

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 141**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2013 PCT/EP2013/001882**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14005683**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2013 E 13732833 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 2869836**

54 Título: **Vacuna de ADN para uso en pacientes con cáncer de páncreas**

30 Prioridad:

**05.07.2012 EP 12004995**

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

**03.04.2020**

73 Titular/es:

**VAXIMM AG (100.0%)  
Hochbergerstrasse 60c  
4057 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**LUBENAU, HEINZ**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 752 141 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**

Vacuna de ADN para uso en pacientes con cáncer de páncreas

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a una vacuna de ADN que comprende la cepa mutante atenuada de Salmonella typhi Ty21a que comprende una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína VEGFR-2 para el uso de dicha cepa mutante atenuada de Salmonella en humanos en una inmunoterapia contra el cáncer antiangiogénico.

**Antecedentes de la invención**

10 Los derivados atenuados de Salmonella enterica son vehículos atractivos para la administración de antígenos heterólogos, tales como antígenos tumorales o antígenos de estroma tumoral, al sistema inmune de mamíferos. Las cepas de S. enterica pueden administrarse potencialmente a través de las rutas mucosales de inmunización, es decir, por vía oral o nasal, lo que ofrece ventajas de simplicidad y seguridad en comparación con la administración parenteral. Además, las cepas de Salmonella incitan fuertes respuestas inmunes humorales y celulares a nivel de los compartimientos tanto sistémicos como mucosales. Los costes de preparación de lotes son relativamente bajos y las formulaciones de vacunas bacterianas vivas son altamente estables. La atenuación se puede lograr mediante la  
15 delección de varios genes, incluidos los genes de virulencia, reguladores y metabólicos.

Se ha demostrado que varias cepas de Salmonella typhimurium atenuadas por mutaciones aro son vehículos de administración seguros y efectivos para antígenos heterólogos en modelos animales.

20 En el documento WO 03/073995 se describen estrategias para administrar construcciones de ADN que codifican antígenos, en particular proteínas receptoras de VEGFR, a través de cepas de Salmonella typhimurium atenuadas vivas en células diana de ratón. Niethammer et al. (Nature Medicine 2002, 8 (12), 1369) describe una cepa SL7207 atenuada de S. typhimurium aro A que alberga un vector de expresión que codifica el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular murino (VEGFR-2 o FLK-1) y su uso como vacuna contra el cáncer.

Sin embargo, solo hay una cepa atenuada de Salmonella enterica serovar, denominada Salmonella enterica serovar typhi Ty21a (abreviatura: S. typhi Ty21a), que ha sido aceptada para su uso en humanos.

25 Esta vacuna viva oral bien tolerada contra la fiebre tifoidea se derivó por mutagénesis química del aislado bacteriano virulento de tipo salvaje S. typhi Ty2 y porta una mutación de pérdida de función en el gen galE, así como otras mutaciones menos definidas. Se ha autorizado como vacuna contra la fiebre tifoidea en muchos países después de que se mostró que es eficaz y segura en ensayos de campo.

30 La angiogénesis contribuye al crecimiento tumoral sólido y la metástasis. Compuestos como bevacizumab y otros, para

ejemplos de moléculas pequeñas como sunitinib y axitinib que se dirigen específicamente a la neovasculatura tumoral han demostrado eficacia en un rango de indicaciones tumorales (Powles et al., Br J Cancer 2011,104 (5): 741-5); Rini et al., Lancet 2011, 378: 1931-1939). El reclutamiento para un estudio de aumento de dosis de fase I en pacientes con  
35 cáncer de páncreas localmente avanzado, inoperable y en estadio IV para examinar la seguridad, la tolerabilidad y la respuesta inmune a una vacuna VXM01 de ADN VEGFR-2 en investigación se ha anunciado en ClinicalTrial.gov ([https://Clinicaltrials.gov/archive/NCT01486329/2011\\_12\\_07](https://Clinicaltrials.gov/archive/NCT01486329/2011_12_07)) y en un comunicado de prensa (<https://vaximm.com/de/vaximm-startet-klinische-studie-mit-der-ersten-schluckimpfung-zur-krebsbehandlung/>), sin revelar detalles de la administración de la vacuna. Además, la nueva vacuna VXM01 contra el cáncer, que incluye el reclutamiento para un estudio de fase I, se informó en línea ([https://www.focus.de/gesundheit/ratgeber/krebs/news/impfung-gegen-bauchspeicheldruesenkrebs-hoffnung-auf-schluckimpfung-gegen-krebs-aid\\_698323.html](https://www.focus.de/gesundheit/ratgeber/krebs/news/impfung-gegen-bauchspeicheldruesenkrebs-hoffnung-auf-schluckimpfung-gegen-krebs-aid_698323.html)), sin  
40 revelar detalles del estudio.

La neovasculatura tumoral está revestida de células endoteliales que sobreexpresan el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) 2 y son fácilmente accesibles a través del torrente sanguíneo. La estabilidad genética de estas células y su capacidad para soportar cientos de células tumorales por célula endotelial las convierten  
45 en un objetivo principal para la terapia contra el cáncer, ya sea a través de anticuerpos, inhibidores de tirosina quinasa, o vacunas (Augustin, Trends Pharmacol Sci 1998,19: 216-222). Recientemente, la inmunoterapia basada en células T ha logrado cierto éxito clínico en el cáncer de próstata y ha validado el potencial de la vacunación contra el cáncer, que a menudo se demostró preclínicamente (Sharma et al., Nat Rev Cancer 2011,11: 805-812). La activación del sistema inmune contra las células cancerosas enfrenta múltiples desafíos. Por ejemplo, las lesiones cancerosas a  
50 menudo son policlonales y las células cancerosas tienen tendencia a mutar. La terapia específica de antígeno a menudo solo da como resultado una selección de células no vehículos de antígeno. Otros obstáculos incluyen la encapsulación tumoral y la pérdida o baja regulación de las moléculas de MHC. Los enfoques de vacunación que se dirigen a la neovasculatura tumoral deberían, en teoría, superar esos obstáculos.

**Objetos de la invención**

A la vista de la técnica anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar una nueva vacuna oral contra el cáncer dirigida al receptor VEGF. Dicha vacuna contra el cáncer dirigida al receptor VEGF ofrecería grandes ventajas para mejorar las opciones de tratamiento para pacientes con cáncer.

## 5 Compendio de la invención

La presente invención combina la terapia antiangiogénica y la vacunación, dirigidas al VEGFR-2 utilizando una nueva vacuna (VXM01), que es una cepa bacteriana atenuada y rediseñada *Salmonella typhi* Ty21a que comprende un plásmido que codifica la proteína 2 del receptor VEGF.

10 VXM01 representa una estrategia novedosa al dirigirse a un antígeno residente en células no tumorales, sino a un antígeno residente en estroma tumoral, sobreexpresado por células endoteliales no malignas de la neovasculatura tumoral.

15 Al dirigirse a las células endoteliales genéticamente estables y de fácil acceso, este producto tiene como objetivo superar las limitaciones encontradas previamente por las vacunas dirigidas directamente a las células tumorales, como la heterogeneidad de las células tumorales, la pérdida de MHC, la inmunosupresión a nivel celular y la encapsulación tumoral, así como las barreras fisiológicas como la barrera hematoencefálica. Además, dado que el objetivo terapéutico es independiente del tipo de tumor, la vacuna puede ser potencialmente activa contra una variedad de tumores malignos sólidos diferentes. El producto representa una vacuna oral "lista para usar" independiente del paciente, que puede almacenarse y distribuirse a los sitios clínicos para su uso. Si bien la terapia antiangiogénica, ya sea mediante moléculas pequeñas o mediante anticuerpos, ya se ha demostrado que es efectiva, el enfoque según  
20 la presente invención difiere significativamente al activar el propio sistema inmunitario del paciente contra la neovasculatura tumoral y, como tal, puede crear un efecto de memoria celular T que proporciona eficacia a largo plazo. Los estudios con bevacizumab en cáncer de colon y ovario sugieren que se requiere una presión antiangiogénica continua para mantener los efectos beneficiosos del tratamiento a largo plazo (Allegra et al., J Clin Oncol 2011, 29: 11-16; Burger et al., N Engl J Med 2011, 365: 2473-2483; Perren et al., N Engl J Med 2011, 365: 2484-2496).

25 Según el conocimiento de los inventores, este es el primer ensayo clínico de una vacuna oral contra el cáncer. Además, esta vacuna tiene el potencial de ser efectiva contra múltiples tipos de tumores.

Este primer ensayo clínico ha demostrado que la vacuna (VXM01) según esta invención es altamente efectiva para provocar una respuesta inmune que influye significativamente en el crecimiento del tumor en el paciente. Es notable y sorprendente que esta respuesta inmune pueda ser provocada por dosis muy bajas de VXM01 administrado por vía  
30 oral. La vacuna es efectiva a dosis que comienzan ya con  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC). Los primeros resultados indican que la vacunación con VXM01 puede conducir a la ruptura de la vasculatura tumoral existente y puede apoyar el desarrollo de una memoria inmune contra la proliferación de células endoteliales.

La vacuna es efectiva tanto en monoterapia como en una terapia combinada con agentes quimioterapéuticos estándar, radioterapia y/o terapia biológica contra el cáncer.

35 En el ensayo clínico actual, los pacientes en estadio IV fueron tratados por adelantado y/o simultáneamente con el agente quimioterapéutico gemcitabina y VXM01. Sin embargo, el tratamiento con VXM01 también es efectivo si los pacientes han desarrollado resistencia a la quimioterapia (pacientes quimio-refractarios).

40 En un aspecto, la presente invención se refiere a una vacuna de ADN que comprende la cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* Ty21a transformada por un plásmido que contiene un ADN que comprende un casete de expresión eucariota que codifica la proteína VEGFR-2 humano de SEQ ID NO: 1, para uso en una inmunoterapia contra el cáncer antiangiogénico en humanos, en donde la vacuna se administra por vía oral y la dosis única de la vacuna es de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC).

En realizaciones particulares, el plásmido es el pVAX10.VR2-1 de 7580 pb como se representa en la Figura 2 y tiene la secuencia que se encuentra en la SEQ ID NO 3 y la vacuna de ADN se designa como VXM01.

45 En realizaciones particulares, el cáncer es cáncer de páncreas.

En realizaciones particulares, dicho cáncer de páncreas es cáncer de páncreas en estadio IV o localmente avanzado.

En realizaciones particulares, el cáncer incluye metástasis.

En realizaciones particulares, el tratamiento se acompaña de quimioterapia y/o radioterapia.

En realizaciones particulares, el agente quimioterapéutico es gemcitabina.

50 En realizaciones particulares, el tratamiento inmunoterapéutico con la vacuna se lleva a cabo durante el ciclo de tratamiento de quimioterapia.

En realizaciones particulares, la dosis única de la vacuna es  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  o  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC).

En realizaciones particulares, la dosis única de la vacuna es inferior a  $1 \times 10^8$  UFC. En realizaciones particulares, la dosis única de la vacuna es de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  CFU.

- 5 En realizaciones particulares, la dosis única comprende de  $10^6$  a  $10^8$ , más particularmente de  $10^6$  a  $10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC).

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a la vacuna VXM01 de ADN, que comprende la cepa Ty21a atenuada de Salmonella typhi transformada por un plásmido que contiene un ADN que codifica la proteína VEGFR-2 de la SEQ ID NO 1, en donde el plásmido es un ADN plasmídico de 7580 pb y comprende el ADNc de VEGFR-2 que está bajo el control del promotor CMV, el gen de resistencia a la kanamicina y el pMB1 ori, y se designa como pVAX10.VR2-1.

Descripción detallada de la invención

La presente invención puede entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de la invención y a los ejemplos incluidos en la misma.

15 En un aspecto, la presente invención se refiere a una vacuna de ADN que comprende la cepa mutante atenuada de Salmonella typhi Ty21a transformada por un plásmido que contiene un ADN que comprende un casete de expresión eucariota que codifica la proteína VEGFR-2 humano de SEQ ID NO:1, para uso en una inmunoterapia contra el cáncer antiangiogénico en humanos, en la que la vacuna se administra por vía oral y la dosis única de la vacuna es de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC).

20 Según la invención, la cepa atenuada de Salmonella funciona como el vehículo bacteriano de la molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión que codifica una proteína VEGFR-2 para la administración de dicha molécula de ADN recombinante en una célula diana.

25 En el contexto de la presente invención, el término "atenuada" se refiere a una cepa bacteriana de virulencia reducida en comparación con la cepa bacteriana parental, que no porta la mutación atenuante. Las cepas bacterianas atenuadas han perdido preferiblemente su virulencia pero retienen su capacidad para inducir inmunidad protectora. La atenuación se puede lograr mediante la delección de varios genes, incluidos los genes de virulencia, reguladores y metabólicos. Las bacterias atenuadas se pueden encontrar de forma natural o se pueden producir artificialmente en el laboratorio, por ejemplo, mediante la adaptación a un nuevo medio o cultivo celular o se pueden producir mediante tecnología de ADN recombinante.

30 En el contexto de la presente invención, el término "cepa mutante" se refiere a una cepa bacteriana que porta una mutación en su genoma. En este contexto, el término "mutación" se refiere a un cambio en una secuencia de ácido nucleico, que incluye mutaciones puntuales, inserciones, delecciones, translocaciones e inversiones.

35 En el contexto de la presente invención, el término "comprende" o "que comprende" significa "que incluye, pero no se limita a". El término está destinado a ser abierto, para especificar la presencia de cualesquiera características, elementos, números enteros, etapas o componentes declarados, pero no para impedir la presencia o adición de una o más características, elementos, números enteros, etapas, componentes o grupos adicionales de los mismos. El término "que comprende" incluye así los términos más restrictivos "que consiste en" y "que consiste esencialmente en". En una realización, el término "que comprende" tal y como se usa en toda la solicitud y en particular en las reivindicaciones puede reemplazarse por el término "que consiste en".

40 En el contexto de la presente invención, el término "molécula de ADN recombinante" se refiere a una construcción de ADN preparada por ingeniería, preferiblemente compuesta de partes de ADN de origen diferente. La molécula de ADN recombinante puede ser un ácido nucleico lineal, o preferiblemente, un plásmido de ADN recombinante circular generado mediante la introducción de un marco de lectura abierto que codifica una proteína receptora de VEGF en un plásmido de vector de expresión.

45 En el contexto de la presente invención, el término "casete de expresión" se refiere a una unidad de ácido nucleico que comprende al menos una proteína receptora VEGF bajo el control de secuencias reguladoras que controlan su expresión. El casete de expresión comprendido en la cepa mutante atenuada de Salmonella puede mediar preferiblemente la transcripción del marco de lectura abierto incluido que codifica una proteína receptora VEGF en una célula diana. Los casetes de expresión comprenden típicamente un promotor, al menos un marco de lectura abierto y una señal de terminación de la transcripción.

50 Las proteínas receptoras de VEGF son receptores de tirosina quinasas específicas de células endoteliales que pueden unirse por el factor de crecimiento endotelial vascular del ligando (VEGF) que hace que se dimericen y se activen mediante la transfosforilación. La familia de factores de crecimiento VEGF (Kd 75-760 pM) abarca 6 miembros de la familia, VEGF-A (también conocido como VEGF) a través de E y PLGF (factor de crecimiento placentario, también conocido como PGF o PIGF-2). Los factores de crecimiento VEGF regulan el crecimiento y la diferenciación de  
55 múltiples componentes del sistema vascular, especialmente los vasos sanguíneos y linfáticos. Hay tres subtipos

principales de VEGFR, VEGFR-1 (o FLT1), VEGFR-2 (o KDR, FLK1) y VEGFR-3 (o FLT4). Los receptores de VEGF unidos a la membrana tienen una porción extracelular que consta de 7 dominios de tipo inmunoglobulina, una única región que abarca la transmembrana y una porción intracelular que contiene un dominio dividido de tirosina-quinasa. Las transcripciones de VEGFR también dan lugar a variantes de empalme alternativas que codifican proteínas receptoras de VEGF solubles.

