

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 929**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2014 PCT/EP2014/059995**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014 WO14191222**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2014 E 14725114 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3004875**

54 Título: **Biomarcador predictivo para la terapia del cáncer**

30 Prioridad:

30.05.2013 GB 201309657

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

25.11.2020

73 Titular/es:

MOLOGEN AG (100.0%)

Fabeckstrasse 30

14195 Berlin, DE

72 Inventor/es:

SCHROFF, MATTHIAS;

SCHMIDT, MANUEL;

KAPP, KERSTIN y

WITTIG, BURGHARDT

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 795 929 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

Biomarcador predictivo para la terapia del cáncer

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a la identificación de pacientes con cáncer en cuanto a si responderán a terapias específicas. Más particularmente, la invención se refiere a un método y una construcción de ADN para identificar respondedores a una terapia que implica construcciones de ADN de activación inmunitaria, así como también a una construcción de ADN destinada a tratar pacientes con cáncer caracterizados individualmente como respondedores potenciales antes del inicio de un tratamiento con dicha construcción.

Antecedentes de la invención

15 Los biomarcadores son sustancias que se encuentran en la sangre u otros fluidos corporales, en los tejidos o como receptores en las células que señalizan la presencia o ausencia de una afección o enfermedad, como el cáncer, por ejemplo. Los biomarcadores pueden diferenciarse en biomarcadores predictivos, de pronósticos y farmacodinámicos.

20 Los biomarcadores predictivos se usan para evaluar la probabilidad de que un paciente responda o se beneficie de un tratamiento particular. Los biomarcadores pronósticos permiten la clasificación de los tumores con respecto a su potencial agresivo para guiar la decisión de a quién tratar o qué tan agresivamente tratar. Los biomarcadores farmacodinámicos miden los efectos del tratamiento a corto plazo de un fármaco sobre el tumor y podrían usarse para guiar la selección de dosis durante el desarrollo clínico de un nuevo fármaco contra el cáncer.

25 Las terapias dirigidas son tratamientos que funcionan a nivel molecular para evitar que el cáncer crezca o se propague. Para evitar enfoques innecesarios, dado que tales terapias están relacionadas generalmente con el uso de fármacos muy agresivos, se necesitan herramientas que permitan predecir si un paciente responderá o no a una terapia dirigida.

30 Con respecto al hecho de que las terapias se vuelven cada vez más específicas del objetivo, aumentará el papel de los biomarcadores. Ellos ayudarán a individualizar los enfoques terapéuticos y a abrir el camino a la oncología individualizada. Incluso la posibilidad de distinguir un respondedor de una terapia específica de un no respondedor ayudará a prevenir que los pacientes estén sometidos a tratamientos innecesarios.

35 Un tratamiento del cáncer comúnmente conocido y bien aprobado es la quimioterapia. Una desventaja importante de la quimioterapia es el uso de medicamentos muy agresivos que provocan efectos secundarios graves. Con el fin de minimizar estos efectos secundarios, se han realizado muchos intentos para reducir la dosis de quimioterapéuticos, como por ejemplo la combinación de quimioterapia con agentes de activación inmunitaria. Un enfoque es el uso de la activación inmunitaria con ADN.

40 Se ha demostrado que las llamadas secuencias CG no metiladas activan el sistema inmune de manera muy efectiva (Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM; CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation; Nature 1995 6 de abril 374:6522 546-9). Esas secuencias se derivan de bacterias. El documento EP 1 196 178 describe un ADN circular cerrado covalentemente con secuencias parcialmente autocomplementarias que dan como resultado una construcción de ADN que tiene un tallo bicatenario con bucles monocatenarios en ambos extremos que comprenden los motivos CG no metilados.

50 La combinación de las construcciones de ADN en forma de doble asa del documento EP 1 196 178 con quimioterapéuticos para tratar enfermedades de cáncer se han propuesto por el documento EP 1 776 124. Los pacientes que se trataron con las construcciones de ADN del documento EP 1 196 178 recibieron quimioterapéutico subsecuentemente. Resultó que la cantidad de quimioterapéutico podría reducirse mediante la combinación descrita. Pero este documento no describe absolutamente ninguna información sobre las herramientas para identificar si un paciente responderá a la aplicación de la terapia combinada.

55 Es un objeto de la presente invención proporcionar un método para predecir si un paciente con cáncer responderá al tratamiento con ADN de activación inmunitaria. Otro objeto de la invención es el ADN de activación inmunitaria en sí mismo, que puede usarse en dicho método, es decir, para tratar a un paciente identificado como respondedor antes del inicio del tratamiento.

60 Riera-Knorrenschild y otros (31 (15): 3643 - ASCO Meeting Abstracts, 20 de mayo de 2013) describen que el agonista de TLR-9 sintético basado en ADN MGN1703 prolonga la supervivencia libre de progresión (PFS) en un subgrupo de pacientes con carcinoma colorrectal avanzado con control de la enfermedad después de la quimioterapia de inducción frente a placebo. El documento no describe un biomarcador predictivo.

65 Varghese y otros (188 (1001): 165.13 - The Journal of Immunology, (2012)) describen que la estimulación celular invariante de NKT (iNKT) mediante el uso del ligando alfa-galactosilceramida, combinada con la estimulación TLR9 mediante el uso

del ligando CpG puede inducir respuestas inmunes terapéuticas duraderas en ratones con tumores grandes avanzados (> 1 cm²). El documento se refiere solo al subgrupo de células iNKT.

5 El documento WO 2010/055340 describe un método para proteger a un sujeto mamífero contra, o tratar, una enfermedad, en donde el sujeto mamífero tiene números elevados y/o actividades de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) que comprende administrar al sujeto una cantidad farmacéuticamente aceptable de un agonista de iNKT, tal como alfa galactosilceramida o un análogo de la misma, o un agonista de TLR, o una combinación de los mismos. El documento se refiere solo al subgrupo de células iNKT

10 Montoya C. y otros (Clinical Immunology, Academic press, Estados Unidos, Vol. 120(2):138-146 (2006)) describe la regulación positiva de CD86 y CD69 inducida por ODN CpG en células innatas.

