

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 970 763**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2015 PCT/EP2015/064746**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2017 WO17000983**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2015 E 15733431 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2023 EP 3313431**

54 Título: **Método para inducir respuesta de memoria T inicial con vacuna antitumoral de péptidos cortos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.05.2024

73 Titular/es:
**OSE IMMUNOTHERAPEUTICS (100.0%)
22 boulevard Benoni Goullin
44200 Nantes, FR**

72 Inventor/es:
COSTANTINI, DOMINIQUE

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 970 763 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para inducir respuesta de memoria T inicial con vacuna antitumoral de péptidos cortos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de medicina, en particular de oncología, y más particularmente la presente invención se refiere al tratamiento del cáncer.

10 **Antecedentes de la invención**

Los linfocitos T de memoria son un subconjunto de linfocitos T específicos de antígeno que persisten a largo plazo después de haber encontrado y respondido a su antígeno afín. Se expanden rápidamente hasta grandes números de linfocitos T efectores tras reexposición a su antígeno afín, proporcionando, por tanto, al sistema inmunitario una "memoria" contra infecciones pasadas, así como células cancerosas. En el segundo encuentro con las células invasoras o cancerosas, los linfocitos T de memoria pueden iniciar una respuesta inmunitaria más rápida y más fuerte que la primera vez. Los linfocitos T de memoria comprenden dos subtipos: linfocitos T de memoria centrales (linfocitos TCM) y linfocitos T de memoria efectores (linfocitos TEM). Los linfocitos de memoria pueden ser CD4⁺ o CD8⁺.

20 Se ha establecido recientemente, para varios cánceres humanos, que altas densidades de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ de memoria efectores están asociadas con una supervivencias global más larga (Fridman W. *et al.*, 2012, Nat Rev Cancer, 12(4), 298-306). Los linfocitos T de memoria centrales, sin embargo, parecen tener una capacidad incluso mayor de persistir *in vivo* y también son más eficaces en mediar la inmunidad protectora a causa de su capacidad proliferativa aumentada (Calarota SA *et al.*, 2013, Clinical and Developmental Immunology, artículo ID 637649).

25 En las publicaciones, los datos indican que una activación apropiada inicial de la respuesta de linfocitos T CD8⁺ mediante vacunas peptídicas en adyuvante de aceite mineral no garantiza eficacia a largo plazo de estos linfocitos T CD8⁺ (Bijker MS *et al.*, 2007, J Immunol, 179:5033-5040), aunque, dicha eficacia a largo plazo sería de gran interés en el campo de enfermedades crónicas tales como cáncer.

30 Bijker *et al.* describieron una estrategia específica ligada al uso de péptidos largos para superar la poca eficacia a largo plazo de las vacunas contra el cáncer. Sin embargo, esta estrategia se mostró poco fiable por Karkada *et al.* (Karkada M *et al.*, 2014, Biologics: Target and Therapy, 8: 27-38). De hecho, la respuesta inmunitaria con dichos péptidos largos no fue constante en cada punto temporal y era decreciente después de la primera inyección.

35 Por tanto, aún hay una fuerte necesidad, actualmente, de desarrollar un método de tratamiento con vacuna peptídica contra el cáncer que pudiera estimular los linfocitos T de memoria lo más pronto posible, especialmente linfocitos T de memoria centrales.

40 La pauta de administración clásica de vacunas contra el cáncer de péptidos cortos se basa en al menos 5-6 administraciones de la vacuna. Holmes *et al.* definen el esquema óptimo de administración de una vacuna contra el cáncer de péptidos cortos específica como 6 inyecciones de vacuna por cada mes de tratamiento (Holmes JP *et al.*, 2008, Cancer, 113, 1666-1675). En un ensayo en fase dos, se consideró que los sujetos formaban parte eficazmente del protocolo de vacunación si habían recibido al menos 6 administraciones de la vacuna (Walter S *et al.*, 2012, Nature Medicine, 18, 1254-126). Otros consideraron de siete a diez administraciones de vacuna de péptidos cortos para un tratamiento eficaz (Kantoff PW *et al.*, 2010, Cancer J Clin Oncol, 28: 1099-1105; Schwartzentruber DJ *et al.*, 2011, N Engl J Med, 364:2119-27). El documento de Epimmune (NCT00104780, www.clinicaltrials.gov) describe "Un estudio en fase II, en abierto, multicéntrico de la vacuna terapéutica EP2101 en paciente con cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC) en estadio IIIB, estadio IV o recidivante" que implica la administración de la composición a pacientes HLA-A2 en las semanas 0, 3, 6, 9, 12 y 15. El documento de Barve Minal *et al.* (2008, J. Clin. Oncol., vol. 26, pág. 4418-4425) describe un estudio en abierto, multicéntrico, de un solo grupo, en fase II diseñado para evaluar la seguridad, eficacia e inmunogenia de IDM-2101 en pacientes con NSCLC avanzado que son HLA-A2 positivos. La vacuna se administró por vía subcutánea cada 3 semanas durante las primeras 15 semanas, después cada 2 meses durante el

55 Estos tratamientos con vacuna de péptidos cortos pueden ser dolorosos para los sujetos y no están desprovistos de efectos secundarios y toxicidad. Además, controlar los costes de asistencia sanitaria y optimizar el tratamiento contra el cáncer son cuestiones clave al considerar la elevación de los costes. Por tanto, hay una fuerte necesidad de hallar nuevos métodos que permitan modificar el esquema de administración de la vacuna para reducir el número de inyecciones mientras se obtiene una respuesta T de memoria lo más pronto posible.

60 **Sumario de la invención**

La invención es como se define en las reivindicaciones.

65

El objeto de la presente invención se refiere a una nueva pauta de administración de una vacuna contra el cáncer de péptidos cortos que permita una respuesta inicial de linfocitos T de memoria, como se define en las reivindicaciones.

5 Los autores de la invención mostraron sorprendentemente que no más de tres administraciones de la combinación de péptidos cortos eran suficientes para obtener una respuesta inmunitaria específica T a través de linfocitos T de memoria y esta respuesta inmunitaria estaba ligada a un tiempo hasta progresión (TTP) más largo.

10 La presente invención se refiere a una composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos para su uso en el tratamiento de un cáncer de un paciente positivo a antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), en donde la composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos comprende los péptidos aKXVAAWTLKAAa (SEQ ID No 10), indicando X y a respectivamente ciclohexilalanina y d-alanina, RLLQETELV (SEQ ID No 1), YLQLVFGIEV (SEQ ID No 2), LLTFWNPPV (SEQ ID No 3), KVFGSLAFV (SEQ ID No 4), KLBPVQLWV (SEQ ID No 5), indicando B ácido α -aminoisobutírico, SMPPPGRV (SEQ ID No 6), IMIGHLVGV (SEQ ID No 7), KVAEIVHFL (SEQ ID No 8) e YLSGADLNL (SEQ ID No 9), y en donde dicho tratamiento consiste en un periodo de sensibilización que consiste en tres administraciones de dicha composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos, a una administración cada una a cuatro semanas, induciendo de ese modo una respuesta de linfocitos T de memoria centrales.

20 La invención también se refiere a una composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos para su uso en el tratamiento de un cáncer de un paciente positivo a antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), en donde la composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos comprende los péptidos aKXVAAWTLKAAa (SEQ ID No 10), indicando X y a respectivamente ciclohexilalanina y d-alanina, RLLQETELV (SEQ ID No 1), YLQLVFGIEV (SEQ ID No 2), LLTFWNPPV (SEQ ID No 3), KVFGSLAFV (SEQ ID No 4), KLBPVQLWV (SEQ ID No 5), indicando B ácido α -aminoisobutírico, SMPPPGRV (SEQ ID No 6), IMIGHLVGV (SEQ ID No 7), KVAEIVHFL (SEQ ID No 8) e YLSGADLNL (SEQ ID No 9), y en donde dicho tratamiento comprende un periodo de sensibilización que consiste en tres administraciones de dicha composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos, a una administración cada una a cuatro semanas, induciendo de ese modo una respuesta de linfocitos T de memoria centrales, en donde, en dicho tratamiento, el periodo de sensibilización va seguido de un periodo de mantenimiento durante el que la administración de dicha composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos se produce cada dos a ocho meses, preferiblemente cada dos a tres meses, más preferiblemente cada dos meses durante un año y después cada tres meses durante un año.

35 En una realización particular, en el periodo de sensibilización, la composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos se administra semanas, más preferiblemente cada 3 semanas.

Preferiblemente, la composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos se administra por vía parenteral, preferiblemente por vía subcutánea.

40 Preferiblemente, los péptidos se emulsionan en adyuvante incompleto de Freund, preferiblemente Montanide ISA-51.

Preferiblemente, cada péptido de la composición está presente a una concentración de 0,1 mg/ml a 1 mg/ml, preferiblemente 0,5 mg/ml.

45 Opcionalmente, la dosis total de péptido para cada inyección es 5,0 mg.

50 Preferiblemente, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer pulmonar tales como NSCLC (cáncer pulmonar no microcítico) y cáncer pulmonar microcítico, melanoma, mesotelioma, cáncer de mama, cánceres cerebrales primarios, cáncer de ovario, carcinoma uterino, especialmente carcinoma del cuerpo uterino y/o cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon o colorrectal, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, sarcoma, tumores de células germinales, leucemia, linfoma, cánceres testiculares y cánceres de vejiga, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en NSCLC, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de ovario y un cáncer de la cabeza y/o el cuello, más preferiblemente NSCLC o cáncer de colon.

55 El paciente es un paciente HLA-A2 positivo. Opcionalmente, el paciente padece un cáncer avanzado o en estadio tardío. Opcionalmente, el paciente padece metástasis, especialmente metástasis cerebral. Opcionalmente, el paciente tiene una efusión pleural maligna. Opcionalmente, el paciente ya ha recibido varias líneas de tratamiento antes del tratamiento con la composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos.

60 Opcionalmente, el tratamiento se usa en combinación con un tratamiento con otro fármaco antitumoral y/o con radioterapia, especialmente con un inhibidor del punto de control, preferiblemente inhibidor de CTLA-4 y/o PD-1/PD-L1 tal como pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, BMS936559, MEDI4736, AMP-224, AMP-514, MPDL3280A y avelumab, más particularmente para transformar pacientes "con memoria T no inmunógena" en paciente "con memoria T inmunógena".

65 La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

Descripción detallada de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

5 Previamente, solo se habían identificado respuestas de linfocitos CTL efectoros y linfocitos HTL efectoros después de combinación original de epítomos de péptidos cortos (documento EP1620456 que describe optimización química sobre la unión a los receptores clave de respuesta T y combinación original de diferente naturaleza de epítomos) como inmunoterapia específica de linfocitos T en oncología. Las respuestas inmunitarias tanto CTL (linfocitos T citotóxicos) como HTL (linfocitos T auxiliares) frente a todos los epítomos se basaban en linfocitos T efectoros después de la inyección de dicha combinación de epítomos de diferente naturaleza (anclajes fijos, epítomo heteróclito y natural). La patente EP1620456 que describe la respuesta inmunitaria con dicha combinación original fue usando un ensayo Elispot convencional que mide linfocitos T efectoros sin expansión *in vitro* en modelos transgénicos HLA-A2. Este ensayo convencional Elispot permite la medición de linfocitos T con capacidad de secreción inmediata de IFN- γ tras estimulación de antígeno/epítomo. Estas células representan principalmente linfocitos T efectoros.