El VEGFR-2, también conocido como receptor que contiene el dominio de inserción de quinasa (KDR), parece mediar en casi todas las respuestas celulares conocidas al VEGF. Por ejemplo, el papel de VEGF en la angiogénesis parece estar mediado por la interacción de esta proteína con VEGFR-2. VEGFR-2 es un receptor de alta afinidad de peso molecular de 200-230 kDa de 1356 aminoácidos de longitud para VEGF, así como para VEGF-C y VEGF-D. Identificado en humanos a través de la selección de ADNc endotelial para receptores de tirosina quinasa, VEGFR-2 comparte una identidad de secuencia del 85% con la quinasa de hígado fetal de ratón descubierta previamente (Flk-1). VEGFR-2 normalmente se expresa en precursores endoteliales y hematopoyéticos, así como en células endoteliales, células madre hematopoyéticas nacientes y el estroma del cordón umbilical. Sin embargo, en la vasculatura adulta en reposo, el ARNm de VEGFR-2 parece estar regulado negativamente.

El dominio extracelular de VEGFR-2 contiene 18 sitios potenciales de glicosilación unidos a N. VEGFR-2 se sintetiza inicialmente como una proteína de 150 kDa y se glucosila rápidamente a una forma intermedia de 200 kDa, y luego se glucosila más a una velocidad más lenta a una proteína madura de 230 kDa que se expresa en la superficie celular.

La secuencia de aminoácidos de la secuencia de ADNc que codifica VEGFR-2 humano clonada en el plásmido pVAX10.VR2-1 se presenta en la Figura 1.

En el contexto de la presente invención, el término "vacuna" se refiere a un agente que es capaz de inducir una respuesta inmune en un sujeto tras su administración. Una vacuna preferiblemente puede prevenir, mejorar o tratar una enfermedad. Una vacuna según la presente invención comprende la cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* Ty21a. La vacuna para uso según la presente invención comprende además al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión eucariota que codifica VEGFR-2 humano.

La cepa mutante atenuada viva de *Salmonella* para uso según la presente invención que comprende una molécula de ADN recombinante que codifica MSLN puede usarse como un vehículo para la administración oral de esta molécula de ADN recombinante. Dicho vector de administración que comprende una molécula de ADN que codifica un antígeno heterólogo, tal como una proteína receptora VEGF, se denomina vacuna de ADN.

La inmunización genética podría ser ventajosa sobre la vacunación convencional. El ADN diana puede detectarse durante un período de tiempo considerable, actuando así como un depósito del antígeno. Los motivos de secuencia en algunos plásmidos, como las islas GpC, son inmunoestimuladores y pueden funcionar como adyuvantes promovidos por la inmunoestimulación debido a LPS y otros componentes bacterianos. Los vectores bacterianos vivos producen sus propios factores inmunomoduladores, tales como los lipopolisacáridos (LPS) *in situ*, lo que puede constituir una ventaja sobre otras formas de administración, tales como la microencapsulación. Además, el uso de la ruta de entrada natural resulta beneficioso ya que muchas bacterias, como *Salmonella*, salen del lumen intestinal a través de las células M de los parches de Peyer y eventualmente migran hacia los ganglios linfáticos y el bazo, lo que permite dirigir las vacunas a sitios inductivos del sistema inmune.

Los derivados atenuados de *Salmonella enterica* son atractivos como vehículos para la administración de antígenos heterólogos al sistema inmunitario de los mamíferos porque las cepas de *S. enterica* pueden administrarse potencialmente a través de rutas mucosales de inmunización, es decir, por vía oral o nasal, lo que ofrece ventajas de simplicidad y seguridad en comparación con la administración parenteral. Además, las cepas de *Salmonella* incitan fuertes respuestas inmunes humorales y celulares a nivel de los compartimientos tanto sistémicos como mucosales.

Hasta la fecha, se ha demostrado que la cepa de vacuna Ty21a tiene un excelente perfil de seguridad. Al salir de la luz intestinal a través de las células M, las bacterias son captadas por las células fagocíticas, tales como los macrófagos y las células dendríticas. Estas células son activadas por el patógeno y comienzan a diferenciarse, y probablemente migran hacia los ganglios linfáticos y el bazo. Debido a sus mutaciones atenuantes, las bacterias de la cepa *S. typhi* Ty21 no pueden persistir en estas células fagocíticas, y mueren en este momento. Las moléculas de ADN recombinante se liberan y posteriormente se transfieren al citosol de las células inmunes fagocíticas, ya sea a través de un sistema de transporte específico o por filtración endosómica. Finalmente, las moléculas de ADN recombinante entran en el núcleo, donde se transcriben, dando lugar a la expresión de MSLN en el citosol de las células fagocíticas. Las células T citotóxicas específicas contra la proteína del receptor VEGFR son inducidas por las células presentadoras de antígeno (APCs) activadas.

No hay datos disponibles hasta la fecha que indiquen que *S. typhi* Ty21a sea capaz de entrar en el torrente sanguíneo sistémicamente. La cepa de vacuna viva atenuada *Salmonella typhi* Ty21a permite, por lo tanto, el direccionamiento específico al sistema inmune mientras exhibe un excelente perfil de seguridad.

En este contexto, el término "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro del 80% al 120%, alternativamente dentro del 90% al 110%, incluido dentro del 95% al 105% de un valor o intervalo dado.

El término "proteína que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con VEGFR-2 humano" se refiere a una proteína que difiere en la secuencia de aminoácidos y/o la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos del VEGFR-2 humano. La proteína puede ser de origen natural, p. ej., un homólogo de VEGFR-2 de una especie diferente, o una proteína preparada por ingeniería, p. ej., un derivado de VEGFR-2 preparado por ingeniería. Se sabe que el uso de codones es diferente entre especies. Por lo tanto, cuando se expresa una proteína heteróloga en una célula diana, puede ser necesario, o al menos útil, adaptar la secuencia de ácido nucleico al uso de codones de la célula diana. Los métodos para definir y construir derivados de una proteína dada son bien conocidos por cualquier experto en la técnica.

La proteína que comparte al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencia con VEGFR-2 humano puede contener una o más mutaciones que comprenden una adición, una deleción y/o una sustitución de uno o más aminoácidos. Según las enseñanzas de la presente invención, dichos aminoácidos eliminados, añadidos y/o sustituidos pueden ser aminoácidos consecutivos o pueden estar intercalados a lo largo de la secuencia de aminoácidos de la proteína que comparte al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencia con la VEGFR-2 humano. Según la enseñanza de la presente invención, se pueden añadir, eliminar y/o sustituir varios aminoácidos, siempre que la identidad de secuencia con VEGFR-2 humano sea al menos aproximadamente 80%. La identidad de secuencia con VEGFR-2 humano puede ser al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, o lo más particularmente al menos aproximadamente 95%. Los métodos y algoritmos para determinar la identidad de la secuencia, incluida la comparación de una proteína parental y su derivado que tiene deleciones, adiciones y/o sustituciones en relación con una secuencia parental, son bien conocidos por el experto en la técnica. A nivel de ADN, las secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con VEGFR-2 pueden diferir en mayor medida debido a la degeneración del código genético.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una vacuna de ADN que comprende la cepa mutante atenuada de Salmonella typhi Ty21a de la presente invención.

La cepa atenuada S. typhi Ty21a es el componente activo de Typhoral L®, también conocido como Vivotif® (fabricado por Berna Biotech Ltd., una compañía Crucell, Suiza). Actualmente, es la única vacuna oral viva autorizada contra la fiebre tifoidea. Esta vacuna se ha ensayado ampliamente y ha demostrado ser segura con respecto a la toxicidad del paciente, así como con respecto a su transmisión a terceros (Wahdan et al., J. Infectious Diseases 1982, 145: 292-295). La vacuna está autorizada en más de 40 países. El número de autorización de comercialización de Typhoral L® es PL 15747/0001 fechada el 16 de diciembre de 1996. Una dosis de vacuna contiene al menos  $2 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias viables de S. typhi Ty21a y al menos  $5 \times 10^9$  células no viables de S. typhi Ty21a.

Una de las propiedades bioquímicas de la cepa bacteriana Salmonella typhi Ty21a es su incapacidad para metabolizar la galactosa. La cepa bacteriana atenuada tampoco es capaz de reducir el sulfato a sulfuro, lo que la diferencia de la cepa de Salmonella typhi Ty2 de tipo salvaje. Con respecto a sus características serológicas, la cepa Salmonella typhi Ty21a contiene el antígeno O9 que es un polisacárido de la membrana externa de la bacteria y carece del antígeno O5, que a su vez es un componente característico de Salmonella typhimurium. Esta característica serológica respalda la justificación para incluir el ensayo respectivo en un panel de ensayos de identidad para la liberación de lotes.

En el contexto de la presente invención, el término "casete de expresión eucariota" se refiere a un casete de expresión que permite la expresión del marco de lectura abierto en una célula eucariota. Se ha mostrado que la cantidad de antígeno heterólogo requerida para inducir una respuesta inmune adecuada puede ser tóxica para la bacteria y provocar la muerte celular, la atenuación excesiva o la pérdida de expresión del antígeno heterólogo. El uso de un casete de expresión eucariota que no se expresa en el vector bacteriano, sino solo en la célula diana puede superar este problema de toxicidad y la proteína expresada puede presentar un patrón de glicosilación eucariota.

Un casete de expresión eucariota comprende secuencias reguladoras que son capaces de controlar la expresión de un marco de lectura abierto en una célula eucariota, preferiblemente un promotor y una señal de poliadenilación. Los promotores y las señales de poliadenilación incluidas en las moléculas de ADN recombinante comprendidas por la cepa mutante atenuada de Salmonella para el uso de la presente invención se seleccionan preferiblemente para que sean funcionales dentro de las células del sujeto a inmunizar. Los ejemplos de promotores adecuados, especialmente para la producción de una vacuna de ADN para humanos, incluyen pero no se limitan a promotores de Citomegalovirus (CMV), tales como el promotor temprano fuerte de CMV, Virus de Simios 40 (SV40), Virus de Tumor Mamario de Ratón (MMTV), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), tal como el promotor de Repetición Terminal Larga (LTR) del VIH, el virus de Moloney, el virus de Epstein Barr (EBV) y del virus del Sarcoma de Rous (RSV), así como los promotores de genes humanos tales como la actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana y metalotioneína humana. En una realización particular, el casete de expresión eucariota contiene el promotor de CMV. En el contexto de la presente invención, el término "promotor de CMV" se refiere al promotor de citomegalovirus fuerte inmediato temprano.

Los ejemplos de señales de poliadenilación adecuadas, especialmente para la producción de una vacuna de ADN para seres humanos, incluyen, pero no se limitan a, el sitio de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (BGH), las señales de poliadenilación de SV40 y las señales de poliadenilación de LTR. En una realización particular, el casete de expresión eucariota incluido en la molécula de ADN recombinante comprendida por la cepa mutante

atenuada de Salmonella de la presente invención comprende el sitio de poliadenilación de BGH.

Además de los elementos reguladores requeridos para la expresión de la proteína receptora VEGF, como un promotor y una señal de poliadenilación, también se pueden incluir otros elementos en la molécula de ADN recombinante. Dichos elementos adicionales incluyen potenciadores. El potenciador puede ser, por ejemplo, el potenciador de actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana y potenciadores virales tales como los de CMV, RSV y EBV.

Las secuencias reguladoras y los codones generalmente dependen de la especie, por lo que para maximizar la producción de proteínas, las secuencias reguladoras y los codones se seleccionan preferiblemente para que sean efectivos en la especie que se va a inmunizar. El experto en la técnica puede producir moléculas de ADN recombinante que son funcionales en una especie de sujeto dada.

La vacuna de ADN de la presente invención es para usar en una inmunoterapia contra el cáncer antiangiogénico en humanos.

La vacuna de ADN comprende la cepa atenuada de Salmonella typhi Ty21a transformada por un plásmido que contiene un ADN que codifica la proteína VEGFR-2 de SEQ ID NO 1.

En realizaciones particulares, la molécula de ADN recombinante comprende el gen de resistencia al antibiótico kanamicina, el pMB1 ori y un casete de expresión eucariota que codifica VEGFR-2 humano bajo el control de un promotor de CMV. En realizaciones particulares, la VEGFR-2 humano tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 2.

El promotor inmediato temprano del citomegalovirus eucariota (CMV) asegura la traducción eficiente de la proteína VEGFR-2 en la célula huésped, y el origen de replicación procariota (ori) media la multiplicación dentro del huésped bacteriano.

En realizaciones particulares, la molécula de ADN recombinante se deriva del plásmido de expresión pVAX1™ disponible comercialmente (Invitrogen, San Diego, California). Este vector de expresión se modificó reemplazando el origen de replicación pUC de alto número de copias por el origen de replicación pMB1 de bajo número de copias de pBR322. La modificación de bajo número de copias se realizó con el fin de reducir la carga metabólica y para hacer que la construcción sea más estable. Los detalles de la construcción del plásmido pVAX10.VR2-1 se representan en la Figura 2. El esqueleto del vector de expresión generado se designó pVAX10. La inserción de VEGFR-2 humano de la secuencia de ácido nucleico como se encuentra en la SEQ ID NO 2 en este esqueleto del vector de expresión a través de NheI/XhoI produjo el plásmido de expresión pVAX10.VR2-1.

El plásmido de expresión pVAX10.VR2-1 se representa esquemáticamente en la Figura 2. En realizaciones particulares, el plásmido es el pVAX10.VR2-1 de 7580 pb como se representa en la Figura 2 y tiene la secuencia que se encuentra en la SEQ ID NO 3 y la vacuna de ADN se designa como VX01. VX01 es una vacuna oral contra el cáncer que consiste en una cepa atenuada de Salmonella enterica serovar typhi Ty21a que lleva al menos una copia de un ADN plasmídico, pVAX10.VR2-1, que codifica un casete de expresión eucariota del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 humano (VEGFR-2).

En realizaciones particulares, el cáncer es cáncer de páncreas.

En realizaciones particulares, dicho cáncer de páncreas es cáncer de páncreas en estadio IV o localmente avanzado.

En realizaciones particulares, el cáncer incluye metástasis.

En realizaciones particulares, la inmunoterapia del cáncer comprende además la administración de una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella que comprenden al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión que codifica un antígeno tumoral y/o un antígeno de estroma tumoral. En realizaciones particulares, dicha una o más cepas mutantes adicionales de Salmonella son Salmonella typhi Ty21a que comprende un casete de expresión eucariota. En realizaciones particulares, dicha una o más cepas adicionales de Salmonella comprenden una cepa mutante atenuada de Salmonella que codifica WT1 humana.

La combinación de la cepa mutante atenuada de Salmonella de la presente invención con una segunda cepa mutante atenuada que comprende una molécula de ADN que codifica un segundo antígeno tumoral puede tener efectos antitumorales sinérgicos. En particular, la focalización simultánea del tumor y el estroma tumoral puede minimizar el riesgo de escape del tumor. Combinando la inmunoterapia basada en VEGFR-2 con la inmunoterapia del cáncer basada en WT1 puede mostrarse especialmente eficaz, ya que se atacan al mismo tiempo las células humanas que sobreexpresan WT1 y la vasculatura tumoral.

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se coadministra con dicha una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella.

En el contexto de la presente invención, el término "coadministración" o "coadministrar" significa la administración de dos cepas mutantes atenuadas diferentes de Salmonella en tres días consecutivos, más particularmente, en dos días

consecutivos, más particularmente, el mismo día, más particularmente en 12 horas. Más particularmente, en el contexto de la presente invención, el término "coadministración" se refiere a la administración simultánea de dos cepas mutantes atenuadas diferentes de Salmonella.

5 En realizaciones particulares, el tratamiento se acompaña de quimioterapia y/o radioterapia. Para la cura del cáncer, puede ser esencial la erradicación completa de las células madre del cáncer. Para una eficacia máxima, puede ser beneficiosa una combinación de diferentes estrategias terapéuticas.

10 En el contexto de la presente invención, el término "terapia biológica contra el cáncer" o "inmunoterapia contra el cáncer" se refiere a la estimulación del sistema inmunitario del paciente para atacar las células tumorales malignas o el estroma tumoral. Las estrategias de terapia biológica del cáncer incluyen la administración de antígenos tumorales, la administración de anticuerpos terapéuticos como fármacos, la administración de citoquinas inmunoestimulantes y la administración de células inmunes.