Breve resumen de la invención

15 La presente invención proporciona un método para predecir o controlar si un paciente que padece cáncer o una enfermedad autoinmune responderá o responde al tratamiento con un agonista TLR-9 al determinar la frecuencia de las células T asesinas naturales (NKT) activadas CD3+/CD56+/CD69+, en donde el agonista de TLR-9 es una construcción de ADN que comprende al menos un motivo de secuencia N¹N²CGN³N⁴, en donde N¹N² y N³N⁴ es cualquier combinación de A, C, T y G, y C es desoxicitidina, G es desoxiguanosina, A es desoxiadenosina y T es desoxitimidina. El método no se lleva a cabo in vivo. La proporción de células NKT activadas de toda la población de células NKT también puede determinarse para evaluar la probabilidad de si un paciente responderá a un tratamiento con un agonista TLR-9.

20 Un respondedor al tratamiento con el agonista TLR-9 deberá tener una frecuencia de al menos el 3 % de las células NKT activadas de toda la población de células NKT.

25 Se pretende además que previamente pueda realizarse una terapia de inducción con un fármaco sin ADN. Dicha terapia comprende quimioterapia con o sin inhibidor de la angiogénesis o el uso de anticuerpos.

30 Un objeto adicional de la presente descripción es un agonista de TLR-9 para su uso en un método de tratamiento del cáncer, el agonista comprende al menos una construcción de ADN que comprende al menos un motivo de secuencia N¹N²CGN³N⁴, en donde N¹N² y N³N⁴ es cualquier combinación de A, C, T y G, y C es desoxicitidina, G es desoxiguanosina, A es desoxiadenosina y T es desoxitimidina y caracterizado porque el paciente tiene niveles elevados de células NKT activadas CD3+/CD56+/CD69.

35 El agonista para su uso en el método de tratamiento del cáncer puede caracterizarse además por N¹N² siendo un elemento seleccionado del grupo que comprende GT, GG, GA, AT o AA, N³N⁴ siendo un elemento seleccionado del grupo que comprende CT o TT.

40 El agonista para su uso en el método de tratamiento del cáncer puede comprender ADN que es una construcción de ADN lineal de cadena abierta que comprende ADN mono o bicatenario o es una construcción de ADN bicatenario lineal, que comprende al menos un extremo con un solo bucle trenzado. En lugar de usar bucles para proteger los extremos de las cadenas dobles lineales, puede usarse al menos un nucleótido L-ADN como parte de la cadena doble de ADN.

45 El motivo de secuencia N¹N²CGN³N⁴ se ubicará dentro de una región monocatenaria y/o bicatenaria de la secuencia de ADN. Se pretende además que al menos un nucleótido de un agonista TLR-9 de ADN se modifica con un grupo funcional seleccionado del grupo que comprende grupos carboxilo, amina, amida, aldimina, cetil, acetal, éster, éter, disulfuro, tiol y aldehído.

50 El agonista para su uso en el método de tratamiento del cáncer comprende una construcción de ADN que puede unirse a un compuesto seleccionado a partir del grupo que comprende péptidos, proteínas, carbohidratos, anticuerpos, lípidos, micelas, vesículas, moléculas sintéticas, polímeros, micro proyectiles, partículas de metal, nanopartículas o una fase sólida.

55 Se pretende además que el agonista para su uso en el método de tratamiento del cáncer que comprende una construcción de ADN pueda ser parte de una composición farmacéutica, en donde la composición farmacéutica puede ser una vacuna.

60 Otro objeto de la presente descripción es el uso de un kit para predecir o controlar si un paciente que padece cáncer o enfermedad autoinmune responderá o responde al tratamiento con un agonista TLR-9 que comprende medios para detectar y cuantificar la frecuencia de células NKT activadas CD3+ CD56+ CD69+ de toda la población de células NKT, y en donde el agonista de TLR-9 comprende una construcción de ADN que comprende al menos un motivo de secuencia N¹N²CGN³N⁴, en donde N¹N² y N³N⁴ es cualquier combinación de A, C, T y G, y C es desoxicitidina, G es desoxiguanosina, A es desoxiadenosina y T es desoxitimidina. El kit no se usa in vivo.

Breve resumen de las figuras

65 Figura 1: Curvas ROC en pacientes verum para células NKT activadas.

Figura 2: Células NKT activadas versus sensibilidad y especificidad.

Figura 3: a: Gráfico de Kaplan-Meier en pacientes con biomarcador positivo para verum y placebo; b: Curva de Kaplan-Meier para los pacientes con biomarcador negativo tanto en el brazo verum como en el placebo.

Figura 4: a: Gráfico de Kaplan-Meier de pacientes con biomarcador positivo versus pacientes con biomarcador negativo en el brazo verum; b: Gráfico de Kaplan-Meier del grupo placebo para pacientes con biomarcador positivo y negativo.

Descripción detallada de la invención

5 Dentro del significado de la presente invención, MGN1703 designa una construcción de ADN de una cadena de ADN parcialmente autocomplementaria parcialmente cerrada covalentemente que tiene un tallo bicatenario y bucles terminales monocatenarios que llevan motivos CG no metilados.

10 Un "tallo" de acuerdo con la presente descripción se entenderá como un ADN bicatenario formado por el emparejamiento de base ya sea dentro de la misma molécula de ADN (que es después parcialmente autocomplementaria) o dentro de diferentes moléculas de ADN (que son parcial o completamente complementarias). El emparejamiento de base intramolecular designa el emparejamiento de base dentro de las mismas moléculas y el emparejamiento de base entre diferentes moléculas de ADN se denomina como emparejamiento de base intermolecular.