15 La clasificación de los linfocitos T de memoria en diferentes subconjuntos (de memoria efectoros (TEM) y de memoria centrales (TCM)) se estudió en varios estudios que examinaron el tipo de linfocitos de memoria que pueden proporcionar protección óptima (Jennifer D Bassett *et al.*, 2012, Molecular Therapy, 20, 860-869).

20 Para normalizar estas medidas, dos ensayos Elispot permiten separar estas 2 poblaciones principales: el ensayo convencional ELISPOT cuantifica los linfocitos T de memoria efectoros mientras el ensayo cultivado ELISPOT cuantifica los linfocitos T de memoria expandibles, que representan los linfocitos T de memoria centrales. Las evidencias indican que una población diferente de linfocitos T, muy probablemente los linfocitos T de memoria centrales que se diferencian en linfocitos T efectoros durante el periodo de cultivo, se miden por el ensayo cultivado ELISPOT, en comparación con la medición de los linfocitos T de memoria efectoros circulantes que se cuantifican por el ensayo convencional ELISPOT (Calarotra S.A. *et al. supra*). Este ensayo cultivado ELISPOT se realiza cultivando linfocitos con antígenos específicos durante 10 días, lo que permite expandir linfocitos T en respuesta al antígeno. Entonces, se aplica un procedimiento convencional ELISPOT en respuesta a los antígenos correspondientes usados durante el periodo de estimulación de 10 días que mide la función efectora.

30 Los linfocitos T de memoria centrales requieren reestimulación antigénica para desarrollar función efectora. El ensayo cultivado ELISPOT comprende principalmente estos linfocitos T de memoria centrales porque la reducción de la población de linfocitos T de memoria centrales anulaba completamente las respuestas en ensayo cultivado Elispot (S. M. Todryk, *et al.*, 2009, Immunology, 128, 83-91). Todryk *et al.* explican la función predominante de los linfocitos T de memoria centrales en el ensayo cultivado ELISPOT que proporciona respuesta específica CD4+ y CD8+. Los linfocitos T de memoria centrales tienen mayor capacidad que los linfocitos T de memoria efectoros de persistir *in vivo* y son más eficaces en mediar la inmunidad protectora a causa de su capacidad proliferativa aumentada.

40 La invención descrita a continuación cumple una necesidad insatisfecha en oncología, proporcionando una pauta de administración optimizada que permite una respuesta de linfocitos T de memoria inicial en el tratamiento contra el cáncer, preferiblemente una respuesta de linfocitos T de memoria centrales inicial, y más particularmente una respuesta de linfocitos T de memoria a largo plazo inicial.

45 Más particularmente, la presente divulgación se refiere a una nueva pauta de administración de un tratamiento contra el cáncer de péptidos cortos basado en inmunoterapia de cáncer específica T multiepitópica. Sorprendentemente, los autores de la invención han demostrado que la administración de una combinación multiepitópica de péptidos cortos da lugar a una fuerte respuesta inmunitaria inesperada que implica linfocitos T de memoria a largo plazo, en particular linfocitos T de memoria centrales. Además, los autores de la invención también han descubierto que una pauta de administración muy corta con solamente tres inyecciones es suficiente para inducir esta respuesta fuerte y a largo plazo.

50 Por consiguiente, la composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos como se define en este documento es para su uso en el tratamiento de un cáncer de un paciente positivo a HLA-A2 (antígeno leucocitario humano A2), en donde dicho tratamiento consiste en o comprende un periodo de sensibilización que consiste en tres administraciones de dicha composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos, como se define en las reivindicaciones.

Definiciones

60 Un "epítomo" es los rasgos colectivos de una molécula, tal como estructura primaria, secundaria y terciaria, y carga, que conjuntamente forman un sitio reconocido por una inmunoglobulina, receptor de linfocitos T o molécula HLA. Como alternativa, un epítomo puede definirse como un conjunto de residuos aminoacídicos que está implicado en el reconocimiento por una inmunoglobulina particular, o en el contexto de los linfocitos T, aquellos residuos necesarios para el reconocimiento por proteínas de receptor de linfocitos T y/o receptores del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Los epítomos están presentes en la naturaleza, y pueden aislarse, purificarse o prepararse u obtenerse de otro modo por los seres humanos. Por ejemplo, los epítomos pueden prepararse mediante aislamiento

de una fuente natural, o pueden sintetizarse de acuerdo con protocolos convencionales en la técnica. En toda esta divulgación, los epítomos pueden denominarse en algunos casos péptidos o epítomos peptídicos.

"Antígeno leucocitario humano" o "HLA" es una proteína del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I o clase II (véase, por ejemplo, Stites, *et al.*, IMMUNOLOGY, 8.^a ED. Lange Publishing, Los Altos, CA (1994). Las moléculas HLA se agrupan en función de las especificidades de unión a péptido compartidas. Por ejemplo, HLA-A2 es un tipo particular de moléculas HLA que comparte afinidad de unión similar por péptidos que portan determinados motivos aminoacídicos. Los métodos para determinar el estado HLA-A2 en un paciente son bien conocidos y fáciles de obtener (es decir; muestras serológicas) por los expertos en la materia.

Un "epítomo peptídico" es un péptido que comprende un motivo o supermotivo específico de alelo de modo que el péptido se unirá a una molécula HLA e inducirá una respuesta CTL y/o HTL. Por tanto, los epítomos peptídicos de la invención pueden unirse a una molécula HLA-A2 apropiada y, después de ello, inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) o una respuesta de linfocitos T auxiliares (HTL), contra el péptido.

Un "péptido panDR" o péptido "PADRE[®]" es un miembro de una familia de moléculas que se unen a más de una molécula HLA de clase II. El patrón que define la familia PADRE[®] de moléculas puede denominarse supermotivo de HLA de clase II. Una molécula PADRE[®] se une a moléculas HLA de clase II y estimula *in vitro* e *in vivo* respuestas HTL humanas. Se describen péptidos PADRE en la patente EP735893.

Una "respuesta CTL y/o una HTL" es una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica contra un antígeno derivado de un antígeno patógeno (por ejemplo, un antígeno de un agente infeccioso o un antígeno tumoral), que de alguna manera evita o al menos detiene parcialmente los síntomas de la enfermedad, los efectos secundarios o la progresión. La respuesta inmunitaria también puede incluir una respuesta de anticuerpos que se ha facilitado por la estimulación de linfocitos T auxiliares.

Como se usa en este documento, la expresión "linfocito T de memoria" pretende incluir las subpoblaciones tanto CCR7- (linfocitos T de memoria efectores) como CCR7+ (linfocitos T de memoria centrales) de linfocitos T. Esta definición también incluye tanto los linfocitos T de memoria CD4 restringidos a clase II como los linfocitos T de memoria CD8 restringidos a clase I.

La estadificación de un cáncer describe la gravedad del cáncer de una persona en función del tamaño y/o la extensión (alcance) del tumor original (primario) y si el cáncer se ha propagado o no en el organismo (metástasis). Los estadios de NSCLC se numeran de 0 a IV. Los estadios IIIb y IV son los estadios más avanzados.

El "estado funcional del ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group)" se usa por los médicos e investigadores para evaluar la manera en que está progresando la enfermedad del paciente y evaluar la manera en que la enfermedad afecta a las capacidades de la vida diaria del paciente. El estado funcional del ECOG se numera de 0 a 5. Un estado funcional de 0 coincide con pacientes que son completamente activos y pueden realizarse todas las funciones anteriores a la enfermedad sin restricciones. Un estado funcional de 1 coincide con pacientes que tienen restringida la actividad físicamente extenuante, pero que conservan la deambulación y pueden realizar trabajo de naturaleza ligera o sedentaria, por ejemplo, tareas domésticas ligeras, trabajo de oficina.

La expresión "supervivencia global" (OS) se refiere a la duración de tiempo desde la fecha del inicio del tratamiento que los pacientes aún están vivos. En un ensayo clínico, medir la supervivencia global es una manera de observar lo bien que funciona un nuevo tratamiento.

Inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos o vacuna peptídica

La inmunoterapia del cáncer específica T multiepitépica divulgadas en este documento puede ayudar al sistema inmunitario a desarrollar memoria inmunitaria que pueda tener efectos de larga duración, específicos de tumor.

Una inmunoterapia del cáncer específica T de péptidos eficaz requiere inducción de un amplio abanico de especificidades de CTL. Esto puede conseguirse mejor con epítomos optimizados que abordan múltiples antígenos asociados a tumor (TAA) que una combinación multiepitépica que aborda al menos 5 antígenos tumorales y basada en combinación de epítomos. Preferiblemente, los al menos 5 antígenos tumorales incluyen o se seleccionan entre HER2/neu, CEA, MAGE2, MAGE3 y p53.

La inmunoterapia del cáncer específica T multiepitépica comprende una combinación de epítomos que pueden ser epítomos naturales y epítomos modificados (epítomos heteróclitos y de anclajes fijos). La inmunoterapia del cáncer específica T multiepitépica comprende al menos 5 epítomos que permiten abordar la combinación de los siguientes 5 antígenos tumorales: HER2/neu, CEA, MAGE2, MAGE3 y p53. Por ejemplo, la inmunoterapia del cáncer específica T multiepitépica comprende al menos 9 epítomos elegidos entre los divulgados en la tabla 6 de la solicitud de Estados Unidos US2014/01474790.

La combinación original usada aquí (OSE-2101) está hecha de epítomos naturales y epítomos modificados (epítomos heteróclitos y de anclajes fijos). Puede encontrarse información más detallada sobre epítomos heteróclitos y de anclajes fijos, por ejemplo, en la patente EP1620456.

5 OSE-2101 es una inmunoterapia del cáncer específica T multiepitópica compuesta de 10 péptidos sintéticos. Nueve de los péptidos se han diseñado para inducir una respuesta CTL contra TAA. Más particularmente, la inmunoterapia específica T está diseñada para su administración a pacientes para la inducción de CTL dirigidos contra antígeno carcinoembrionario (CEA), p53, receptor-2 epidérmico humano/neurológico (HER-2/neu) y antígeno 2 y 3 de melanoma (MAGE-2/3). Estos TAA se han elegido en función de su epidemiología porque frecuentemente se sobreexpresan en diversos cánceres avanzados como cánceres de colon, cánceres de ovario, cánceres de mama y NSCLC. Cada epítomo CTL está restringido por la superfamilia HLA-A2 de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I, proporcionando de ese modo cobertura de aproximadamente un 45 % de la población general. El décimo péptido sintético es el epítomo pan-DR (PADRE), un epítomo de linfocitos T auxiliares (HTL) diseñado de forma racional incluido solamente para aumentar la magnitud de las respuestas CTL.