15 Los agentes quimioterapéuticos que se pueden usar en combinación con la cepa mutante atenuada de Salmonella de la presente invención pueden ser, por ejemplo: gemcitabina, amifostina (etiol), cabazitaxel, cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, docetaxel, mecloretamina, estreptozocina, ciclofosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina), doxorubicina lipo (doxil), ácido folínico, gemcitabina (gemzar), daunorubicina, daunorubicina lipo (daunoxoma), procarbazona, ketokonazol, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo (5-FU), vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleucina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cladribina, camptotecina, CPT-11, 10-hidroxi-7-etil-camptotecina (SN38), dacarbazina, floxuridina, fludarabina, hidroxurea, ifosfamida, idarrubicina, mesna, interferón alfa, interferón beta, irinotecán, mitoxantrona, topotecán, leuprólido, megestrol, melfalán, mercaptopurina, oxaliplatino, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, plicamicina, estreptozocina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo y combinaciones de los mismos.

20 Los agentes quimioterapéuticos más preferidos según la invención en combinación con VXM01 son cabazitaxel, carboplatino, oxaliplatino, cisplatino, ciclofosfamida, docetaxel, gemcitabina, doxorubicina, paclitaxel (taxol), irinotecán, vincristina, vinblastina, vinorelbina, ácido folínico, 5-fluorouracilo y bleomicina, especialmente gemcitabina.

25 En realizaciones particulares, el agente quimioterapéutico es gemcitabina.

También puede ser favorable dependiendo de la aparición de posibles efectos secundarios, incluir un tratamiento con antibióticos o agentes antiinflamatorios.

30 En el caso en el que ocurran eventos adversos que se parezcan a reacciones de hipersensibilidad mediadas por histamina, leucotrienos o citoquinas, están disponibles opciones de tratamiento para la fiebre, anafilaxia, inestabilidad de la presión arterial, broncoespasmo y disnea. Las opciones de tratamiento en el caso de autoagresión derivada de células T no deseada se derivan de esquemas de tratamiento estándar en la enfermedad de injerto contra huésped aguda y crónica aplicada después del trasplante de células madre. Se proponen ciclosporina y glucocorticoides como opciones de tratamiento.

35 En el caso improbable de infección sistémica por el tipo de Salmonella typhi Ty21a, se recomienda una terapia antibiótica apropiada, por ejemplo con fluoroquinolonas que incluyen ciprofloxacina u ofloxacina. Las infecciones bacterianas del tracto gastrointestinal deben tratarse con agentes respectivos, tales como la rifaximina.

40 En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra durante la quimioterapia o el ciclo de tratamiento de radioterapia o durante la terapia biológica del cáncer. En realizaciones particulares, el tratamiento inmunoterapéutico

con la vacuna se lleva a cabo durante el ciclo de tratamiento de quimioterapia.

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra antes de la quimioterapia o del ciclo de tratamiento de radioterapia o antes de la terapia biológica del cáncer. Esta estrategia puede tener la ventaja de que la quimioterapia o la radioterapia se pueden realizar bajo condiciones de inmunidad frente al cáncer potenciada.

45 En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra después de la quimioterapia o del ciclo de tratamiento de radioterapia o después de la terapia biológica del cáncer.

50 La vacuna según la presente invención se administra por vía oral. La administración oral es más simple, segura y cómoda que la administración parenteral. Los efectos adversos de la administración parenteral, subcutánea o intradérmica pueden superarse mediante la administración oral de la vacuna de ADN de la presente invención. Sin embargo, debe observarse que la cepa mutante atenuada de Salmonella para el uso de la presente invención también puede administrarse por cualquier otra ruta adecuada. Preferiblemente, se administra una dosis terapéuticamente eficaz al sujeto, y esta dosis depende de la aplicación particular, del tipo de malignidad, del peso, la edad, el sexo y el estado de salud del sujeto, de la forma de administración y la formulación, etc. La administración puede ser única o múltiple, según se requiera.

5 La cepa mutante atenuada de Salmonella para uso de la presente invención se puede proporcionar en la forma de una disolución, una suspensión, liofilizado o cualquier otra forma adecuada. Se puede proporcionar en combinación con vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. También se pueden incluir agentes para ajustar el valor del pH, tampones, agentes para ajustar la toxicidad y similares. En el contexto de la presente invención, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y otros ingredientes de composiciones farmacéuticas que son fisiológicamente tolerables y que típicamente no producen reacciones adversas cuando se administran a un mamífero (p. ej., un ser humano). El término "farmacéuticamente aceptable" también puede significar aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en mamíferos y, más particularmente, en seres humanos.

10 La vacuna para el uso de la presente invención es sorprendentemente efectiva a dosis relativamente bajas. En realizaciones particulares, la dosis única de la vacuna es de aproximadamente  $1 \times 10^6$ , sobre  $1 \times 10^7$ , o alrededor de  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (CFU). La administración de dosis bajas de esta vacuna bacteriana viva minimiza el riesgo de excreción y, por lo tanto, de transmisión a terceros.

15 En este contexto, el término "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro de un factor de 3, alternativamente dentro de un factor de 2, incluido dentro de un factor de 1,5 de un valor o intervalo dado.

En realizaciones particulares, la dosis única de la vacuna es inferior a  $1 \times 10^8$  UFC. En realizaciones particulares, la dosis única de la vacuna es de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  CFU.

En realizaciones particulares, la dosis única comprende de  $10^6$  a  $10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC).

20 En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella es para uso en inmunoterapia individualizada contra el cáncer. La inmunoterapia individualizada contra el cáncer puede comprender la etapa de evaluar el patrón de expresión del antígeno del estroma tumoral y/o el patrón de expresión del antígeno tumoral de un paciente. La inmunoterapia individualizada contra el cáncer también puede comprender el paso de evaluar las respuestas preinmunes contra un antígeno de estroma tumoral o un antígeno tumoral, preferiblemente la respuesta preinmune contra VEGFR-2. En línea con esto, se demostró que las respuestas inmunes preexistentes contra VEGFR-2 se correlacionan fuertemente con las respuestas clínicas positivas de VXM01, en particular con una disminución en la perfusión tumoral.

30 VXM01 se puede usar - ya sea solo o en combinación con otras vacunas contra el cáncer basadas en Salmonella typhi Ty21a que comprenden sistemas de expresión eucariotas - para el tratamiento de varios tipos de cáncer. En realizaciones particulares, VXM01 se puede usar para el tratamiento individualizado del cáncer específico del paciente. Para ese propósito, el patrón de expresión de antígeno estromal y/o tumoral del paciente puede evaluarse en una primera etapa, por ejemplo, mediante diagnósticos complementarios dirigidos al patrón de antígeno tumoral y/o estromal específico del paciente. Alternativamente, se pueden evaluar las respuestas inmunes preexistentes contra los antígenos estromales y/o tumorales. Dependiendo del patrón de expresión de los antígenos tumorales y/o estromales del paciente o de las respuestas preinmunes del paciente contra los antígenos tumorales y/o estromales, 35 VXM01 puede administrarse bien solo o en combinación con una o más vacunas adecuadas contra el cáncer basadas en Salmonella typhi Ty21a adicionales que comprenden sistemas de expresión eucariotas. Sin embargo, las combinaciones de VXM01 con una o más vacunas adicionales contra el cáncer basadas en Salmonella typhi Ty21a también se pueden administrar como combinaciones fijas. Estas mezclas que combinan dos o más vacunas contra el cáncer basadas en Salmonella typhi Ty21a pueden estar compuestas por productos comerciales independientes. Las combinaciones, ya sean fijas o individualizadas, pueden contener VXM01 como terapia de base antiangiogénica. 40

En otro aspecto, la presente invención se refiere a la vacuna VXM01 de ADN, que comprende la cepa Ty21a atenuada de Salmonella typhi transformada por un plásmido que contiene un ADN que codifica la proteína VEGFR-2 de la SEQ ID NO 1, en donde el plásmido es un ADN plasmídico de 7580 pb y comprende el ADNc de VEGFR-2 que está bajo el control del promotor CMV, el gen de resistencia a la kanamicina y el pMB1 ori, y se designa como pVAX10.VR2-1.

#### 45 **Breve descripción de las figuras y tablas**

Figura 1: Secuencia de aminoácidos del ADNc de VEGFR-2 clonado en el plásmido pVAX1 0.VR2-1

Figura 2: mapa del plásmido de pVAX10.VR2-1

Figura 3: Diseño de dosis creciente de la vacuna VXM01

Figura 4: Esquema de estudio general

50 Figura 5: respuestas de células T específicas de VXM01

Figura 6: Efectos de VXM01 en la perfusión tumoral

Figura 7: Efectos de VXM01 en los niveles séricos de VEGF A

Figura 8: Efectos de VXM01 sobre los niveles séricos de colágeno IV

Figura 9: Efectos de VXM01 en la presión arterial

Figura 10: inmunidad anti-vehículos inducida por VXM01

Figura 11: Cascada de análisis de excreción de VXM01

Figura 12: Excreción de VXM01

5 Tabla 1: Criterios de selección de pacientes

Tabla 2: Respuestas de células T específicas de VMX01

### Ejemplos

Ejemplo 1 Preparación de cepas de Salmonella typhi Ty21a y preparación de plásmidos

10 La primera etapa en la preparación del lote de semillas de investigación (RSL) consistió en el aislamiento de la cepa atenuada de Salmonella typhi Ty21a seguida de la transformación de la bacteria atenuada con el ADN plasmídico (pVAX1 0.VR2-1).

15 El medio de cultivo líquido se inoculó con un aislado de Salmonella typhi Ty21a y el cultivo líquido se sembró en un medio de agar con el fin de aislar colonias bacterianas individuales. Se aislaron colonias individuales y se cultivaron en medio de cultivo líquido. Dos cultivos, denominados VAX.Ty21-1 y VAX.Ty21-2, se formularon después con glicerol, se dividieron en alícuotas (1 ml) y se almacenaron a  $-75\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  en espera de uso. La identidad de cada uno de los dos cultivos se confirmó aún más.

El principio de la síntesis de plásmidos se basó en la síntesis de genes *in vitro* de doble cadena con las siguientes etapas:

20 Toda la secuencia de plásmido pVAX10-VR2.1 de 7,58 kb se subdividió (mediante análisis de software) en 5 secciones de  $\sim 1,5$  kb. Cada sección se subdividió en 40-50 pb de oligonucleótidos, cada uno con regiones superpuestas entre oligonucleótidos de ambas cadenas.

Los oligonucleótidos sintetizados *in vitro* se fosforilaron luego por incubación con polinucleótido quinasa T4

Después del proceso de recocido de la superposición de oligonucleótidos en condiciones apropiadas, la enzima ligasa de ADN Taq conectó los oligonucleótidos alineados

25 Una vez completado la etapa de ligadura, la PCR se realizó usando cebadores recocidos en posiciones externas, para aumentar el rendimiento de los fragmentos de plásmidos ligados ( $\sim 1.5$  kb)

Se realizó una electroforesis preparativa en gel de agarosa para aislar los productos de PCR

Los productos de PCR aislados se clonaron en vectores TOPO (Invitrogen K#4575-40) y se transformaron en células TOP10 E. coli para propagación

30 Después del aislamiento del plásmido TOPO, se realizó una restricción y verificación de secuencia

Los fragmentos alineados aislados se ensamblaron mediante PCR solapada. Este proceso fue seguido por el ensamblaje lineal del plásmido pVAX10.VR2-1

35 Después de la digestión de restricción *Xho* (el sitio de restricción único está presente en el plásmido pVAX10.VR2-1, ver Figura 2) y la unión covalente a través de la ligasa T4, E. coli se transformó con el plásmido circular para propagación

Después de la verificación final de la secuencia del plásmido, el plásmido pVAX10.VR2-1 se transformó en la cepa bacteriana S. typhi Ty21a.

El plásmido pVAX10.VR2-1 se sintetizó así con éxito (sin desviación de la secuencia de referencia). Este plásmido se utilizó además para transformar la cepa bacteriana de S. typhi Ty21a.

40 Ejemplo 2 VXM01 - Ensayo clínico de fase I: descripción del estudio

45 Este ensayo de fase I examinó la seguridad, la tolerabilidad y las respuestas inmunológicas y clínicas a VXM01. El estudio aleatorizado, controlado con placebo, doble ciego, aumento de dosis estudio incluyó a 45 pacientes con cáncer de páncreas localmente avanzado o estadio IV. Los pacientes recibieron cuatro dosis de VXM01 o placebo además de gemcitabina como estándar de atención. En el estudio se evaluaron dosis de  $10^6$  UFC hasta  $10^{10}$  UFC de VXM01. Una junta independiente de monitoreo de seguridad de datos (DSMB) participó en las decisiones de escalado de dosis. Además de la seguridad como punto final primario, se evaluaron la reacción inmune específica de VXM01, así como los parámetros de respuesta clínica.

Evaluación preclínica de eficacia:

La eficacia y seguridad de este enfoque en animales ha sido validada varias veces por los inventores. Otros experimentos de los inventores mostraron una actividad de esta vacuna en dos modelos diferentes de cáncer de páncreas.

- 5 VXM01, la vacuna utilizada en este ensayo, es una versión humanizada de la vacuna anti-VEGFR-2 probada previamente en ratones. Codifica el VEGFR-2 de longitud completa humana y utiliza la cepa de Salmonella typhi con licencia Ty21a en lugar de Salmonella typhimurium como vehículo. Se supone que la vacuna conduce a la expresión de la proteína VEGFR-2 en monocitos y células dendríticas después de la entrada de VXM01 en los parches de Peyer a través de las células M del intestino, y la internalización por las células presentadoras de antígeno seguido de la traducción del ADN codificado.
- 10

Evaluación preclínica de seguridad:

Los estudios de toxicidad preclínica en ratones incluyeron, pero no se limitaron a un estudio de toxicidad de dosis única en ratones realizado con la vacuna humana VXM01. Como VXM01 es específica para el huésped humano, el estudio de la vacuna humana en ratones se centró en los posibles efectos de las impurezas relacionadas con el proceso y los signos y síntomas relacionados de posible relevancia para el deterioro cardiovascular, respiratorio o del sistema nervioso central. Para investigar el perfil de toxicidad de una respuesta de células T anti-VEGFR-2, se realizó un estudio de toxicidad de dosis repetidas utilizando el constructo análogo murino de VXM01 que indujo una respuesta de células T dependiente de la dosis en ratones. Según las observaciones anteriores de los inventores, no se observaron muertes relacionadas con el tratamiento ni signos clínicos toxicológicamente importantes a lo largo de estos estudios, que se realizaron según las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

15

20

El vector Salmonella typhi Ty21a utilizado aquí es un vehículo bacteriano vivo y atenuado que permite la administración oral de la vacuna VXM01. Es en sí una vacuna aprobada contra la fiebre tifoidea (Vivotif®, Crucell, anteriormente Berna Biotech Ltd., Suiza) que ha sido ampliamente probada y ha demostrado su seguridad con respecto a la toxicidad del paciente y la transmisión a terceros (Wahdan et al., J Enfermedades infecciosas 1982, 145:292-295). VXM01 está clasificada como un medicamento de transferencia génica y está sujeto a las respectivas directrices y regulaciones.

25

Descripciones de estudio y objetivos:

El estudio realizado fue un estudio de aumento de dosis doble ciego, controlado con placebo, de la vacuna experimental VXM01 en pacientes con cáncer de páncreas inoperable o en estadio IV. La vacuna se administró como complemento de un tratamiento de gemcitabina estándar de atención.

- 30 Los objetivos fueron examinar la seguridad y la tolerabilidad, y las respuestas inmunológicas y clínicas a la vacuna VXM01 en investigación anti-VEGFR-2, así como identificar la dosis máxima tolerada (MTD) de VXM01. La MTD se define como el nivel de dosis más alto en el que menos de dos de hasta seis pacientes bajo el tratamiento con VXM01 experimentan una toxicidad limitante de la dosis (DLT).

- 35 Los puntos finales primarios para la seguridad y la tolerabilidad fueron los siguientes: número de DLT definidos como cualquier evento adverso (EA) relacionado con el fármaco del estudio de grado 4 o superior, o grado 3 o superior para fístula gastrointestinal, diarrea, perforación gastrointestinal, falla multiorgánica, anafilaxia, cualquier trastorno autoinmune, síndrome de liberación de citoquinas, hemorragia intestinal, insuficiencia renal, proteinuria, eventos tromboembólicos, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca o vasculitis según los Criterios de Terminología Común del Instituto Nacional del Cáncer (CTCAE).

