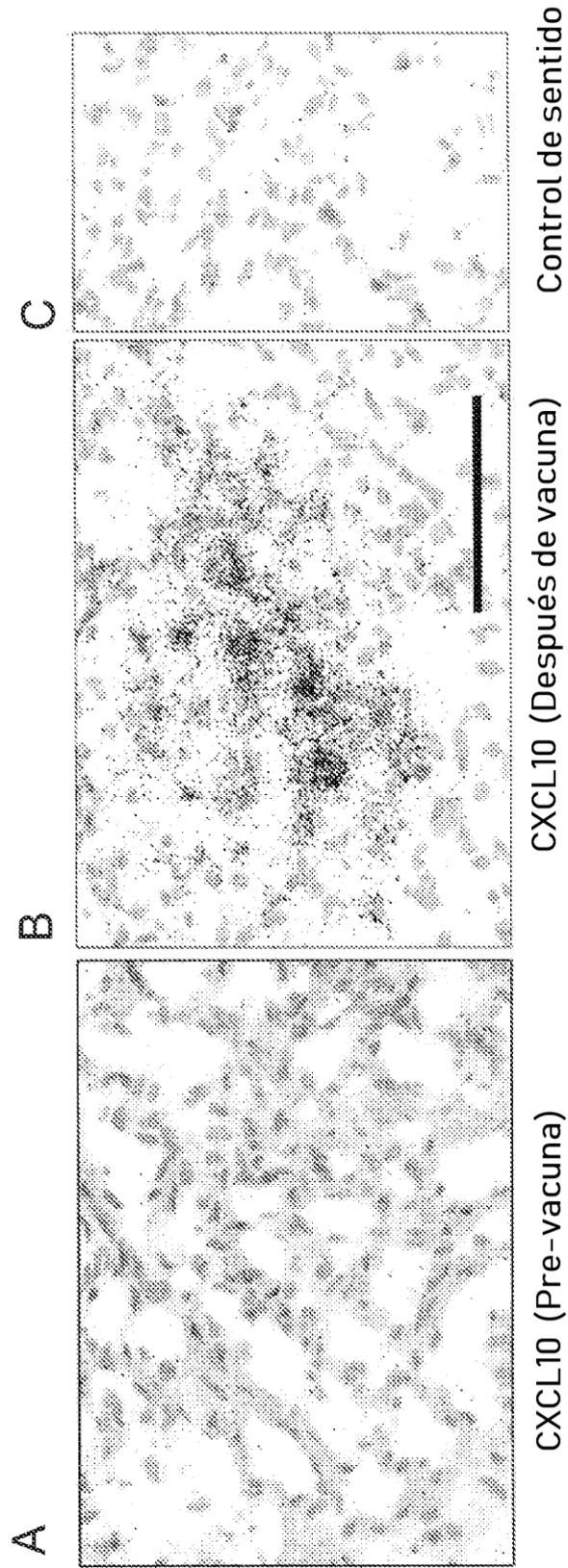


FIG. 17