15 La composición OSE-2101 comprende o consiste en los siguientes péptidos:

RLLQETELV	SEQ ID No 1
YLQLVFGIEV	SEQ ID No 2
LLTFWNPPV	SEQ ID No 3
KVFGSLAFV	SEQ ID No 4
KLBPVQLWV	SEQ ID No 5, indicando B ácido α -aminoisobutírico
SMPPPGTRV	SEQ ID No 6
IMIGHLVGV	SEQ ID No 7
KVAEIVHFL	SEQ ID No 8
YLSGADLNL	SEQ ID No 9
aKXVAAWTLKAAa	SEQ ID No 10, indicando X y a respectivamente ciclohexilalanina y d-alanina.

20 Por lo tanto, la composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos comprende los péptidos aKXVAAWTLKAAa (SEQ ID No 10, indicando X y a respectivamente ciclohexilalanina y d-alanina), RLLQETELV (SEQ ID No 1), YLQLVFGIEV (SEQ ID No 2), LLTFWNPPV (SEQ ID No 3), KVFGSLAFV (SEQ ID No 4), KLBPVQLWV (SEQ ID No 5, indicando B ácido α -aminoisobutírico), SMPPPGTRV (SEQ ID No 6), IMIGHLVGV (SEQ ID No 7), KVAEIVHFL (SEQ ID No 8) e YLSGADLNL (SEQ ID No 9).

25 Los péptidos pueden sintetizarse usando química convencional de Boc o Fmoc para síntesis peptídica en fase sólida partiendo de la resina apropiada, y purificarse por métodos convencionales. Como alternativa, el péptido puede producirse por genomanipulación con células recombinantes o mediante ARN, por ejemplo, mediante sistema de traducción *in vitro*.

30 La composición de inmunoterapia del cáncer específica T multiepitópica puede comprender un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Más preferiblemente, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un vehículo acuoso, especialmente un tampón. En particular, puede comprender uno o varios adyuvantes. Por ejemplo, los adyuvantes pueden ser adyuvante incompleto de Freund, adyuvante de aceite mineral, hidróxido de aluminio o alumbre, GM-CSF. Otros adyuvantes adecuados son bien conocidos en la técnica.

35 Preferiblemente, en la composición de inmunoterapia del cáncer específica T multiepitópica, los péptidos se emulsionan en adyuvante incompleto de Freund. En una realización preferida, el adyuvante es un adyuvante de aceite mineral, similar a adyuvante incompleto de Freund, fabricado y suministrado por Seppic SA, París, Francia. En una realización mucho más preferida, el adyuvante es Montanide® ISA 51.

40 Cada péptido de la composición puede estar presente a una concentración de 0,1 mg/ml a 1 mg/ml, preferiblemente 0,5 mg/ml. Preferiblemente, todos los péptidos están presentes en la composición a la misma concentración.

45 Preferiblemente, la composición de inmunoterapia del cáncer específica T multiepitópica es una emulsión estéril sin conservante de los 10 péptidos a una concentración de 0,5 mg/ml cada uno, formulada en adyuvante Montanide® ISA 51 a una relación de 1:1 (p:p) y llenada en viales de vidrio con tampón de caucho, y refrigerada a 2 °C hasta 8 °C.

50 OSE-2101 se fabrica en condiciones asépticas. Los péptidos se disuelven en tres disolventes diferentes, se filtran a esterilidad, se combinan y después se emulsionan en adyuvante mediante homogeneización en condiciones controladas. El ensayo de aprobación del producto incluyó el aspecto, las endotoxinas, la esterilidad, la viscosidad, el

tamaño de partículas, la concentración de los péptidos para cada péptido, el volumen, el pH y la potencia. La preparación de la composición OSE-2101 se detalla en el documento WO2004/094454, figura 3A y páginas 105-106.

5 Opcionalmente, además de los 10 péptidos de OSE -2101, la composición de péptidos puede comprender además péptidos adicionales, en particular epítopos peptídicos usados para inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) y que aborden TAA. Por ejemplo, la composición de péptidos puede comprender además un péptido como se divulga en el documento WO2009/143843, y más particularmente IDO5 (SEQ ID No 11).

10 **Pauta de administración de la inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos:**

La pauta de administración de una vacuna consiste en un periodo de sensibilización o comprende un periodo de sensibilización y un periodo de mantenimiento.

15 La expresión "periodo de sensibilización" se refiere al periodo del proceso de vacunación durante el que se induce una respuesta de linfocitos T de memoria centrales contra uno o varios péptidos de la inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos.

La expresión "periodo de mantenimiento" o "periodo de refuerzo" se refiere al periodo del proceso de vacunación después del periodo de sensibilización durante el que se administra la misma inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos y se mantiene y potencia la respuesta inmunitaria de memoria T.

El periodo de sensibilización de un sujeto en tratamiento con inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos consiste en tres administraciones de la inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos o vacuna.

25 Durante este periodo de sensibilización, la inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos se administra cada una-cuatro semanas, preferiblemente cada dos-tres semanas, más preferiblemente cada 3 semanas. El periodo de sensibilización es eficaz para inducir una respuesta de linfocitos T de memoria centrales contra uno o varios péptidos de la inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos, preferiblemente contra al menos 2, 3, 4 o 5 péptidos de la inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos.

30 Durante el periodo de mantenimiento, que sigue al periodo de sensibilización, se lleva a cabo una o varias administraciones de la inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos o vacuna. Durante este periodo de mantenimiento, la administración de la vacuna se produce cada dos-ocho meses, preferiblemente cada dos-tres meses, por ejemplo, cada dos meses durante uno o dos años y después cada tres meses durante uno o dos años.

35 En una realización alternativa, el periodo de sensibilización no va seguido de un periodo de mantenimiento. El periodo de sensibilización y el periodo de mantenimiento pueden estar separados por un periodo de descanso que no incluye ninguna administración de la inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos. El periodo de descanso puede durar de cuatro a doce semanas.

40 El periodo de sensibilización puede estar seguido de un tratamiento con un inhibidor del punto de control ya que los linfocitos T de memoria inducidos por la inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos se vuelven inmunógenos en el entorno tumoral.

45 **Dosificación**

Dentro del contexto de la invención, el término "tratamiento" o "tratar" se refiere a tratamiento curativo, sintomático y preventivo. Las composiciones y preparaciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la invención pueden usarse en seres humanos con cáncer o tumor existente, preferiblemente en los estadios tardíos de progresión del cáncer. Las composiciones y preparaciones farmacéuticas divulgadas en este documento no necesariamente curarán al paciente que tiene el cáncer, sino que retardarán o ralentizarán la progresión o evitarán la progresión adicional de la enfermedad, mejorando de ese modo el estado del paciente. En particular, las composiciones y preparaciones farmacéuticas divulgadas en este documento reducen el desarrollo de tumores, y/o evitan la aparición y desarrollo de metástasis y la recidiva del cáncer. En el tratamiento del cáncer, la composición farmacéutica se administra preferiblemente en una cantidad terapéuticamente eficaz.

60 Por "cantidad eficaz" se entiende la cantidad de la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención que evita, elimina o reduce los efectos nocivos de metástasis cerebrales. Se entiende que la dosis administrada puede adaptarse por los expertos en la materia de acuerdo con el paciente, la patología, el modo de administración, etc. La dosificación y pauta depende del estadio y gravedad de la enfermedad a tratar, el peso y estado general de salud del paciente y el criterio del médico prescriptor. Más particularmente, por "cantidad terapéuticamente eficaz de la inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos como se divulga en este documento" se entiende la cantidad que es suficiente para aumentar la supervivencia global de un paciente. En particular, por "cantidad terapéuticamente eficaz de la inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos como se divulga en este

documento" se entiende la cantidad que es suficiente para inducir una respuesta de linfocitos T de memoria centrales contra uno o varios péptidos de la inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos.

5 Los ensayos previos de cáncer han ensayado dosis crecientes de péptido, que varían de 0,1 a 10 mg de cada péptido por dosis de inyección, emulsionados en adyuvante incompleto de Freund. A todas las dosis ensayadas, el tratamiento con péptido/adyuvante incompleto de Freund se consideró seguro y bien tolerado, sin que se informara de toxicidades sistémicas graves relacionadas con la dosis.

10 La inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos como se divulga en este documento puede administrarse por cualquier vía apropiada, en particular por vía parenteral tal como vía subcutánea, intradérmica o intramuscular o por vía en aerosol, transmucosa, intrapleural o intratecal. La composición de péptidos puede administrarse por vía subcutánea. Preferiblemente, la inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos como se divulga en este documento está diseñada para inyección subcutánea. Preferiblemente, las dosis de péptido varían de 0,1 a 10 mg de péptido por dosis de inyección. En una realización preferida, la dosis total de péptidos por cada inyección o 15 administración será de 5,0 mg (1 ml de producto farmacológico que contiene 0,5 mg de cada péptido).

Cáncer

20 De acuerdo con un aspecto preferido de la presente invención, los sujetos de vacunación con la composición OSE-2101 son pacientes con un cáncer. En una realización preferida, el cáncer del paciente se debe a uno de los siguientes cánceres: cáncer pulmonar tal como NSCLC (cáncer pulmonar no microcítico) y cáncer pulmonar microcítico, melanoma, mesotelioma, cánceres de mama, cánceres cerebrales primarios, de ovario, carcinoma uterino, especialmente carcinoma del cuerpo uterino y/o el cuello uterino, de cabeza y cuello, de colon, gastrointestinal, cánceres renales, sarcoma, tumores de células germinales, leucemia, linfoma, cánceres testiculares y cánceres de 25 vejiga, preferiblemente NSCLC, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de ovario y un cáncer de la cabeza y/o el cuello, más preferiblemente NSCLC.

30 En otra realización preferida, el cáncer del paciente es cáncer avanzado. La expresión "cáncer avanzado" se refiere a un cáncer en un estadio avanzado de desarrollo, es decir, un cáncer que se ha propagado en el organismo (metástasis). Preferiblemente, el paciente padece metástasis cerebral.

35 Como alternativa, el paciente tiene una efusión pleural maligna, preferiblemente una efusión pleural metastásica, en particular asociada con cáncer pulmonar, cáncer de mama, linfoma o leucemia. Opcionalmente, el paciente ya ha recibido varias líneas de tratamiento antes de la vacunación mediante la composición de péptidos. En una realización particular, el paciente tiene una respuesta HTL positiva.

Combinación con otro fármaco antitumoral.

40 Opcionalmente, el tratamiento se usa en combinación con un tratamiento con otro fármaco antitumoral, en particular quimioterapia, hormonoterapia y/o inmunoterapia.

45 Por ejemplo, la quimioterapia puede seleccionarse entre cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida, etopósido, tenipósido, mitomicina, irinotecán, vinorelbina, etopósido, ifosfamida, temozolomida, fluorouracilo (5FU), docetaxel, pemetrexed, navelbina, fármacos que abordan el crecimiento de vasos sanguíneos tumorales (VEGF) tales como bevacizumab, ramucirumab; prednisona; inhibidores de tirosina cinasa que abordan EGFR tales como gefitinib, erlotinib, afatinib; inhibidores de ALK tales como crizotinib; ceritinib y cualquier combinación de los mismos.