- 40 Los criterios de valoración secundarios, que evalúan la eficacia de la vacuna experimental para provocar una respuesta inmune específica al VEGFR-2, incluyeron el número de pacientes inmunes positivos.

- Otro punto final secundario fue la respuesta clínica: estadificación del tumor según los criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST), tasa de respuesta global, supervivencia libre de progresión, supervivencia general y cambios en la perfusión tumoral. La perfusión tumoral se determinó mediante imágenes de resonancia magnética con contraste dinámico (DCE-MRI) en un sistema 1.5 Tesla (Magnetom Aera, Siemens, Erlangen, Alemania).
- 45

VXM01 se había fabricado según las Buenas prácticas de fabricación (GMP) y se administró en una solución tamponada. El control con placebo consistió en una solución isotónica de cloruro de sodio.

Selección de pacientes y diseño de estudios clínicos:

- 50 El estudio incluyó un máximo de 45 pacientes con cáncer de páncreas localmente avanzado e inoperable o en estadio IV. Los criterios de elegibilidad se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1:

<b>Criterios de inclusión</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Consentimiento informado por escrito, firmado y fechado</li> <li>2. Pacientes con cáncer de páncreas localmente avanzado, inoperable y en estadio IV según UICC basado en imágenes de diagnóstico mediante tomografía computarizada (TC) o exámenes histológicos</li> <li>3. Hombre o mujer posmenopáusica</li> <li>4. Edad <math>\geq</math> 18 años</li> <li>5. La quimioterapia es inocua dentro de los 60 días previos a la visita de selección, excepto el tratamiento con gemcitabina.</li> <li>6. Índice de Karnofsky <math>&gt;70</math></li> <li>7. Esperanza de vida <math>&gt;3</math> meses.</li> <li>8. Función renal, hepática y de médula ósea adecuada</li> <li>9. Recuento absoluto de neutrófilos <math>&gt;1500/\mu\text{L}</math></li> <li>10. Hemoglobina <math>&gt;10</math> g/dL</li> <li>11. Plaquetas <math>&gt;75000/\mu\text{L}</math></li> <li>12. Tiempo de protrombina y relación internacional normalizada (INR) <math>&lt;1,5</math> veces el límite superior de la normalidad (ULN) (excepto bajo tratamiento anticoagulante)</li> <li>13. Aspartato aminotransferasa <math>&lt;4</math> veces ULN</li> <li>14. Alanina aminotransferasa <math>&lt;4</math> veces ULN</li> <li>15. Bilirrubina total <math>&lt;3</math> veces ULN</li> <li>16. Liquidación de creatinina estimada según Cockcroft-Gault <math>&gt; 30</math> ml/min</li> <li>17. Proteinuria <math>&lt;1</math> g de proteína en la recolección de orina de 24 h</li> </ol>
<b>Criterio de exclusión</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>18. Estado después de la resección del páncreas (completa o parcial)</li> <li>19. Enfermedad que se puede reseccionar</li> <li>20. Participación en el ensayo de fármacos dentro de los 60 días previos a la visita de selección</li> <li>21. Otra neoplasia maligna anterior o actual, excepto cáncer de piel de células basales o escamosas, cáncer cervical <i>in situ</i> o cualquier otro cáncer del que el paciente haya estado libre de enfermedad durante <math>&lt;2</math> años</li> <li>22. Vacunación previa con Ty21a State después de la resección del páncreas (completa o parcial)</li> <li>23. Enfermedad que se puede reseccionar</li> <li>24. Participación en el ensayo de fármacos dentro de los 60 días previos a la visita de selección</li> <li>25. Otra neoplasia maligna anterior o actual, excepto cáncer de piel de células basales o escamosas, cáncer cervical <i>in situ</i> o cualquier otro cáncer del que el paciente haya estado libre de enfermedad durante <math>&lt;2</math> años</li> <li>26. Vacunación previa con Ty21a</li> <li>27. Enfermedad cardiovascular definida como: <ul style="list-style-type: none"> <li>Hipertensión no controlada (presión arterial sistólica <math>&gt;160</math> mmHg o presión arterial diastólica <math>&gt;100</math> mmHg) Evento tromboembólico arterial dentro de los 6 meses previos a la aleatorización, que incluyen: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Infarto de miocardio</li> <li>- Angina de pecho inestable</li> <li>- Accidente cerebrovascular</li> <li>- Ataque isquémico transitorio</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>28. Insuficiencia cardíaca congestiva New York Heart Association grado III a IV</li> <li>29. Arritmia ventricular grave que requiere medicación</li> <li>30. Enfermedad arterial periférica clínicamente significativa <math>&gt;</math> grado 2b según Fontaine</li> <li>31. Hemoptisis dentro de los 6 meses previos a la aleatorización</li> <li>32. Varices esofágicas</li> <li>33. Sangrado gastrointestinal superior o inferior dentro de los 6 meses previos a la aleatorización</li> <li>34. Lesión traumática significativa dentro de las 4 semanas previas a la aleatorización</li> <li>35. Herida no cicatrizante, fractura ósea o antecedentes de úlceras gastrointestinales dentro de los tres años</li> </ol>

anteriores a la inclusión, o gastroscopia positiva dentro de los 3 meses anteriores a la inclusión
36. Fístula gastrointestinal
37. Terapia de trombolisis dentro de las 4 semanas previas a la aleatorización
38. Obstrucción intestinal en los últimos 30 días antes de la visita de selección.
39. Cirrosis hepática $\geq$ grado B según la clasificación de puntuación de Child-Pugh
40. Presencia de cualquier infección sistémica aguda o crónica.
41. Radioterapia dentro de las 4 semanas previas a la aleatorización
42. Procedimientos quirúrgicos mayores o biopsia abierta dentro de las 4 semanas previas a la aleatorización
43. Aspiración con aguja fina dentro de los 7 días previos a la aleatorización
44. Terapia concurrente crónica dentro de las 2 semanas anteriores y durante el período de estudio doble ciego con:
- Corticosteroides (excepto esteroides para insuficiencia suprarrenal) o agentes inmunosupresores
- Antibióticos
- Bevacizumab
- Cualquier inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico
45. Quimioterapia excepto gemcitabina antes del día 10 Germen gramnegativo resistente a múltiples fármacos
46. Embarazo
47. Lactancia
48. Incapacidad para cumplir con los procedimientos de estudio y/o seguimiento
49. Antecedentes de otra enfermedad, disfunción metabólica, hallazgos en el examen físico o hallazgos en el laboratorio clínico que dan sospechas razonables de una enfermedad o afección que contraindica el uso de un fármaco en investigación o que podría afectar la interpretación de los resultados del estudio o hacer que el paciente tenga un alto riesgo de complicaciones del tratamiento
50. Mujeres en edad fértil
51. Cualquier historial de hipersensibilidad a drogas
52. Cualquier condición que resulte en un riesgo indebido para el paciente durante la participación en el estudio según el investigador

- Un total de 371 pacientes fueron seleccionados para el estudio. 326 pacientes no eran elegibles debido a terapias médicas excluidas (179), condiciones médicas preexistentes (129) en el historial médico del paciente y razones personales (18). Se incluyeron 45 pacientes, se asignaron al azar y se completaron con éxito la fase de estudio interno de 10 días en la Unidad de Investigación Clínica en las Clínicas Universitarias de Heidelberg (KliPS), según el protocolo del estudio. Las características demográficas basales de la enfermedad de los pacientes no fueron significativamente diferentes en los dos grupos, pero el tiempo transcurrido desde el diagnóstico fue más prolongado en el grupo VXM01 (8 vs. 6 meses) y los pacientes en el grupo VXM01 tenían un estadio tumoral más avanzado al momento de la inclusión (CA19.9 > 1000 en 40% vs. 20% y enfermedad metastásica en 83% vs. 53%).
- Se incluyeron pacientes varones y mujeres posmenopáusicas en este estudio. Sin embargo, no se investigaron las diferencias entre los dos géneros. El tiempo promedio de supervivencia de los pacientes que participaron en este ensayo fue inferior a 6 meses. Sin embargo, el período de seguimiento para los pacientes según lo definido por el protocolo fue de hasta 24 meses. El tratamiento del estudio se administró en primera línea como complemento del estándar de atención. Teniendo más en cuenta otros factores, entre ellos los múltiples estudios preclínicos farmacodinámicos primarios y secundarios, se asumió que el análisis riesgo-beneficio tiene un resultado favorable para la población de pacientes seleccionada.
- La dosis inicial consistió en una solución que contenía  $10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC) de VXM01 o placebo. Esta dosis de VXM01 se eligió por razones de seguridad y se asumió que estaba por debajo de la dosis efectiva mínima para provocar una respuesta inmune. A modo de comparación, una dosis de Typhoral®, la vacuna autorizada contra la fiebre tifoidea, contiene  $2 \times 10^9$  a  $6 \times 10^9$  UFC de Salmonella typhi Ty21a, equivalente a aproximadamente mil veces la dosis inicial de VXM01. La dosis se incrementó en pasos logarítmicos de factor diez, lo que parece estar justificado para una vacuna bacteriana viva. El diseño de aumento de dosis se muestra en la Figura 3.
- Cumpliendo con las pautas para los primeros ensayos en humanos, los pacientes de un grupo de dosis fueron tratados en cohortes. La primera administración de VXM01 en cualquier grupo de dosis se administró a un paciente solo acompañado por un paciente que recibió placebo. La segunda cohorte de cada grupo de dosis consistió en dos pacientes que recibieron VXM01 y un paciente que recibió placebo. Esta administración escalonada con un candidato

favorito, es decir, solo un paciente que recibió VXM01 primero, sirvió para mitigar los riesgos.

Una tercera cohorte de pacientes (tres que recibieron VXM01 y uno que recibió placebo) se incluyeron en los grupos de dosis  $10^8$ ,  $10^9$  y  $10^{10}$ . Este enfoque minimizó la exposición a las dosis de VXM01 que se supone que son subterapéuticas. La tercera cohorte y las dos primeras cohortes del siguiente grupo de tratamiento superior se trataron en paralelo según una estrategia de aleatorización claramente definida. Esta estrategia permitió el reclutamiento de pacientes disponibles y evitó el sesgo de selección para pacientes tratados en paralelo en el grupo de dosis más baja y más alta. En los grupos de dosis  $10^6$  y  $10^7$ , se incluyó una tercera cohorte de pacientes solo si un paciente de los tres pacientes iniciales que recibieron VXM01 del grupo de dosis respectivo experimentó un DLT y requirió confirmación por una decisión de la Junta de Monitoreo de Seguridad de Datos (DSMB).

10 Todos los pacientes completaron el ciclo de vacunación de siete días de 4 dosis cada dos días según el protocolo sin ninguna reducción de dosis. Debido a que no se observaron toxicidades limitantes de la dosis (DLT), no se alcanzó la dosis máxima tolerada. VXM01 fue bien tolerado en todos los niveles de dosis. Los EA y los SAE se distribuyeron equitativamente entre ambos grupos y no hubo signos obvios de efectos secundarios dependientes de la dosis entre los grupos.

15 El riesgo ambiental inherente a una vacuna oral es el potencial de excreción en el medio ambiente y la posterior vacunación de personas fuera de la población objetivo. Todos los pacientes del estudio fueron confinados en el sitio del estudio (KliPS) durante el período durante el cual tuvieron lugar las vacunas más tres días adicionales. Todas las heces de los pacientes del estudio fueron recolectadas e incineradas. Se investigaron muestras de fluidos corporales y heces para detectar el desprendimiento de VXM01. Se observó excreción fecal de VXM01 en dos pacientes, uno en el  $10^9$  y uno en el grupo de dosis de  $10^{10}$ . La excreción de VXM01 en heces en ambos pacientes fue transitoria en una ocasión después de la primera o segunda administración, respectivamente, y desapareció sin tratamiento con antibióticos. En otros fluidos corporales, no se determinó la excreción.

Se aplicaron precauciones higiénicas para proteger al personal del estudio de la absorción accidental. El personal del estudio fue entrenado específicamente para este aspecto del estudio.

25 Los pacientes solo eran dados de alta del hospital si resultaban negativos para la excreción de la vacuna después de la última administración del fármaco del estudio. En caso de que un paciente diera positivo por excreción después de la última administración, se realizó una descontaminación antibiótica del tracto gastrointestinal antes de que el paciente fuera dado de alta. La excreción fue seguida hasta que los resultados fueron negativos. Estas medidas parecen haber sido justificadas y suficientes para proteger el medio ambiente y estudiar al personal de la exposición al VXM01 hasta que se aclare el perfil de eliminación.

30 VXM01 se aplicó en paralelo a la terapia de fondo con gemcitabina como se muestra en la Figura 4 (esquema general del estudio). En resumen, se administró gemcitabina los días 1, 8 y 15 de un ciclo de quimioterapia de 28 días. La vacuna se administró cuatro veces en los días 1, 3, 5 y 7, comenzando tres días después de la última dosis de gemcitabina. La fase doble ciego del estudio terminó 31 días después de que el último paciente había recibido la última administración.

35 Para este ensayo de fase I (pacientes con cáncer de páncreas avanzado o en estadio IV) se eligió una población de pacientes con un pronóstico sombrío y un nivel de atención relativamente suave con respecto a la inmunosupresión. Los co-regímenes del agente quimioterapéutico gemcitabina con vacunación tumoral pueden ser sinérgicos. Además, se midió la activación específica de células T en este entorno de pacientes, lo que demuestra la efectividad de la vacuna VXM01. Se incluyó un control con placebo en el presente ensayo, con el fin de obtener un mayor conocimiento sobre cuestiones de seguridad específicas relacionadas con la vacuna activa frente al tratamiento de fondo. Además, los pacientes con placebo agrupados sirvieron como un buen comparador para evaluar la activación inmune específica y otros signos de eficacia clínica. Si y al pasar a la fase II, se puede prever una entidad del paciente diferente con una esperanza de vida más larga dependiendo del perfil de seguridad observado. Dichos estudios también incluirán tipos de tumores que han demostrado ser más susceptibles al tratamiento antiangiogénico.

#### Ejemplo 3 Respuestas específicas de VXM01 de células T

Las respuestas a VXM01 se evaluaron monitoreando las frecuencias de células T específicas de VEGFR2 en sangre periférica de VXM01 y pacientes tratados con placebo, detectados por INF $\gamma$  ELISpot, en diferentes momentos antes y después de la vacunación.

50 En primer lugar, se añadieron células T y DC pulsadas con péptidos a pocillos recubiertos con anticuerpos anti-INF $\gamma$ . Después de un período de incubación, las células se eliminaron con INF $\gamma$  secretado que se unía a los anticuerpos del recubrimiento. Luego se añadió el anticuerpo de detección para detectar el INF $\gamma$  unido, y después de una amplificación de señal, el rendimiento final podría verse como "manchas de color" que representan células T específicas activadas y específicas.

55 La positividad de las muestras ELISpot se calificó según las reglas predefinidas que definen el aumento de la señal, lo que resultó en una calificación de 0 a 3 por muestra:

Sin aumento: grado 0  
 Aumento claro pero < 3x: grado 1  
 ≥ 3x pero aumento < 5x: grado 2  
 Aumento ≥ 5x: grado 3

5 La respuesta inmune ELISpot de los pacientes del estudio se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2: respuesta de células T específicas de VEGFR-2 (pacientes con puntuación de calificación > 3)

Placebo	10 <sup>6</sup> UFC/admin	10 <sup>7</sup> UFC/admin	10 <sup>8</sup> UFC/admin	10 <sup>9</sup> UFC/admin	10 <sup>10</sup> UFC/admi
1/11	2/6	3/5	1/6	0/6	2/6

Los resultados de la respuesta inmune ELISpot de los pacientes del estudio se representan gráficamente en la Figura 5.