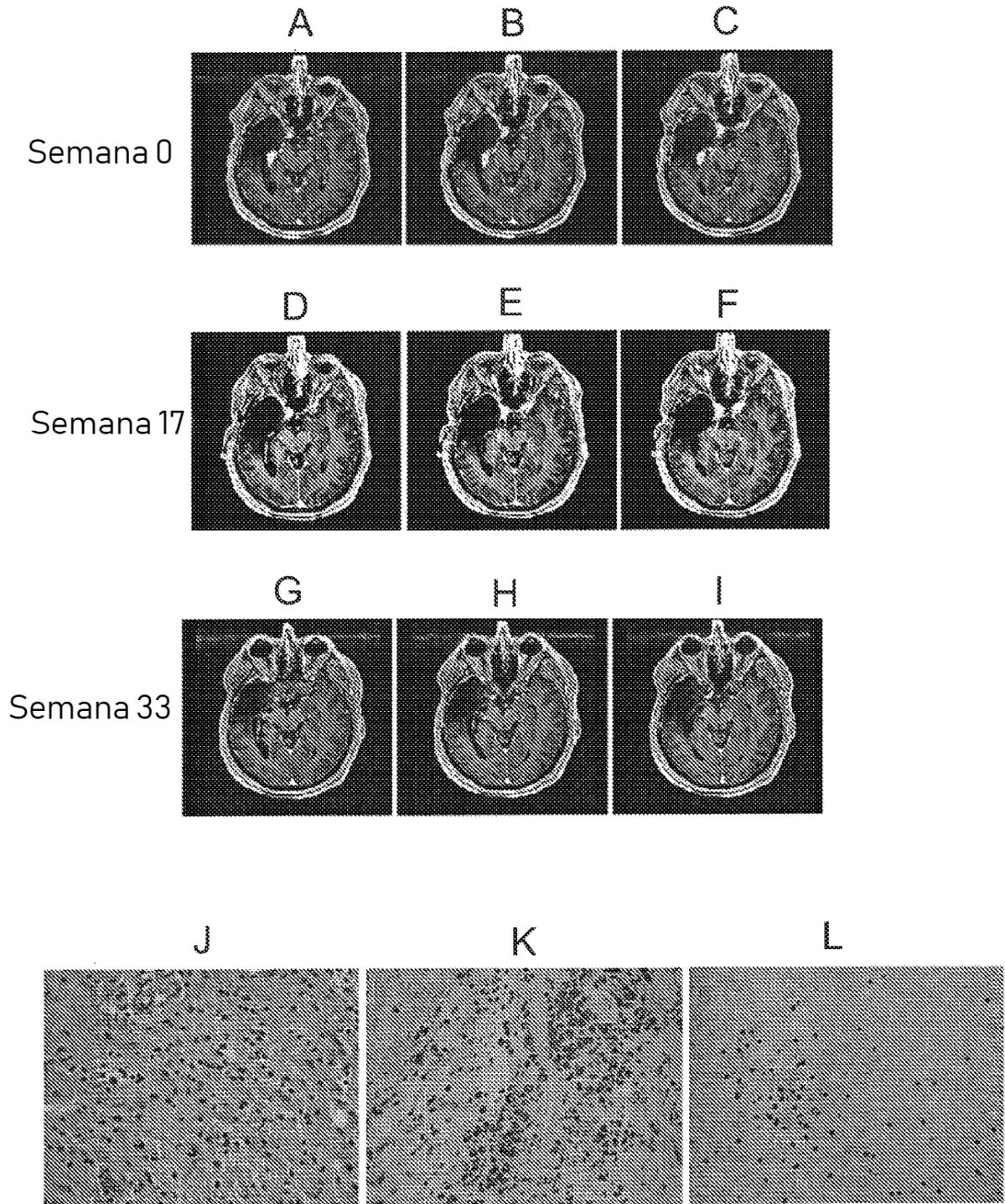


FIG. 18

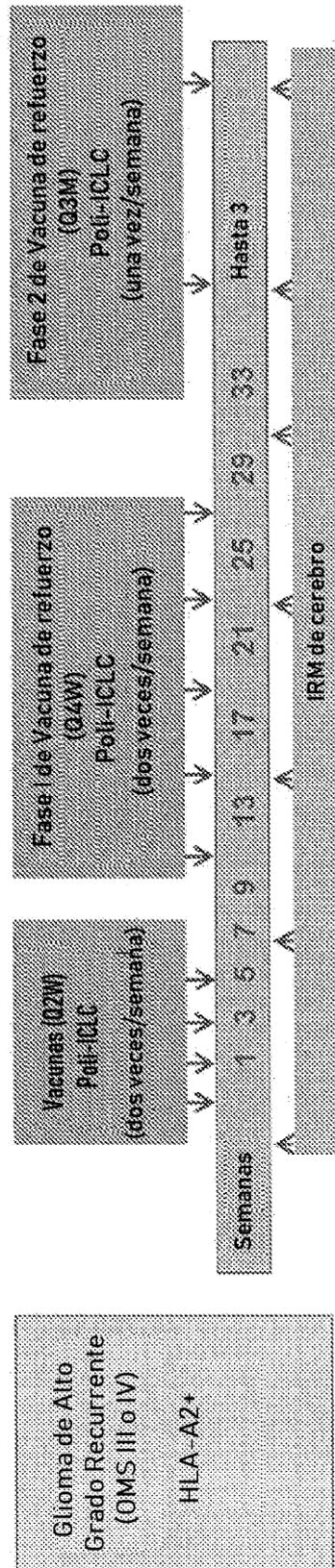


FIG. 19

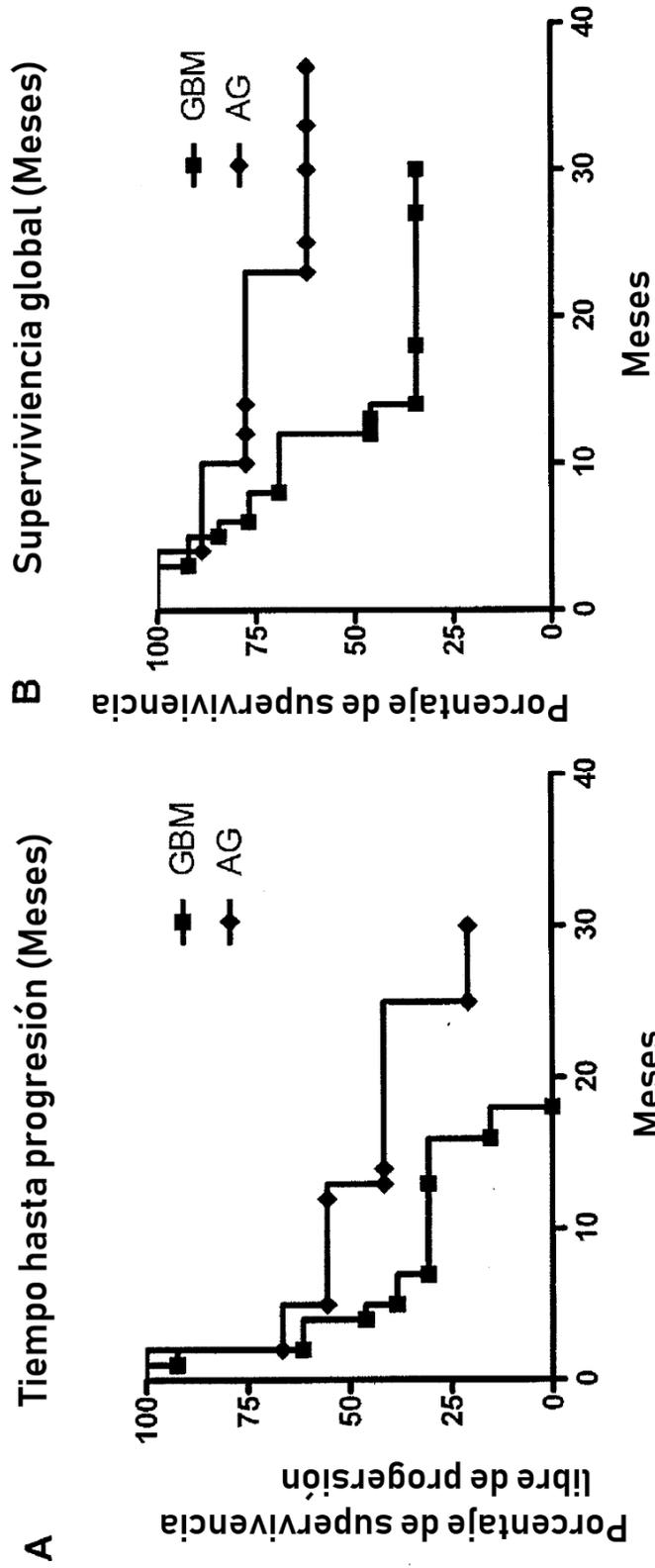


FIG. 20

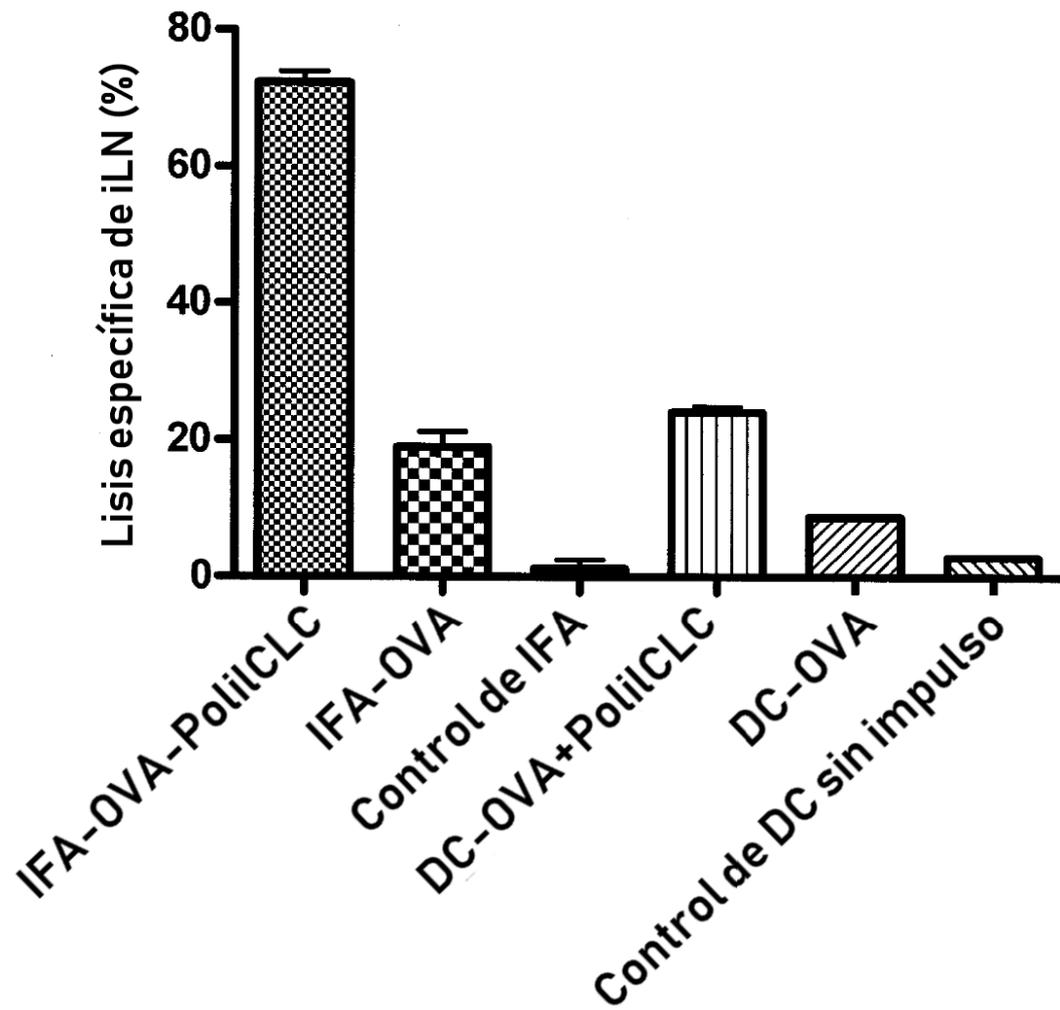


FIG. 21