15 Un "bucle" dentro del significado de la presente descripción se entenderá como una región monocatenaria no emparejada ya sea dentro de o en el extremo de una estructura de tallo. Una "horquilla" es una combinación distinta de un tallo y un bucle, que ocurre cuando dos regiones autocomplementarias de la misma molécula de ADN hibridan para formar un tallo con un bucle no emparejado.

20 Una forma de doble asa describe una construcción de ADN lineal con horquillas en ambos extremos que flanquean una región de tallo. Así, una "construcción de ADN lineal" dentro del contexto de la presente descripción describe una construcción de ADN con forma de doble asa que comprende bucles monocatenarios en ambos extremos de un tallo de ADN bicatenario.

25 La inmunomodulación de acuerdo con la presente descripción se refiere a la activación inmunitaria y la inmunosupresión. La activación inmunitaria significa preferentemente que las células efectoras del sistema inmunitario se activan para proliferar, migrar, diferenciarse o activarse en cualquier otra forma. La proliferación de células B, por ejemplo, puede inducirse sin señales coestimuladoras por moléculas de ADN de activación inmunitaria, que normalmente requieren una señal coestimuladora de las células T auxiliares.

30 La inmunosupresión, por otra parte, se entenderá como la reducción de la activación o eficacia del sistema inmunitario. La inmunosupresión generalmente se induce deliberadamente para evitar por ejemplo el rechazo de un órgano trasplantado, para tratar la enfermedad de injerto contra huésped después de un trasplante de médula ósea o para el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como, por ejemplo, artritis reumatoide o enfermedad de Crohn.

35 En este contexto, la inmunomodulación también puede referirse a la influencia de la naturaleza o el carácter de una reacción inmunitaria, ya sea al afectar una reacción inmunitaria que se está desarrollando o madurando o al modular el carácter de una reacción inmunitaria establecida.

40 El término "vacunación" usado en esta descripción se refiere a la administración de material antigénico (una vacuna) para producir inmunidad a una enfermedad. Las vacunas pueden prevenir o mejorar los efectos de la infección por muchos patógenos tales como virus, hongos, parásitos protozoarios, bacterias, pero además de enfermedades alérgicas y asma, así como también de tumores. Las vacunas contienen típicamente uno o más adyuvantes, por ejemplo, ácidos nucleicos de activación inmunitaria, usados para aumentar la respuesta inmunitaria. Se considera generalmente que la vacunación es el método más efectivo y rentable para prevenir enfermedades infecciosas y otras.

45 El material administrado puede ser, por ejemplo, formas vivas pero debilitadas de patógenos (bacterias o virus), formas muertas o inactivadas de estos patógenos, material purificado tales como proteínas, ácidos nucleicos que codifican antígenos o células tales como células tumorales o células dendríticas. Particularmente, se ha desarrollado recientemente la vacunación con ADN. La vacunación con ADN funciona mediante la inserción (y la expresión, activando el reconocimiento del sistema inmunitario) de ADN que codifica antígenos en células humanas o animales. Algunas células del sistema inmunitario que reconocen las proteínas expresadas lanzarán un ataque contra estas proteínas y contra las células que las expresan. Una ventaja de las vacunas de ADN es que son muy fáciles de producir y almacenar. Además, las vacunas de ADN tienen una serie de ventajas sobre las vacunas convencionales, que incluyen la capacidad de inducir una variedad más amplia de tipos de respuesta inmunitaria.

55 La vacunación puede usarse como un enfoque profiláctico, lo que lleva a la inmunidad contra el antígeno en el individuo sano y vacunado tras la exposición al antígeno. Alternativamente, una vacunación terapéutica puede causar una

respuesta mejorada del sistema inmunitario del individuo enfermo vacunado, guiando el sistema inmunitario del individuo hacia los antígenos. Tanto la vacunación profiláctica como la terapéutica pueden aplicarse a seres humanos, así como también a animales.

5 El término "cáncer" comprende enfermedades cancerosas o un tumor que se trata o se previene que se selecciona del grupo que comprende, pero no se limita a, carcinomas mamarios, melanoma, neoplasmas de piel, linfoma, leucemia, tumores gastrointestinales, que incluyen carcinomas de colon, carcinomas de estómago, carcinomas de páncreas, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, carcinomas ováricos, carcinomas cervicales, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, carcinomas de células renales y/o metástasis hepáticas.

10 Las enfermedades autoinmunes de acuerdo con la presente descripción comprenden artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, lupus sistémico (SLE), tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis de Hashimoto, esclerosis múltiple, enfermedad de Graves, miastenia grave, enfermedad celíaca y enfermedad de Addison.

15 Durante los experimentos con construcciones de ADN en forma de doble asa con activación inmunitaria con secuencias CG no metiladas en los bucles terminales monocatenarios, resultó que las frecuencias elevadas de ciertos tipos de células de la activación inmunitaria y la vía efectora estaban relacionadas con una terapia exitosa con las construcciones de ADN.

20 En los vertebrados, los llamados "receptores tipo toll" (TLR) son parte del sistema inmune innato. Los TLR son una familia de receptores inmunes especializados que inducen respuestas inmunes protectoras cuando detectan patrones moleculares relacionados con patógenos altamente conservados, tales como proteínas, estructuras lipídicas, estructuras sacáridas y ciertos ácidos nucleicos. Los agonistas sintéticos para varios TLR, que incluyen TLR-3, TLR-4, TLR-7, TLR-8 y TLR-9, se han desarrollado o se están desarrollando para el tratamiento del cáncer, generalmente con la intención de activar el sistema inmunitario en la presencia de tumores. El TLR-9 reconoce la presencia de secuencias de ADN que contienen CG no metiladas, que se encuentran típicamente en bacterias, pero prácticamente nunca en el ADN genómico humano. Por lo tanto, las secuencias de ADN que contienen CG no metiladas se han diseñado como agonistas artificiales de TLR-9. El efecto de dichas construcciones de ADN que contienen CG no metiladas depende de su interacción con TLR-9, y la interacción de ADN-proteína depende de la conformación de ADN y proteína. Los datos experimentales demuestran que las moléculas de ADN con forma de doble asa son sorprendentemente adecuadas para la inducción de una respuesta inmune.

30 Con el fin de identificar una herramienta para predecir si un paciente con cáncer responderá a la aplicación de un agonista de TLR-9, se usó una construcción de ADN con forma de doble asa que tiene motivos CG no metilados en los bucles terminales monocatenarios.

35 En total, se seleccionaron para el estudio 46 pacientes que padecían cáncer colorrectal metastásico que se habían tratado previamente durante 4,5 a 6 meses en una terapia de combinación de primera línea estándar con o sin un anticuerpo monoclonal humano que inhibe el factor de crecimiento del endotelio vascular A. Después de un intervalo sin tratamiento de ca. 1-6 semanas, se realizó una aleatorización de los pacientes, de modo que 32 pacientes recibieron 60 mg por dosis de la construcción de ADN MGN1703 y 14 pacientes recibieron un placebo, cada paciente dos veces por semana por inyección subcutánea.

40 Después de 12 semanas de tratamiento, todos los pacientes fueron examinados por progresión tumoral. En función de la presencia o ausencia de progresión tumoral, los pacientes se dividieron en dos grupos, designados como "grupos de PFS". Los pacientes cuyo tumor no había progresado fueron designados como pacientes libres de progresión y etiquetados como "PFS1", mientras que los pacientes con progresión tumoral fueron etiquetados como "PFS0". Obviamente, la falta de progresión tumoral (PFS1) indica una posible respuesta al tratamiento, mientras que el crecimiento tumoral (PFS2) indica una falta de respuesta. El tratamiento se continuó para cada paciente hasta que se encontró la progresión del tumor.

50 La Tabla 1 resume los resultados. Es obvio que casi todos los pacientes sin progresión recibieron la construcción de ADN.

Tabla 1: Designación de pacientes

Brazos de tratamiento	Designación de grupo		
	PFS0	PFS1	Total
MGN1703	19	13	32
Placebo	13	1	14
Total	32	14	46

65 Antes de la primera aplicación de MGN1703 o placebo (al inicio del estudio) se recogieron muestras de sangre de todos los pacientes. Se determinó la distribución de las siguientes inmunovariantes, por ejemplo, parte de la población total de PBMC y la relación de las subpoblaciones activadas y no activadas. Se investigó una correlación de la designación del grupo PFS respectivo después de 12 semanas y se investigaron todas las inmunovariantes al inicio del estudio. Se determinaron las siguientes inmunovariantes: monocitos, monocitos activados 1, monocitos activados 2, células B, células

B activadas, células T, células T activadas, células asesinas naturales (NK), células NK activadas, células NKT, células NKT activadas, células dendríticas plasmacitoides (pDC), pDC activadas, células dendríticas mieloides (mDC) y mDC activadas. La Tabla 2 resume el contexto de los tipos de células, los CD y las frecuencias determinadas.

5 Tabla 2: Relación de los tipos de células, los CD y las frecuencias determinadas

	Tipo celular	Identificado por	Frecuencia como porcentaje de
	monocitos	CD14+	todos los PBMC
10	monocitos activados 1	CD14+ / CD86+	todos los monocitos
	monocitos activados 2	CD14+ / CD169+	todos los monocitos
	Células B	CD19+	todos los PBMC
15	células B activadas	CD19+ / CD86+	todas las células B
	Células T	CD3+ / CD56-	todos los PBMC
	células T activadas	CD3+ / CD56- / CD69+	todas las células T
	células asesinas naturales (NK)	CD3- / CD56+	todos los PBMC
20	células NK activadas	CD3- / CD56+ / CD69+	todas las células asesinas naturales
	Células NKT	CD3+ / CD56+	todos los PBMC
	células NKT activadas	CD3+ / CD56+ / CD69+	todas las células NKT
25	células dendríticas plasmacitoides (pDC)	Lin1- / CD123+ / HLA-DR+	todos los PBMC
	pDC activados	Lin1- / CD123+ / HLA-DR+ / CD40+	todos los pDC
	células dendríticas mieloides (mDC)	Lin1- / CD11c+ / HLA-DR+	todos los PBMC
30	mDC activados	Lin1- / CD11c+ / HLA-DR+ / CD86+	todos los mDC

Para evaluar si una de las inmunovariantes puede servir como un biomarcador adecuado, se calculó la llamada regresión de Cox para cada inmunovariante. Una regresión de Cox permite estimar el efecto del(los) parámetro(s) sin ninguna consideración de la función de riesgo. La relación de riesgo que resulta de dicho cálculo debería ser inferior a 1 y estar relacionada con un valor p significativo inferior a 0,05. De cualquier otra manera, el efecto observado no estaría relacionado con el agonista de TLR-9 aplicado. Esos criterios se aplicaron solo a las células NKT activadas que tienen una relación de riesgo de aproximadamente 0.933 y un valor de p de 0.0309.

40 Sorprendentemente, el porcentaje de células NKT activadas podría usarse para predecir el éxito del tratamiento dentro del grupo verum. La relación entre el porcentaje de células NKT activadas y el estado del grupo PFS se estudió mediante el uso de análisis estadísticos avanzados y bien establecidos dentro del grupo verum.

45 Una curva de la característica operativa del receptor (ROC), o simplemente curva ROC, muestra el comportamiento de un sistema clasificador binario a medida que varía su umbral de discriminación. Las curvas ROC se crean trazando la fracción de verdaderos positivos de los positivos frente a la fracción de falsos positivos de los negativos en varios ajustes del umbral. Los verdaderos positivos también se designan como sensibilidad y los falsos positivos son uno menos la especificidad o tasa negativa verdadera.

50 El análisis ROC se usa en medicina, radiología, biometría y otras áreas durante muchas décadas y es cada vez más usado en el aprendizaje automático y la investigación de minería de datos. En biomarcadores, puede usarse para estudiar el estudio si un biomarcador potencial puede tener validez clínica, es decir, si puede usarse con fines predictivos. Una prueba diagnóstica o biomarcador exitosa dará como resultado una curva que se dobla por encima de la diagonal, mientras que una prueba fallida reflejará la diagonal o caerá debajo de ella. Por lo tanto, una curva ROC proporciona información sobre si una prueba de diagnóstico es exitosa o no.

55 Se establecieron curvas ROC en pacientes verum para células NKT activadas (figura 1). Se determinó que el área bajo la curva era 0,71, lo cual es una clara indicación de la confiabilidad del biomarcador. El índice de Youden, que puede usarse para determinar un valor de corte óptimo para la lectura de la prueba, muestra un valor óptimo en el corte en células NKT activadas al 3,08 %. La figura 2 muestra células NKT activadas frente a sensibilidad y especificidad.

60 Todos los pacientes ahora se clasificaron en grupos en dependencia de su nivel de células NKT activadas. Los pacientes con niveles de células por encima del corte del 3,08 % de células NKT activadas fueron designados como biomarcador positivo, mientras que los pacientes con niveles por debajo del corte fueron etiquetados como biomarcador negativo.

65 La Figura 3a muestra un gráfico de Kaplan-Meier en pacientes con biomarcador positivo para verum y placebo (línea continua: pacientes tratados con MGN1703; línea de puntos: pacientes tratados con placebo). Es obvio que la probabilidad

de sobrevida dentro del grupo de biomarcador positivo está sorprendentemente relacionada con la aplicación del agonista de TLR-9.

La Figura 3b muestra una curva de Kaplan-Meier para los pacientes con biomarcador negativo tanto en el brazo verum como en el placebo. Es obvio que el tiempo de sobrevida libre de progresión es claramente más corto dentro de este grupo verum en comparación con los pacientes con biomarcador positivo (comp. figura 3a).

La Figura 4a muestra una gráfica de Kaplan-Meier de pacientes con biomarcador positivo versus pacientes con biomarcador negativo, solo del brazo de tratamiento verum (línea continua: pacientes con biomarcador positivo; línea de puntos: pacientes con biomarcador negativo). Claramente, los pacientes con biomarcador positivo tienen una ventaja significativa en la probabilidad de sobrevida en comparación con los pacientes con biomarcador negativo, incluso cuando ambos grupos recibieron el tratamiento verum MGN1703.

La Figura 4b muestra un gráfico de Kaplan-Meier del grupo placebo para pacientes con biomarcador positivo y negativo (línea continua: pacientes con biomarcador positivo; línea de puntos: pacientes con biomarcador negativo). Es obvio que ambos grupos muestran una sobrevida libre de progresión más o menos idéntica, ya que solo fueron tratados con placebo. Claramente, el biomarcador es adecuado para evaluar si un paciente responde o no al tratamiento con un agonista de TLR-9. Además, el grupo placebo muestra que el biomarcador no está relacionado con los efectos causados por el estado general de salud de un paciente.

La presente invención proporciona un nuevo biomarcador predictivo para responder a un tratamiento contra el cáncer con un agonista de TLR-9, especialmente una cadena de ADN parcialmente autocomplementaria cerrada covalentemente que tiene un tallo bicatenario, unos bucles terminales monocatenarios con motivos CG no metilados. La determinación de las frecuencias de las células NKT activadas (CD3+/CD56+/Cd69+) al inicio del estudio permite evaluar la probabilidad de si un paciente responde o no al tratamiento con la construcción de ADN. Es importante destacar que, en el brazo de placebo, los pacientes con características similares a las del respondedor se comportan de la misma manera que los no respondedores, lo que demuestra que el tiempo de sobrevida prolongado sin progresión de los pacientes verum con biomarcador positivo se debe de hecho a la aplicabilidad de los biomarcadores para la terapia seleccionada, no solo una mejor salud general o cualquier efecto no específico.

Material y métodos

Manejo de muestras

Se recogió sangre completa (10 ml) para FACS en tubos Streck Cyto-Chex® BCT. Dentro de las 2 horas posteriores al muestreo, las muestras de sangre se enviaron al laboratorio analítico. De acuerdo con el Protocolo establecido, las muestras se almacenaron a temperatura ambiente. Se evaluó la frecuencia y el estado de activación de las células dendríticas plasmacitoides (pDC), células dendríticas mieloides (mDC), monocitos, células asesinas naturales (NK), células NKT, células B, células T y otras poblaciones de células.

Métodos Analíticos:

Se realizó la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de acuerdo con los principios establecidos. Las muestras de sangre completa se tiñeron con anticuerpos marcados con fluorescencia y se incubaron. El análisis fenotípico de las células inmunes se realizó con un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson). Se documentaron las frecuencias de las respectivas poblaciones de células analizadas para cada muestra de los pacientes.

Análisis de PBMC humanas para la activación de poblaciones celulares específicas

Expresión CD40 de células dendríticas plasmacitoides (pDC)

Las células se tiñeron con la siguiente combinación de anticuerpos monoclonales: Anti-Lineage marker-FITC, (cóctel de anticuerpos que contiene anticuerpos dirigidos contra CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56); Anti-CD123-PE; Anti-HLA-DR-PerCP; Anti-CD40-APC; Los pDC se seleccionaron como: linaje negativo, positivo para HLA-DR, células positivas para CD123. Dentro de la población pDC, se usó CD40 como marcador de activación.

Activación de NK-, NK-T y células T mediante el uso del marcador de activación CD69

Las células se tiñeron con la siguiente combinación de anticuerpos monoclonales: Anti CD3-FITC; Anti CD56-PE; Anti CD69-APC

Las células NK se seleccionaron como: Células CD3 negativas, CD56 positivas

Las células NK-T se seleccionaron como: Células CD3 positivas, CD56 positivas

Las células T se seleccionaron como: CD3 positivas, CD56 negativas

Se usó CD69 como marcador de activación para las 3 poblaciones.

Expresión CD86 de células dendríticas mieloides (MDC):

Las células se tiñeron con la siguiente combinación de anticuerpos monoclonales: Anti-Lineage marker-FITC, (cóctel de anticuerpos que contiene anticuerpos dirigidos contra CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56); Anti-CD11c-PE; Anti-HLA-DR-PerCP; Anti-CD86-APC

Las MDC se seleccionaron como: linaje negativo, positivas para HLA-DR, células positivas para CD11c.

ES 2 795 929 T3

Dentro de la población de MDC, se usó CD86 como marcador de activación.

Expresión de CD86 de células B y monocitos; expresión de CD169 de monocitos

5 Las células se tiñeron con la siguiente combinación de anticuerpos monoclonales: Anti CD14-FITC; Anti CD169-PE; Anti CD19-PerCP; Anti CD86-APC

Las células B se seleccionaron como células positivas para CD19. Dentro de la población de células B, se usó CD86 como marcador de activación.

10 Los monocitos se seleccionaron como células positivas para CD14. Dentro de la población de monocitos, se usaron CD86 y CD169 como marcadores de activación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir o controlar si un paciente que padece de cáncer responderá o responde al tratamiento con un agonista de TLR-9 al determinar la frecuencia de las células T asesinas naturales (NKT) activadas CD3+ CD56+ CD69+, en donde el agonista de TLR-9 es una construcción de ADN que comprende al menos un motivo de secuencia N¹N²CGN³N⁴, en donde N¹N² y N³N⁴ es cualquier combinación de A, C, T y G, y C es desoxicitidina, G es desoxiguanosina, A es desoxiadenosina y T es desoxitimidina, en donde el método no se lleva a cabo in vivo.
2. El método de la reivindicación 1, en donde se determina la relación de células NKT activadas CD3+ CD56+ CD69+ de la población completa de células NKT.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde un respondedor al tratamiento con el agonista de TLR-9 tiene una frecuencia de al menos 3 % de células NKT activadas CD3+ CD56+ CD69+ de toda la población de células NKT.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde se realizó previamente una terapia de inducción con un fármaco sin ADN.
5. Un agonista de TLR-9 para su uso en un método de tratamiento del cáncer, que comprende al menos una construcción de ADN que comprende al menos un motivo de secuencia N¹N²CGN³N⁴, en donde N¹N² y N³N⁴ es cualquier combinación de A, C, T y G, y C es desoxicitidina, G es desoxiguanosina, A es desoxiadenosina y T es desoxitimidina y **caracterizado porque** el paciente tiene niveles elevados de células NKT activadas CD3+ CD56+ CD69+.
6. El agonista para su uso en el método de tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 5, en donde N¹N² es un elemento seleccionado del grupo que comprende GT, GG, GA, AT o AA, N³N⁴ es un elemento seleccionado del grupo que comprende CT o TT.
7. El agonista para su uso en el método de tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde el ADN es una construcción de ADN lineal de cadena abierta que comprende ADN mono o bicatenario o es una construcción de ADN bicatenario lineal, que comprende al menos un extremo con un bucle monocatenario.
8. El agonista para su uso en el método de tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde el motivo de secuencia N¹N²CGN³N⁴ está ubicado dentro de una región monocatenaria y/o bicatenaria de la secuencia de ADN.
9. El agonista para su uso en el método de tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, que comprende al menos un nucleótido de L-ADN.
10. El agonista para su uso en el método de tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en donde al menos un nucleótido se modifica con un grupo funcional seleccionado del grupo que comprende grupos carboxilo, amina, amida, aldimina, cetil, acetal, éster, éter, disulfuro, tiol y aldehído.
11. El agonista para su uso en el método de tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en donde la construcción de ADN se une a un compuesto seleccionado del grupo que comprende péptidos, proteínas, carbohidratos, anticuerpos, lípidos, micelas, vesículas, moléculas sintéticas, polímeros, micro proyectiles, partículas de metal, nanopartículas, o una fase sólida.
12. El agonista para su uso en el método de tratamiento del cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde la construcción de ADN es parte de una composición farmacéutica.
13. El agonista para su uso en el método de tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la composición farmacéutica es una vacuna.
14. El uso de un kit para predecir o controlar si un paciente que padece cáncer responderá o responde al tratamiento con un agonista de TLR-9 que comprende los medios para detectar y cuantificar la frecuencia de las células NKT activadas CD3+ CD56+ CD69+ de toda la población de células NKT, y en donde el agonista de TLR-9 comprende una construcción de ADN que comprende al menos un motivo de secuencia N¹N²CGN³N⁴, en donde N¹N² y N³N⁴ es cualquier combinación de A, C, T y G, y C es desoxicitidina, G es desoxiguanosina, A es desoxiadenosina y T es desoxitimidina, en donde el kit no se usa in vivo.

Figura 1

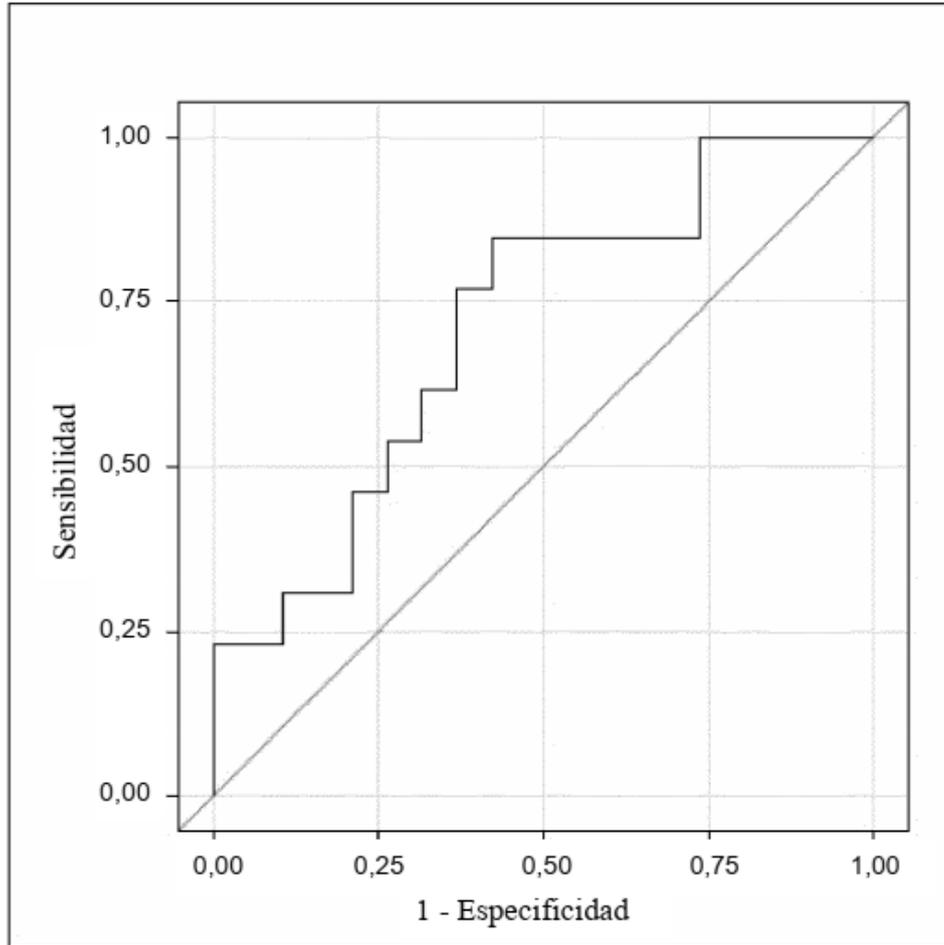


Figura 2

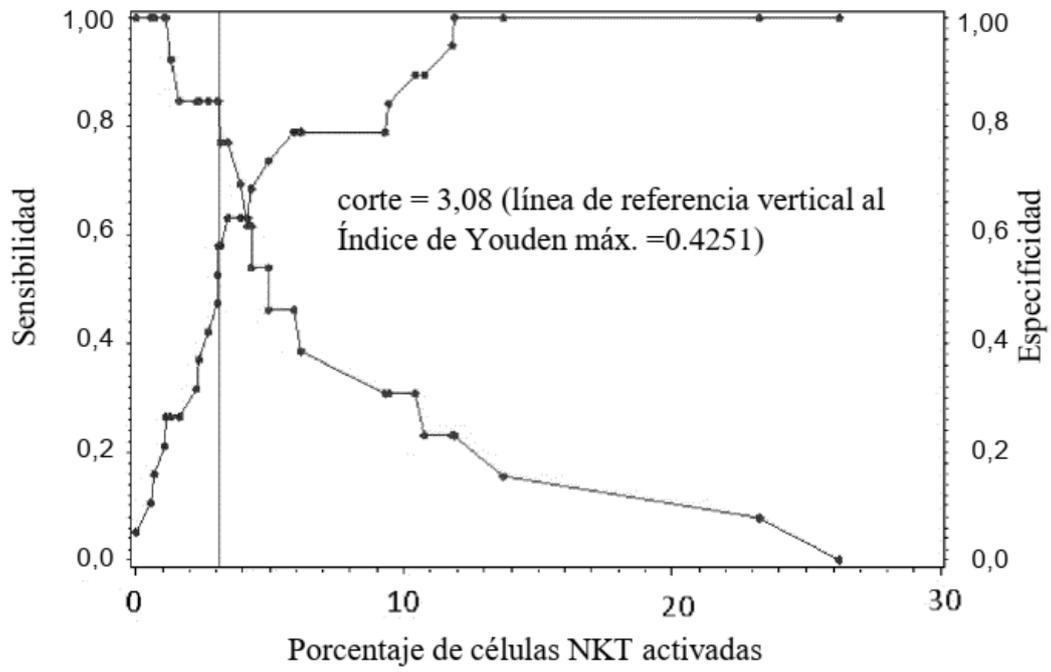


Figura 3a

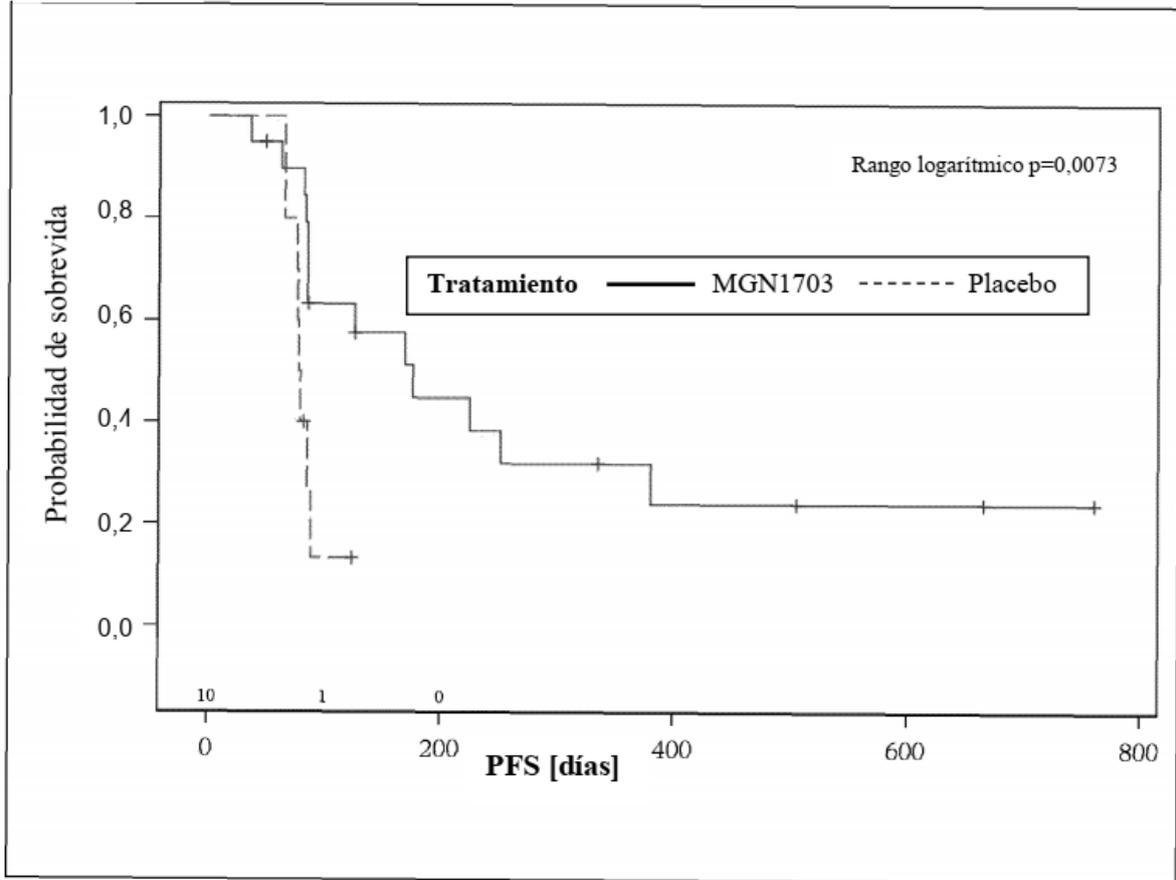


Figura 3b

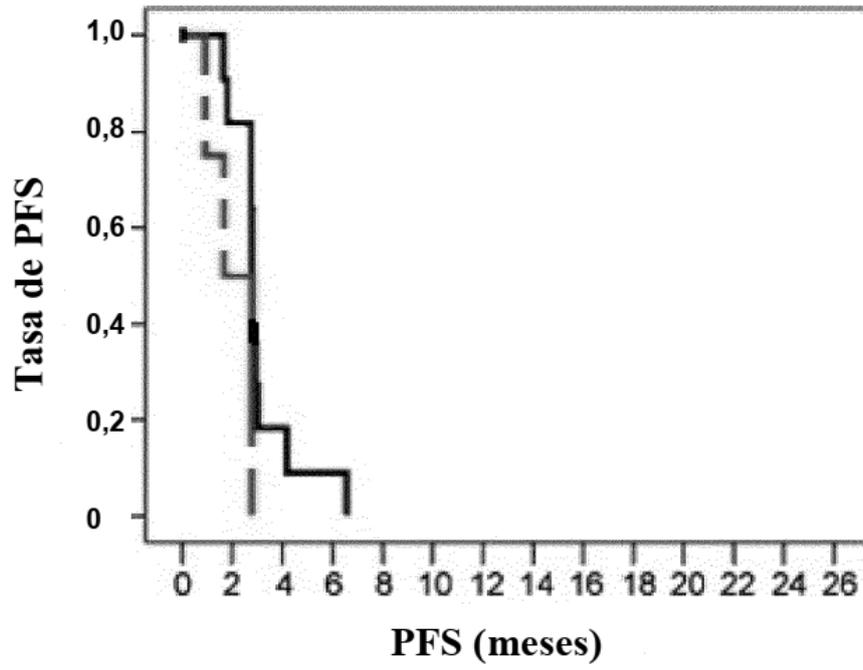


Figura 4a

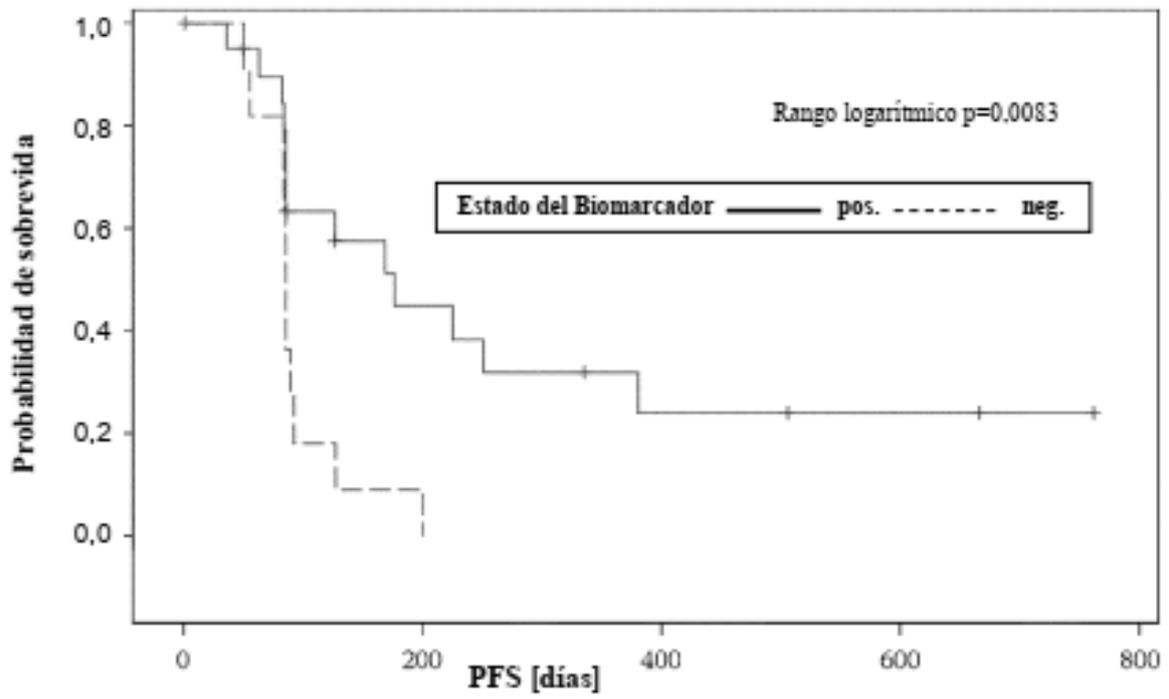


Figura 4b