10 **Ejemplo 4. Efectos sobre la perfusión tumoral**

La perfusión tumoral se evaluó mediante el tiempo de tránsito de los medios de contraste (Ktrans) durante la resonancia magnética mejorada con contraste dinámico (DCEMRI) para caracterizar la respuesta al tratamiento. Se realizó una imagen ponderada T1 potenciada por contraste dinámico. La DCE-MRI se evaluó en un sistema 1.5 Tesla (Magnetom Aera, Siemens, Erlangen, Alemania) el día 0,38 y 3 meses después del tratamiento. La RM de contraste dinámico se realizó con secuencias VIBE (retención de la respiración interpolada volumétrica). Para ello, se inyectó una dosis de 8 ml de Gadovist.

Para cada examen, las regiones de interés se dibujaron manualmente dentro del tejido tumoral seguido de un análisis de píxel a píxel utilizando un paquete de software de Siemens (Tissue 4D). El modelado-ROI se basó en el modelo Tofts con el supuesto T10 (1000 ms) y Parker AIF. Para la estimación de la perfusión tumoral, Ktrans se consideró como punto final primario.

Los cambios medios en la perfusión tumoral fueron de -9% en el grupo VXM01 (n = 26) vs. +18% en el grupo placebo (n = 11). Se detectó una caída de más del 33% en la perfusión tumoral en el 35% de los pacientes evaluados tratados con VXM01 vs. 10% en el grupo placebo. Los respondedores más fuertes se analizaron adicionalmente en un análisis de subgrupos. Los efectos promedio máximos se detectaron en el punto de tiempo d38. Los efectos de varias dosis de VXM01 sobre la perfusión tumoral se representan gráficamente en la Figura 6.

25 **Ejemplo 5 Biomarcadores de angiogénesis**

Con el fin de caracterizar aún más la actividad antiangiogénica mediada por células T específicas de VEGFR-2 de VXM01, se acompañaron los cambios en los biomarcadores de angiogénesis VEGF A, el colágeno humano IV y la presión arterial.

30 VEGF A:

El VEGF A se midió en muestras de suero humano mediante ELISA usando un kit de ensayo comercial (ELISA Kit Quantikine Human VEGF A Immunoassay, R&D Systems, Cat.-No.: DVE00). El ensayo se usó como se describe en el prospecto y se modificó como parte de este plan de estudio según el estudio de validación anterior 580.132.2786.

Este ensayo emplea la técnica cuantitativa de inmunoensayo enzimático en sándwich. Un anticuerpo monoclonal específico para VEGF A humano había sido recubierto previamente sobre una microplaca. Los estándares, los controles de calidad (obtenidos comercialmente) y las muestras se pipetearon en los pocillos y cualquier presente VEGF A se unió al anticuerpo inmovilizado. El calibrador, las muestras de control de calidad y las muestras se analizaron como duplicados. Después de eliminar cualquier sustancia no unida, se añadió a los pocillos un anticuerpo policlonal ligado a enzimas específico para VEGF A. Después de un lavado para eliminar cualquier reactivo de anticuerpo enzimático no unido, se añadió una solución de sustrato a los pocillos y se desarrolló el color en proporción a la cantidad de VEGF A unido en la etapa inicial. Se detuvo el desarrollo del color y se midió la intensidad del color usando un lector de placa de microtitulación espectrofotométrica a 450 nm. Se generó una curva estándar trazando la absorbancia frente a la concentración de VEGF A respectiva para cada estándar. La concentración de VEGF A en la muestra se determinó directamente a partir de esta curva.

45 Los niveles séricos de VEGF-A aumentaron en el grupo VXM01 en un 235% tanto en d38 como en m3 vs. 17% y 31% en el grupo placebo (p = 0.05 a m3). La cuantificación de VEGF A en muestras de suero de pacientes se representa gráficamente en la Figura 7.

## Colágeno IV:

5 El colágeno humano IV se midió en muestras de suero humano mediante ELISA utilizando un kit de ensayo comercial (ELISA de colágeno humano IV, suero, KAMIYA BIOMEDICAL COMPANY, número de catálogo: KT-035). El ensayo se usó como se describe en el prospecto y se modificó como parte de este informe de estudio según el estudio de validación anterior 580.132.3645.

10 El ELISA de colágeno IV humano fue un ELISA sándwich de una sola etapa en fase sólida. El colágeno IV en la muestra estaba unido simultáneamente por un anticuerpo monoclonal en fase sólida y un conjugado de anticuerpo monoclonal-enzima, cada uno dirigido a diferentes sitios antigénicos. Esto dio como resultado que la molécula de colágeno IV se intercalara entre la fase sólida y los anticuerpos marcados con enzimas. Después de eliminar el anticuerpo marcado con enzima no unido y la muestra, la placa se incubó con sustrato cromogénico (TMB). El desarrollo de color resultante fue directamente proporcional a la cantidad de colágeno IV en la muestra.

Los niveles séricos de colágeno IV aumentaron en d38 y m3 en promedio en un 7% y 22%, respectivamente, en el grupo VXM01 frente a cambios de 2% y -7% en el grupo placebo ( $p = 0.02$  en m3). La cuantificación del colágeno IV en muestras de suero de pacientes se representa gráficamente en la Figura 8.

15 La presión arterial (sistólica y diastólica) y la frecuencia del pulso como marcadores farmacodinámicos de eficacia antiangiogénica se midieron después de 5 minutos de descanso en posición supina. Los cambios promedio en la presión arterial sistólica fueron + 3,6mmHg y + 3,9mmHg en el grupo de tratamiento vs. -8,8mmHg y 9,1 mmHg bajo placebo ( $p = 0.08$  en d38). Los efectos sobre la presión arterial promedio después de la primera dosis de vacunación (hasta el día 38) se representan gráficamente en la Figura 9.

## 20 Ejemplo 6 Inmunidad anti-vehículo

25 Para evaluar las respuestas inmunitarias al vehículo bacteriano, se detectaron inmunoglobulinas IgM e IgM anti-Salmonella typhi mediante ELISA usando dos kits de ensayo comerciales (ELISA Salmonella typhi IgG, cat. No. ST0936G y Salmonella typhi ELISA IgM, cat. No. ST084M; Calbiotech Inc., 10461 Austin Dr, Spring Valley, CA 91978, EE. UU.). Estos ensayos fueron ensayos cualitativos. Los ensayos se usaron como se describe en los prospectos, respectivamente, App. I/I) y modificado como parte del plan de estudio según el estudio de validación anterior 580.132.2785.

30 Ambos ensayos emplearon la técnica de ensayo inmunosorbente ligado a enzimas. Calibrador, control negativo, control positivo y muestras se analizaron como duplicados. Se añadió suero diluido del paciente (dilución 1:101) a los pocillos recubiertos con antígeno purificado. El anticuerpo específico IgG o IgM, si está presente, se une al antígeno. Todos los materiales no unidos se lavaron y se añadió el conjugado enzimático para unirse al complejo anticuerpo-antígeno, si está presente. El exceso de conjugado enzimático se lavó y se añadió sustrato. La placa se incubó para permitir la hidrólisis del sustrato por la enzima. La intensidad del color generado fue proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos IgG o IgM en la muestra. La intensidad del color se midió usando un lector de placa de microtitulación espectrofotométrica a 450 nm. El apagado de corte se calculó como sigue:

35 Calibrador OD x calibrador Factor (CF).

El índice de anticuerpos de cada determinación se determinó dividiendo el valor de OD de cada muestra por el valor de corte.

Interpretación del índice de anticuerpos:

40	<0,9	Sin anticuerpos detectables para Salmonella typhi IgG o IgM por ELISA
	0,9-1,1	Límite positivo
	> 1,1	Anticuerpo detectable contra Salmonella typhi IgG o IgM por ELISA

El número de pacientes con inmunoglobulinas IgG anti-Salmonella typhi detectables se muestra en la Figura 10.

## Ejemplo 7 Excreción

45 El desprendimiento de bacterias en las heces y fluidos corporales, lágrimas, saliva, orina y sangre se monitoreó en el estudio VXM01-01-DE según los métodos validados transferidos como previamente validados según GLP en un laboratorio de servicio central establecido (Huntingdon Life Sciences, Huntingdon, UK). El desprendimiento y la biodistribución en los fluidos corporales de VXM01 se determinaron mediante cultivo en placa y enriquecimiento. La identidad de la bacteria vehículo de VXM01 se determinó mediante aglutinación serológica y métodos de PCR.

50 Se recogieron muestras de prueba (sangre, lágrimas, orina, saliva y heces) en el sitio de Heidelberg y se realizó la entrega en el mismo día de muestras posteriores a la vacunación a MicroMol GmbH, ubicada en Karlsruhe, Alemania. La cascada de análisis de biodistribución y eliminación de vectores bacterianos se diseñó para detectar CFU in vivo de VXM01 o transferencia de plásmido horizontal. Se compone de dos ramas de análisis separadas (Rama I y Rama II):

Rama I: Método de recubrimiento para detectar cualquier transferencia de plásmido horizontal

Rama II: culture Cultivo de enriquecimiento líquido para detectar CFU en vivo de VXM01

La cascada de análisis es seguida por una decisión de matriz con el fin de determinar la excreción de bacterias vivas de VXM01 u observación de una transferencia horizontal de plásmidos. La cascada se describe en la Figura 11.

5 Análisis Rama I para la detección de la transferencia horizontal de plásmidos:

- Día 0: Recubrimiento de las 5 muestras de prueba en 3 placas TSA (+ kanamicina) cada una, incubación durante la noche a 37 °C
- Día 1: Discriminación visual entre los morfotipos VXM01 (Ty21a) y no VXM01 en las placas selectivas. Selección de morfotipos no VXM01 (9 colonias cada uno), rayas en placas de agar (+ kanamicina) para aglutinación y cultivo líquido paralelo (+ kanamicina) para cada morfotipo agrupado para análisis por PCR al día siguiente
- Día 2: PCR de cada grupo de morfotipos líquidos

10

Análisis Branch II para la detección de VXM01:

- Día 0: Preparación de cultivos de enriquecimiento líquido (+ kanamicina) para cada una de las 5 muestras de prueba.
- Día 1: PCR directa en cada cultivo de enriquecimiento líquido. Rayado de cada cultivo de enriquecimiento en placas de agar (+ kanamicina) para análisis serológico al día siguiente en caso de que la PCR sea positiva para el plásmido
- Día 2: confirmación serológica de la presencia de VXM01 (Ty21a)

15

Debido al hecho de que la PCR de cualquier muestra de ensayo no sería discriminatoria entre la CFU viva y/o el plásmido de flotación libre o el ADN genómico de Ty21a y como la aglutinación no puede aplicarse directamente en las muestras de ensayo, la PCR y los métodos de aglutinación se usaron como métodos de segunda línea después de aplicar el método de recubrimiento. Las colonias vivas identificadas cultivadas en placas que contienen kanamicina se caracterizaron adicionalmente por estos métodos. Solo el método de recubrimiento permite la discriminación entre células vivas y muertas (ya sea VXM01 o transformantes de plásmidos ajenos a VXM01 debido a la transferencia horizontal de plásmidos).

20

25

Se observó excreción fecal de VXM01 en dos pacientes, uno en el 10<sup>9</sup> y uno en el grupo de dosis de 10<sup>10</sup>. La excreción de VXM01 en heces en ambos pacientes fue transitoria en una ocasión después de la primera o segunda administración, respectivamente, y desapareció sin tratamiento con antibióticos. Los números de VMX01 que excretan pacientes en los diversos grupos de dosis se representan gráficamente en la Figura 12.

30

En resumen, VXM01 tiene el potencial de apuntar a una variedad de tipos de tumores y superar múltiples obstáculos encontrados por otros enfoques actuales de vacunas contra el cáncer. Una visión tentadora es la posibilidad de combinar la vacuna de la presente invención con una multitud de otros agentes anticancerosos e inmunomoduladores. Los resultados del estudio presentado aquí motivan a los inventores a avanzar en este enfoque altamente interesante.

**Listado de secuencias**

35

<110> VAXIMM AG

<120> Vacuna de ADN para uso en pacientes con cáncer de páncreas

40

<130> 109313P855PC

<140> aún no asignado

<141> 26-06-2013

45

<150> EP 12004995.2

<151> 05-07-2012

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

50

<210> 1

<211> 1356

<212> PRT

<213> Homo sapiens

55

<400> 1

ES 2 752 141 T3

Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu  
 1 5 10 15

Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro  
 20 25 30

Arg Leu Ser Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr  
 35 40 45

Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro  
 50 55 60

Asn Asn Gln Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser  
 65 70 75 80

Asp Gly Leu Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn  
 85 90 95

Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser  
 100 105 110

Val Ile Tyr Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser  
 115 120 125

Val Ser Asp Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys  
 130 135 140

Thr Val Val Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser  
 145 150 155 160

Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg  
 165 170 175

ES 2 752 141 T3

Ile Ser Trp Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile  
180 185 190

Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser  
195 200 205

Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr  
210 215 220

Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu  
225 230 235 240

Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile  
245 250 255

Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu  
260 265 270

Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe  
275 280 285

Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu  
290 295 300

Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr  
305 310 315 320

Phe Val Arg Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met  
325 330 335

Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala  
340 345 350

Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly  
355 360 365

Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr  
370 375 380

Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu  
385 390 395 400

Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val  
405 410 415

Val Tyr Val Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val  
420 425 430

Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr  
435 440 445

ES 2 752 141 T3

Ala Ile Pro Pro Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu  
450 455 460

Glu Cys Ala Asn Glu Pro Ser Gln Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr  
465 470 475 480

Pro Cys Glu Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys  
485 490 495

Ile Glu Val Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys  
500 505 510

Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr  
515 520 525

Lys Cys Glu Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser  
530 535 540

Phe His Val Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln  
545 550 555 560

Pro Thr Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser  
565 570 575

Thr Phe Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro  
580 585 590

Ile His Val Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr  
595 600 605

Leu Trp Lys Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile  
610 615 620

Leu Ile Met Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr  
625 630 635 640

Val Cys Leu Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val  
645 650 655

Arg Gln Leu Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn  
660 665 670

Leu Glu Asn Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys  
675 680 685

Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn  
690 695 700

Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg  
705 710 715 720

ES 2 752 141 T3

Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr  
 725 730 735  
 Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe  
 740 745 750  
 Ile Ile Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu Ile Ile Ile Leu  
 755 760 765  
 Val Gly Thr Ala Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu Val Ile  
 770 775 780  
 Ile Leu Arg Thr Val Lys Arg Ala Asn Gly Gly Glu Leu Lys Thr Gly  
 785 790 800  
 Tyr Leu Ser Ile Val Met Asp Pro Asp Glu Leu Pro Leu Asp Glu His  
 805 810 815  
 Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp Ala Ser Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp  
 820 825 830  
 Arg Leu Lys Leu Gly Lys Pro Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Gln Val  
 835 840 845  
 Ile Glu Ala Asp Ala Phe Gly Ile Asp Lys Thr Ala Thr Cys Arg Thr  
 850 855 860  
 Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr His Ser Glu His Arg  
 865 870 875 880  
 Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly His His Leu  
 885 890 895  
 Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gly Gly Pro Leu  
 900 905 910  
 Met Val Ile Val Glu Phe Cys Lys Phe Gly Asn Leu Ser Thr Tyr Leu  
 915 920 925  
 Arg Ser Lys Arg Asn Glu Phe Val Pro Tyr Lys Thr Lys Gly Ala Arg  
 930 935 940  
 Phe Arg Gln Gly Lys Asp Tyr Val Gly Ala Ile Pro Val Asp Leu Lys  
 945 950 955 960  
 Arg Arg Leu Asp Ser Ile Thr Ser Ser Gln Ser Ser Ala Ser Ser Gly  
 965 970 975  
 Phe Val Glu Glu Lys Ser Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Ala Pro  
 980 985 990

ES 2 752 141 T3

Glu Asp Leu Tyr Lys Asp Phe Leu Thr Leu Glu His Leu Ile Cys Tyr  
 995 1000 1005

Ser Phe Gln Val Ala Lys Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys  
 1010 1015 1020

Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu  
 1025 1030 1035

Lys Asn Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile  
 1040 1045 1050

Tyr Lys Asp Pro Asp Tyr Val Arg Lys Gly Asp Ala Arg Leu Pro  
 1055 1060 1065

Leu Lys Trp Met Ala Pro Glu Thr Ile Phe Asp Arg Val Tyr Thr  
 1070 1075 1080

Ile Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile  
 1085 1090 1095

Phe Ser Leu Gly Ala Ser Pro Tyr Pro Gly Val Lys Ile Asp Glu  
 1100 1105 1110

Glu Phe Cys Arg Arg Leu Lys Glu Gly Thr Arg Met Arg Ala Pro  
 1115 1120 1125

Asp Tyr Thr Thr Pro Glu Met Tyr Gln Thr Met Leu Asp Cys Trp  
 1130 1135 1140

His Gly Glu Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Ser Glu Leu Val Glu  
 1145 1150 1155