50 En una realización preferida, la vacuna para su uso en el tratamiento de la presente invención se usa en combinación con un inhibidor del punto de control, especialmente un inhibidor de CTLA-4 y/o un inhibidor de PD-1 o PD-L1; inhibidores de IDO. El tratamiento con el inhibidor del punto de control puede realizarse antes, simultáneamente o después del tratamiento con la inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos como se divulga en este documento, en particular el periodo de sensibilización del tratamiento.

55 En este documento se divulga también un kit o producto que comprende (a) la cantidad eficaz terapéutica de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos como se divulga en este documento; y (b) un inhibidor del punto de control, preferiblemente un inhibidor de CTLA-4 y/o inhibidor de PD-1 o PD-L1, como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial, en particular en el tratamiento de cáncer. Preferiblemente, la inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos es OSE-2101.

60 El tratamiento con un inhibidor del punto de control puede realizarse después del periodo de sensibilización del tratamiento con la cantidad eficaz terapéutica de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos como se divulga en este documento.

65 Varios inhibidores de PD-1/PD-L1 ya están disponibles o en desarrollo clínico. Por ejemplo, los inhibidores de PD-1/PD-L1 pueden elegirse entre la lista no completa que incluye pembrolizumab (Merk), nivolumab (Bristol Myers Squibb), pidilizumab (Cure Tech), BMS936559 (Bristol Myers Squibb), MEDI4736 (Astra Zeneca), AMP-224 (Astra

Zeneca), AMP-514 (Astra Zeneca), MPDL3280A (Roche), avelumab (también conocido como MSB0010718C de Merck KgA Serono/Pfizer). Por ejemplo, los inhibidores de PD-1/PD-L1 pueden elegirse entre los divulgados en el documento WO2013/079174.

5 Por ejemplo, los inhibidores de CTLA-4 pueden elegirse entre la lista no completa que incluye tremelimumab (Pfizer Medimmune) y ipilimumab (BMS).

Aspectos y ventajas adicionales de esta invención se divulgarán en la siguiente sección experimental.

10 **Descripción de las figuras**

Figura 1: Fase 1/2 W9 W18 Magnitud de las respuestas de linfocitos T de memoria centrales inducidas por OSE2101.

15 Figura 2: Fase 2 Respuestas de linfocitos T de memoria centrales inducidas por OSE2101 para varios epítomos a través del número de dosis.

Figura 3: Correlación entre las respuestas HTL PADRE inducidas por OSE-2101 y las respuestas CTL/de linfocitos T de memoria centrales.

20

Figura 4: Estimación de Kaplan-Meier de TTP.

Ejemplos

25 **Ejemplo 1: respuesta inmunitaria inicial a través de implicación de linfocitos T de memoria centrales**

En los estudios clínicos en fase 1/2, la seguridad e inmunogenia de una combinación de epítomos potenciados de 10 péptidos, OSE-2101, diseñada racionalmente para inducir respuestas CTL multiepitópicas amplias en pacientes con cáncer de colon y NSCLC en estadio inicial. Además de la cobertura multiepitópica, OSE-2101 también abordó epítomos de cinco antígenos tumorales que se expresan ampliamente en tumores de mama, colon y pulmón no microcítico, ovario (CEA, HER-2/neu, p53, MAGE2 y MAGE3) haciendo que este producto sea adecuado para tratamiento contra diferentes indicaciones cancerosas. Como fuente de linfocitos T auxiliares para la inducción de CTL, también se incluyó el epítomo de HTL universal epitopo Pan DR y se usó un adyuvante de aceite mineral para la formulación final de esta inmunoterapia del cáncer específica T.

35

Criterios de elegibilidad de los pacientes. OSE-2101 se ensayó en dos ensayos clínicos en fase I específicos de enfermedad que incluyeron pacientes HLA-A2+ con NSCLC en estadio IIB/IIIA o cáncer de colon en estadio III histológicamente confirmado. Todos los pacientes se diagnosticaron como NED en los últimos 6 meses después de experimentar tratamiento convencional. Los pacientes cumplieron los parámetros de laboratorio normales para química sanguínea y recuentos de glóbulos blancos y tenían un estado funcional del Eastern Cooperative Oncology Group de 0 o 1. Se excluyeron si se habían tratado con agentes inmunomoduladores en un mes hasta la entrada en el estudio o con otras inmunoterapias del cáncer. Los pacientes con antecedentes de otros cánceres, excepto carcinoma basocelular o escamocelular de la piel o cáncer cervicouterino *in situ*, también se excluyeron así como pacientes con afecciones médicas agudas simultáneas o enfermedades autoinmunitarias especificadas. **Péptidos.** La inmunogenia de todos los epítomos de control inmunitario se confirmó al estimular CTL inducidos por tratamiento de ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b con un lote preclínico de OSE-2101 (ensayo convencional Elispot).

40

45

Diseño del estudio clínico. Ambos ensayos se diseñaron como estudios en fase 1/2, en abierto, multicéntricos, de una sola dosis, de múltiple administración para evaluar la seguridad e inmunogenia de la inmunoterapia OSE-2101. Los pacientes se trataron con 1 ml de OSE-2101 cada 3 semanas para un total de seis dosis. Cada dosis se administró por vía subcutánea en la misma zona en el deltoides o la región superior del mismo, o en un sitio contralateral si se observaban efectos secundarios locales. La duración del estudio para cada paciente que lo completó fue de 18 semanas. No se midieron las respuestas clínicas o la supervivencia del paciente en los estudios en fase 1/2.

50

Procesamiento de la muestra clínica. Se obtuvo sangre o producto de leucocitaféresis de pacientes en los puntos temporales de pretratamiento, semana 9 y semana 18, 3 semanas después de la tercera y sexta dosis de OSE-2101 respectivamente. Se aislaron leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) de muestras en 24 horas desde la recogida usando un gradiente de densidad de Ficoll-Paque y se crioconservaron en recipientes diseñados para garantizar una congelación óptima (Mr. Frosty, Nalgene). Para su uso, las células se descongelaron rápidamente a 37 °C, después se transfirieron a medio que contenía suero humano AB para el pretratamiento. **Medición de respuestas de linfocitos T de memoria centrales y linfocitos T de memoria efectores.** Las respuestas CTL en 16 pacientes en total (10 de colon y seis de NSCLC) se supervisaron para las respuestas CTL contra cada epítomo y contra el epítomo natural de análogos epitópicos. Para cada paciente, los puntos temporales de pretratamiento, semana 9 y semana 18 se ensayaron de forma discontinua en el mismo experimento para permitir una comparación de respuestas antes frente a después del tratamiento en el mismo experimento. Las respuestas de linfocitos T de memoria centrales se midieron usando un enzimoimmunoanálisis de recuento de manchas con IFN-γ (ELISPOT)

55

60

65

cultivado) después de estimulación *in vitro* de PBMC durante 10 días con cada epítipo de la vacuna. En resumen, los PBMC de cada punto temporal se estimularon en el día 0 con 10 µg/ml de cada epítipo individualmente en réplica en placas de cultivo de 48 pocillos (2×10^6 PBMC/pocillo). Todos los cultivos se alimentaron con rIL-2 (Endogen, Woburn, MA; 10 U/ml de concentración final) en los días 1, 4 y 7. Diez días después del inicio del cultivo, las células se recogieron y se ensayaron para la actividad contra los péptidos específicos de la vacuna y los correspondientes péptidos naturales de los análogos de la vacuna en el ensayo ELISPOT de memoria T. Las células se ensayaron en placas de 96 pocillos Millipore IP recubiertas previamente con anticuerpo de ratón anti-IFN- γ humano (Mabtech EE. UU., Cincinnati, OH). Cinco $\times 10^4$ células y $1,25 \times 10^4$ células de cada cultivo se sembraron en placas en pocillos triplicados junto con 10^5 PBMC autólogos irradiados y 10 µg/ml de péptido. Como control, también se ensayaron CTL contra un péptido de VHB de unión a HLA-A2.1 irrelevante. Después de 20 horas de incubación, se desarrollaron placas de ELISPOT de memoria T realizando incubación secuencial con anticuerpo biotinilado anti-IFN- γ humano (Mabtech EE. UU.), complejo de avidina-peroxidasa (APC, Vector Laboratories, Burlingame, CA) y sustrato 3-amino-9-etil carbazol (AEC) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Las células formadoras de manchas (SFC) se enumeraron usando un sistema de análisis de imágenes asistido por ordenador (Zeiss KS ELISPOT Reader, Carl Zeiss Microimaging, Thornwood, NJ). Los datos se presentan como las SFC netas por 5×10^4 células después de restar las manchas inducidas con el péptido de VHB irrelevante.

El ensayo ELISPOT cultivado de memoria T central se caracterizó usando PBMC HLA-A2+ de pacientes que demostraron una respuesta de memoria efectora T de recuerdo contra un epítipo CTL de VEB BMLF1 (secuencia, GLCTLVAML) en condiciones de estimulación idénticas usadas para ensayar las muestras clínicas. La respuesta específica generada a partir de estos donadores se valoró a dosis celulares limitantes y se midió una respuesta lineal (coeficiente de correlación = 0,99). El límite de detección inferior del ensayo se determinó en 5 SFC/pocillo y el límite superior fue 600 SFC. Se evaluó la reproducibilidad entre experimentos mediante ensayo repetido de muestras crioconservadas de PBMC previas a la vacunación de donadores positivos en días separados, y el coeficiente de variación (CV) varió de un 7-12 % en estos ensayos. Para evaluar la reproducibilidad entre operarios, dos operarios ensayaron los PBMC antes del tratamiento del mismo paciente en diferentes días y el CV fue de un 13-16 % a la dosis celular óptima. Los valores de CV se consideraron dentro de un intervalo aceptable de variabilidad y respaldaron fuertemente el uso de nuestro ensayo para análisis de respuestas inmunitarias clínicas.

Criterios de respuesta. Los criterios de respuesta positiva se establecieron de forma prospectiva después de analizar la variabilidad de las respuestas antes del tratamiento contra cada epítipo y el epítipo de control de VHB irrelevante. La respuesta de SFC media en una muestra después del tratamiento se consideró una respuesta positiva de linfocitos T de memoria inducida por epítipo si cumplía todo lo siguiente: 1) era mayor de 5 SFC por encima de la respuesta al epítipo irrelevante, 2) era mayor que las SFC medias de la respuesta al epítipo irrelevante, más 2 DT, y 3) era dos veces mayor que la respuesta de SFC en la muestra antes del tratamiento del mismo paciente, más 2 DT. La inclusión de "más dos desviaciones típicas" se usó para adaptar la variabilidad del ensayo y sirvió para hacer los criterios más rigurosos.

Resultados

Caracterización de pacientes. Catorce pacientes con cáncer de colon en estadio III se incluyeron en el ensayo y diez pacientes completaron el estudio después de recibir seis dosis de OSE-2101. En el ensayo de NSCLC, diez pacientes con enfermedad en estadio IIB/IIIA se incluyeron y seis pacientes completaron el estudio. OSE-2101 se consideró segura y se toleró por los pacientes en los dos ensayos clínicos observándose efectos secundarios típicos comunes a los péptidos preparados en adyuvante de aceite mineral.

Inmunogenia de OSE-2101 Un total de 16 pacientes (10 de cáncer de colon y 6 de NSCLC) que recibieron el ciclo completo de seis dosis de OSE-2101 se evaluaron para la frecuencia, amplitud y magnitud de las respuestas de linfocitos T de memoria centrales específicas de TAA inducidas por la inmunoterapia específica. Para mejorar la detección de las respuestas de linfocitos T de memoria centrales, se estimularon PBMC *in vitro* durante 10 días con cada epítipo. La actividad efectora de los PBMC expandidos *in vitro* se midió con un ensayo ELISPOT con IFN- γ contra el epítipo respectivo y un epítipo de VHB de unión a HLA-A*0201 irrelevante. Si el epítipo era un análogo, también se ensayó el epítipo natural correspondiente.

Los resultados de la supervisión inmunitaria de los 16 pacientes indicaron que OSE-2101 podía inducir una ancha amplitud de respuestas de linfocitos T de memoria centrales en los pacientes. En el ensayo de cáncer de colon, ocho de los 10 pacientes generaron sorprendentemente respuestas CTL contra cuatro o más epítipos de la vacuna en los puntos temporales de la semana 9 y/o semana 18 (figura 1). El promedio de la magnitud del ELISPOT cultivado estuvo en el mismo intervalo entre la semana 9 y la semana 18.

El paciente 607 demostró la amplitud más ancha y la magnitud más elevada de respuestas de linfocitos T de memoria centrales, presentando respuestas entre 60 - 200 SFC por 5×10^4 células contra siete epítipos en el punto temporal de la semana 9. De forma más importante, cinco de las siete respuestas de memoria T inducidas en este paciente estaban dirigidas contra los epítipos naturales. En el punto temporal de la semana 18, el paciente 607 generó respuestas de linfocitos T de memoria centrales, excediendo algunas de 1000 SFC, contra seis de los mismos epítipos de la semana 9.

Igual de destacables fueron las respuestas multiepitópicas observadas en los pacientes con cáncer de colon 601, 603, 604 y 606 a cinco o más epítomos sorprendentemente en los puntos temporales de la semana 9 y/o también la semana 18.

5 También se observaron respuestas de linfocitos T de memoria centrales multiepitópicas en pacientes con NSCLC, sorprendentemente en los puntos temporales de la semana 9 y/o también la semana 18. Todos los datos descritos utilizaron un protocolo de ensayo donde se cultivaron muestras de PBMC *in vitro* durante 10 días con epítomos individuales de OSE-2101 para expandir los CTL sensibilizados *in vivo* antes de ensayarlos en el ensayo ELISPOT y la medida de la respuesta de linfocitos T de memoria centrales y la etapa de estimulación *in vitro* como Elispot cultivado se requirió para observar las respuestas a los epítomos.

15 **Inmunogenia de diferentes clases de epítomos.** El análisis de la frecuencia y magnitud de las respuestas CTL indicó que la mayoría de los epítomos y todas las clases de epítomos representados en el producto eran inmunógenos en los pacientes. Globalmente, ocho de los nueve epítomos de la vacuna indujeron respuestas de linfocitos T de memoria centrales en al menos un paciente con cáncer de colon y seis epítomos de la vacuna eran inmunógenos en al menos un paciente con NSCLC. Tres de los análogos de anclaje fijo (CEA.24V9 (SEQ ID No 3), HER2.369V2V9 (SEQ ID No 4) y p53.139L2B3 (SEQ ID No 5)) y dos análogos heteróclitos (CEA.691H5 (SEQ ID No 7) y CEA.605D6 (SEQ ID No 9)) fueron particularmente inmunógenos ya que un 60-80 % de los pacientes con cáncer de colon y un 40-80 % de los pacientes con NSCLC clasificados como HLA-A*0201 respondieron a cada uno de los análogos (tabla 1A y 1B respuestas de la semana 9 o semana 18). La inmunogenia intensificada de los análogos también se indicó por el promedio de las magnitudes de respuesta que varían de 70 - 180 SFC en la semana 9 y de 90 - 315 SFC en la semana 18 en pacientes con cáncer de colon (tabla 1A) y 60 - 138 SFC en la semana 18 en pacientes con NSCLC (tabla 1B).

25 El ensayo inmunológico en los 16 pacientes de colon y NSCLC que completaron el tratamiento indicó que OSE-2101 era satisfactorio en inducir una ancha amplitud de respuestas CTL y de linfocitos T de memoria en pacientes individuales tan pronto como después de 3 inyecciones, caracterizada por la inducción simultánea de especificidades de CTL dirigidas contra varios epítomos. Las respuestas CTL amplias/de linfocitos T de memoria centrales mínimas observadas en pacientes individuales en ambas cohortes indicaron la posible eficacia a largo plazo para inmunoterapia en pacientes en estadio inicial y tardío. En su lugar, las respuestas CTL y de linfocitos T de memoria centrales simultáneas satisfacen un beneficio clínico a largo plazo de la estrategia multiepitópica para inmunoterapia del cáncer.

Tabla 1A

A. Sumario de respuestas CTL en 10 pacientes de colon

Paciente	Muestra	CEA-DWG		CEA-6030A		CEA-D9115		HER2-0001299		MAGE2-457		MAGE2-11915		P50-100LZDQ		P50-142M2		N° epítipos positivos	
		A	WT†	A	WT	A	WT	A	WT	A	WT	A	WT	A	WT	A	WT	Vacuna	WT†
601	Prevac.	0,3	30,6	15,6	0,0	0,0	38,7	1,0	1,3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0	1
	Sern. 9	42,7	-	-	30,7	-	134,7	119,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
	Sern. 18	-	-	-	83,7	-	80,7	24,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0
601	Prevac.	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0
	Sern. 9	115,0	20,3	88,3	74,3	411,3	112,7	102,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	0
	Sern. 18	98,0	22,0	-	193,7	-	70,8	20,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	2
602	Prevac.	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0
	Sern. 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0
	Sern. 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0
603	Prevac.	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0
	Sern. 9	63,0	30,3	114,7	101,0	32,7	30,0	24,3	320,0	3,5	1,6	5,0	0,8	1,0	0,0	-	-	0	4
	Sern. 18	20,7	32,7	-	8,6	-	-	11,6	-	16,0	12,3	-	-	-	-	-	-	0	0
604	Prevac.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0
	Sern. 9	55,0	75,0	70,0	62,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0
	Sern. 18	187,0	167,0	470,0	399,0	-	214,7	220,9	-	298,0	43,7	-	-	-	-	-	-	0	0
605	Prevac.	0,0	0,0	0,0	0,0	10,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0
	Sern. 9	43,7	30,0	-	65,7	-	30,7	35,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0
	Sern. 18	103,7	123,7	-	-	-	33,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
606	Prevac.	0,0	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0
	Sern. 9	-	-	-	24,0	-	24,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
	Sern. 18	-	-	-	45,0	-	71,0	38,0	-	19,7	-	-	-	-	-	-	-	0	0
607	Prevac.	4,0	1,7	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0
	Sern. 9	105,7	105,7	72,7	0,0	0,0	300,3	176,7	172,0	60,0	23,0	114,0	114,0	114,0	114,0	114,0	114,0	7	0
	Sern. 18	365,7	25,7	414,7	372,0	1638,0	-	1638,0	1161,0	-	-	-	-	-	-	-	-	6	0
608	Prevac.	8,0	0,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1	0
	Sern. 9	-	-	-	61,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0
	Sern. 18	-	-	-	18,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0
609	Prevac.	9,7	4,0	6,0	0,0	0,0	1,0	2,0	5,0	1,7	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0
	Sern. 9	-	20,0	70,0	100,7	0,0	-	0,0	24,7	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
	Sern. 18	31,7	28,0	22,0	17,0	0,0	-	14,7	9,0	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0
media de SFC	Sern. 9	62,0	75,3	61,2	62,5	170,0	-	130,0	75,7	246,0	30,2	33,0	70,3	-	10,0	-	-	-	-
	Sern. 18	172,0	109,1	200,0	194,7	300,0	-	310,7	209,0	416,1	77,0	10,0	69,4	-	-	-	-	-	-

- a) A, los CTL se ensayaron contra el análogo de vacuna.
- b) WT, los CTL se ensayaron contra el epítipo natural de vacuna correspondiente al análogo de vacuna.
- 5 c) El valor indica las SFC netas antes de la vacunación por 50 000 células ensayadas contra el epítipo indicado.
- d) El valor indica las SFC netas por 50 000 células de respuestas positivas a la vacuna.
- e) -, indica que la respuesta de SFC no cumplía los criterios y la respuesta a la vacuna fue negativa.
- f) Número total de respuestas positivas a la vacuna contra un epítipo natural de vacuna o el epítipo natural correspondiente al análogo de vacuna.

Tabla 1B

B. Sumario de respuestas CTL en 6 pacientes de NSCLC

Paciente	Muestra	CEA 24V9		CEA 60306		CEA 60310		4E2C 309274		MAGEA 127		MAGEA 121D		p53 13021283		p53 1494E		N.º de epítomos positivos	
		A	WT ^a	A	WT	A	WT	A	WT	A	WT	A	WT	A	WT	A	WT	Vacuna	WT ^b
001	Prevac.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0
	Sem. 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
	Sem. 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
002	Prevac.	0,0	0,0	0,0	0,0	4,3	3,0	4,7	2,2	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1	1
	Sem. 9	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	0	0
	Sem. 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
004	Prevac.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	1,0	1,7	0,0	0,0	0,0	1,3	1,0	1,0	0,0	0	2
	Sem. 9	-	-	20,7	-	40,7	-	84,3	71,0	30,7	-	-	-	90,7	-	-	-	0	2
	Sem. 18	25,3 ^d	23,9	214,3	10,7	364,0	-	284,0	180,7	184,7	-	-	-	50,9	-	-	-	6	4
005	Prevac.	5,2	1,0	3,0	0,7	6,7	11,7	16,7	30,0	7,5	13,5	10,8	0,0	7,0	21,7	12,5	0,0	0	0
	Sem. 9	-	-	35,7	30,0	40,3	-	-	-	-	-	-	-	20,3	-	-	-	4	1
	Sem. 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
002	Prevac.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2	0
	Sem. 9	-	-	-	-	120,7	-	-	-	-	-	-	-	53,0	-	-	-	0	0
	Sem. 18	40,1	-	-	-	36,0	-	-	-	-	-	-	-	117,3	-	-	-	0	0
001	Prevac.	0,2	0,7	0,0	0,0	1,7	0,2	2,0	1,2	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	1	0
	Sem. 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0	-	-	-	0	0
	Sem. 18	-	-	-	-	60,7	-	22,0	-	0,0	-	-	-	20,0	-	-	-	4	1
Media de SFC	64,9	29,3	20,7	0,0	84,7	71,0	31,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	29,2	0,0	2,7	0,0	0	0	
N.º de respuestas positivas ^e	2	1	2	2	2	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

- a) A, los CTL se ensayaron contra el análogo de vacuna.
- b) WT, los CTL se ensayaron contra el epítipo natural de vacuna correspondiente al análogo de vacuna.
- 5 c) El valor indica las SFC netas antes de la vacunación por 50 000 células ensayadas contra el epítipo indicado.
- d) El valor indica las SFC netas por 50 000 células de respuestas positivas a la vacuna.
- e) -, indica que la respuesta de SFC no cumplía los criterios y la respuesta a la vacuna fue negativa.
- f) Número total de respuestas positivas a la vacuna contra un epítipo natural de vacuna o el epítipo natural correspondiente al análogo de vacuna.

Ejemplo 2: implicación de linfocitos T de memoria iniciales confirmada en fase 2

Respuestas inmunitarias CTL medidas por Elispot cultivado. La inmunogenia se midió en ensayo clínico en fase 2 sobre PBMC crioconservados de cada muestra de ensayo que se descongelaron en medio de cultivo humano al 5 % (medio RPMI-1640 con HEPES 25 mM, complementado con suero humano AB al 5 %, L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 0,5 mM, aminoácidos no esenciales MEM 0,1 mM, 100 µg/ml de estreptomina y 100 U/ml de penicilina) que contenía 30 µg/ml de DNasa. Después de centrifugación durante 5 minutos a 1200 rpm, los sedimentos celulares se resuspendieron en medio de cultivo humano al 5 % y se lavaron 2 veces. Para el ensayo ELISPOT cultivado de linfocitos T de memoria centrales, se pusieron 2×10^6 PBMC/ml en pocillos replicados en placas de 48 pocillos y se estimularon durante 10 días con 10 µg/ml de cada péptido. Como control positivo, los PBMC también se estimularon con una combinación de péptidos víricos de recuerdo. Se añadió rIL2 humana (10 U/ml) a los cultivos estimulados con péptido en el día 1, día 4 y día 7. Después de 10 días, las células estimuladas se recogieron y se sembraron en placa a una concentración de 5×10^4 /pocillo. Los pocillos de ensayo también recibieron PBMC autólogos irradiados (1×10^5 /pocillo) y 10 µg/ml de péptido, el péptido de la vacuna, péptido irrelevante o péptidos de control positivo. Las células estimuladas *in vitro* con cada péptido análogo también se ensayaron contra el epítipo natural correspondiente.

Respuestas inmunitarias HTL medidas por Elispot convencional. Para el ensayo ELISPOT de HTL que mide las respuestas T auxiliares contra el epítipo PADRE, se pusieron 4×10^6 PBMC/ml en una placa de 12 pocillos para cultivo durante una noche. Las células entonces se recogieron y pusieron a 2×10^5 /pocillo en placas de nitrocelulosa de 96 pocillos de fondo plano que se habían recubierto previamente con anticuerpo monoclonal (mAb) anti-IFN- γ (10 µg/ml; clon 1-D1K; Mabtech). Las células sembradas en réplicas de 6 pocillos se estimularon con 10 µg/ml de péptido PADRE o con un péptido SSP2 del paludismo irrelevante. Después de 20 h de incubación a 37 °C, las placas de ensayo se lavaron con PBS/Tween-20 al 0,05 % y se añadieron a los pocillos 100 µl/pocillo de mAb biotinilado anti-IFN- γ (2 µg/ml; clon 7-B6-1; Mabtech). Las placas se incubaron durante 2 h a 37 °C, después se lavaron 6 veces. Finalmente, se revelaron las manchas de las células secretoras de IFN- γ incubando secuencialmente los pocillos con soluciones de Vectastain ABC y 3-amino-9-etil carbazol (AEC). Las manchas se contaron mediante un lector de análisis de imágenes asistido por ordenador (Zeiss KS ELISPOT Reader).

Análisis de datos y criterios de aceptación. La media y la desviación típica (DT) de las manchas en pocillos replicados se calcularon en todos los ensayos transfiriendo los datos sin procesar de ELISPOT de cada experimento a un programa informático basado en Excel. Las respuestas positivas de linfocitos T inducidas por vacuna se determinaron de acuerdo con los criterios descritos a continuación.

Los criterios de aceptación para la respuesta de linfocitos T específica inducida por péptido a través de linfocitos T de memoria centrales: Los criterios positivos para respuestas CTL usados en el ensayo en fase 2 fueron idénticos a los criterios de los ensayos en fase 1/2 que se establecieron prospectivamente después de analizar la variabilidad de las respuestas antes del tratamiento en pacientes contra cada epítipo de la vacuna y el epítipo de control de VHB irrelevante. Una respuesta positiva CTL/T de memoria inducida por péptido a un epítipo dado cumplía todas las siguientes condiciones: 1) era mayor de 5 SFC por encima de la respuesta al epítipo irrelevante, 2) era mayor que las SFC medias de la respuesta al epítipo irrelevante, más 2 DT, y 3) era dos veces mayor que la respuesta de SFC en la muestra antes de la vacunación del mismo paciente, más 2 DT. La inclusión de "más dos desviaciones típicas" se usó para adaptar la variabilidad del ensayo y sirvió para aumentar la rigurosidad de los criterios.

Los criterios para una respuesta HTL positiva al epítipo PADRE HTL, medido sin expansión previa de PBMC, fueron como sigue: 1) una respuesta específica de PADRE >5 SFC netas por 2×10^5 células después de restar el fondo; 2) para cada muestra ensayada en réplicas de 6 pocillos, un valor de p en ensayo de la $t < 0,05$ en comparación con las SFC de pocillos estimulados con el péptido del paludismo de unión a HLA-DR irrelevante frente a los pocillos estimulados con el péptido PADRE; y 3) un valor de p en ensayo de la $t < 0,05$ en comparación con las SFC inducidas por estimulación con el péptido PADRE en las muestras antes frente a después de la vacunación. Los tres criterios tenían que cumplirse antes de que una respuesta HTL se considerara inducida por la vacunación con OSE-2101.

Resultados

Inclusión de pacientes y criterios de supervisión inmunitaria. Un total de 64 pacientes HLA-A2+ con NSCLC en estado IIIB, IV o recidivante en el ensayo en fase 2 se trataron con al menos una dosis de OSE-2101. Treinta y tres pacientes completaron la fase inicial del estudio que consiste en seis dosis de OSE-2101 administradas a intervalos de 3 semanas y se supervisaron para respuestas de linfocitos T/linfocitos T de memoria inducidas por epítipos. Los resultados para los ensayos de esta cohorte de pacientes se describen a continuación con una atención particular sobre la respuesta inicial en W9 (después de 3 inyecciones) y W18 (después de 6 inyecciones). La amplitud de las respuestas CTL/de linfocitos T de memoria centrales inducidas en cada uno de los 11 primeros pacientes y el perfil de inmunogenia de los epítipos individuales de la vacuna fueron muy similares a los ensayos en fase 1/2 en pacientes con NSCLC y cáncer de colon en estadio inicial con menos carga de enfermedad.

La mayoría de las respuestas CTL efectoras/de linfocitos T de memoria centrales en pacientes tratados se indujeron durante la fase de tratamiento inicial de 3 a 6 dosis/18 semanas y sorprendentemente tan pronto como después de 3 semanas (3 dosis). Preferiblemente, las respuestas CTL/de linfocitos T de memoria centrales inducidas durante este

periodo, incluyendo las dirigidas a epítomos naturales, tienen que mantenerse mediante refuerzo continuado con inyecciones subcutáneas de OSE-2101 a intervalos de 2-3 meses.

5 Para los 22 pacientes restantes que pueden someterse a leucocitaféresis y ensayo de inmunogenia, los datos globales indicaron que la supervisión de las muestras contra cinco de los epítomos más inmunogénicamente relevantes en el producto (CEA.24V9 (SEQ ID No 3), CEA.605D6 (SEQ ID No 9), HER2.369V2V9 (SEQ ID No 4), MAGE3.112I5 (SEQ ID No 8) y MAGE2.157 (SEQ ID No 2)) fue suficiente para determinar la inmunogenia de linfocitos T y linfocitos T de memoria centrales. Los puntos temporales clínicos seleccionados para ensayo discontinuo fueron los puntos temporales de pretratamiento, la semana 9, la semana 18 y la semana 30 ya que la mayoría de respuestas CTL/de linfocitos T de memoria centrales observadas entre los primeros 11 pacientes que se ensayaron indicaron que se inducían ya en la semana 9 y semana 18 y algunas se mantenían en la semana 30.

15 La inmunogenia de OSE 2101 fue similar en pacientes avanzados en fase 2 (pacientes con NSCLC HLA A2 positivos en estadio avanzado invasivo o metastásico y después de ineficacia de al menos la primera línea de tratamiento) a la observada previamente en los dos ensayos en fase 1/ 2 en términos de la amplitud global de respuestas CTL+/de linfocitos T de memoria centrales inducidas en pacientes y el nivel de inmunogenia de los epítomos individuales, conformando, por tanto, la potencia global del producto en diferentes poblaciones de pacientes. Las respuestas CTL+/de linfocitos T de memoria centrales multiépítópicas, definidas por respuestas a al menos 3 de 5 epítomos inmunógenos representativos en el tratamiento con OSE-2101, se observaron en 22 de los 33 pacientes (67 %) que se supervisaron en el ensayo en fase 2 y se consiguieron tan pronto como en la semana 9.

Tabla 2

Antígeno	Epítopo	semana 9		semana 18		semana 30		mes 9		mes 12	
			%		%		%		%		%
CEA	CEA24-ANA	13/33	39%	10/32	31%	9/23	28%	4/7	57%	2/4	50%
	CEA24-WT	12/33	36%	7/32	22%	5/23	22%	2/7	29%	1/4	0%
	CEA605-ANA	9/33	27%	10/32	31%	8/23	35%	1/7	14%	1/4	25%
	CEA605-WT	10/33	30%	5/32	16%	8/23	35%	1/7	14%	0/4	0%
CEA691-ANA	CEA691-ANA	7/11	64%	10/11	91%	2/6	33%	3/7	43%	2/4	50%
	CEA691-WT	0/11	0%	0/11	0%	0/6	0%	0/7	0%	0/4	0%
HER2	HER2.369-ANA	14/33	42%	14/32	44%	13/23	57%	2/7	29%	2/4	50%
	HER2.369-WT	11/33	33%	9/32	28%	10/23	43%	2/7	29%	2/4	50%
MAGE	HER2-689-WT	4/11	36%	3/11	27%	0/6	0%	0/7	0%	0/4	0%
	MAGE2.157-WT	9/33	27%	9/32	28%	10/23	43%	4/7	57%	2/4	50%
	MAGE3.112-ANA	10/33	30%	8/32	25%	10/23	43%	0/7	0%	0/4	0%
p53	MAGE3.112-WT	10/33	30%	3/32	9%	5/23	22%	0/7	0%	0/4	0%
	p53.139-ANA	6/11	55%	4/11	36%	3/6	50%	2/7	29%	2/4	50%
	p53.139-WT	2/11	18%	1/11	9%	0/6	0%	0/7	0%	0/4	0%
	p53.149-ANA	1/11	9%	0/11	0%	0/6	0%	0/7	0%	0/4	0%
p53.149-WT	0/11	0%	1/11	9%	0/6	0%	0/7	0%	0/4	0%	

ANA= péptido análogo, WT= péptido natural

25 Los 11 primeros pacientes se ensayaron con los 9 epítomos peptídicos y los 22 pacientes restante se ensayaron con 5 epítomos peptídicos compartidos (CEA24 (SEQ ID No 3), CEA605 (SEQ ID No 9), HER2.369 (SEQ ID No 4), MAGE2.157 (SEQ ID No 2) y MAGE3.112 (SEQ ID No 8)). Los resultados se muestran también en la figura 2.

30 La respuesta W9 inicial estuvo al mismo nivel que la respuesta W18 y la respuesta a largo plazo aún estaba presente en un año para pacientes capaces de recibir leucocitaféresis. La respuesta a largo plazo se mantuvo a través de inyecciones aditivas.

35 Las respuestas HTL se midieron a partir de PBMC sin una etapa de expansión *in vitro* mediante Elispot convencional. Se descongelaron PBMC, se tuvieron en reposo durante una noche en medio y se estimularon 2×10^5 PBMC/pocillo con 10 µg/ml de epítopo Pan DR (HTL) o péptido de paludismo irrelevante en el ensayo ELISPOT con interferón gamma.

40 Los linfocitos T auxiliares productores de IFN-γ contra PADRE se detectaron en 18 de 33 pacientes ensayados (55 %), sin expansión *in vitro* a corto plazo de los PBMC con péptido y estuvieron en el mismo intervalo en la semana 9 o semana 18, lo que demuestra una respuesta HTL inicial a la combinación de epítomos.

Entonces, existe una correlación entre las respuestas HTL contra PADRE inducidas por OSE-2101 y las respuestas CTL/de linfocitos T de memoria centrales (figuras 3). El coeficiente de correlación para este análisis es 0,405.

45 **Ejemplo 3: impacto sobre el tiempo hasta la progresión (TTP) a través de implicación de linfocitos T de memoria iniciales**

Resultados de TTP de la combinación de péptidos cortos en NSCLC avanzado después de al menos ineficacia de la primera línea (informe interno de datos de OSE 2101 en fase 2). Clínicamente en oncología, la presencia

de altos niveles de linfocitos T de memoria infiltrantes, evaluados inmunohistoquímicamente, se correlacionó con la ausencia de signos de invasión metastásica inicial, un estadio patológico menos avanzado, y supervivencia aumentada en 959 muestras de cáncer colorrectal resecado (Pages, F *et al.*, 2005, N Engl J Med; 353:2654-2666). El TTP es interesante como punto equivalente coherente correlacionado con linfocitos T de memoria efectores para supervivencia a largo plazo y sin enfermedad.

Sesenta y tres (63) pacientes que eran HLA-A2 y recibieron OSE-2101 se incluyeron en el análisis de tiempo hasta la progresión (TTP). Veintiocho (28) pacientes habían documentado progresión de la enfermedad. Usando el estimador de Kaplan-Meier, se determinó la mediana del tiempo hasta la progresión en 285 días.

La mediana del tiempo hasta la progresión (mediana de TTP) después de la combinación de péptidos cortos OSE-2101 fue 285 días o 9,4 meses (DT 86 días). Este punto clínico importante está relacionado con la estimulación inicial de linfocitos T citotóxicos CD8+ de memoria efectores (el TTP se define como el tiempo desde la asignación aleatoria hasta la progresión del tumor objetivo; el TTP no incluye muertes. PFS se define como el tiempo desde la asignación aleatoria hasta la progresión del tumor objetivo o muerte).

En el mismo tipo de población con NSCLC avanzado (invasivo o metastásico) y después de ineficacia de al menos la primera línea (tratamiento de segunda línea), la supervivencia sin progresión (PFS) se describió en 2,2 meses con un inhibidor de tirosina cinasa como erlotinib (Shepherd FA, *et al.*, 2005, N Engl J Med., 353, 123-132).

Dos agentes quimioterápicos, docetaxel y pemetrexed, y erlotinib están aprobados actualmente para el tratamiento de segunda línea de pacientes con NSCLC. El TTP observado en los dos ensayos clínicos en fase 3 para docetaxel fue entre 10,6 y 26 semanas. A partir de los resultados de pemetrexed en fase 3, la mediana de PFS fue 2,9 meses (M A Bareschino; J Thorac Dis 2011; 3:122-133). La mediana de PFS fue 3,5 meses en el estudio en fase 3 de nivolumab en NSCLC escamocelular (Julie Brahmer, *et al.*, 2015, New England Journal of Medicine 31 de mayo).

Los resultados iniciales inesperados de inducción de CTL a través de inducción de linfocitos T de memoria centrales mediante secuencias epitópicas cortas de antígenos tumorales de la vacuna OSE-2101, establecen la utilidad clínica de la combinación de epítomos como inmunoterapia específica T contra el cáncer y es de particular interés para respuesta inmunitarias de memoria T a corto plazo que proporcionan eficacia a largo plazo en pacientes con cáncer con mal pronóstico.

Ejemplo 4. Resultados en pacientes con cáncer avanzado con efusión pleural maligna (MPE).

Los pacientes presentan una MPE como una complicación de cáncer muy avanzado o como la manifestación inicial de una neoplasia maligna subyacente. Los tipos comunes de cáncer que provocan MPE incluyen linfomas, mesoteliomas y carcinomas de mama, pulmón, sistema gastrointestinal y ovarios. La incidencia anual de efusiones pleurales malignas en los Estados Unidos se estima en más de 150 000 casos. Las curvas de supervivencia para más de 8000 pacientes con cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC) con efusión pleural (es decir, estadio IIIB) a partir de la base de datos SEER mostraron que la supervivencia a largo plazo es inusual en este grupo. La mediana del tiempo de supervivencia es aproximadamente 3 meses. La efusión pleural restringe la ventilación y provoca disnea progresiva por compresión del tejido pulmonar, así como movimiento paradójico del diafragma invertido. Los depósitos pleurales de tumor provocan dolor pleural.

Las efusiones pleurales se producen más normalmente en pacientes con tumores en estadio avanzado, que frecuentemente tienen metástasis al cerebro, el hueso y otros órganos; deficiencias fisiológicas; desnutrición; debilitamiento; y otras comorbilidades. A causa de estas numerosas variables clínicas y patológicas, es difícil realizar ensayos prospectivos en pacientes con efusiones pleurales. Por la misma razón, a menudo es difícil predecir un posible desenlace del tratamiento o la duración prevista de supervivencia para el paciente específico con múltiples problemas clínicos interrelacionados. La efusión pleural fue en primer síntoma de cáncer en un 41 % de 209 pacientes con efusión pleural maligna; el cáncer pulmonar en hombres (42 %) y el cáncer de ovario en mujeres (27 %) fueron los más comunes.

La descubrimiento de células malignas en el líquido pleural y/o la pleura parietal implica enfermedad diseminada o avanzada y una esperanza de vida reducida en pacientes con cáncer.

Para entender la función de los linfocitos T de memoria centrales descubiertos en pacientes con cáncer en fase 2, los autores de la invención han analizado retrospectivamente un subgrupo de pacientes que presentan efusión pleural maligna. El estudio se diseñó para evaluar la seguridad, eficacia (respuesta y supervivencia) e inmunogenia de OSE-2101 en pacientes con NSCLC avanzado (estadio IIIB y IV) que eran HLA-A2 positivos. La combinación multiepitópica se administró por vía subcutánea a una dosis de 5 mg cada 3 semanas durante las primeras 15 semanas, después cada 2 meses durante el año 1, después trimestralmente durante el año 2.

Un subgrupo de 5 pacientes presentaba efusión pleural, 2 pacientes tenían NSCLC en estadio IIIB y 3 pacientes tenían NSCLC en estadio IV metastásico.

De acuerdo con las publicaciones, los pacientes con efusiones pleurales malignas (MPE) presentan un pronóstico grave con neoplasias malignas intratorácicas y extratorácicas. La mediana de supervivencia después del diagnóstico de una MPE es entre 3-4 meses. Se supuso que estos pacientes tenían peor tiempo de supervivencia y, por tanto, se supuso que serían los primeros en morir, en breve en el estudio.

5 Estos 5 pacientes con MPE consiguieron, después de recibir la inmunoterapia específica T OSE-2101, un largo tiempo sin progresión y también una supervivencia a muy largo plazo.

Tabla 4A: Descripción de MPE en pacientes con NSCLC

Número de paciente	166 (centro 115) NSCLC	104 (centro 121) NSCLC	172 (centro 116) NSCLC	144 (centro 217) NSCLC	170 (centro 217) NSCLC
sexo	mujer	mujer	hombre	hombre	mujer
edad	58 años	73 años	88 años	55 años	45 años
Origen étnico	Asiático	Caucásico	Caucásico	Caucásico	Afroamericano
Estadio de NSCLC	IIIB	IIIB	IV	IV	IV
MPE	Efusión pleural más efusión pericárdica	Efusión pleural	Efusión pleural	Efusión pleural	Efusión pleural
Tratamientos previos	Pericardiocentesis Radioterapia torácica (10300 cGY) y 1 línea de quimioterapia con carboplatino + paclitaxel	Toracentesis Radioterapia torácica (70,2 CGY) y 1 línea de quimioterapia con carboplatino + paclitaxel	Radioterapia torácica (5940 GY) y 1 línea de quimioterapia con cisplatino + VP16	Radioterapia torácica (5040 CY) y 4 líneas de quimioterapia con carboplatino +paclitaxel Tarceva Topotecán Alimta	Toracentesis y 3 líneas de carboplatino + paclitaxel +gemzar fármaco en investigación TRM 1; Tarceva

10

Tabla 4B: Tiempo hasta la progresión - supervivencia OS - número de inyecciones

Número de paciente	166 NSCLC	121 NSCLC	172 NSCLC	144 NSCLC	170 NSCLC
OS	20 meses	19 meses	18 meses	6 meses	26 meses
Tiempo hasta la progresión	Enfermedad estable llocalizable a los 20 meses	19 meses	6 meses	5 meses	3 meses
Respuestas CTL + de linfocitos T de memoria centrales	CTL+/T de memoria centrales frente a 4 epítosos	CTL+/T de memoria centrales frente a 4 epítosos	CTL+/T de memoria centrales frente a 4 epítosos	No realizado	No realizado
Número de inyecciones	3+9	3+7	3+6	3+2	3

15 El tiempo hasta la progresión conseguir en dicha población de MPE de mal pronóstico fue impactante con una mediana de más de 6 meses (de 3 a 20 meses). La mediana de supervivencia conseguida es de 18 meses (de 6 a 26 meses). Estos resultados clínicos a largo plazo están relacionados con una sensibilización inicial de 3 inyecciones a través de la implicación inicial de los linfocitos T de memoria centrales que reclutan linfocitos T CD8+ efectores. Además, 3 pacientes de 5 presentan fuertes respuestas positivas frente a 4 epítosos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos para su uso en el tratamiento de un cáncer de un paciente positivo a antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), en donde la composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos comprende los péptidos aKXVAAWTLKAAa (SEQ ID No 10), indicando X y a respectivamente ciclohexilalanina y d-alanina, RLLQETELV (SEQ ID No 1), YLQLVFGIEV (SEQ ID No 2), LLTFWNPPV (SEQ ID No 3), KVFGSLAFV (SEQ ID No 4), KLBPVQLWV (SEQ ID No 5), indicando B ácido α -aminoisobutírico, SMPPPGRV (SEQ ID No 6), IMIGHLVGV (SEQ ID No 7), KVAEIVHFL (SEQ ID No 8) e YLSGADLNL (SEQ ID No 9), y en donde dicho tratamiento comprende un periodo de sensibilización que consiste en tres administraciones de dicha composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos, a una administración cada una a cuatro semanas, induciendo de ese modo una respuesta de linfocitos T de memoria centrales, en donde, en dicho tratamiento, el periodo de sensibilización va seguido de un periodo de mantenimiento durante el que la administración de dicha composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos se produce cada dos a ocho meses, preferiblemente cada dos a tres meses, más preferiblemente cada dos meses durante un año y después cada tres meses durante un año.
2. Una composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos para su uso en el tratamiento de un cáncer de un paciente positivo a antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), en donde la composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos comprende los péptidos aKXVAAWTLKAAa (SEQ ID No 10), indicando X y a respectivamente ciclohexilalanina y d-alanina, RLLQETELV (SEQ ID No 1), YLQLVFGIEV (SEQ ID No 2), LLTFWNPPV (SEQ ID No 3), KVFGSLAFV (SEQ ID No 4), KLBPVQLWV (SEQ ID No 5), indicando B ácido α -aminoisobutírico, SMPPPGRV (SEQ ID No 6), IMIGHLVGV (SEQ ID No 7), KVAEIVHFL (SEQ ID No 8) e YLSGADLNL (SEQ ID No 9), y en donde dicho tratamiento consiste en un periodo de sensibilización que consiste en tres administraciones de dicha composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos, a una administración cada una a cuatro semanas, induciendo de ese modo una respuesta de linfocitos T de memoria centrales.
3. La composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde, en dicho periodo de sensibilización, la composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos se administra cada dos a tres semanas, más preferiblemente cada 3 semanas.
4. La composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer pulmonar tales como NSCLC (cáncer pulmonar no microcítico) y cáncer pulmonar microcítico, melanoma, mesotelioma, cánceres de mama, cáncer cerebral primario, cáncer de ovario, carcinoma uterino, especialmente carcinoma del cuerpo uterino y/o cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon o colorrectal, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, sarcoma, tumores de células germinales, leucemia, linfoma, cánceres testiculares y cánceres de vejiga, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en NSCLC, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de ovario y un cáncer de la cabeza y/o el cuello, más preferiblemente NSCLC.
5. La composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho paciente padece un cáncer avanzado o en estadio tardío, preferiblemente metástasis, especialmente metástasis cerebral.
6. La composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho paciente tiene una efusión pleural maligna.
7. La composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho paciente es HTL (linfocitos T auxiliares) positivo.
8. La composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos se administra por vía parenteral, preferiblemente por vía subcutánea.
9. La composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde los péptidos se emulsionan en adyuvante incompleto de Freund, preferiblemente Montanide ISA-51.
10. La composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde cada péptido de la composición está presente a una concentración de 0,1 mg/ml a 1 mg/ml, preferiblemente 0,5 mg/ml, y/o en donde la dosis total de péptidos para cada inyección es 5,0 mg.
11. La composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho paciente ya ha recibido varias líneas de tratamiento antes del tratamiento con la composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos.

12. La composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho tratamiento se usa en combinación con un tratamiento con otro fármaco antitumoral y/o con radioterapia.
- 5 13. La composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicho tratamiento se usa en combinación con un tratamiento con un inhibidor del punto de control, preferiblemente inhibidor de CTLA-4 y/o PD-1/PD-L1, tal como pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, BMS936559, MEDI4736, AMP-224, AMP-514 MPDL3280A y avelumab.
- 10 14. La composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde dicho cáncer es un cáncer pulmonar, preferiblemente NSCLC.
- 15 15. La composición de inmunoterapia específica T de péptidos terapéuticos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde dicho cáncer es cáncer de colon.

Figura 1

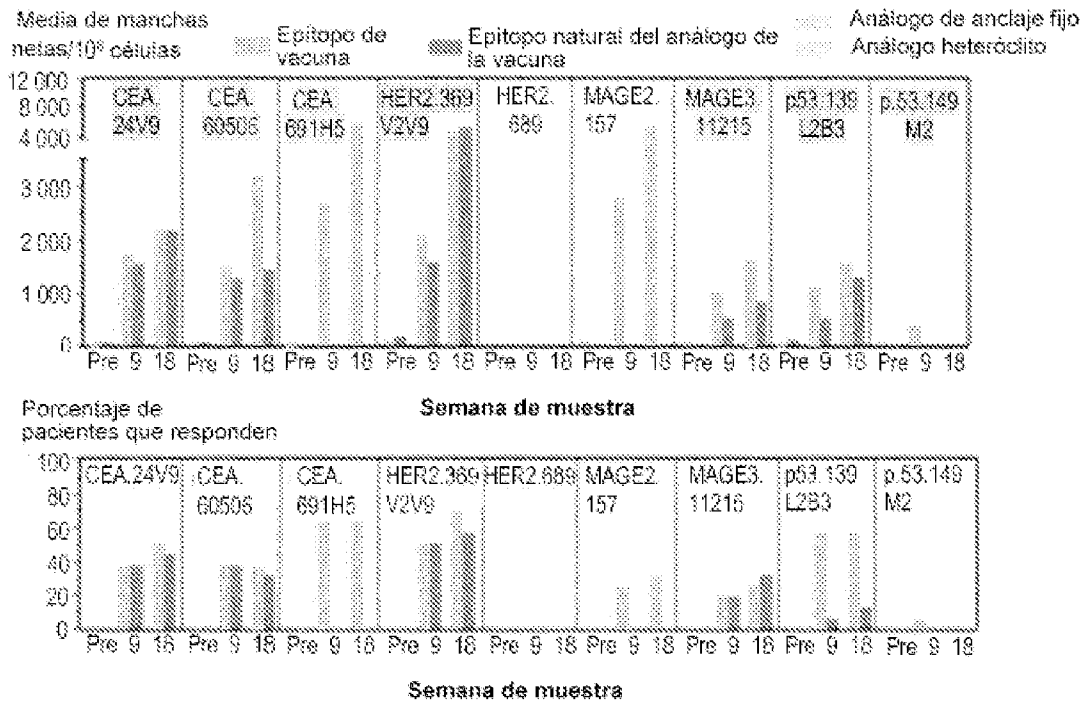


FIGURA 2

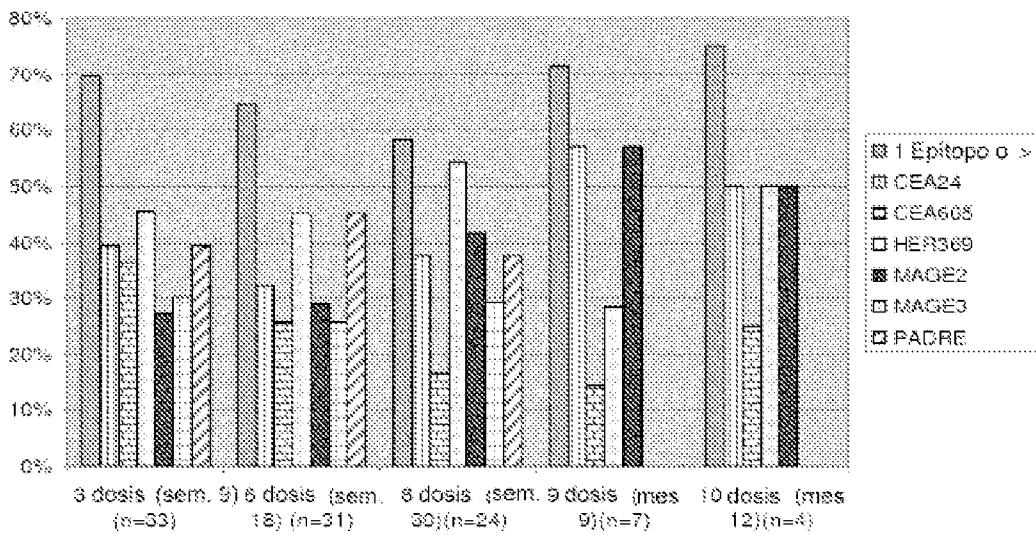


FIGURA 3

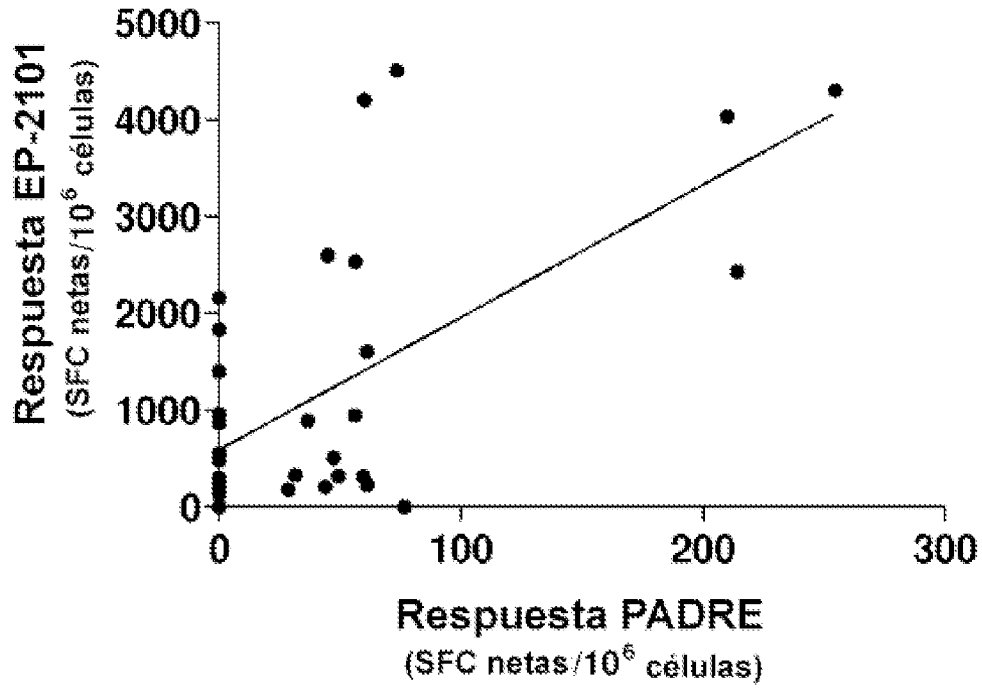


FIGURA 4

Estimación de Kaplan-Meier de TTP