His Leu Gly Asn Leu Leu Gln Ala Asn Ala Gln Gln Asp Gly Lys  
 1160 1165 1170

Asp Tyr Ile Val Leu Pro Ile Ser Glu Thr Leu Ser Met Glu Glu  
 1175 1180 1185

Asp Ser Gly Leu Ser Leu Pro Thr Ser Pro Val Ser Cys Met Glu  
 1190 1195 1200

Glu Glu Glu Val Cys Asp Pro Lys Phe His Tyr Asp Asn Thr Ala  
 1205 1210 1215

Gly Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Asn Ser Lys Arg Lys Ser Arg Pro  
 1220 1225 1230

Val Ser Val Lys Thr Phe Glu Asp Ile Pro Leu Glu Glu Pro Glu  
 1235 1240 1245

ES 2 752 141 T3

Val Lys Val Ile Pro Asp Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val  
 1250 1255 1260  
 Leu Ala Ser Glu Glu Leu Lys Thr Leu Glu Asp Arg Thr Lys Leu  
 1265 1270 1275  
 Ser Pro Ser Phe Gly Gly Met Val Pro Ser Lys Ser Arg Glu Ser  
 1280 1285 1290  
 Val Ala Ser Glu Gly Ser Asn Gln Thr Ser Gly Tyr Gln Ser Gly  
 1295 1300 1305  
 Tyr His Ser Asp Asp Thr Asp Thr Thr Val Tyr Ser Ser Glu Glu  
 1310 1315 1320  
 Ala Glu Leu Leu Lys Leu Ile Glu Ile Gly Val Gln Thr Gly Ser  
 1325 1330 1335  
 Thr Ala Gln Ile Leu Gln Pro Asp Ser Gly Thr Thr Leu Ser Ser  
 1340 1345 1350  
 Pro Pro Val  
 1355

<210> 2  
 <211> 4071  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

atgcagagca aggtgctgct ggccgtcgcc ctgtggctct gcgtggagac ccgggccgcc 60  
 tctgtgggtt tgcctagtgt ttctcttgat ctgcccaggc tcagcataca aaaagacata 120  
 cttacaatta aggctaatac aactcttcaa attacttgca ggggacagag ggacttggac 180  
 tggctttggc ccaataatca gagtggcagt gagcaaaggg tggaggtgac tgagtgcagc 240  
 gatggcctct tctgtaagac actcacaatt ccaaaagtga tcggaaatga cactggagcc 300  
 tacaagtgct tctaccggga aactgacttg gcctcgggtca tttatgtcta tgttcaagat 360  
 tacagatctc catttattgc ttctgttagt gaccaacatg gagtcgtgta cattactgag 420  
 aacaaaaaca aaactgtggt gattccatgt ctcggttcca tttcaaatct caacgtgtca 480  
 ctttgtgcaa gatacccaga aaagagattt gttcctgatg gtaacagaat ttctgggac 540  
 agcaagaagg gctttactat tcccagctac atgatcagct atgctggcat ggtcttctgt 600  
 gaagcaaaaa ttaatgatga aagttaccag tctattatgt acatagttgt cgttgtaggg 660  
 tataggattt atgatgtggt tctgagtccg tctcatggaa ttgaactatc tgttgagaaa 720  
 aagcttgtct taaattgtac agcaagaact gaactaaatg tggggattga cttcaactgg 780  
 gaataccctt cttcgaagca tcagcataag aaacttgtaa accgagacct aaaaccag 840  
 tctgggagtg agatgaagaa atttttgagc accttaacta tagatggtgt aaccggagtg 900

10

ES 2 752 141 T3

gaccaaggat tgtacacctg tgcagcatcc agtgggctga tgaccaagaa gaacagcaca 960  
 tttgtcaggg tccatgaaaa accttttgtt gcttttggaa gtggcatgga atctctggtg 1020  
 gaagccacgg tgggggagcg tgtcagaatc cctgcgaagt accttgggta cccaccccca 1080  
 gaaataaaat ggtataaaaa tggaataccc cttgagtcca atcacacaat taaagcgggg 1140  
 catgtactga cgattatgga agtgagtga agagacacag gaaattacac tgtcatcctt 1200  
 accaatccca tttcaaagga gaagcagagc catgtggtct ctctggttgt gtatgtccca 1260  
 ccccagattg gtgagaaatc tctaactctt cctgtggatt cctaccagta cggcaccact 1320  
 caaacgctga catgtacggt ctatgccatt cctccccgc atcacatcca ctggtattgg 1380  
 cagttggagg aagagtgcgc caacgagccc agccaagctg tctcagtgc aaaccatac 1440  
 ccttgtgaag aatggagaag tgtggaggac ttccagggag gaaataaaat tgaagttaat 1500  
 aaaaatcaat ttgctcta tgaaggaaaa acaaaaactg taagtaccct tgttatccaa 1560  
 ggggcaaatt gtgcagcttt gtacaaatgt gaagcggta acaaagtcgy gagaggagay 1620  
 aggggtgatc cttccacgt gaccaggggt cctgaaatta ctttgcaacc tgacatgcag 1680  
 cccactgagc aggagagcgt gtctttgtgg tgcactgcag acagatctac gtttgagaac 1740  
 ctcacatggt acaagcttgg cccacagcct ctgccaatcc atgtgggaga gttgccaca 1800  
 cctgtttgca agaacttgg tactctttgg aaattgaatg ccaccatggt ctctaatagc 1860  
 acaaatgaca ttttgatcat ggagcttaag aatgcatcct tgcaggacca aggagactat 1920  
 gtctgccttg ctcaagacag gaagaccaag aaaagacatt gcgtggtcag gcagctcaca 1980  
 gtcctagagc gtgtggcacc cacgatcaca ggaaacctgg agaatcagac gacaagtatt 2040  
 ggggaaagca tcgaagtctc atgcacggca tctgggaatc cccctccaca gatcatgtgg 2100  
 tttaaagata atgagaccct tgtagaagac tcaggcattg tattgaagga tgggaaccgg 2160  
 aacctcacta tccgcagagt gaggaaggag gacgaaggcc tctacacctg ccaggcatgc 2220  
 agtgttcttg gctgtgcaaa agtggaggca tttttcataa tagaagggtc ccaggaaaag 2280  
 acgaacttgg aaatcattat tctagtaggc acggcgggta ttgccatggt cttctggtca 2340  
 cttctgtgca tcatcctacg gaccgttaag cgggccaatg gaggggaact gaagacaggc 2400  
 tacttgtcca tcgtcatgga tccagatgaa ctcccattgg atgaacattg tgaacgactg 2460  
 cttatgatg ccagcaaatg ggaattcccc agagaccggc tgaagctagg taagcctctt 2520  
 ggccgtggtg cttttggcca agtgattgaa gcagatgcct ttggaattga caagacagca 2580  
 acttgcagga cagtagcagt caaatggtt aaagaaggag caacacacag tgagcatcga 2640  
 gctctcatgt ctgaaactca gatcctcatt catattggtc accatctcaa tgtggtcaac 2700  
 cttctaggtg cctgtacca gccaggagg cactcatggt tgattgtgga attctgcaaa 2760  
 tttggaaacc tgtccactta cctgaggagc aagagaaatg aatttgtccc ctacaagacc 2820  
 aaaggggcac gattccgtca agggaaagac tacgttggag caatccctgt ggatctgaaa 2880  
 cggcgttgg acagcatcac cagtagccag agctcagcca gctctggatt tgtggaggag 2940

ES 2 752 141 T3

aagtcctca gtgatgtaga agaagaggaa gctcctgaag atctgtataa ggacttctcg 3000  
 accttgagc atctcatctg ttacagcttc caagtggtca agggcatgga gttcttggca 3060  
 tcgcgaaagt gtatccacag ggacctggcg gcacgaaata tcctcttatac ggagaagaac 3120  
 gtggttaaaa tctgtgactt tggcttggcc cgggatattt ataaagatcc agattatgtc 3180  
 agaaaaggag atgctcgcct ccctttgaaa tggatggccc cagaaacaat ttttgacaga 3240  
 gtgtacacaa tccagagtga cgtctggtct tttggtgttt tgctgtggga aatattttcc 3300  
 ttaggtgctt ctccatattc tggggtaaag attgatgaag aattttgtag gcgattgaaa 3360  
 gaaggaacta gaatgagggc ccctgattat actacaccag aatgtacca gaccatgctg 3420  
 gactgctggc acggggagcc cagtcagaga cccacgtttt cagagttggt ggaacatttg 3480  
 ggaaatctct tgcaagctaa tgctcagcag gatggcaaag actacattgt tcttccgata 3540  
 tcagagactt tgagcatgga agaggattct ggactctctc tgctacctc acctgtttcc 3600  
 tgmtggagg aggaggaagt atgtgacccc aaattccatt atgacaacac agcaggaatc 3660  
 agtcagtatc tgcagaacag taagcgaaag agccggcctg tgagtgtaaa aacatttgaa 3720  
 gatatcccgt tagaagaacc agaagtaaaa gtaatcccag atgacaacca gacggacagt 3780  
 ggtatggttc ttgcctcaga agagctgaaa actttggaag acagaaccaa attatctcca 3840  
 tcttttggtg gaatggtgcc cagcaaaagc agggagtctg tggcatctga aggctcaaac 3900  
 cagacaagcg gctaccagtc cggatatcac tccgatgaca cagacaccac cgtgtactcc 3960  
 agtgaggaag cagaactttt aaagctgata gagattggag tgcaaaccgg tagcacagcc 4020  
 cagattctcc agcctgactc ggggaccaca ctgagctctc ctctgttta a 4071

<210> 3  
 <211> 7580  
 5 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia del vector de expresión pVAX10.VR2-1

10 <400> 3

tgggcttttg ctggcctttt gctcacatgt tcttgactct tcgcgatgta cgggccagat 60  
 atacgcgctt acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag 120  
 ttcataagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct 180  
 gaccgcccga cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc 240  
 caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggactattt acggtaaact gccacttgg 300  
 cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat 360  
 ggcccgcctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttctact tggcagtaca 420  
 tctacgtatt agtcatcgtc attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc 480  
 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga 540  
 gtttgttttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat 600

ES 2 752 141 T3

tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggaggctta tataagcaga gctctctggc	660
taactagaga acccactgct tactggctta tcgaaattaa tacgactcac tataaggaga	720
cccaagctgg cttagcaggat gcagagcaag gtgctgctgg ccgctgccct gtggctctgc	780
gtggagacct gggccgcctc tgtgggtttg cctagtgttt ctcttgatct gcccaggctc	840
agcatacaaa aagacatact tacaattaag gctaatacaa ctcttcaaat tacttgcagg	900
ggacagaggg acttggactg gctttggccc aataatcaga gtggcagtga gcaaagggtg	960
gaggtgactg agtgcagcga tggcctcttc tgtaagacac tcacaattcc aaaagtgatc	1020
ggaaatgaca ctggagccta caagtgttc taccgggaaa ctgacttggc ctcggtcatt	1080
tatgtctatg ttcaagatta cagatctcca tttattgctt ctgttagtga ccaacatgga	1140
gtcgtgtaca ttactgagaa caaaaacaaa actgtggtga ttccatgtct cgggtccatt	1200
tcaaatctca acgtgtcact ttgtgcaaga taccagaaa agagatttgt tcctgatggt	1260
aacagaattt cctgggacag caagaagggc tttactattc ccagctacat gatcagctat	1320
gctggcatgg tcttctgtga agcaaaaatt aatgatgaaa gttaccagtc tattatgtac	1380
atagttgtcg ttgtagggtg taggatttat gatgtggttc tgagtccgtc tcatggaatt	1440
gaactatctg ttggagaaaa gcttgtctta aattgtacag caagaactga actaaatgtg	1500
gggattgact tcaactggga atacccttct tcgaagcatc agcataagaa acttgtaaac	1560
cgagacctaa aaaccagtc tgggagtggg atgaagaaat ttttgagcac cttaaactata	1620
gatgggtgtaa cccggagtga ccaaggattg tacacctgtg cagcatccag tgggctgatg	1680
accaagaaga acagcacatt tgtcagggtc catgaaaaac cttttgttgc ttttggaagt	1740
ggcatggaat ctctggtgga agccacgggtg ggggagcgtg tcagaatccc tgcaagtac	1800
cttggttacc caccaccaga aataaaatgg tataaaaatg gaatacccct tgagtccaat	1860
cacacaatta aagcggggca tgtactgacg attatggaag tgagtgaaag agacacagga	1920
aattacactg tcaccttac caatcccatt tcaaggaga agcagagcca tgtggtctct	1980
ctggttgtgt atgtcccacc ccagattggt gagaaatctc taatctctcc tgtggattcc	2040
taccagtacg gcaccactca aacgtgaca tgtacggtct atgccattcc tccccgcat	2100
cacatccact ggtattggca gttggaggaa gagtgcgcca acgagcccag ccaagctgtc	2160
tcagtgacaa acccataccc ttgtgaagaa tggagaagtg tggaggactt ccagggagga	2220
aataaaattg aagttaataa aaatcaattt gctctaattg aaggaaaaaa caaaactgta	2280
agtacccttg ttatccaagc ggcaaatgtg tcagctttgt acaaatgtga agcggtcaac	2340
aaagtcggga gaggagagag ggtgatctcc ttccacgtga ccaggggtcc tgaaattact	2400
ttgcaacctg acatgcagcc cactgagcag gagagcgtgt ctttgtggtg cactgcagac	2460
agatctacgt ttgagaacct cacatggtac aagcttggcc cacagcctct gccaatccat	2520
gtgggagagt tgccacacc tgtttgcaag aacttgata ctctttggaa attgaaatgcc	2580
accatgttct ctaatagcac aaatgacatt ttgatcatgg agcttaagaa tgcatccttg	2640

ES 2 752 141 T3

caggaccaag gagactatgt ctgccttgct caagacagga agaccaagaa aagacattgc 2700  
 gtggtcaggc agctcacagt cctagagcgt gtggcaccca cgatcacagg aaacctggag 2760  
 aatcagacga caagtattgg ggaaagcatc gaagtctcat gcacggcatc tgggaatccc 2820  
 cctccacaga tcatgtggtt taaagataat gagacccttg tagaagactc aggcattgta 2880  
 ttgaaggatg ggaaccggaa cctcactatc gcgagagtga ggaaggagga cgaaggcctc 2940  
 tacacctgcc aggcattgag tgttcttggc tgtgcaaaag tggaggcatt tttcataata 3000  
 gaaggtgccc aggaaaagac gaacttggaa atcattattc tagtaggcac ggcggtgatt 3060  
 gccatgttct tctggctact tcttgtcatc atcctacgga ccgttaagcg ggccaatgga 3120  
 ggggaactga agacaggcta cttgtccatc gtcattgatc cagatgaact cccattgat 3180  
 gaacattgtg aacgactgcc ttatgatgcc agcaaattgg aattccccag agaccggctg 3240  
 aagctaggta agcctcttgg ccgtggtgcc tttggccaag tgattgaagc agatgccttt 3300  
 ggaattgaca agacagcaac ttgcaggaca gtagcagtca aaatgttga agaaggagca 3360  
 acacacagtg agcatcgagc tctcatgtct gaactcaaga tcctcattca tattggtcac 3420  
 catctcaatg tggtaacct tctaggtgcc tgtaccaagc caggagggcc actcatggtg 3480  
 attgtggaat tctgcaaatt tggaacctg tccacttacc tgaggagcaa gagaaatgaa 3540  
 tttgtcccct acaagaccaa aggggcacga ttccgtcaag ggaaagacta cgttgagca 3600  
 atccctgtgg atctgaaacg gcgcttggac agcatcacca gtagccagag ctccagccagc 3660  
 tctggatttg tggaggagaa gtcctcagt gatgtagaag aagaggaagc tcctgaagat 3720  
 ctgtataagg acttctgac cttggagcat ctcatctgtt acagcttcca agtggctaag 3780  
 ggcatggagt tcttggcatc gcgaaagtgt atccacaggg acctggcggc acgaaatatac 3840  
 ctcttatcgg agaagaacgt ggttaaaatc tgtgactttg gcttggcccg ggatatttat 3900  
 aaagatccag attatgtcag aaaaggagat gctcgcctcc ctttgaaatg gatggcccca 3960  
 gaaacaattt ttgacagagt gtacacaatc cagagtgacg tctggtcttt tgggtgtttg 4020  
 ctgtgggaaa tattttcctt aggtgcttct ccatatcctg gggtaaagat tgatgaagaa 4080  
 tttgtaggc gattgaaaga aggaactaga atgagggccc ctgattatac tacaccagaa 4140  
 atgtaccaga ccatgctgga ctgctggcac ggggagccca gtcagagacc cacgttttca 4200  
 gagtgggtg aacatttggg aaatctcttg caagctaattg ctcagcagga tggcaaagac 4260  
 tacattgttc ttccgatata agagactttg agcatggaag aggattctgg actctctctg 4320  
 cctacctcac ctgtttcctg tatggaggag gaggaagtat gtgaccccaa attccattat 4380  
 gacaacacag caggaatcag tcagtatctg cagaacagta agcgaagag ccggcctgtg 4440  
 agtgtaaaaa catttgaaga tatcccgtta gaagaaccag aagtaaaagt aatcccagat 4500  
 gacaaccaga cggacagtgg tatggttctt gcctcagaag agctgaaaac tttggaagac 4560  
 agaaccaaat tatctccatc ttttgggtgga atggtgccc gcaaaaagcag ggagtctgtg 4620  
 gcatctgaag gctcaaacca gacaagcggc taccagtccg gatatactc cgatgacaca 4680

ES 2 752 141 T3

gacaccaccg tgtactccag tgaggaagca gaacttttaa agctgataga gattggagtg 4740  
caaaccggta gcacagccca gattctccag cctgactcgg ggaccacact gagctctcct 4800  
cctgtttaaa aggaactcga gtctagaggg cccgtttaaa cccgctgac agcctcgact 4860  
gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgcccctccc ccgtgccttc cttgaccctg 4920  
gaaggtgcc a cccccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcatc gcattgtctg 4980  
agtaggtgtc attctattct ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg 5040  
gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta tggcttctac tgggcggttt 5100  
tatggacagc aagcgaaccg gaattgccag ctggggcgcc ctctggtaag gttgggaagc 5160  
cctgcaaagt aaactggatg gctttctcgc cgccaaggat ctgatggcgc aggggatcaa 5220  
gctctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgatgat tgaacaagat ggattgcacg 5280  
caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggg tattcggcta tgactgggca caacagacaa 5340  
tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca ggggcgccc gttctttttg 5400  
tcaagaccga cctgtccggg gccctgaatg aactgcaaga cgaggcagcg cggctatcgt 5460  
ggctggccac gacgggcggt ccttgccag ctgtgctcga cgttgcact gaagcgggaa 5520  
gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc 5580  
ctgccgagaa agtatccatc atggctgat caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg 5640  
ctacctgcc attcgaccac caagcgaaac atcgcacgca gcgagcacgt actcggatgg 5700  
aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg 5760  
aactgttcgc caggctcaag gcgagcatgc ccgacggcga ggatctcgtc gtgacccatg 5820  
gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg cttttctgga ttcacgact 5880  
gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg 5940  
ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttctcgt gctttacggg atcgccgctc 6000  
ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga attattaacg 6060  
cttacaattt cctgatgcgg tttttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca 6120  
tacaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg cggaaccct atttgtttat ttttctaaat 6180  
acattcaa at atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatagca 6240  
cgtgctaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctagggtg aagatccttt ttgataatct 6300  
catgacaaa atccctaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc cccatcagtg 6360  
accaaacagg aaaaaaccgc ccttaacatg gcccgcttta tcagaagcca gacattaacg 6420  
cttctggaga aactcaacga gctggacgcg gatgaacagg cagacatctg tgaatcgctt 6480  
cacgaccacg ctgatgagct ttaccgcagc tgccctcgcg gtttcgggtga tgacggtgaa 6540  
aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg 6600  
agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg cgagccatg 6660  
accagtcac gtagcgatag cggagtgtat actggcttaa ctatgcggca tcagagcaga 6720

## ES 2 752 141 T3

ttgtactgag agtgcaccat atgCGgtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat	6780
accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc	6840
tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg	6900
ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg	6960
ccgcgttgct ggcgtttttc cataggtctc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac	7020
gctcaagtca gaggtggcga aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg	7080
gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct	7140
ttctcccttc gggaaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg	7200
tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct	7260
gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt ccaaccggt aagacacgac ttatcgccac	7320
tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt	7380
tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc	7440
tgctgaagcc agttacctc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca	7500
ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat	7560
ctcaagaaga tcctttgatc	7580

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una vacuna de ADN que comprende la cepa atenuada de *Salmonella typhi* Ty21a transformada por un plásmido que contiene un ADN que comprende un casete de expresión eucariota que codifica la proteína humana VEGFR-2 de SEQ ID NO 1, para su uso en una inmunoterapia contra el cáncer antiangiogénico en humanos en donde la vacuna se administra por vía oral y la dosis única de la vacuna es de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC).
2. La vacuna de ADN para su uso según la reivindicación 1, en donde el cáncer es cáncer de páncreas.
3. La vacuna de ADN para su uso según la reivindicación 2, en donde dicho cáncer de páncreas es cáncer de páncreas en estadio IV o localmente avanzado.
- 10 4. La vacuna de ADN para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el cáncer incluye metástasis.
5. La vacuna de ADN para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el tratamiento se acompaña de quimioterapia y/o radioterapia.
6. La vacuna de ADN para su uso según la reivindicación 5, en donde el agente quimioterapéutico es gemcitabina.
- 15 7. La vacuna de ADN para su uso según las reivindicaciones 5 o 6, en donde el tratamiento inmunoterapéutico con la vacuna se lleva a cabo durante el ciclo de tratamiento de quimioterapia.
8. La vacuna de ADN para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la dosis única de la vacuna es  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  o  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC).
9. La vacuna de ADN para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la dosis única de la vacuna es inferior a  $1 \times 10^8$  UFC.
- 20 10. La vacuna de ADN para su uso según la reivindicación 9, en donde la dosis única de la vacuna es de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  UFC.

**Figura 1:**

10	20	30	40	50	60
MQSKVLLAVA	LWLCVETRAA	SVGLPSVSLD	LPRLSIQKDI	LTIKANTTLQ	ITCRGQRDL D
70	80	90	100	110	120
WLWPNNQSGS	EQRVEVTECS	DGLFCKTLTI	PKVIGNDTGA	YKCFYRETDL	ASVIYVYVQD
130	140	150	160	170	180
YRSPFIASVS	DQHG VVYITE	NKNKTVVIPC	LGSISNLNVS	LCARYPEKRF	VPDGNRISWD
190	200	210	220	230	240
SKKGFTIPSY	MISYAGMVFC	EAKINDESYQ	SIMYIVVVVG	YRIYDVVLSP	SHGIELSVGE
250	260	270	280	290	300
KLVLNCTART	ELNVGIDFNW	EYPSSKHQHK	KLVNRDLKTQ	SGSEMKKFLS	TLTIDGVTRS
310	320	330	340	350	360
DQGLYTCAAS	SGLMTKKNST	FVRVHEKPFV	AFGSGMESLV	EATVGERVRI	PAKYLGYP PP
370	380	390	400	410	420
EIKWYKNGIP	LESNHTIKAG	HVLTIMEVSE	RDTGN YTVIL	TNPISKEKQS	HVSLVWYV P
430	440	450	460	470	480
PQIGEKSLIS	PVDSYQYGT T	QTLTCTVYAI	PPPHIH HWYW	QLEEECANEP	SQAVSVTNPY
490	500	510	520	530	540
PCEEWR SVED	FQGGNKIEVN	KNQFALIEGK	NKTVSTLVIQ	AANVSALYKC	EAVNKVGRGE
550	560	570	580	590	600
RVISFHVTRG	PEITLQPDMQ	PTEQESVSLW	CTADRSTFEN	LTWYKLG PQP	LPIHVGELPT
610	620	630	640	650	660
PVCKNLDTLW	KLNATMFSNS	TNDILIMELK	NASLQDQGDY	VCLAQDRKTK	KRHCVVRQLT
670	680	690	700	710	720
VLERVAPTIT	GNLENQTTSI	GESIEVSCTA	SGNPPQIMW	FKDNETLVED	SGIVLKDGNR

ES 2 752 141 T3

Figura 1: (contd.)

730	740	750	760	770	780
NLTIRRVKKE	DEGLYTCQAC	SVLGCAKVEA	FFIIEGAQEK	TNLEIILVVG	TAVIAMFFWL
790	800	810	820	830	840
LLVIILRTVK	RANGGELKTG	YLSIVMDPDE	LPLDEHCERL	PYDASKWEFP	RDRLKLGKPL
850	860	870	880	890	900
GRGAFGQVIE	ADAFGIDKTA	TCRTVAVKML	KEGATHSEHR	ALMSELKILI	HIGHHLNVVN
910	920	930	940	950	960
LLGACTKPGG	PLMVIVEFCK	FGNLSTYLRS	KRNEFVPYKT	KGARFRQGKD	YVGAIPVDLK
970	980	990	1000	1010	1020
RRLDSITSSQ	SSASSGFVEE	KSLSDVEEEE	APEDLYKDFL	TLEHLICYSF	QVAKGMEFLA
1030	1040	1050	1060	1070	1080
SRKCIHRDLA	ARNILLSEKN	VVKICDFGLA	RDIYKDPDYV	RKGDARLPLK	WMAPETIFDR
1090	1100	1110	1120	1130	1140
VYTIQSDVWS	FGVLLWEIFS	LGASPYPGVK	IDEEFCRRLK	EGTRMRAPDY	TTPEMYQTML
1150	1160	1170	1180	1190	1200
DCWHGEPQRS	PTFSELVEHL	GNULLQANAQQ	DGKDYLPLI	SETLSMEEDS	GLSLPTSPVS
1210	1220	1230	1240	1250	1260
CMEEEVCDP	KFHYDNTAGI	SQYLQNSKRK	SRPVSVKTFE	DIPLEEPEVK	VIPDDNQTDS
1270	1280	1290	1300	1310	1320
GMVLASEELK	TLEDRTKLSP	SFGGMVPSKS	RESVASEGSN	QTSGYQSGYH	SDDTDTTVYS
1330	1340	1350			
SEEAELLKLI	EIGVQTGSTA	QILQPDSGTT	LSSPPV		

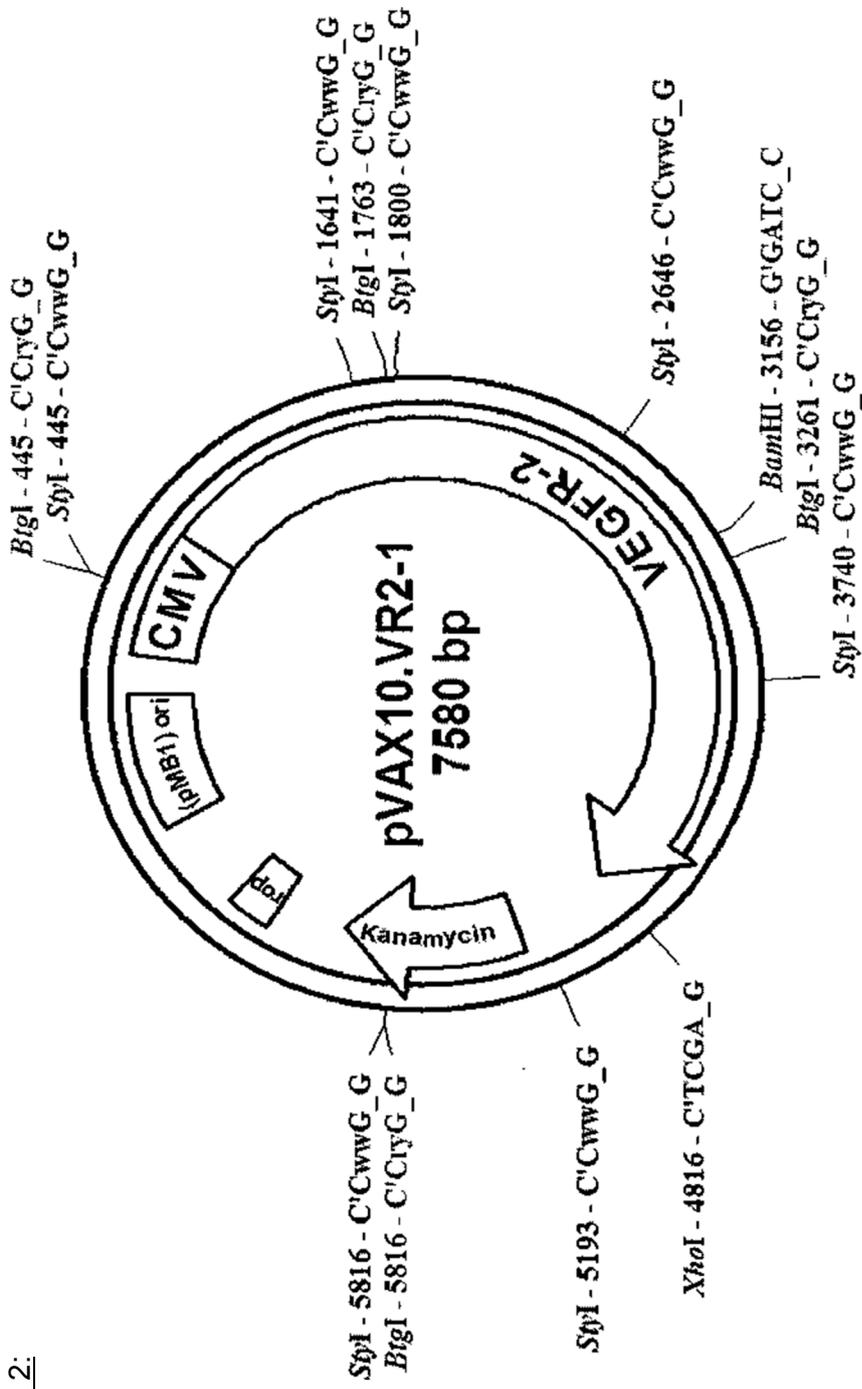


Figura 2:

Figura 3:

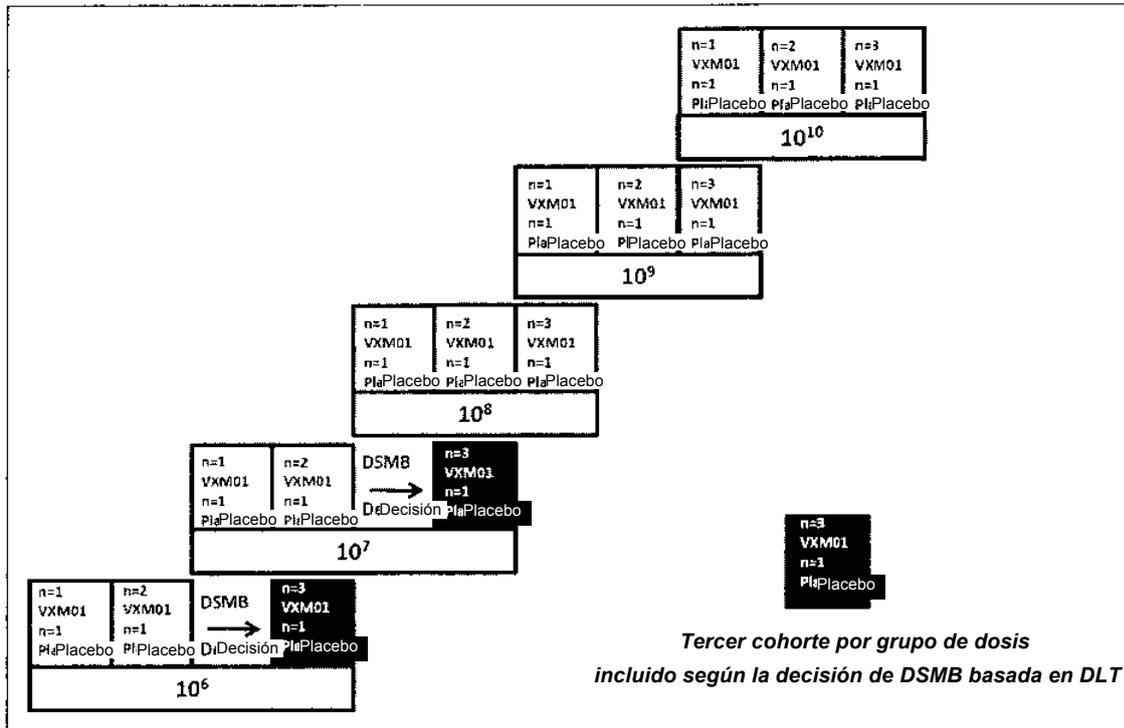


Figura 4:

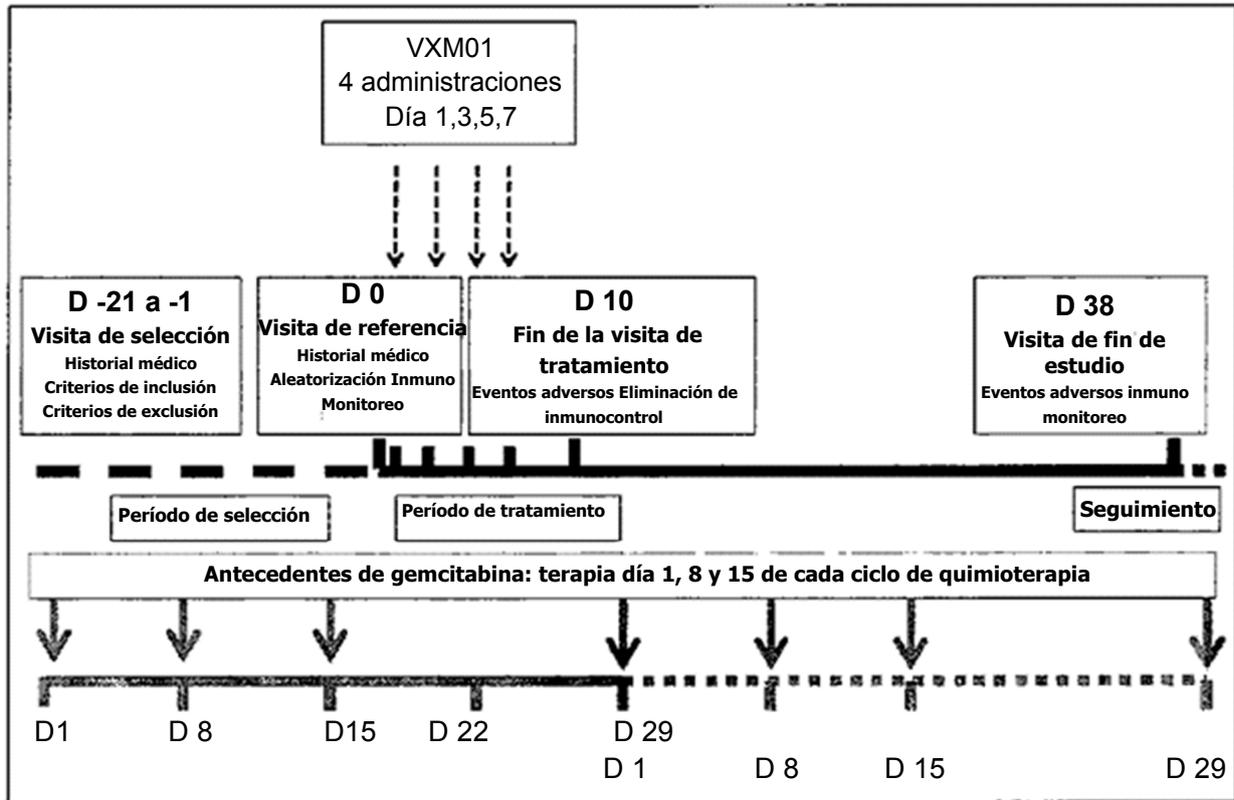


Figura 5:

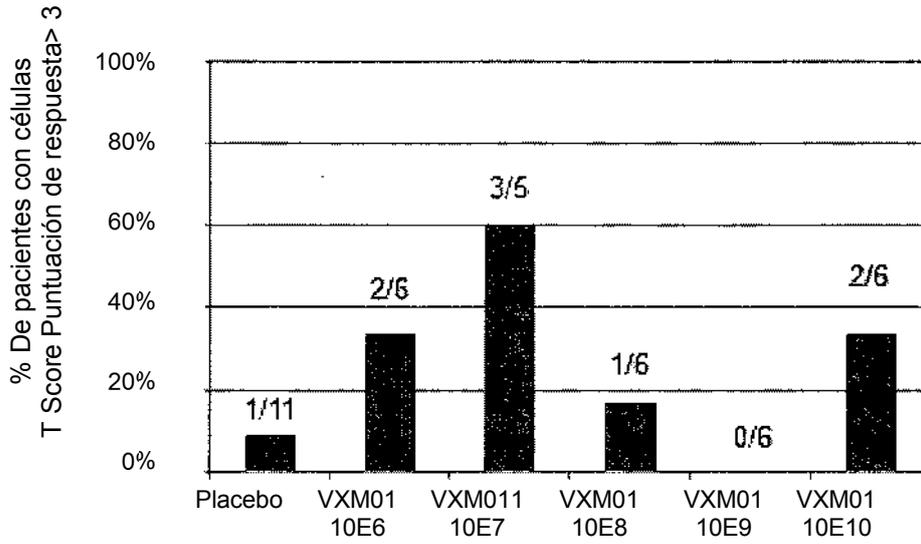


Figura 6:

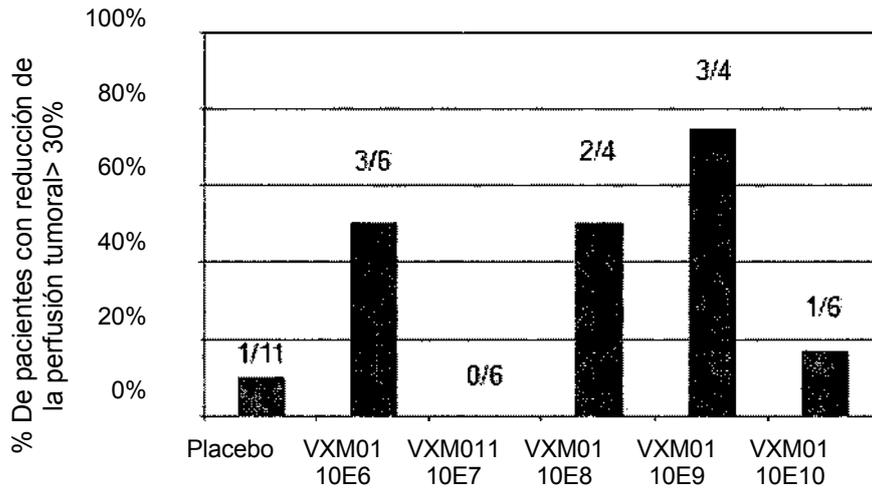


Figura 7:

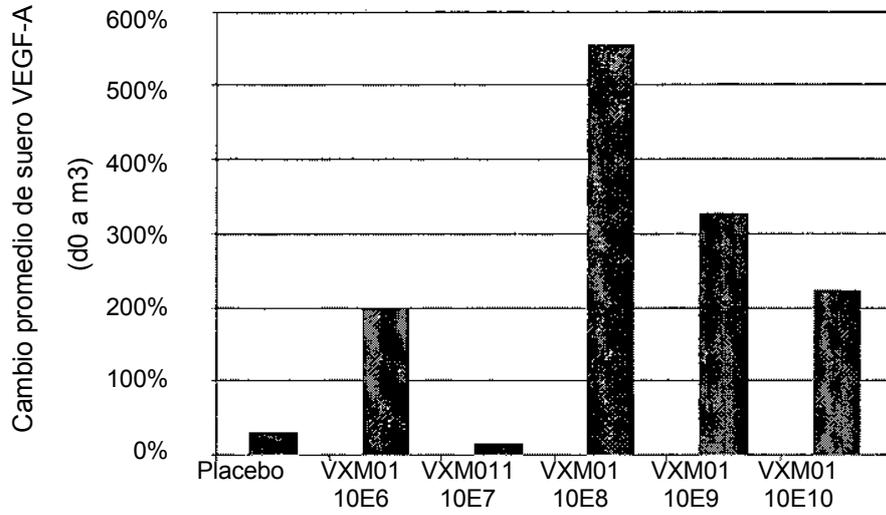


Figura 8:

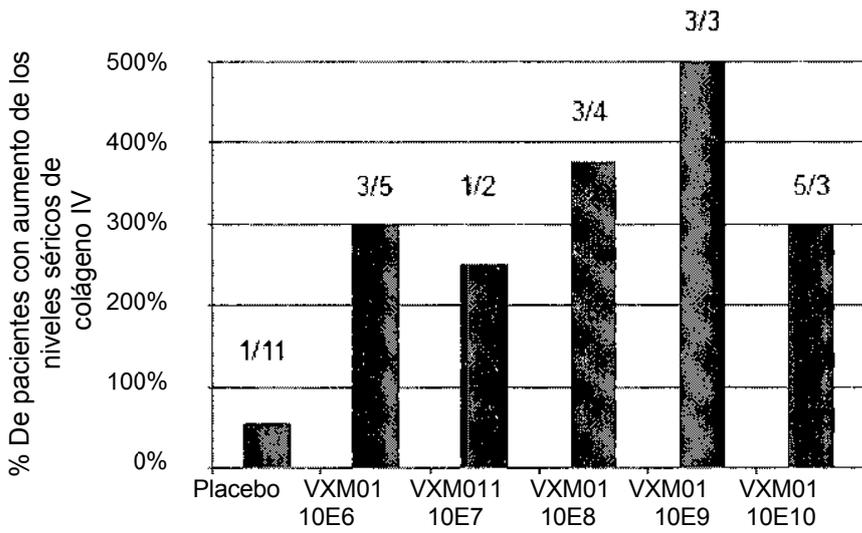


Figura 9:

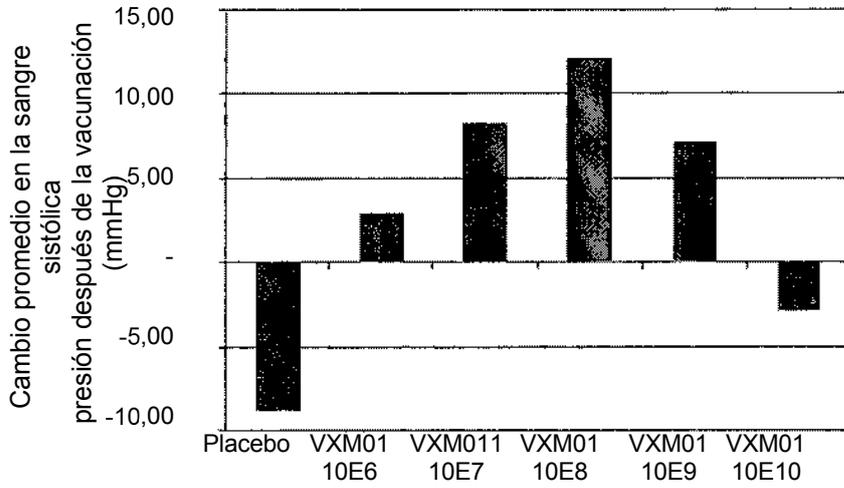


Figura 10:

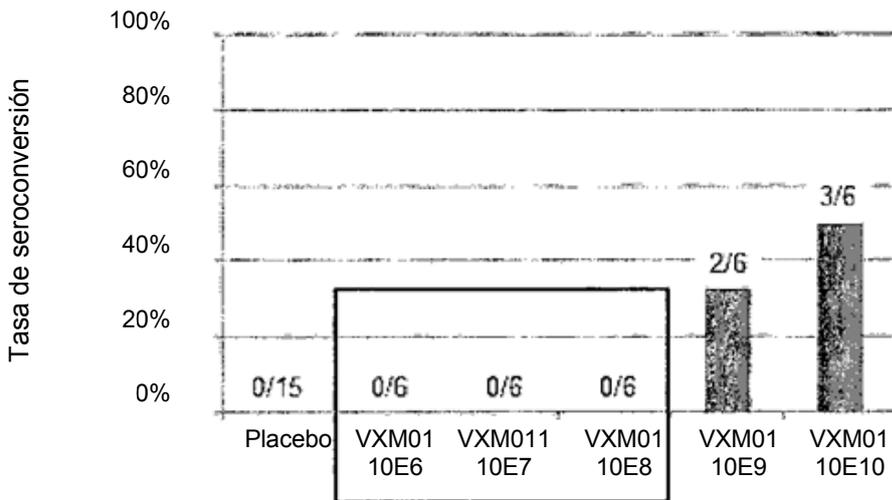


Figura 11:

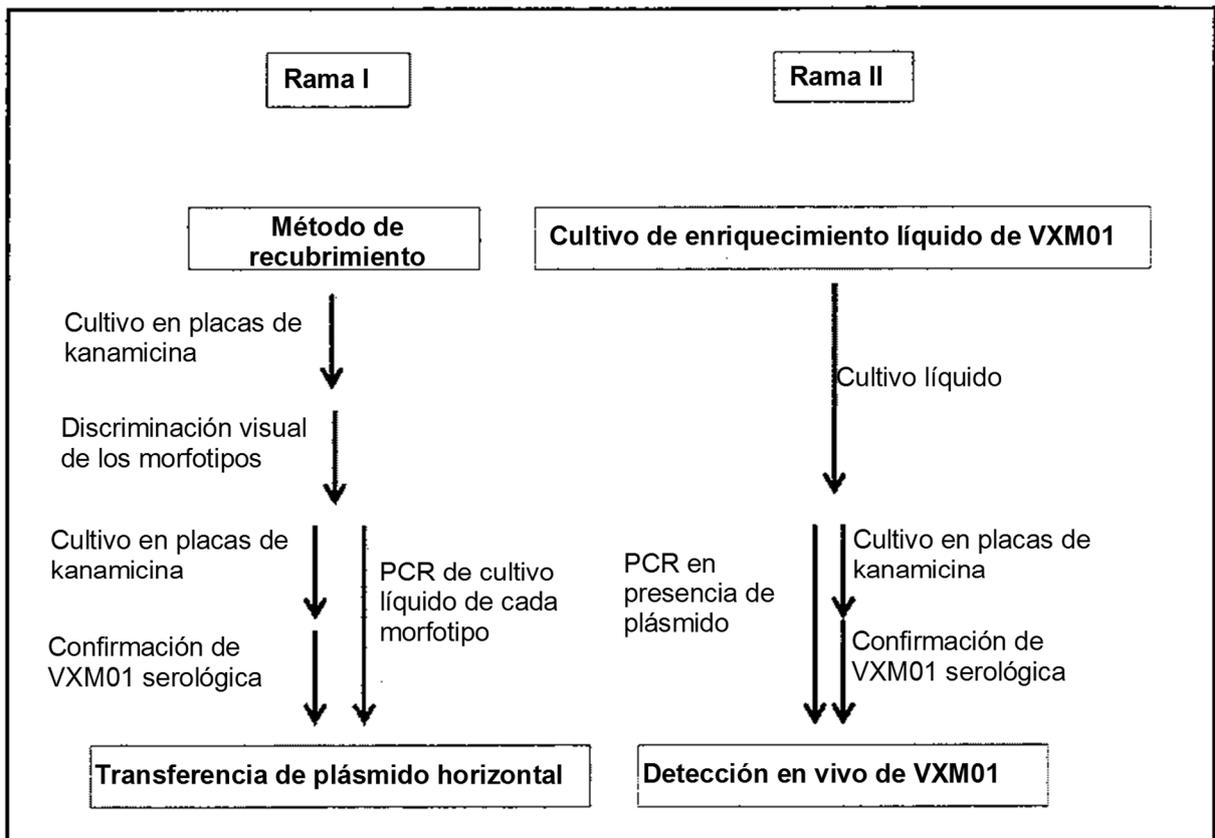


Figura 12:

