

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 851 451**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2015 PCT/US2015/029885**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2015 WO15175340**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2015 E 15724454 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2020 EP 3142689**

54 Título: **Terapia de combinación para tratar cáncer con un poxvirus que expresa un antígeno de tumor y un anticuerpo monoclonal contra TIM-3**

30 Prioridad:

13.05.2014 US 201461992771 P

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

07.09.2021

73 Titular/es:

BAVARIAN NORDIC A/S (100.0%)

Hejreskovvej 10A

3490 Kvistgaard, DK

72 Inventor/es:

FOY, SUSAN;

MANDL, STEFANIE y

ROUNTREE, RYAN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 851 451 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

Terapia de combinación para tratar cáncer con un poxvirus que expresa un antígeno de tumor y un anticuerpo monoclonal contra TIM-3

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención se refiere al tratamiento de cánceres usando poxvirus que codifican un antígeno asociado a tumor en combinación con uno o más antagonistas de la molécula de punto de control inmunitario TIM-3.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Se han usado poxvirus recombinantes como vacunas para un organismo infeccioso y, más recientemente, para tumores. Mastrangelo et al. J Clin Invest. 2000; 105 (8): 1031-1034. Se ha mostrado que dos de estos grupos de poxvirus, los avipoxvirus y los orthopoxvirus, son eficaces en luchar contra tumores y están relacionados con posibles tratamientos antineoplásicos. Ídem.

- 15 Se ha mostrado que una especie de avipoxvirus a modo de ejemplo, la viruela aviar, es un vehículo seguro para administraciones humanas, ya que el virus de la viruela aviar entra en las células de mamífero y expresa proteínas, pero se duplica abortivamente. Skinner et al., Expert Rev Vaccines. 2005 Feb;4(1):63-76. El uso de virus de la viruela aviar como vehículo para la expresión está siendo evaluado en numerosos ensayos clínicos de vacunas contra el cáncer, la malaria, la tuberculosis y el SIDA. Ídem.

- 20 La variolovacuna, la especie mejor conocida de los orthopoxvirus, se usó en la erradicación mundial de la viruela y ha mostrado su utilidad como un vector y/o vacuna. Se han diseñado vectores de la variolovacuna recombinantes para expresar una amplia variedad de genes insertados, que incluyen varios genes asociados a tumores, tales como p97, HER-2/neu, p53 y ETA (Paoletti et al., 1993).

- 25 Una cepa útil de orthopoxvirus es el virus modificado de la variolovacuna de Ankara (MVA). MVA se generó por 516 pases en serie en fibroblastos de embrión de pollo de la cepa de la variolovacuna de Ankara (CVA) (para una revisión véase Mayr, A. et al., Infection 3, 6-14 (1975)). Como consecuencia de estos pases a largo plazo, el genoma del virus MVA resultante tuvo aproximadamente 31 kilobases delecionadas de su secuencia genómica y, por tanto, se describió como altamente restringido a las células hospedadoras para la replicación en células aviarias (Meyer, H. et al., J. Gen. Virol. 72, 1031-1038 (1991)). Se mostró en una variedad de modelos animales que el MVA resultante era significativamente avirulento (Mayr, A. & Danner, K., Dev. Biol. Stand. 41: 225-34 (1978)). Además, esta cepa de MVA se ha probado en ensayos clínicos como una vacuna para inmunizar contra la enfermedad de la viruela humana (Mayr et al., Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Org. B 167, 375-390 (1987); Stickl et al., Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392 (1974)). Estos estudios involucraron a más de 120.000 seres humanos, que incluyeron pacientes de alto riesgo, y demostraron que, en comparación con las vacunas basadas en la variolovacuna, MVA tenía un perfil de seguridad mejorado con virulencia reducida, mientras se mantiene la capacidad para inducir una respuesta inmunitaria fuerte y específica.

En las siguientes décadas, MVA se manipuló para su uso como un vector viral para la expresión génica recombinante o como una vacuna recombinante (Sutter, G. et al., Vaccine 12: 1032-40 (1994)).

- 35 Aún cuando Mayr et al. demostraron durante los años 70 que MVA se atenúa altamente y es avirulento en seres humanos y mamíferos, ciertos investigadores han informado que MVA no se atenúa completamente en líneas celulares de mamífero y humanas puesto que la replicación residual podría ocurrir en estas células (Blanchard et al., J Gen Virol 79, 1159-1167 (1998); Carroll & Moss, Virology 238, 198-211 (1997); Altenberger, patente de EE. UU. Nº 5.185.146; Ambrosini et al., J Neurosci Res 55(5), 569 (1999)). Se asume que los resultados informados en estas publicaciones han sido obtenidos con diversas cepas de MVA conocidas, puesto que los virus usados se diferencian esencialmente en sus propiedades, particularmente en su comportamiento de crecimiento en diversas líneas celulares. Dicha replicación residual no es deseable por diversos motivos, que incluyen cuestiones de seguridad a propósito de su uso en seres humanos.

- 45 Se han descrito cepas de MVA que tienen perfiles de seguridad potenciados para el desarrollo de productos más seguros, tales como vacunas o productos farmacéuticos. Véase la publicación internacional PCT WO2002042480 (véanse también, por ejemplo, las patentes de EE. UU. Nº 6.761.893 y 6.913.752). Dichas cepas son capaces de replicación reproductiva en células no humanas y líneas celulares, especialmente en fibroblastos de embrión de pollo (CEF), pero no son capaces de replicación reproductiva significativa en ciertas líneas celulares humanas que se sabe que permiten la replicación con cepas conocidas de la variolovacuna. Dichas líneas celulares incluyen una línea celular de queratinocitos humanos, HaCat (Boukamp et al., J Cell Biol 106(3): 761-71 (1988)), una línea celular de adenocarcinoma de cuello uterino humano, HeLa (ATCC Nº CCL-2), una línea celular de riñón de embrión humano, 293 (ECACC Nº 85120602) y una línea celular de osteosarcoma de hueso humano, 143B (ECACC Nº 91112502). Dichas cepas tampoco son capaces de replicación reproductiva significativa *in vivo*, por ejemplo, en ciertas cepas de ratón, tales como el modelo de ratón transgénico AGR 129, que está intensamente inmunocomprometido y es altamente susceptible a un virus replicante. Véanse las patentes de EE. UU. Nº 6.761.893. Se ha descrito dicha cepa de MVA y sus derivados y recombinantes, denominados "MVA-BN". Véase la publicación internacional PCT WO2002042480 (véanse también, por ejemplo, las patentes de EE. UU. Nº 6.761.893 y 6.913.752). Se han

manipulado MVA y MVA-BN para su uso como un vector viral para la expresión génica recombinante o como una vacuna recombinante. Véanse, por ejemplo, Sutter, G. et al., Vaccine 12: 1032-40 (1994), publicación internacional PCT WO2002042480 (véanse también, por ejemplo, las patentes de EE. UU. Nº 6.761.893 y 6.913.752).

5 Ciertos enfoques para la quimioterapia contra el cáncer han incluido la vacunación con antígenos asociados a tumor. En ciertos casos, dichos enfoques han incluido el uso de un sistema de administración para promover respuestas inmunitarias de hospedador a los antígenos asociados a tumor. En ciertos casos, dichos sistemas de administración han incluido vectores virales recombinantes. Véase, por ejemplo, Harrop et al., Front. Biosci. 11:804-817 (2006); Arlen et al., Semin. Oncol. 32:549-555 (2005); Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (supl. 2):14567-14571 (2004).

10 HER-2 es un antígeno asociado a tumor que se expresa por incremento en células tumorales de varios pacientes con cáncer. Se ha usado la inmunización con diversos polipéptidos HER-2 para generar una respuesta inmunitaria contra células tumorales que expresan este antígeno. Véase, por ejemplo, Renard et al., J. Immunology 171:1588-1595 (2003); Mittendorf et al., Cancer 106:2309-2317 (2006).

15 Se ha mostrado que un MVA que codifica un antígeno de HER-2, MVA-BN-HER2, ejerce una potente eficacia antitumoral en un modelo murino de metástasis pulmonar experimental, a pesar de un fuerte entorno inmunosupresor mediado por tumor caracterizado por una alta frecuencia de linfocitos T reguladores (T_{reg}) en los pulmones. Mandl et al., Cancer Immunol Immunother (2012) 61:19-29. Se informó que MVA recombinante inducía anticuerpo específico de HER-2 fuertemente dominado por Th1 y respuestas de linfocitos T. Ídem. La actividad antitumoral se caracterizó por un aumento de la infiltración de pulmones con linfocitos T CD8+CD11c+ altamente activados, específicos de HER-2, y se acompañó de una disminución en la frecuencia de linfocitos T_{reg} en el pulmón, dando como resultado una
20 relación significativamente elevada entre linfocitos T efectores y linfocitos T_{reg}. Ídem.

También se ha mostrado que MVA-BN-HER2 es seguro y rompe la tolerancia para inducir respuestas específicas de linfocitos T y B en estudios clínicos humanos en un entorno metastásico. Guardino et al., Cancer Research: 15 de diciembre de 2009; volumen 69, número 24, suplemento 3.

25 Trastuzumab (Herceptin) es un anticuerpo monoclonal humanizado (mAb) que se dirige al dominio extracelular de HER2, y ha mostrado eficacia clínica en cáncer de mama HER2-positivo. Wang et al., Cancer Res. 1 de septiembre de 2012; 72(17): 4417-4428. Sin embargo, un número significativo de pacientes dejan de responder al tratamiento inicial con trastuzumab y muchos tumores sensibles a trastuzumab desarrollan resistencia después del tratamiento continuo. Ídem.

30 Los receptores inhibidores en células inmunitarias son reguladores clave del escape inmunitario en el cáncer. Woo et al., Cancer Res; 72(4); 917-27, 2011. Entre estos receptores inhibidores, TIM-3 (dominio de inmunoglobulina de linfocitos T y dominio 3 de mucina) es una molécula selectivamente expresada en un subconjunto de linfocitos T cooperadores 1 (Th1) secretores de IFN-gamma humana y se conoce que regula la inmunidad de Th1 y la tolerancia *in vivo*. Hastings et al. Eur J Immunol. 2009 Sep;39(9):2492-501.

35 TIM-3 es una molécula de punto de control inmunitario, que se ha asociado a la inhibición de la actividad de linfocitos y en algunos casos la inducción de anergia de linfocitos. Pardoll D. Nature Reviews Abril de 2012 Vol. 12: 252. TIM-3 es un receptor para galectina 9 (galectina que se regula por incremento en diversos tipos de cánceres, que incluyen cánceres de mama. Ídem. Se ha mostrado que los anticuerpos anti-TIM-3 promueven la inmunidad antitumoral medida por IFN-γ de linfocitos T y suprimen los tumores establecidos. Ngiow et al. (2011) Cancer Res. 71: 3540-3551; Ngiow et al. (2011) Cancer Res. 71: 6567-6571. Baghdadi et al. (2013) Cancer Immunol. Immunother. 62: 629-37 desvelaron la administración de un anticuerpo monoclonal contra TIM-3 en combinación con células de melanoma B16 irradiadas para expresar el gen de ligando flt3, pero no se desveló la combinación con vacunas virales.

40 El estado de la técnica también incluye Chakraborty et al. (2007) Cancer Immunol. Immunother. 56: 1471-84, que desvela vacunas que comprenden vectores de poxvirus que expresan un AAT para su uso en un método de tratamiento de cáncer junto con un bloqueador del punto de control inmunitario que era un anticuerpo monoclonal contra CTLA-4, y una primovacuna contra la variolovacuna-refuerzo contra la viruela aviar para su uso en un método de
45 tratamiento antineoplásico. Sin embargo, no se desveló combinación con un bloqueador del punto de control de anti-TIM-3.

Existe claramente una necesidad médica sustancial sin cumplir para tratamientos del cáncer adicionales, que incluyen inmunoterapias activas y vacunas para el cáncer como las descritas en el presente documento.

50 BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La invención engloba composiciones para tratar pacientes humanos con cáncer. En una realización, la invención incluye una combinación para su uso en el tratamiento de un paciente humano con cáncer que comprende: (a) un poxvirus recombinante que codifica un polipéptido que comprende al menos un antígeno asociado a tumor (AAT); y (b) un antagonista de TIM-3 que es un anticuerpo, un ARN antisentido o un ARNi.

55 En una realización preferida, el poxvirus recombinante es un orthopoxvirus recombinante o un avipoxvirus recombinante.

En una realización más preferida, el orthopoxvirus recombinante es un virus de la variolovacuna recombinante o un virus modificado recombinante de la variolovacuna de Ankara (MVA). En otra realización preferida, el orthopoxvirus recombinante es MVA-BN.

En otra realización preferida, el avipoxvirus recombinante es un virus recombinante de la viruela aviar.

- 5 En diversas realizaciones preferidas, al menos un antígeno de tumor incluye, pero no se limita a, a CEA, MUC-1, PAP, PSA, HER-2, survivina, proteína 1 relacionada con tirosina (tyrp1), proteína 2 relacionada con tirosina (tyrp2) o antígeno Brachyury.

En otras realizaciones preferidas, el antagonista de TIM-3 puede incluir un anticuerpo anti-TIM-3.

- 10 En otra realización más, los tratamientos contra el cáncer descritos en el presente documento se pueden dirigir contra cánceres tales como, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de hígado, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer colorrectal o combinaciones de los mismos.

- 15 En otra realización adicional, la presente divulgación engloba además una combinación o medicamento para su uso en el tratamiento de un paciente humano con cáncer. La combinación o el medicamento comprende un vector de poxvirus recombinante, comprendiendo el vector de poxvirus al menos un antígeno asociado a tumor (AAT); y un antagonista de TIM-3.

- 20 En otra realización más, la combinación o medicamento para su uso en el tratamiento de un paciente humano con cáncer comprende un poxvirus recombinante que codifica un polipéptido que comprende al menos un antígeno asociado a tumor (AAT) y un antagonista de TIM-3; y que comprende además un antagonista de una molécula de punto de control inmunitario seleccionada de PD-1, LAG-3, CTLA-4 o combinaciones de los mismos, en donde el antagonista es un anticuerpo, un ARN antisentido o un ARNi.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 25 Figura 1. La expresión de Tim-3 aumenta con el tratamiento de MVA-BN-HER2. Se midió la expresión de Tim-3 en ratones después del día 1 de tratamiento con MVA-BN-HER2 (1E7 unidades infecciosas, e.c.) como se describe en el Ejemplo 3. Expresión de Tim-3 después del día 1 de tratamiento con MVA-BN-HER2 en linfocitos T CD8 (A) y linfocitos T CD4 (B). Expresión de Tim-3 después del día 1 y 15 de tratamiento con tratamiento con MVA-BN-HER2 con MVA-BN-HER2 en linfocitos T CD8 (C) y linfocitos T CD4 (D).

- 30 Figura 2. Tratamiento con MVA-BN-HER2 y Tim-3. Se implantaron i.d. ratones con tumores CT26-HER-2 en el día 1 y se trataron con MVA-BN-HER2 (1E7 unidades infecciosas e.c.) y anti-Tim-3 (200 µg, i.p.) en los días 1 y 15 como se describe en el Ejemplo 4. A) Volumen tumoral promedio en ratones. B) Crecimiento tumoral individual en ratones.

Figura 3. Tratamiento con MVA-BN-HER2 y Tim-3 y anti-PD-1. Se implantaron i.d. ratones con tumores CT26-HER-2 en el día 1 y se trataron con MVA-BN-HER2 (1E7 unidades infecciosas e.c.) y anti-Tim-3 y anti-PD-1 (200 µg de cada uno, i.p.) en los días 1 y 15 como se describe en el Ejemplo 5. A) Volumen tumoral promedio en ratones. B) Crecimiento tumoral individual en ratones.

- 35 Figura 4. Tratamiento con MVA-BN-HER2 y anti-Tim-3 y anti-LAG-3. Se implantaron i.d. ratones con tumores CT26-HER-2 en el día 1 y se trataron con MVA-BN-HER2 (1E7 unidades infecciosas e.c.) y anti-Tim-3 y anti-LAG-3 (200 µg de cada uno, i.p.) en los días 1 y 15 como se describe en el Ejemplo 6. A) Volumen tumoral promedio en ratones. B) Crecimiento tumoral individual en ratones.

- 40 Figura 5. Tratamiento con MVA-BN-HER2 y anti-Tim-3 y anti-CTLA-4. Se implantaron i.d. ratones con tumores CT26-HER-2 en el día 1 y se trataron con MVA-BN-HER2 (1E7 unidades infecciosas, s.c. en la base de la cola) y anti-Tim-3 (200 µg) y anti-CTLA-4 (22 µg) en 100 µL de PBS en los días 1 y 15 como se describe en el Ejemplo 7. A) Volumen tumoral promedio en ratones. B) Crecimiento tumoral individual en ratones.

- 45 Figura 6. Terapia de combinación de PROSTVAC y anti-PD-1 en un modelo de tumor sólido E6 como se describe en el Ejemplo 9. Se trataron ratones en el día 1 con PROSTVAC-V, y los días 8 y 15 con PROSTVAC-F. Se administró anti-PD-1 en los días 1 y 15. A) Volumen tumoral promedio en ratones. B) Crecimiento tumoral individual en ratones.

Figura 7. Terapia de combinación de PROSTVAC y anti-LAG-3 en un modelo de tumor sólido E6. Se trataron ratones en el día 1 con PROSTVAC-V y los días 8 y 15 con PROSTVAC-F como se describe en el Ejemplo 10. Se administró anti-LAG-3 en los días 1 y 15. A) Volumen tumoral promedio en ratones. B) Crecimiento tumoral individual en ratones.

- 50 Figura 8. PROSTVAC en combinación con anti-PD-1 y anti-LAG-3 en un modelo de tumor sólido E6. Se trataron ratones en el día 1 con PROSTVAC-V y los días 8 y 15 con PROSTVAC-F como se describe en el Ejemplo 11. Se administraron anti-PD-1 y anti-LAG-3 en los días 1 y 15. A) Volumen tumoral promedio en ratones. B) Crecimiento tumoral individual en ratones.

Figura 9. Supervivencia global en ratones tratados con MVA-BN-CV301 y anti-PD-1 y anti-CTLA-4. Se implantaron ratones C57/BL6 hembra (edad 6-8 semanas, ~ 20 g, Simonsen Laboratories, Gilroy, CA) en el día 1 i.v. con $1,0 \times 10^6$ células MC38-MUC1 en 300 μ L de DPBS como se describe en el Ejemplo 12. Se trataron ratones con MVA-BN-CV301 (4E5 unidades infecciosas por vía subcutánea, s.c. por encima de la base de la cola) y se trataron con anti-CTLA-4 y anti-PD-1 (200 μ g de cada uno) i.p. en los días 4 y 18.

Figura 10. Se trataron ratones como se describe en el Ejemplo 13. Se ensayaron mezclas de esplenocitos para respuestas específicas de PSA por ELISPOT de IFN γ (A, B) y actividad citotóxica por citometría de flujo (% de linfocitos T CD107 $^{+}$ IFN γ^{+} CD8) (C). Se determinaron por ELISA títulos de IgG anti-PSA para cada ratón individual (D). Para ELISPOT, los gráficos muestran datos representativos de cuatro experimentos realizados independientemente.

Figura 11. Se trataron ratones como se describe en el Ejemplo 14. (A) Los diagramas de sectores se ponderan en tamaño para reflejar los números de células detectadas (se indican los números totales de CD8 específico de PSA por millón de linfocitos T debajo de cada diagrama). (B) Cantidad de producción de IFN γ en una base por célula como se mide por intensidad media de fluorescencia (IMF). Los gráficos muestran datos representativos de dos experimentos realizados independientemente.

Figura 12. Se trataron ratones como se describe en el Ejemplo 15. Se ensayaron mezclas de esplenocitos para actividad citotóxica específica del virus de la variolovacuna (VV) (paneles A y C a la izquierda) o específica de PSA (paneles A y C a la derecha) por citometría de flujo (% de linfocitos T CD107 $^{+}$ IFN γ^{+} CD8) 14 días después del último tratamiento. Los gráficos muestran datos representativos de dos experimentos realizados independientemente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Varios ensayos clínicos actuales implican terapias que emplean vectores basados en la variolovacuna, en la variolovacuna modificada de Ankara (MVA) y en la viruela aviar que se manipularon para expresar uno o más antígenos asociados a tumor (AAT). Estos vectores se usan solos o en estrategias de primovacunación-refuerzo para generar una respuesta inmunitaria activa contra una variedad de cánceres. PROSTVAC® emplea una estrategia de primovacunación-refuerzo que usa variolovacuna y viruela aviar que expresa PSA y TRICOM™ y está actualmente en un ensayo clínico global de fase III (PROSPECT) para cáncer de próstata metastásico resistente a la castración. CV301, o CV-301, emplea una estrategia heteróloga de primovacunación-refuerzo usando variolovacuna y viruela aviar que expresan antígeno MUC-1, CEA y TRICOM™ y está actualmente en un ensayo clínico de fase II para cáncer de vejiga.

MVA-BN-HER2 (Mandl et al., 2012) está en ensayos clínicos de fase I para el tratamiento de cáncer de mama HER-2 $^{+}$. Este vector recombinante deriva de la reserva de virus modificado altamente atenuado de la variolovacuna de Ankara (MVA) conocida como MVA-BN. Expresa una forma modificada de HER-2 (designada HER2) que consiste en el dominio extracelular de HER-2 que se ha manipulado para incluir dos epítopes universales de linfocitos T de la toxina tetánica (TTP2 y TTP30) para facilitar la inducción de respuestas inmunitarias eficaces contra HER-2.

Para potenciar más la eficacia antitumoral de la inmunoterapia basada en poxvirus, se combinó MVA-BN-HER2 con un anticuerpo monoclonal que bloquea la actividad de TIM-3, una proteína de punto de control inmunitario que regula por disminución la activación de linfocitos T. En el modelo de tumor CT26-HER-2, los volúmenes de tumor disminuyeron significativamente en comparación con los tumores tratados con un anticuerpo anti-TIM-3 solo y MVA-BN-HER2 solo.

Para una revisión adicional de la capacidad de antagonistas de TIM-3 para tratar pacientes con cáncer en combinación con poxvirus, se probaron MVA-BN-HER2 y anticuerpos anti-TIM-3 en combinación con antagonistas y agonistas del punto de control inmunitario adicionales. MVA-BN-HER2 y un anticuerpo anti-TIM-3 en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 produjeron una disminución en el volumen tumoral, al igual que MVA-BN-HER2 y un anticuerpo anti-TIM-3 en combinación con un anticuerpo anti-LAG-3. Además, MVA-BN-HER2 y un anticuerpo anti-TIM-3 en combinación con un anticuerpo anti-CTLA-4 produjeron una disminución en el volumen tumoral.

PROSTVAC® y MVA-BN CV-301 también se probaron cada uno en combinación con diversos anticuerpos antagonistas dirigidos contra PD-1 y LAG-3 en diversos modelos tumorales. Se encontraron combinaciones que potenciaron los efectos de PROSTVAC® y MVA-BN CV301.

Poxvirus que codifica un polipéptido que comprende un antígeno de tumor

En una realización de la invención, existe una combinación para su uso en el tratamiento de un paciente humano con cáncer que comprende un poxvirus recombinante que codifica y/o que expresa un polipéptido que comprende al menos un antígeno de tumor o tumor asociados antígeno; y al menos un antagonista de TIM-3 que es un anticuerpo, un ARN antisentido o un ARNip.

En una realización, el poxvirus recombinante que expresa un antígeno de tumor es preferentemente un orthopoxvirus tal como, pero no se limita a, un virus de la variolovacuna, un virus modificado de la variolovacuna de Ankara (MVA) o MVA-BN.

Ejemplos de cepas de virus de la variolovacuna son las cepas Temple de Heaven, Copenhagen, Paris, Budapest, Dairen, Gam, MRIVP, Per, Tashkent, TBK, Tom, Bern, Patwadangar, BIEM, B-15, Lister, EM-63, New York City Board of Health, Elstree, Ikeda y WR. Una cepa preferida del virus de la variolovacuna (VV) es la cepa Wyeth (DRYVAX) (patente de EE. UU. 7.410.644). Otra cepa preferida de VV es un virus modificado de la variolovacuna de Ankara (MVA) (Sutter, G. et al. [1994], Vaccine 12: 1032-40). Otra cepa de VV preferida es MVA-BN.

Los ejemplos de cepas de virus de MVA que son útiles en la práctica de la presente invención y que se han depositado en cumplimiento con los requisitos del Tratado de Budapest son las cepas MVA 572, depositadas en la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales (ECACC), Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, Reino Unido, con el número de depósito ECACC 94012707, el 27 de enero de 1994, y MVA 575, depositada en ECACC 00120707 el 7 de diciembre de 2000. MVA-BN, depositado el 30 de agosto de 2000 en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) con el número V00083008, y sus derivados, son cepas adicionales a modo de ejemplo.

Aunque se prefiere MVA-BN por su mayor seguridad (menos competente en la replicación), todos los MVA son adecuados para la presente invención. Según una realización de la presente invención, la cepa de MVA es MVA-BN y sus derivados. Una definición de MVA-BN y sus derivados se da en el documento de patente PCT/EP01/13628.

En una realización, la invención engloba el uso de orthopoxvirus recombinantes, preferentemente un virus de la variolovacuna (VV), VV de cepa Wyeth, ACAM 1000, ACAM 2000, un MVA, o un virus MVA-BN, para terapia del cáncer. Los orthopoxvirus recombinantes se pueden generar por inserción de secuencias heterólogas en un orthopoxvirus.

En otra realización, la invención engloba el uso de un avipoxvirus recombinante, preferentemente un virus de la viruela aviar. Los avipoxvirus recombinantes se pueden generar por inserción de secuencias heterólogas en un avipoxvirus.

En ciertas realizaciones, el orthopoxvirus comprende al menos un antígeno asociado a tumor (AAT). En una realización preferida, el AAT incluye, pero no se limita a, a CEA, MUC-1, PAP, PSA, HER-2, survivina, tyrp1, tyrp2 o antígeno Brachyury.

En realizaciones adicionales, el antígeno asociado a tumor se modifica para incluir uno o más epítopes T_H extraños. Dicho agente inmunoterapéutico antineoplásico se describe en el presente documento en un ejemplo no limitante y se denomina "MVA-BN-mHER2". Como se describe en el presente documento, dichos agentes inmunoterapéuticos antineoplásicos, que incluyen, pero no se limitan a MVA-BN-mHER2, son útiles para el tratamiento del cáncer. La invención permite el uso de dichos agentes en pautas de primovacunación/vacunación de refuerzo de seres humanos y otros mamíferos, que incluyen pacientes inmunodeprimidos; y la inducción de tanto respuestas celulares humorales como inmunitarias, tales como la inducción de una respuesta inmunitaria de Th1 en un entorno de Th2 preexistente.

En ciertas realizaciones, el MVA es MVA-BN, depositado el 30 de agosto de 2000, en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) con el número V00083008, y descrito en la publicación PCT internacional WO2002042480 (véanse también, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N° 6.761.893 y 6.913.752). Como se describe en las publicaciones de patente, MVA-BN no se replica reproductivamente en líneas celulares 293, 143B, HeLa y HaCat. En particular, MVA-BN presenta una relación de amplificación entre 0,05 y 0,2 en la línea celular de riñón de embrión humano 293. En la línea celular de osteosarcoma de hueso humano 143B, MVA-BN presenta una relación de amplificación entre 0,0 y 0,6. MVA-BN presenta una relación de amplificación entre 0,04 y 0,8 en la línea celular de adenocarcinoma de cuello uterino humano HeLa, y 0,02 y 0,8 en la línea celular de queratinocitos humanos HaCat. MVA-BN tiene una relación de amplificación entre 0,01 y 0,06 en células de riñón de mono verde africano (CV1: ATCC N° CCL-70).

La relación de amplificación de MVA-BN es superior a 1 en fibroblastos de embrión de pollo (CEF: cultivos primarios) como se describe en la publicación internacional PCT WO2002042480 (véanse también, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N° 6.761.893 y 6.913.752). El virus se puede propagar y amplificar fácilmente en cultivos primarios de CEF con una relación superior a 500.

En ciertas realizaciones, un MVA recombinante es un derivado de MVA-BN. Dichos "derivados" incluyen virus que presentan esencialmente las mismas características de replicación que la cepa depositada (ECACC N° V00083008), pero que presentan diferencias en una o más partes de su genoma. Los virus que tienen las mismas "características de replicación" que los virus depositados son virus que se replican con relaciones de amplificación similares a las de la cepa depositada en células de CEF y las líneas celulares, HeLa, HaCat y 143B; y que muestran características de replicación similares *in vivo*, como se determina, por ejemplo, en el modelo de ratón transgénico AGR129.

En ciertas realizaciones, el poxvirus es un virus de la variolovacuna recombinante que contiene secuencias de nucleótidos adicionales que son heterólogas al poxvirus. En ciertas de tales realizaciones, las secuencias heterólogas codifican epítopes que inducen una respuesta por el sistema inmunitario. Así, en ciertas realizaciones, el poxvirus recombinante pretende vacunar contra las proteínas o agentes que comprenden el epítipo. En una realización preferida, el epítipo es un antígeno asociado a tumor, preferentemente, HER-2. En una realización, el antígeno HER-2 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2.

En otras realizaciones preferidas, el epítoto es un antígeno asociado a tumor seleccionado de un antígeno tal como, pero no se limita a, CEA, MUC-1, PAP, PSA, HER-2, survivina, tyrp1, tyrp2 o Brachyury.

En ciertas realizaciones, una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un antígeno asociado a tumor descrito en el presente documento se inserta en una región no esencial del genoma del virus. En ciertas de las realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga se inserta en un sitio de delección que existe de forma natural del genoma de MVA como se describe en el documento de patente PCT/EP96/02926. Un experto en la técnica conoce métodos de inserción de secuencias heterólogas en el genoma poxviral.

En otra realización, el poxvirus recombinante que expresa un antígeno de tumor es preferentemente un avipoxvirus, tal como, pero no se limita a, un virus de la viruela aviar.

En otras realizaciones, el poxvirus recombinante que expresa un antígeno de tumor es una combinación de un virus de la variolovacuna que expresa un antígeno de tumor y un avipoxvirus, tal como viruela aviar, que expresa un antígeno de tumor.

El término "avipoxvirus" se refiere a cualquier avipoxvirus, tal como virus de la viruela aviar, virus de la viruela de los canarios, Uncopoxvirus, virus de la viruela de los minás, virus de la viruela de las palomas, virus de la viruela de los psittaciformes, virus de la viruela de las perdices, virus de la viruela de los pavos reales, virus de la viruela de los pingüinos, virus de la viruela de los gorriones, virus de la viruela de los estorninos y virus de la viruela de los pavos. Los avipoxvirus preferidos son el virus de la viruela de los canarios y el virus de la viruela aviar.

Un ejemplo de un virus de la viruela de los canarios es la cepa Rentschler. Se depositó una cepa de la viruela de los canarios purificada en placa denominada ALVAC (patente de EE. UU. Nº 5.766.598) bajo los términos del Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), número de acceso VR-2547. Otra cepa de la viruela de los canarios es la vacuna de la viruela de los canarios comercial designada LF2 CEP 524 24 10 75, disponible de Institute Merieux, Inc.

Los ejemplos de un virus de la viruela aviar son las cepas FP-1, FP-5, TROVAC (patente de EE. UU. Nº 5.766.598) y POXVAC-TC (patente de EE. UU. 7.410.644). FP-1 es una cepa de Duvette modificada para ser usada como una vacuna en pollos de un día de edad. La cepa es una cepa de vacuna del virus de la viruela aviar comercial designada O DCEP 25/CEP67/2309 Octubre de 1980 y está disponible de Institute Merieux, Inc. FP-5 es una cepa de vacuna del virus de la viruela aviar comercial de origen de embrión de pollo disponible de American Scientific Laboratories (división de Schering Corp.) Madison, Wis., licencia veterinaria de Estados Unidos Nº 165, Nº de serie 30321.

Los ejemplos de cepas del virus de la variolovacuna son las cepas Temple de Heaven, Copenhagen, Paris, Budapest, Dairen, Gam, MRIVP, Per, Tashkent, TBK, Tom, Bern, Patwadangar, BIEM, B-15, Lister, EM-63, New York City Board of Health, Elstree, Ikeda y WR. Una cepa preferida del virus de la variolovacuna (VV) es la cepa Wyeth (DRYVAX) (patente de EE. UU. 7.410.644). Otra cepa preferida de VV es un virus modificado de la variolovacuna de Ankara (MVA) (Sutter, G. et al. [1994], Vaccine 12: 1032-40). Otra cepa preferida de VV es MVA-BN.

En ciertas realizaciones, el avipoxvirus incluye al menos un antígeno asociado a tumor (AAT). En una realización preferida, el AAT incluye, pero no se limita a, un antígeno CEA, MUC-1, PAP, PSA, HER-2, survivina, tyrp1, tyrp2 o Brachyury.

En otras realizaciones, el poxvirus recombinante que expresa un antígeno de tumor es una combinación de un virus de la variolovacuna que expresa un antígeno de tumor y un avipoxvirus, tal como viruela aviar, que expresa un antígeno de tumor. Se contempla que la combinación de virus de la variolovacuna y virus de la viruela aviar se puede administrar como una pauta heteróloga de primovacunación-refuerzo. En un ejemplo no limitante, la pauta heteróloga de primovacunación-refuerzo es PROSTVAC® o CV301.

Para la preparación de vacunas, el poxvirus se puede convertir en una forma fisiológicamente aceptable. En ciertas realizaciones, dicha preparación se basa en la experiencia en la preparación de vacunas de poxvirus usadas para la vacunación contra la viruela como se describe, por ejemplo, en Stickl, H. et al., Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392 (1974).

Sigue una preparación a modo de ejemplo. El virus purificado se conserva a -80 °C con un título de 5×10^8 TCID₅₀/mL formulado en Tris 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. Para la preparación de dosis de vacuna, por ejemplo, se pueden liofilizar 10^2 - 10^8 partículas del virus en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en presencia de 2 % de peptona y 1 % de albúmina humana en una ampolla, preferentemente una ampolla de vidrio. Alternativamente, la dosis de vacuna se puede preparar por liofilización escalonada del virus en una formulación. En ciertas realizaciones, la formulación contiene aditivos adicionales tales como manitol, dextrano, azúcar, glicina, lactosa, polivinilpirrolidona u otros aditivos, tales como, que incluyen, pero no se limitan a, antioxidantes o gas inerte, estabilizadores o proteínas recombinantes (por ejemplo, albúmina de suero humano) adecuadas para la administración *in vivo*. Entonces se cierra la ampolla y se puede conservar a una temperatura adecuada, por ejemplo, entre 4 °C y temperatura ambiente durante varios meses. Sin embargo, en tanto que no exista necesidad, la ampolla se conserva preferentemente a temperaturas inferiores a -20 °C.

En diversas realizaciones que implican la vacunación o terapia, el liofilizado se disuelve en 0,1 a 0,5 mL de una disolución acuosa, preferentemente solución salina fisiológica o tampón Tris, y se administra ya sea por vía sistémica o localmente, es decir, por administración parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intranasal, intradérmica o cualquier otra vía de administración conocida por un médico habitual. La optimización del modo de administración, la dosis y el número de administraciones está dentro de la experiencia y el conocimiento de un experto en la técnica.

En ciertas realizaciones, las cepas atenuadas de virus de la variolovacuna son útiles para inducir respuestas inmunitarias en animales inmunocomprometidos, por ejemplo, monos (CD4 <400/μL de sangre) infectados con SIV, o seres humanos inmunocomprometidos. El término "inmunocomprometido" describe el estado del sistema inmunitario de un individuo que presenta solo respuestas inmunitarias incompletas o tiene una eficiencia reducida en la defensa contra agentes infecciosos.

Ciertos antígenos asociados a tumor a modo de ejemplo

En ciertas realizaciones, se produce una respuesta inmunitaria en un sujeto contra un antígeno de polipéptido asociado a célula. En ciertas de tales realizaciones, un antígeno de polipéptido asociado a célula es un antígeno asociado a tumor.

El término "polipéptido" se refiere a un polímero de dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados. Puede ser que los aminoácidos existan de forma natural, así como que no existan de forma natural, o un análogo químico de un aminoácido que existe de forma natural. El término también se refiere a proteínas, es decir, biomoléculas funcionales que comprenden al menos un polipéptido; cuando comprenden al menos dos polipéptidos, estos pueden formar complejos, unirse covalentemente, o pueden unirse no covalentemente. El (Los) polipéptido(s) en una proteína pueden estar glucosilados y/o lipidados y/o comprender grupos prostéticos.

Preferentemente, el antígeno asociado a tumor incluye, pero no se limita a, CEA, MUC-1, PAP, PSA, HER-2, survivina, proteína 1 relacionada con tirosina (tyrp1), proteína 2 relacionada con tirosina (tyrp2), Brachyury solo o en combinaciones. Dicha combinación a modo de ejemplo puede incluir CEA y MUC-1, también conocido como CV301. Otras combinaciones a modo de ejemplo pueden incluir PAP y PSA.

Se conocen en la técnica numerosos antígenos asociados a tumor. Los antígenos asociados a tumor a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, 5-alfa-reductasa, alfa-fetoproteína, AM-1, APC, April, BAGE, beta-catenina, Bcl12, bcr-abl, CA-125, CASP-8/FLICE, cathepsinas, CD19, CD20, CD21, CD23, CD22, CD33 CD35, CD44, CD45, CD46, CD5, CD52, CD55, CD59, CDC27, CDK4, CEA, c-myc, Cox-2, DCC, DcR3, E6/E7, CGFR, EMBP, DNA78, farnesil transferasa, FGF8b, FGF8a, FLK-1/KDR, receptor de ácido fólico, G250, familia de GAGE, gastrina 17, hormona liberadora de gastrina, GD2/GD3/GM2, GnRH, GnTV, GP1, gp100/Pmel17, gp-100-in4, gp15, gp75/TRP-1, hCG, heparanasa, Her2/neu, HMTV, Hsp70, hTERT, IGFR1, IL-13R, iNOS, Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA, LKLR-FUT, familia de MAGE, gammaglobina, MAP17, melan-A/MART-1, mesotelina, MIC A/B, MT-MMP, mucina, NY-ESO-1, osteonectina, p15, P170/MDR1, p53, p97/melanotransferrina, PAI-1, PDGF, uPA, PRAME, probasina, progenipoietina, PSA, PSM, RAGE-1, Rb, RCAS1, SART-1, familia de SSX, STAT3, STn, TAG-72, TGF-alfa, TGF-beta, timosina-beta-15, TNF-alfa, TP1, TRP-2, tirosinasa, VEGF, ZAG, p16INK4 y glutatión-S-transferasa.

Un antígeno de PSA preferido comprende el cambio de aminoácido de isoleucina a leucina en la posición 155.

Un antígeno asociado a tumor a modo de ejemplo es HER-2. HER-2 es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (c-erbB) que consiste en cuatro receptores diferentes hasta la fecha: c-erbB-1 (EGFr), c-erbB-2 (HER-2, c-Neu), c-erbB-3 y c-erbB-4 (Salomon et al., 1995). C-erbB-3 y c-erbB-4 están menos caracterizados que EGFr y HER-2. HER-2 es una glucoproteína de membrana integral. La proteína madura tiene un peso molecular de 185 kD con características estructurales que se parecen mucho al receptor EGFr (Prigent et al., 1992). EGFr también es un receptor de la membrana integral que consiste en una subunidad. Tiene un peso molecular aparente de 170 kD y consiste en un dominio de unión a ligando superficial de 621 aminoácidos, un único dominio transmembranario hidrófobo de 23 aminoácidos y un dominio de tirosina cinasa citoplásmica altamente conservado de 542 aminoácidos. La proteína está N-glucosilada (Prigent et al., 1994).

Todas las proteínas en esta familia son tirosina cinasas. La interacción con el ligando conduce a la dimerización del receptor, que aumenta la acción catalítica de la tirosina cinasa (Bernard. 1995, Chantry 1995). Las proteínas dentro de la familia son capaces de homo- y heterodimerizar, que es importante para su actividad. El EGFr transmite efectos promotores del crecimiento y estimula la captación de glucosa y aminoácidos por las células (Prigent et al., 1992). HER-2 también transmite señales promotoras del crecimiento.

El receptor de factor de crecimiento epidérmico se expresa en tejidos normales en bajas cantidades, pero se expresa en exceso en muchos tipos de cánceres. El EGFr se expresa en exceso en cánceres de mama (Earp et al., 1993, Eppenberger 1994), gliomas (Schlegel et al., 1994), cáncer gástrico (Tkunaga et al., 1995), carcinoma escamoso cutáneo (Fujii 1995), cáncer de ovario (van Dam et al., 1994) y otros. HER-2 también se expresa en algunos tejidos humanos normales en baja cantidad, lo más característicamente en epitelios secretores. La expresión en exceso de HER-2 ocurre en aproximadamente 30 % de cánceres de mama, gástrico, pancreático, de vejiga y de ovario.

La expresión de estos receptores varía dependiendo del grado de diferenciación de los tumores y el tipo de cáncer, por ejemplo, en cáncer de mama, los tumores primarios expresan en exceso ambos receptores; mientras que en cáncer gástrico, la expresión en exceso ocurre en una etapa posterior en los tumores metastásicos (Salomon et al., 1995). El número de receptores expresados en exceso en células de carcinoma es mayor que 10^6 /célula para varios cánceres de cabeza y cuello, líneas de cáncer de vulva, mama y de ovario aisladas de pacientes (Dean et al., 1994).

Existen varios motivos por los que la familia de receptores EGFR constituye dianas adecuadas para la inmunoterapia de tumores. Primero, se expresan en exceso en muchos tipos de cánceres, que deben dirigir la respuesta inmunitaria hacia el tumor. Segundo, los tumores expresan frecuentemente o expresan en exceso los ligandos para esta familia de receptores y algunos son hipersensibles a los efectos proliferativos mediados por los ligandos. Tercero, los pacientes con tumores que expresan en exceso los receptores del factor de crecimiento tienen frecuentemente un mal pronóstico. La expresión en exceso se ha relacionado estrechamente con un mal pronóstico, especialmente en cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer de vejiga, y se puede asociar a fenotipos invasivos/metastásicos, que son bastantes insensibles a terapias convencionales (Eccles et al., 1994).

Antígenos modificados asociados a tumor

En ciertas realizaciones, un antígeno de polipéptido asociado a célula se modifica de forma que se induzca una respuesta de CTL contra una célula que presenta epítopes derivados de un antígeno de polipéptido sobre su superficie, cuando se presenta en asociación con una molécula de clase I de MHC sobre la superficie de una APC. En ciertas de tales realizaciones, al menos un primer epítoto TH extraño, cuando se presenta, se asocia con una molécula de clase II de MHC sobre la superficie de la APC. En ciertas de tales realizaciones, un antígeno asociado a célula es un antígeno asociado a tumor.

Las APC a modo de ejemplo capaces de presentar epítopes incluyen células dendríticas y macrófagos. Las APC a modo de ejemplo adicionales incluyen cualquier APC pinocitante o fagocitante, que es capaz de presentar simultáneamente 1) epítopes de CTL unidos a moléculas de clase I de MHC y 2) epítopes de TH unidos a moléculas de clase II de MHC.

En ciertas realizaciones, las modificaciones a uno o más de los antígenos asociados a tumor (AAT) presentados en el presente documento, tales como, pero no se limitan a, CEA, MUC-1, PAP, PSA, HER-2, survivina, tyrp1, tyrp2 o Brachyury, se hacen de forma que, después de la administración a un sujeto, se provoquen anticuerpos policlonales que reaccionan predominantemente con el uno o más de los AAT descritos en el presente documento. Dichos anticuerpos podrían atacar y eliminar las células tumorales, así como prevenir que las células metastásicas se transformen en metástasis. El mecanismo efector de este efecto antitumoral estaría mediado por citotoxicidad celular dependiente de complemento y de anticuerpo. Además, los anticuerpos inducidos también podrían inducir el crecimiento de células cancerosas mediante la inhibición de la oligo-dimerización dependiente del factor de crecimiento e internalización de los receptores. En ciertas realizaciones, dichos antígenos de polipéptido de AAT modificados podrían inducir respuestas de CTL dirigidas contra epítopes de AAT conocidos y/o predichos presentados por las células tumorales.

En ciertas realizaciones, un antígeno de polipéptido de AAT modificado comprende un epítoto de CTL del antígeno de polipéptido asociado a células y una variación, en donde la variación comprende al menos un epítoto de CTL de un epítoto de TH extraño. Ciertos de dichos AAT modificados pueden incluir en un ejemplo no limitante uno o más antígenos de polipéptido HER-2 que comprenden al menos un epítoto de CTL y una variación que comprende al menos un epítoto de CTL de un epítoto de TH extraño, y métodos de producción de los mismos se describen en la patente de EE. UU. Nº 7.005.498 y las publicaciones de patente de EE. UU. Nº 2004/0141958 y 2006/0008465.

En ciertas realizaciones, un epítoto de TH extraño es un epítoto de linfocitos T "promiscuo" que existe de forma natural. Dichos epítopes de linfocitos T "promiscuos" son activos en una gran proporción de individuos de una especie de animal o una población de animales. En ciertas realizaciones, una vacuna comprende dichos epítopes de linfocitos T promiscuos. En ciertas de tales realizaciones, el uso de epítopes de linfocitos T promiscuos reduce la necesidad de un número muy grande de diferentes epítopes de CTL en la misma vacuna. Los epítopes de linfocitos T promiscuos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, epítopes de toxina tetánica, que incluyen, pero no se limitan a, los epítopes P2 y P30 (Panina-Bordignon et al., 1989), toxina diftérica, hemaglutinina del virus de la gripe (HA) y antígeno CS de *P. falciparum*.

Los epítopes de linfocitos T promiscuos adicionales incluyen péptidos capaces de unirse a una gran proporción de moléculas de HLA-DR codificadas por los diferentes HLA-DR. Véanse, por ejemplo, el documento de patente WO 98/23635 (Frazer IH et al., cedido a la Universidad de Queensland); Southwood S et al, 1998, J. Immunol. 160: 3363-3373; Sinigaglia F et al., 1988, Nature 336: 778-780; Rammensee HG et al., 1995, Immunogenetics 41: 4-178; Chicz RM et al., 1993, J. Exp. Med 178: 27-47; Hammer J et al., 1993, Cell 74: 197-203; y Falk K et al., 1994, Immunogenetics 39: 230-242. La última referencia también trata de ligandos HLA-DQ y HLA-DP. Todos los epítopes listados en estas referencias son relevantes como candidatos a epítopes naturales como se describe en el presente documento, ya que son epítopes que comparten motivos comunes con estos.

En ciertas otras realizaciones, el epítipo de linfocitos T promiscuo es un epítipo de linfocitos T artificial que es capaz de unirse a una gran proporción de haplotipos. En ciertas de dichas realizaciones, el epítipo de linfocitos T artificial es un péptido de epítipo pan DR ("PADRE") como se describe en el documento de patente WO 95/07707 y en el artículo correspondiente Alexander J et al., 1994, Immunity 1: 751 761.

5 mHER2

Se describen diversos antígenos de polipéptido HER-2 modificados y métodos de producción de los mismos en la patente de EE. UU. Nº 7.005.498 y las publicaciones de patente de EE. UU. Nº 2004/0141958 y 2006/0008465. Los documentos describen diversos antígenos de polipéptido HER-2 modificados que comprenden epítopos de linfocitos T promiscuos en diferentes posiciones en el polipéptido HER-2.

10 La secuencia de HER-2 humana se puede dividir en varios dominios basados únicamente en la estructura primaria de la proteína. Los dominios son del siguiente modo. El dominio extracelular (receptor) se extiende desde los aminoácidos 1-654 y contiene varios subdominios del siguiente modo: el dominio I (dominio del extremo N de polipéptido maduro) se extiende desde los aminoácidos 1-173; el dominio II (dominio rico en cisteína, 24 restos de cisteína) se extiende desde los aminoácidos 174-323; el dominio III (dominio de unión a ligando en el receptor de EGF homólogo) se extiende desde los aminoácidos 324-483; y el dominio IV (dominio rico en cisteína, 20 restos de cisteína) se extiende desde los aminoácidos 484-623. Los restos transmembranarios se extienden desde los aminoácidos 654-675. El dominio intracelular (cinasa) se extiende desde los aminoácidos 655-1235 y contiene el dominio de tirosina cinasa, que se extiende desde los aminoácidos 655-1010 (el dominio TK central se extiende desde 725-992); y el dominio del extremo C, que se extiende desde los aminoácidos 1011-1235.

20 La selección de sitios en la secuencia de aminoácidos de HER-2 que se va a desplazar por cualquiera de los epítopos cooperadores T humanos P2 o P30 se describe en la patente de EE. UU. Nº 7.005.498 y las publicaciones de patente de EE. UU. Nº 2004/0141958 y 2006/0008465. Para resumir, se consideraron los siguientes parámetros:

1. Epítopos de CTL conocidos y predichos;
2. Homología con receptores relacionados (EGFR en particular);
- 25 3. Conservación de restos de cisteína;
4. Bucle predicho, estructuras de hélice α y hoja β ;
5. Posibles sitios de N-glucosilación;
6. Predicción de restos de aminoácidos expuestos y enterrados;
7. Organización de dominios.

30 Parece que los epítopos de CTL están agrupados en el dominio I, dominio III, el dominio TM y en dos o tres "puntos calientes" en el dominio TK. Como se describe en la patente de EE. UU. Nº 7.005.498 y las publicaciones de patente de EE. UU. Nº 2004/0141958 y 2006/0008465, estos deben estar ampliamente conservados.

Es probable que las regiones con un alto grado de homología con otros receptores sean estructuralmente importantes para la estructura terciaria "global" de HER-2 y, por tanto, para el reconocimiento de anticuerpos, mientras que regiones con baja homología se pueden intercambiar posiblemente con solo alteraciones locales de la estructura como consecuencia.

Los restos de cisteína participan frecuentemente en la formación de puentes de disulfuro intramoleculares y así participan en la estructura terciaria y no se debe cambiar. Se deben evitar las regiones predichas para formar estructuras de hélice alfa u hoja beta como puntos de inserción de epítopos extraños, ya que se cree que estas regiones participan en el plegamiento de la proteína.

Se deben conservar los posibles sitios de N-glucosilación si se desea la manosiación de la proteína.

Las regiones que se predice (por sus propiedades hidrófobas) que son interiores en la molécula deben ser conservadas preferentemente, ya estas podrían participar en el plegamiento. A diferencia, las regiones expuestas al disolvente podrían servir de posiciones candidatas para la inserción de los epítopos T_H modelo P2 y P30.

45 Finalmente, se debe tener en cuenta la organización de dominios de la proteína debido a su relevancia para la estructura y función de proteínas.

Como se describe en la patente de EE. UU. Nº 7.005.498 y las publicaciones de patente de EE. UU. Nº 2004/0141958 y 2006/0008465, el centro de la estrategia ha sido conservar la estructura de la parte extracelular de HER-2 en la medida de lo posible, debido a que esta es la parte de la proteína que es relevante como diana para los anticuerpos neutralizantes. Por el contrario, la parte intracelular de HER-2 unido a la membrana nativa sobre la superficie de células cancerosas es inaccesible para el sistema inmunitario humoral.

Diversas construcciones a modo de ejemplo que usan los epítopes P2 y P30 de la toxina tetánica insertada en diversos dominios de HER-2 se proporcionan en la patente de EE. UU. N° 7.005.498 y las publicaciones de patente de EE. UU. N° 2004/0141958 y 2006/0008465. Un antígeno de polipéptido HER-2 modificado a modo de ejemplo, denominado "mHER2", comprende los dominios extracelulares y nueve aminoácidos del dominio transmembranario; el epítipo P2 insertado en el dominio II entre los restos de aminoácidos 273 a 287 del polipéptido HER-2 modificado; y el epítipo P30 insertado en el dominio IV entre los restos de aminoácidos 655 a 675 del polipéptido HER-2 modificado.

MVA-BN-mHER2 recombinante

En una realización no limitante, se construye MVA recombinante que comprende un antígeno asociado a tumor, por ejemplo, MVA-BN-mHER2, del siguiente modo. Se genera la reserva de virus inicial por recombinación en cultivo celular usando un tipo de célula permisiva para la replicación, por ejemplo, células CEF. Las células tanto se inoculan con un virus de la variolovacuna atenuado, por ejemplo, MVA-BN, como se transfectan con un plásmido de recombinación (por ejemplo, pBN146) que codifica el antígeno asociado a tumor, por ejemplo, HER2, secuencia y regiones flanqueantes del genoma del virus. En una realización no limitante, el plásmido pBN146 contiene secuencias que también están presentes en MVA-BN (los marcos de lectura abiertos 14L y 15L). La secuencia de HER2 se inserta entre las secuencias de MVA-BN para permitir la recombinación en el genoma viral de MVA-BN. En ciertas realizaciones, el plásmido también contiene un casete de selección que comprende uno o más genes de selección para permitir la selección de construcciones recombinantes en células CEF. En una realización preferida, el MVA recombinante codifica un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 2.

La infección y transfección simultánea de los cultivos permite que ocurra la recombinación homóloga entre el genoma viral y el plásmido de recombinación. Entonces se aísla el virus que lleva el inserto, se caracteriza y se preparan las reservas de virus. En ciertas realizaciones, el virus se somete a pases en cultivos celulares CEF en ausencia de selección para permitir la pérdida de la región que codifica los genes de selección, gpt y EGFP.

Antagonistas de TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4

Al menos en un aspecto, la invención engloba antagonistas de inmunoglobulina de linfocitos T y dominio 3 de mucina (TIM-3), proteína 1 de muerte celular programada (PD-1), ligando 1 de muerte programada (PDL-1), gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3) y antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4). Un antagonista de TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 o CTLA-4 interfiere con la función de TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 o CTLA-4, respectivamente, y es un anticuerpo, un ARN antisentido o un ARNip.

Dichos antagonistas de TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 pueden incluir anticuerpos que se unen específicamente a TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 e inhiben y/o bloquean la actividad y función biológica de TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4, respectivamente.

Otros antagonistas de TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 pueden incluir ARN antisentido de ácidos nucleicos que interfieren con la expresión de TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4; y ARN interferentes pequeños que interfieren con la expresión de TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4.

Se pueden cribar candidatos a antagonistas de TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 para su función mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica y/o desveladas dentro de la presente solicitud, tales como la capacidad para interferir con la función de TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 en un modelo *in vitro* o de ratón.

Anticuerpos

En una realización, el antagonista de TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 es un anticuerpo. Los anticuerpos pueden ser sintéticos, monoclonales o policlonales, y se pueden preparar por técnicas bien conocidas en la técnica. Dichos anticuerpos se unen específicamente a TIM-3, PD-1, LAG-3, PDL-1 y CTLA-4 por los sitios de unión al antígeno del anticuerpo (a diferencia de la unión no específica). Los polipéptidos TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4, fragmentos, variantes, proteínas de fusión, etc., se pueden emplear como inmunógenos en la producción de anticuerpos inmunorreactivos con ellos. Más específicamente, los polipéptidos, fragmentos, variantes, proteínas de fusión, etc., contienen determinantes antigénicos o epítipes que provocan la formación de anticuerpos.

Estos determinantes antigénicos o epítipes pueden ser o lineales o conformacionales (discontinuos). Los epítipes lineales están compuestos de una única sección de aminoácidos del polipéptido, mientras que los epítipes conformacionales o discontinuos están compuestos de secciones de aminoácidos de diferentes regiones de la cadena de polipéptidos que se ponen en proximidad tras el plegamiento de las proteínas (C. A. Janeway, Jr. y P. Travers, *Immuno Biology* 3:9 (Garland Publishing Inc., 2ª ed. 1996)). Debido a que las proteínas plegadas tienen superficies complejas, el número de epítipes disponibles es bastante numeroso; sin embargo, debido a la conformación de la proteína y los impedimentos estéricos, el número de anticuerpos que en realidad se unen a los epítipes es inferior al número de epítipes disponibles (C. A. Janeway, Jr. y P. Travers, *Immuno Biology* 2:14 (Garland Publishing Inc., 2ª ed. 1996)). Los epítipes se pueden identificar por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica.

Están englobados por la invención anticuerpos, que incluyen los fragmentos scFv, que se unen específicamente a TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 y bloquean su función ("anticuerpos antagonistas"). Dichos anticuerpos se pueden generar mediante medios convencionales.

- 5 En una realización, la invención engloba anticuerpos monoclonales contra TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 que bloquean cada función de la molécula de punto de control inmunitario ("anticuerpos"). Los anticuerpos monoclonales bloqueantes a modo de ejemplo contra PD-1 se describen en el documento de patente WO 2011/041613.

- 10 Los anticuerpos son capaces de unirse a sus dianas con tanto alta avidez como especificidad. Son moléculas relativamente grandes (~150 kDa), que pueden inhibir estéricamente las interacciones entre dos proteínas (por ejemplo, PD-1 y su ligando diana) cuando el sitio de unión al anticuerpo entra dentro de la proximidad del sitio de interacción proteína-proteína. La invención engloba además anticuerpos que se unen a epítopes dentro de una estrecha proximidad a un sitio de unión a ligando TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 o CTLA-4.

- 15 En diversas realizaciones, la invención engloba anticuerpos que interfieren con interacciones intermoleculares (por ejemplo, interacciones proteína-proteína), así como anticuerpos que perturban las interacciones intramoleculares (por ejemplo, cambios conformacionales dentro de una molécula). Los anticuerpos se pueden cribar para su capacidad para bloquear la actividad biológica de TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 o CTLA-4, o la unión de TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3, o CTLA-4 a un ligando, y/o para otras propiedades.

Tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales se pueden preparar por técnicas convencionales.

- 20 Se pueden utilizar TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 y péptidos basados en la secuencia de aminoácidos de TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 para preparar anticuerpos que se unen específicamente a TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4. El término "anticuerpos" pretende incluir anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de los mismos, tales como fragmentos F(ab')₂ y Fab, fragmentos variables de una sola cadena (scFv), fragmentos de anticuerpos de un solo dominio (VHH o nanocuerpos), fragmentos de anticuerpos bivalentes (diacuerpos), así como cualquier componente de unión recombinantemente y sintéticamente producido.

- 25 Se define que los anticuerpos se unen específicamente si se unen a TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 o CTLA-4 con una K_a superior o igual a aproximadamente 10^7 M^{-1} . Se pueden determinar fácilmente las afinidades de los componentes de unión o anticuerpos usando técnicas convencionales, por ejemplo, las descritas por Scatchard et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949).

- 30 Se pueden generar fácilmente anticuerpos policlonales a partir de una variedad de fuentes, por ejemplo, caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones o ratas, usando procedimientos que se conocen bien en la técnica. En general, se administra normalmente por inyección parenteral TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 purificado o un péptido basado en la secuencia de aminoácidos de TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 o CTLA-4 que se conjuga apropiadamente con el animal hospedador. La inmunogenicidad de TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 se puede potenciar mediante el uso de un adyuvante, por ejemplo, adyuvante completo o incompleto de Freund. Tras las inmunizaciones de refuerzo, se recogen pequeñas muestras de suero y se prueba para su reactividad con el polipéptido TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4. Los ejemplos de diversos ensayos útiles para dicha determinación incluyen los descritos en Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; así como procedimientos, tales como inmunoelectroforesis en contracorriente (CIEP), radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), ensayos de transferencia puntual y ensayos de sándwich. Véanse las patentes de EE. UU. N° 4.376.110 y 4.486.530.

- 40 Se pueden preparar fácilmente anticuerpos monoclonales usando procedimientos bien conocidos. Véanse, por ejemplo, los procedimientos descritos en las patentes de EE. UU. N° RE 32.011, 4.902.614, 4.543.439 y 4.411.993; Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKeam, and Bechtol (eds.), 1980.

- 45 Por ejemplo, los animales hospedadores, tales como ratones, se pueden inyectar por vía intraperitoneal al menos una vez y preferentemente al menos dos veces en intervalos de aproximadamente 3 semanas con TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 aislados y purificados o TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 conjugados, opcionalmente en presencia de adyuvante. Entonces se ensayan sueros de ratón por la técnica de transferencia puntual convencional o captura de anticuerpos (ABC) para determinar qué animal es mejor fusionar. Aproximadamente dos a tres semanas después, los ratones se administran con un refuerzo intravenoso de TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 o péptido
50 TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 conjugado. Después se sacrifican los ratones y se fusionan las células del bazo con células de mieloma comercialmente disponibles, tales como Ag8.653 (ATCC), siguiendo los protocolos establecidos. Brevemente, las células de mieloma se lavan varias veces en medio y se fusionan con las células del bazo de ratón en una relación de aproximadamente tres células del bazo por cada célula de mieloma. El agente de fusión puede ser cualquier agente adecuado usado en la técnica, por ejemplo, polietilenglicol (PEG). La fusión se
55 siembra en placas que contienen medio que permite el crecimiento selectivo de las células fusionadas. Entonces se puede dejar que las células fusionadas crezcan durante aproximadamente ocho días. Se recogen los sobrenadantes de los hibridomas resultantes y se añaden a una placa que se recubre primero con Ig anti-ratón de cabra. Después de los lavados, se añade una marca, tal como un polipéptido TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 marcado, a cada

pocillo, seguido por incubación. Posteriormente se pueden detectar los pocillos positivos. Se pueden cultivar clones positivos en cultivo en masa y los sobrenadantes se purifican posteriormente sobre una columna de proteína A (Pharmacia).

Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden producir usando técnicas alternativas, tales como las descritas por Altling-Mees et al., "Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas", *Strategies in Molecular Biology* 3:1-9 (1990), que se incorpora en el presente documento como referencia. Similarmente, se pueden construir componentes de unión usando técnicas de ADN recombinante para incorporar las regiones variables de un gen que codifica un anticuerpo de unión específica. Dicha técnica se describe en Larrick et al., *Biotechnology*, 7:394 (1989).

También están englobados por la presente invención fragmentos de unión al antígeno de dichos anticuerpos, que se pueden producir por técnicas convencionales. Los ejemplos de dichos fragmentos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab y F(ab')₂. También se proporcionan fragmentos de anticuerpos y derivados producidos por técnicas de ingeniería genética.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, por ejemplo, versiones humanizadas de anticuerpos monoclonales murinos. Dichos anticuerpos humanizados se pueden preparar por técnicas conocidas, y ofrecen la ventaja de inmunogenicidad reducida cuando los anticuerpos se administran a seres humanos. En una realización, un anticuerpo monoclonal humanizado comprende la región variable de un anticuerpo murino (o solo el sitio de unión al antígeno del mismo) y una región constante derivada de un anticuerpo humano. Alternativamente, un fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo monoclonal murino y un fragmento de región variable (que carece del sitio de unión al antígeno) derivado de un anticuerpo humano. Los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales quiméricos y manipulados adicionales incluyen los descritos en Riechmann et al. (*Nature* 332:323, 1988), Liu et al. (*PNAS* 84:3439, 1987), Larrick et al. (*Bio/Technology* 7:934, 1989) y Winter y Harris (*TIPS* 14:139, Mayo, 1993). Los procedimientos para generar anticuerpos transgénicamente se pueden encontrar en el documento de patente GB 2.272.440, patentes de EE. UU. Nº 5.569.825 y 5.545.806.

Se pueden usar anticuerpos producidos por métodos de ingeniería genética, tales como anticuerpos quiméricos y monoclonales humanizados, que comprenden tanto porciones humanas como no humanas, que se pueden preparar usando técnicas de ADN recombinante convencionales. Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados se pueden producir por ingeniería genética usando técnicas de ADN convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, usando métodos descritos en Robinson et al., publicación internacional Nº WO 87/02671; Akira, et al., solicitud de patente europea 0184187; Taniguchi, M., solicitud de patente europea 0171496; Morrison et al., solicitud de patente europea 0173494; Neuberger et al., publicación internacional PCT Nº WO 86/01533; Cabilly et al., patente de EE. UU. Nº 4.816.567; Cabilly et al., solicitud de patente europea 0125023; Better et al., *Science* 240:1041 1043, 1988; Liu et al., *PNAS* 84:3439 3443, 1987; Liu et al., *J. Immunol.* 139:3521 3526, 1987; Sun et al. *PNAS* 84:214 218, 1987; Nishimura et al., *Canc. Res.* 47:999 1005, 1987; Wood et al., *Nature* 314:446 449, 1985; y Shaw et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553 1559, 1988; Morrison, S. L., *Science* 229:1202 1207, 1985; Oi et al., *BioTechniques* 4:214, 1986; Winter, patente de EE. UU. Nº 5.225.539; Jones et al., *Nature* 321:552 525, 1986; Verhoeyan et al., *Science* 239:1534, 1988; y Beidler et al., *J. Immunol.* 141:4053 4060, 1988.

A propósito de los anticuerpos sintéticos y semisintéticos, dichos términos pretenden cubrir, pero no se limitan a, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cambio de isotipo, anticuerpos humanizados (por ejemplo, ratón-humano, humano-ratón), híbridos, anticuerpos que tienen múltiples especificidades y moléculas de tipo anticuerpo completamente sintético.

Para aplicaciones terapéuticas, se prefieren frecuentemente los anticuerpos monoclonales "humanos" que tienen regiones constantes y variables humanas para minimizar la respuesta inmunitaria de un paciente contra el anticuerpo. Dichos anticuerpos se pueden generar inmunizando animales transgénicos que contienen genes de la inmunoglobulina humana. Véase Jakobovits et al., *Ann NY Acad Sci* 764:525-535 (1995).

Los anticuerpos monoclonales humanos contra los polipéptidos TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 también se pueden preparar construyendo una biblioteca combinatoria de inmunoglobulinas, tal como un biblioteca de presentación en fagos de Fab o una biblioteca de presentación en fagos de scFv, usando ADNc de la cadena ligera y la cadena pesada de la inmunoglobulina preparados a partir de ARNm derivado de linfocitos de un sujeto. Véanse, por ejemplo, McCafferty et al., publicación PCT WO 92/01047; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581 597; y Griffiths et al. (1993) *EMBO J* 12:725 734. Además, se puede generar una biblioteca combinatoria de regiones variables de anticuerpo mutando un anticuerpo humano conocido. Por ejemplo, se puede mutar una región variable de un anticuerpo humano que se sabe que se une a TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4, por ejemplo, usando oligonucleótidos mutagenizados aleatoriamente alterados, para generar una biblioteca de regiones variables mutadas que luego se puede cribar para unirse a TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4. Se pueden encontrar métodos de inducción de la mutagénesis al azar dentro de las regiones CDR de las cadenas pesadas y/o ligeras de inmunoglobulina, métodos de cruce de cadenas pesadas y ligeras aleatorizadas para formar emparejamientos y métodos de cribado en, por ejemplo, Barbas et al., publicación PCT WO 96/07754; Barbas et al. (1992) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:4457 4461.

Se puede expresar una biblioteca de inmunoglobulinas por una población de paquetes de presentación, preferentemente derivados de fago filamentoso, para formar una biblioteca de presentación de anticuerpos. Los ejemplos de métodos y reactivos particularmente flexibles para su uso en generar la biblioteca de presentación de anticuerpos se pueden encontrar en, por ejemplo, Ladner et al., patente de EE. UU. N° 5.223.409; Kang et al., publicación PCT WO 92/18619; Dower et al., publicación PCT WO 91/17271; Winter et al., publicación PCT WO 92/20791; Markland et al., publicación PCT WO 92/15679; Breitling et al., publicación PCT WO 93/01288; McCafferty et al., publicación PCT WO 92/01047; Garrard et al., publicación PCT WO 92/09690; Ladner et al., publicación PCT WO 90/02809; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370 1372; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81 85; Huse et al. (1989) Science 246:1275 1281; Griffiths et al. (1993) arriba; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889 896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624 628; Gram et al. (1992) PNAS 89:3576 3580; Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9:1373 1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133 4137; y Barbas et al. (1991) PNAS 88:7978 7982. Una vez presentado sobre la superficie de un paquete de presentación (por ejemplo, fago filamentoso), se criba la biblioteca de anticuerpos para identificar y aislar paquetes que expresan un anticuerpo que se une al polipéptido TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 o CTLA-4. En una realización preferida, el cribado primario de la biblioteca implica inmunopurificar con un polipéptido TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 inmovilizado y se seleccionan paquetes de presentación que expresan anticuerpos que se unen al polipéptido TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 inmovilizado.

Además de los antagonistas de TIM-3, PD-1, PDL-1, LAG-3 y CTLA-4 ya descritos en el presente documento, se contempla que los antagonistas y agonistas descritos en el presente documento pueden incluir los conocidos en la técnica. Por ejemplo, Ipilimumab® y tremelimumab, son anticuerpos contra CTLA-4 conocidos. Además, lambrolizumab, AMP-224, Nivolumab y MK-3475 son anticuerpos contra PD-1 conocidos. Algunos anticuerpos conocidos a modo de ejemplo para PDL-1 que interfieren con la función de PD-1 incluyen: MPDL3280A (Roche), MED14736 (AZN), MSB0010718C (Merck).

Terapia de combinación con un poxvirus que expresa un antígeno de tumor y un antagonista o agonista del punto de control inmunitario

En al menos un aspecto, la invención engloba una combinación de un poxvirus recombinante que codifica un antígeno de tumor con uno o más antagonistas o agonistas del punto de control inmunitario, para su uso en métodos de tratamiento.

En al menos un aspecto, la invención engloba una combinación de un poxvirus recombinante que codifica un AAT y uno o más anticuerpos o antagonistas de TIM-3, para su uso en el tratamiento del cáncer.

En otro aspecto, la invención engloba una combinación de (a) un poxvirus recombinante que codifica un AAT; (b) uno o más anticuerpos o antagonistas de TIM-3; y (c) y uno o varios de otros anticuerpos, agonistas o antagonistas de moléculas de punto de control inmunitario, para su uso en métodos de tratamiento. En una realización preferida, los otros anticuerpos, agonistas o antagonistas de moléculas de punto de control inmunitario se seleccionan de anticuerpos o antagonistas de PD-1, PDL-1, LAG-3 o CTLA-4, o combinaciones de los mismos.

En una realización, los pacientes con un cáncer mediado por células que expresan en exceso el antígeno asociado a tumor HER-2 (por ejemplo, cáncer de mama) se pueden tratar por la combinación de un poxvirus, por ejemplo un orthopoxvirus (por ejemplo, virus de la variolovacuna, Wyeth, ACAM 1000, ACAM 2000, MVA o MVA-BN) o un avipoxvirus (por ejemplo, virus de la viruela aviar, POXVAC-TC), que codifica un antígeno HER-2 con uno o más anticuerpos, agonistas, o antagonistas según la invención. En una realización preferida, el MVA es MVA-BN. En una realización particularmente preferida, el MVA codifica un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 2.

En una realización, se pueden tratar pacientes con un cáncer de próstata por la combinación de un orthopoxvirus, por ejemplo un virus de la variolovacuna (por ejemplo, virus de la variolovacuna, Wyeth, ACAM 1000, ACAM 2000, MVA o MVA-BN) y un avipoxvirus (por ejemplo, virus de la viruela aviar, POXVAC-TC), que codifica un antígeno PSA y/o PAP, con uno o más anticuerpos, agonistas o antagonistas según la invención. En una realización particularmente preferida, el virus de la variolovacuna es parte de PROSTVAC®.

En una realización, se pueden tratar pacientes con un cáncer mediado por células que expresan en exceso el AAT CEA y/o MUC-1 (por ejemplo, cáncer de mama, colorrectal, de pulmón y ovario) por la combinación de un orthopoxvirus, por ejemplo, un virus de la variolovacuna (por ejemplo, virus de la variolovacuna, Wyeth, ACAM 1000, ACAM 2000, MVA, o MVA-BN) o un avipoxvirus (por ejemplo, virus de la viruela aviar, POXVAC-TC), que codifica un antígeno CEA y/o MUC-1, con uno o más anticuerpos, agonistas o antagonistas según la invención.

El poxvirus recombinante se puede administrar ya sea por vía sistémica o localmente, es decir, por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intranasal, intradérmica, escarificación o cualquier otra vía de administración conocida para un médico habitual. Preferentemente, la administración es por escarificación. En una realización, se administran 10^5 - 10^{10} TCID₅₀ del poxvirus recombinante al paciente. Preferentemente, se administran 10^7 - 10^{10} TCID₅₀ del poxvirus recombinante al paciente. Más preferentemente, se administran 10^8 - 10^{10} TCID₅₀ del poxvirus recombinante al paciente. Lo más preferentemente, se administran 10^8 - 10^9 TCID₅₀ del poxvirus recombinante al paciente.

El cáncer incluye preferentemente, pero no se limita a, un cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, tiroides, melanoma, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de hígado, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de ovario o cáncer colorrectal.

En una realización preferida, el cáncer es un cáncer de mama, cáncer de próstata o cáncer colorrectal.

El paciente con cáncer puede ser cualquier mamífero, que incluye un ratón o rata. Preferentemente, el paciente con cáncer es un primate, lo más preferentemente un humano.

5 En una realización, se administran al mismo tiempo uno o más anticuerpos, agonista o antagonista, según la invención y el poxvirus que codifica un polipéptido que comprende un AAT. El tratamiento de combinación es superior a cualquier tratamiento solo.

En realizaciones preferidas, el poxvirus recombinante es para administración en 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días desde la administración del agonista y/o antagonista. El poxvirus recombinante se puede administrar antes o después del agonista y/o antagonista.

10 La dosis de agonista o antagonista administrada a un paciente normalmente es 0,1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosis administrada a un paciente es entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg de peso corporal del paciente, más preferentemente 1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal del paciente, lo más preferentemente 3 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal del paciente. En general, los anticuerpos humanos y humanizados tienen una semivida más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria a los polipéptidos extraños. Así, es frecuentemente posible dosis más bajas de anticuerpos humanos y administración menos frecuente.

20 Las cantidades de principio activo necesarias para la terapia eficaz dependerán de muchos factores diferentes, que incluyen medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente y otros medicamentos administrados. Así, se deben valorar las dosis de tratamiento para optimizar la seguridad y eficacia. Normalmente, las dosis usadas *in vitro* pueden proporcionar orientación útil de las cantidades útiles para la administración *in situ* de los principios activos. Pruebas animales de dosis eficaces para el tratamiento de trastornos particulares proporcionarán indicación predictiva adicional de la dosis humana. Se describen diversas consideraciones, por ejemplo, en Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 7ª edición (1985), MacMillan Publishing Company, New York, y Remington's Pharmaceutical Sciences 18ª edición, (1990) Mack Publishing Co, Easton Pa. Se tratan métodos de administración en su interior, que incluyen administración oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, transdérmica, nasal, iontoforética y similares.

30 Las composiciones de la invención se pueden administrar en una variedad de formas farmacéuticas unitarias dependiendo del método de administración. Por ejemplo, las formas farmacéuticas unitarias adecuadas para administración por vía oral incluyen formas farmacéuticas sólidas tales como polvo, comprimidos, píldoras, cápsulas y comprimidos recubiertos de azúcar, y formas farmacéuticas líquidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones. Los principios activos también se pueden administrar por vía parenteral en formas farmacéuticas líquidas estériles. Las cápsulas de gelatina contienen el principio activo y como principios inactivos vehículos en polvo, tales como glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina sódica, talco, carbonato de magnesio y similares. Los ejemplos de principios inactivos adicionales que se pueden añadir para proporcionar color deseable, estabilidad del sabor, capacidad de tamponamiento, dispersión u otras características deseables conocidas son óxido de hierro rojo, gel de sílice, laurilsulfato de sodio, dióxido de titanio, tinta blanca comestible y similares. Se pueden usar diluyentes similares para preparar comprimidos por compresión. Tanto los comprimidos como las cápsulas se pueden fabricar como productos de liberación sostenida para proporcionar la liberación continua de la medicación durante un periodo de horas. Los comprimidos por compresión pueden estar recubiertos de azúcar o recubiertos de película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger el comprimido de la atmósfera, o con recubrimiento entérico para la disgregación selectiva en el tubo gastrointestinal. Las formas farmacéuticas líquidas para administración por vía oral pueden contener colorante y aromatizante para aumentar la aceptación del paciente.

45 La concentración de las composiciones de la invención en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, desde menos de aproximadamente 0,1 %, normalmente de o al menos aproximadamente 2 % hasta como mucho 20 % a 50% o más en peso, y se seleccionará principalmente por volúmenes de líquido, viscosidades, etc., según el modo particular de administración seleccionado.

50 Para composiciones sólidas, se pueden usar vehículos sólidos no tóxicos convencionales que incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. Para administración por vía oral, se forma una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable incorporando cualquiera de los excipientes normalmente empleados, tales como los vehículos previamente listados, y, en general, 10-95 % de principio activo, es decir, una o más composiciones de la invención de la invención, y más preferentemente a una concentración de 25 %-75 %.

55 Para la administración en aerosol, las composiciones de la invención se suministran preferentemente en forma finamente dividida junto con un tensioactivo y propulsor. Los porcentajes preferidos de composiciones de la invención son 0,01 %-20 % en peso, preferentemente 1-10 %. El tensioactivo debe ser, por supuesto, no tóxico, y preferentemente soluble en el propulsor. Son representativos de dichos agentes los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen desde 6 hasta 22 átomos de carbono, tales como los ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linolénico,

olestérico y oleico con un alcohol polihidroxilado alifático o su anhídrido cíclico. Se pueden emplear ésteres mixtos, tales como glicéridos mixtos o naturales. El tensioactivo puede constituir 0,1 %-20 % en peso de la composición, preferentemente 0,25-5 %. El resto de la composición es, en general, propulsor. También se puede incluir, según se desee, un vehículo como con, por ejemplo, lecitina para administración intranasal.

- 5 Las construcciones de la invención se pueden administrar adicionalmente en un sistema de tipo depósito, una forma encapsulada o un implante por técnicas muy conocidas en la técnica. Similarmente, las construcciones se pueden administrar por una bomba a un tejido de interés.

10 Cualquiera de las formulaciones apropiadas puede ser apropiada en tratamientos y terapias según la presente invención, a condición de que el agente activo en la formulación no se inactive por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible.

15 En ciertas realizaciones, los recombinantes de la presente invención pueden estar incorporados en una o más composiciones farmacéuticas. Además de un poxvirus recombinante que codifica un AAT y uno o más antagonistas o agonistas del punto de control inmunitario, las composiciones farmacéuticas pueden comprender uno o más vehículos, aditivos, antibióticos, conservantes, adyuvantes, diluyentes y/o estabilizadores farmacéuticamente aceptables y/o autorizados. Dichos aditivos incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, agua, solución salina, glicerol, etanol, humectantes o emulsionantes, y sustancias de tamponamiento del pH. Los vehículos a modo de ejemplo normalmente son moléculas grandes lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados de lípidos o similares.

Terapia de combinación usando pautas homólogas/heterólogas de primovacunación-refuerzo

20 Es posible inducir una respuesta inmunitaria con una única administración del poxvirus recombinante como se ha definido anteriormente. El poxvirus según la presente invención también se puede usar como parte de una pauta homóloga de primovacunación-refuerzo. En la primovacunación-refuerzo homólogo, se administra una primera primovacunación, seguida por una o más vacunaciones de refuerzo posteriores. Las vacunaciones de refuerzo están configuradas para reforzar la respuesta inmunitaria generada en la primera vacunación por administración del mismo poxvirus recombinante o uno relacionado que se usó en la primera vacunación.

El poxvirus recombinante según la presente invención también se puede usar en pautas heterólogas de primovacunación-refuerzo en las que una o más de las primovacunaciones iniciales se hacen con un poxvirus como se define en el presente documento y en las que una o más vacunaciones de refuerzo posteriores se hacen con una vacuna diferente, tal como, pero no se limita a, otra vacuna contra el virus, una vacuna de proteína o una de ácido nucleico.

30 En una realización a modo de ejemplo, se puede emplear una pauta homóloga de primovacunación-refuerzo en donde un poxvirus, tal como MVA-BN que expresa uno o más antígenos asociados a tumor (AAT), tales como, pero no se limitan a HER2, se administra en una primera dosis en combinación con uno o más antagonistas o agonistas del punto de control inmunitario. Se pueden administrar una o más administraciones posteriores de MVA-BN que expresan uno o más AAT, tales como, pero no se limitan a HER2, en combinación con uno o más antagonistas o agonistas del punto de control inmunitario para reforzar la respuesta inmunitaria proporcionada en la primera administración. Preferentemente, el uno o más AAT en la segunda y posteriores MVA-BN son AAT iguales o similares a los de la primera administración.

40 En otra realización a modo de ejemplo, se puede emplear una primovacunación-refuerzo heterólogo en donde un poxvirus, tal como variolovacuna que expresa uno o más AAT, se administra en una primera dosis en combinación con uno o más antagonistas o agonistas del punto de control inmunitario. Esta primera dosis va seguida por una o más administraciones de diferentes poxvirus, tales como viruela aviar que expresa uno o más AAT. Preferentemente, el uno o más AAT en el virus de la viruela aviar son el mismo AAT o similares a los incluidos en la variolovacuna de la primera administración. Se puede encontrar una descripción adicional de pautas heterólogas de primovacunación-refuerzo a modo de ejemplo en las patentes de EE. UU. 6.165.460; 7.598.225; y 7.247.615.

45 En una realización preferida, el uno o más AAT en la pauta heteróloga de primovacunación-refuerzo incluyen antígeno prostático específico (PSA) y/o antígeno de fosfatasa ácida prostática (PAP). En una realización más preferida, el antígeno PSA puede incluir los antígenos PSA encontrados en las patentes de EE. UU. 7.247.615 y 7.598.225. En un ejemplo no limitante, la primovacunación-refuerzo heterólogo que incluye PSA es PROSTVAC®.

50 En aún otra realización preferida, el uno o más AAT en la pauta heteróloga de primovacunación-refuerzo incluyen una mucina 1, antígeno asociado a la superficie celular (MUC1) y un antígeno carcinoembrionario (CEA). En una realización más preferida, los antígenos MUC1 y CEA pueden incluir los encontrados en las patentes de EE. UU. 7.118.738; 7.723.096; y la solicitud PCT N° PCT/US2013/020058. En un ejemplo no limitante, la pauta heteróloga de primovacunación-refuerzo que incluye un antígeno MUC-1 y CEA es CV301.

55 En aún otra realización a modo de ejemplo, se puede emplear una primovacunación-refuerzo heterólogo en donde un poxvirus, tal como MVA o MVA-BN, que expresa uno o más AAT, se administra en una primera dosis en combinación con uno o más antagonistas o agonistas del punto de control inmunitario. La primera dosis va seguida por una o más administraciones de poxvirus diferentes, tales como viruela aviar, que expresa uno o más AAT. Preferentemente, el

uno o más AAT en el virus de la viruela aviar son los mismos AAT o similares a los incluidos en el virus MVA o MVA-BN de la primera administración.

En ciertas realizaciones, la una o más vacunaciones de refuerzo se administran en intervalos que comprenden días, semanas o meses después de la administración de la primovacuna inicial. En ciertas realizaciones, la una o más vacunaciones de refuerzo se administran en intervalos del mismo día, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días después de la administración de la primovacuna inicial. En ciertas realizaciones, la una o más vacunaciones de refuerzo se administran en intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más semanas después de la administración de la primovacuna inicial. En ciertas realizaciones, la una o más vacunaciones de refuerzo se administran en intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más meses después de la administración de la primovacuna inicial. En ciertas realizaciones, la una o más vacunaciones de refuerzo se administran en cualquier combinación de intervalos después de la administración de la primovacuna inicial (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más semanas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más meses).

En una realización, la una o más vacunaciones de refuerzo posteriores de una pauta heteróloga de primovacuna-refuerzo se seleccionan de poxvirus de un género diferente de aquél de las primovacunas iniciales. En un ejemplo no limitante, cuando la primera vacuna de poxvirus o inicial incluye variolovacuna, la segunda vacuna de poxvirus y posteriores se seleccionan de los poxvirus de un género diferente, tal como suipox, avipox, capripox o un orthopox inmunogénicamente diferente de la variolovacuna.

La administración de un antagonista/agonista del punto de control inmunitario después de las dosis de refuerzo en primovacuna-refuerzo heterólogo aumenta la eficacia de los tratamientos del cáncer

PROSTVAC® comprende una pauta heteróloga de primovacuna-refuerzo que incluye una única administración de primovacuna con PROSTVAC-V (virus de la variolovacuna que expresa PSA y TRICOM™) seguido por una o más dosis de refuerzo consecutivas de PROSTVAC-F (virus de la viruela aviar que expresa PSA y TRICOM™); también se describe en J Clin Oncol 2010, 28:1099-1105.

Como se muestra y se describe en las Figuras 10-12 y los Ejemplos 13-15, una pauta posológica heteróloga de PROSTVAC® potencia enormemente la magnitud y la calidad de la respuesta de linfocitos T específica de PSA en comparación con la administración homóloga con el mismo vector. Además, las figuras y los ejemplos demuestran que la primovacuna con PROSTVAC-V y el refuerzo con PROSTVAC-F proporcionan el beneficio añadido de dirigir la respuesta inmunitaria de CTL CD8 altamente funcional hacia PSA, el antígeno de tumor diana, y lejos del vector de la variolovacuna.

En al menos un aspecto, cuando una o más dosis de un poxvirus recombinante se administran a un paciente con cáncer, la mayor eficacia terapéutica en el tratamiento del cáncer se logra administrando uno o más antagonistas o agonistas del punto de control inmunitario en combinación con una segunda dosis o administración de poxvirus recombinante o posterior.

En un aspecto más particular, cuando se administran una o más dosis de un poxvirus recombinante de la presente invención a un paciente con cáncer como parte de una pauta heteróloga de primovacuna-refuerzo, se logra mayor eficacia terapéutica en el tratamiento del cáncer administrando al menos un antagonista o agonista del punto de control en combinación con la segunda dosis de refuerzo o posteriores de poxvirus recombinante que codifica al menos un AAT. Esta mayor eficacia terapéutica se realiza, al menos en parte, debido a que durante y después de la segunda dosis de refuerzo o posteriores de una pauta heteróloga de primovacuna-refuerzo, la respuesta de linfocitos T inmunitaria de un paciente se centra más en el antígeno de tumor en comparación con el poxvirus recombinante. Por consiguiente, al menos en un aspecto, una administración de un antagonista o agonista del punto de control inmunitario durante las dosis de refuerzo funciona potenciando la respuesta inmunitaria de un paciente al antígeno de tumor, y así aumenta la respuesta inmunitaria de un paciente más específicamente al tumor.

En al menos otro aspecto, como parte de un tratamiento del cáncer que implica una pauta heteróloga de primovacuna-refuerzo, la administración de al menos un antagonista o agonista del punto de control inmunitario en combinación con la segunda dosis de refuerzo o posteriores de poxvirus recombinante maximiza los beneficios terapéuticos del antagonista o agonista del punto de control inmunitario, mientras que se minimizan los efectos secundarios adversos que se han observado en los tratamientos del punto de control inmunitario.

En vista de las enseñanzas de la presente divulgación, en realizaciones adicionales, la presente invención incluye una combinación para su uso en el tratamiento de un paciente humano con cáncer, comprendiendo la combinación: (a) un primer poxvirus recombinante, comprendiendo el poxvirus al menos un antígeno asociado a tumor (AAT); y (b) un segundo poxvirus recombinante, comprendiendo el poxvirus al menos un antígeno asociado a tumor (AAT); en donde el segundo poxvirus recombinante se administra en combinación con al menos un antagonista o agonista del punto de control inmunitario. En una realización adicional, el segundo poxvirus recombinante es diferente del primer poxvirus recombinante. En otras realizaciones, el segundo poxvirus recombinante es de un género diferente del primer poxvirus recombinante.

En otra realización, el primer y segundo poxvirus recombinantes son diferentes o son de un género diferente y se administran como una pauta heteróloga de primovacuna-refuerzo, comprendiendo la pauta heteróloga de primovacuna-refuerzo: a) administrar el primer poxvirus recombinante como una primera dosis de

primovacunación; y b) administrar el segundo poxvirus recombinante como una o más dosis de refuerzo en combinación con al menos un antagonista o agonista del punto de control inmunitario. En una realización preferida, la pauta heteróloga de primovacunación-refuerzo se selecciona de PROSTVAC®, CV301 o MVA-BN-CV301.

5 En otra realización más, se contempla que el primer poxvirus recombinante o el poxvirus recombinante de la dosis inicial o de primovacunación no incluye un antagonista o agonista del punto de control inmunitario.

Se contempla además que el primer y el segundo poxvirus recombinantes pueden ser cualquier poxvirus, tal como, pero no se limita a, los descritos en la presente divulgación. Se contempla además que el al menos un antígeno asociado a tumor (AAT) puede ser cualquier AAT, tal como, pero no se limita a, los AAT descritos en la presente divulgación.

10 En una o más realizaciones, al menos un antagonista o agonista del punto de control inmunitario se administra el mismo día o en 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días desde la segunda dosis o posteriores de un poxvirus recombinante que codifica al menos un AAT. En una realización preferida, al menos un antagonista o agonista del punto de control inmunitario se administra como parte de una pauta heteróloga de primovacunación-refuerzo y se administra el mismo día o en 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días desde la segunda dosis de refuerzo o posteriores de un poxvirus recombinante que codifica al menos un AAT.

15 En una o más realizaciones, al menos un antagonista o agonista del punto de control inmunitario se administra después de que se administre la segunda dosis o posterior de un poxvirus recombinante que codifica al menos un AAT. En una realización preferida, al menos un antagonista o agonista del punto de control inmunitario se administra como parte de una pauta heteróloga de primovacunación-refuerzo, y se administra después de la segunda dosis de refuerzo o posteriores de un poxvirus recombinante que codifica al menos un AAT. Se contempla que, después de la segunda dosis de refuerzo o posteriores de un poxvirus recombinante, los intervalos de tiempo en los que se administra al menos un antagonista o agonista del punto de control inmunitario pueden incluir los intervalos de tiempo descritos en la presente divulgación.

20 Se contempla además que cuando se administra en combinación con una segunda dosis de refuerzo o una más posteriores de un poxvirus recombinante que codifica al menos un AAT, se puede administrar al menos un antagonista o agonista del punto de control inmunitario a una dosis o concentración como se proporciona en la presente divulgación.

Realizaciones adicionales para combinaciones o medicamentos

25 En realizaciones adicionales, la presente divulgación engloba una combinación o medicamento para su uso en el tratamiento de un paciente humano con cáncer. La combinación o el medicamento comprende un vector de poxvirus recombinante, comprendiendo el vector de poxvirus a) al menos un antígeno asociado a tumor (AAT); y b) un antagonista de TIM-3. El antagonista de TIM-3 puede incluir un anticuerpo anti-TIM-3, ARN antisentido o ARNip.

30 En aún una realización adicional, la presente divulgación puede incluir una combinación o medicamento para su uso en el tratamiento de un paciente humano con cáncer, comprendiendo la combinación o medicamento: (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un poxvirus recombinante, comprendiendo el vector de poxvirus al menos un antígeno asociado a tumor (AAT); (b) una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un antagonista de TIM-3; y (c) una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de un antagonista PD-1, un antagonista LAG-3 o un antagonista CTLA-4. Se contempla que los diversos antagonistas o agonistas del punto de control inmunitario pueden estar incorporados en uno o más anticuerpos, ARN antisentido o ARNip.

35 En otra realización adicional, la presente divulgación puede incluir una combinación o medicamento para su uso en el aumento de la tasa global de supervivencia en un paciente humano con cáncer, comprendiendo la combinación o medicamento: (a) un vector de poxvirus recombinante, comprendiendo el vector de poxvirus al menos un antígeno asociado a tumor (AAT); y b) un antagonista de TIM-3. El antagonista de TIM-3 puede incluir un anticuerpo anti-TIM-3.

40 En otra realización adicional, el poxvirus recombinante que codifica un AAT en la combinación o medicamentos descritos en el presente documento puede ser PROSTVAC®. En otra realización más, el poxvirus recombinante que codifica un AAT en la combinación o medicamentos descritos en el presente documento puede ser CV301.

45 En aún una realización adicional, la presente divulgación puede incluir el uso de: (a) un poxvirus recombinante, comprendiendo el poxvirus al menos un antígeno asociado a tumor (AAT); y (b) un antagonista de TIM-3. El antagonista de TIM-3 puede incluir un anticuerpo anti-antagonista de TIM-3. En una realización adicional, el uso de la composición farmacéutica o medicamento desvelado puede ser para el tratamiento de un paciente humano con cáncer.

50 En aún una realización adicional, la presente divulgación puede incluir el uso de: (a) un poxvirus recombinante, comprendiendo el poxvirus al menos un antígeno asociado a tumor (AAT); y (b) un antagonista de TIM-3; y (c) al menos uno de un antagonista PD-1, un antagonista LAG-3 o un antagonista CTLA-4. Se contempla que los diversos antagonistas o agonistas del punto de control inmunitario pueden estar incorporados en uno o más anticuerpos. En una realización adicional, el uso de la composición farmacéutica o medicamento desvelado puede ser para el tratamiento de un paciente humano con cáncer.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Construcción de MVA-BN-HER2

La infección y transfección simultánea de los cultivos permitió que ocurriera la recombinación homóloga entre el genoma viral y el plásmido de recombinación. Se aisló el virus portador del inserto, se caracterizó y se prepararon reservas de virus.

- 5 El plásmido pBN146 contiene secuencias que también están presentes en MVA-BN (los marcos de lectura abiertos 14L y 15L). La secuencia de HER2 se insertó entre las secuencias de MVA-BN para permitir la recombinación en el genoma viral de MVA-BN. Así, se construyó un plásmido que contenía la secuencia de HER2 en la dirección 3' de un promotor de poxvirus, específicamente el promotor del gen de cuerpos de inclusión de tipo A del virus de la viruela vacuna. El plásmido también contuvo un casete de selección que comprende un promotor sintético del virus de la variolovacuna (Ps), un gen de resistencia a fármacos (guanina-xantina fosforribosiltransferasa; Ecogpt), un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP). Ambos genes de selección (gpt y EGFP) se codificaron por un único transcrito bicistrónico.

Se modificó la secuencia de HER-2 mediante la adición de secuencias de nucleótidos que codifican epítopes de la toxina tetánica de p2 y p30 para aumentar la respuesta inmunitaria contra ella. Después de que mHER2 se insertara en el genoma de MVA-BN, la "región de inserción" del virus tuvo la siguiente estructura:

- 15 Promotor ATI - secuencia HER2 - promotor Ps - gpt - IRES - EGFP. La región de inserción se flanqueó por secuencias de la región intergénica MVA-BN I4L (F1 y F2) en el plásmido de recombinación bacteriana pBN146. La secuencia de nucleótidos de la construcción se muestra a continuación.

AGTATGCATTTTTACGGATGGAGTCTCGGTCTAAAAACGGGAATGTACTATCTACGTACG
AAACCCGCATCCGCTCCCATTCATTCAATTACATTGGACAAGGATAAAATAAAACCACTGGTG
GTTTGGCATTCCGAAATCTGTACATCATGCAGTGGTTAAACAAATCTAGAACTAGTTTAA
TTAAGGAGCTGTTTTGAATAAAATTTTTTATAATAAAATCTAGAACTAGTGGATCCCCCG
GGCTGCAGGAATTCGATCTAGCCGCCACCATGGAGCTGGCGGCCTTGTGCCGCTGGGGGC
TCCTCCTCGCCCTCTTGCCCCCGGAGCCGCGAGCACCAAGTGTGCACCGGCACAGACA
TGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCTCTACC
AGGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAACCTGGAACCTACCTACCTGCCACCAATGCCAGCT
TAAGTTTCCTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAACCAAG
TGAGGCAGGTCCCCTGCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACA
ACTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGAGACCCGCTGAACAATACCACCCCTGTACAG
GGGCTCCCCAGGAGGCCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCACAGAGATCTTGAAG
GAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCAAGCTCTGCTACCAGGACACGATTTTGTGGAAGG
ACATCTTCCACAAGAACAACAGCTGGCTCTCACACTGATAGACACCAACCGCTCTCGGG
CCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGCTGGGGAGAGAGTTCTGAGG
ATTGTCAGAGCCTGACGCGCACTGTCTGTGCCGGTGGCTGTGCCCGCTGCAAGGGGCCAC
TGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTGCACGGGCCCAAGCACTCTG
ACTGCCTGGCCTGCCTCCACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCCTGCCAGCCC
TGGTCCAGTACATCAAAGCTAACTCCAAATTCATCGGTATCACCGAGCTGCGGTATACAT
TCGGCGCCAGCTGTGTGACTGCCTGTCCCTACAACTACCTTTCTACGGACGTGGGATCCT
GCACCCCTCGTCTGCCCCCTGCACAACCAAGAGGTGACAGCAGAGGATGGAACACAGCGGT
GTGAGAAGTGCAGCAAGCCCTGTGCCCGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACTTGC
GAGAGGTGAGGGCAGTTACCAAGTGCATATCCAGGAGTTTGTGCTGCAAGAAGATCT
TTGGGAGCCTGGCATTCTGCGGGAGAGCTTTGATGGGGACCCAGCCTCCAACACTGCC
CGCTCCAGCCAGAGCAGCTCCAAGTGTGTTGAGACTCTGGAAGAGATCACAGTTACCTAT
ACATCTCAGCATGGCCGGACAGCCTGCCTGACCTCAGCGTCTTCCAGAACCCTGCAAGTAA
TCCGGGGACGAATTCTGCACAATGGCGCCTACTCGCTGACCCTGCAAGGGCTGGGCATCA
GCTGGCTGGGGCTGCGCTCACTGAGGGAACCTGGGCAGTGGACTGGCCCTCATCCACCATA
ACACCCACCTCTGCTTCGTGCACACGGTGCCCTGGGACCAAGCTCTTTCGGAAACCCGCACC
AAGCTCTGCTCCACACTGCCAACCAGGACAGAGTGTGTGGGCGAGGGCCTGGCCT
GCCACCAAGCTGTGCGCCCGAGGGCACTGCTGGGGTCCAGGGCCACCCAGTGTGTCAACT
GCAGCCAGTTCTTTCGGGGCCAGGAGTGCCTGGAGGAATGCCGAGTACTGCAGGGGCTCC
CCAGGGAGTATGTGAATGCCAGGCACTGTTTGCCGTGCCACCCCTGAGTGTGAGCCCCAGA
ATGGCTCAGTGACCTGTTTTGGACCGGAGGCTGACCAGTGTGTGGCCTGTGCCCACTATA
AGGACCTCCCTTCTGCGTGGCCGCTGCCCGAGCGGTGTGAAACCTGACCTCTCCTACA
TGCCCATCTGGAAGTTTTCCAGATGAGGAGGGCGCATGCCAGCCTTGCCCATCAACTGCA
CCCACTCCTGTGTGGACCTGGATGACAAGGGCTGCCCCGCCGAGCAGAGAGCCAGCCCTC
TGACGTCCTTCAACAACCTTACCCTGAGCTTCTGGCTGCGCGTGCCCAAGGTGAGCGCCA
GCCACCTGGAGATCGTCTCTGCGGTGGTTGGCATTCTGTAGAAAGCTTGGTACCGAGCTCG
GATCCACTAGTCCAGTGTGGTGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCATCAAG
CTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAGTTAATTAAGGATCCCCCG

GGCTGCAGGAATTCCATTTTTATTCTCAAATGAGATAAAGTGAAAATATATATCATATAT
ACAAAGTA

(SEQ ID NO:1).

Los codones de iniciación y de terminación de HER2 se indican en negrita. Las secuencias flanqueantes se indican en cursiva.

La traducción del polipéptido HER2 codificado se muestra a continuación:

MELAAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMRLHLYQGCQVVQGNL
ELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNVQVQVPLQRLRIVRGTLQFEDNYALAVLDNG
DPLNNTTPTVTGASPGGLRELQRLSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLA
LTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQC
AAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALV**QYIKANSKFIGITEL**RYTFGASCVTACP
YNYLSTDVGSCTLVCP LHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVAVTSAN
IQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLOPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLP
DLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNNHLCFVHTV
PWDQLFRNP HQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGP GPTQCVNCSQFLRGQEC
VEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFPCVARC
PSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTS**FNFTVS**
FWLRVPKVSASHLEIVSAVVGIL.

5 (SEQ ID NO:2).

Los epítomos de la toxina tetánica de las secuencias p2 y p30 se indican en negrita.

Se inocularon cultivos de CEF con MVA-BN y también se transfectaron con ADN de plásmido pBN146. A su vez, se inocularon muestras de estos cultivos celulares en cultivos de CEF en medio que contenía fármacos de selección, y se aislaron clones virales que expresan EGFP por purificación en placa. Las reservas de virus que crecieron en presencia de los fármacos de selección y expresaron EGFP se designaron MVA-BN-mHER2. La generación de MVA-BN-HER2 y la preparación de la reserva de virus involucraron a doce (12) pases secuenciales, que incluyen cinco (5) purificaciones en placa.

Se sometió a pases MVA-BN-HER2 en cultivos de células CEF en ausencia de fármacos de selección. La ausencia de fármacos de selección permitió la pérdida de la región que codifica los genes de selección, gpt y EGFP y el promotor asociado (el casete de selección) de la secuencia insertada. La recombinación que dio como resultado la pérdida del casete de selección está mediada por la región F1 I4L y una subsección de esa región, la repetición F1 (F1 rpt), que flanquea el casete de selección en el plásmido pBN146. Estas secuencias duplicadas se incluyeron para mediar en la recombinación que da como resultado la pérdida del casete de selección, dejando solo la secuencia HER2 insertada en la región intergénica I4L.

Se preparó virus que carecía de placas en el casete de selección. Dicha preparación involucró a quince (15) pases que incluyen cinco (5) purificaciones en placa.

La presencia de la secuencia HER2 y la ausencia de virus MVA-BN parental en reservas de MVA-BN-HER2 se confirmó por análisis por PCR, y se usó PCR anidada para verificar la ausencia del casete de selección (los genes gpt y EGFP).

Se demostró la expresión de la proteína HER2 en células inoculadas con MVA-BN-HER2 *in vitro*.

Ejemplo 2

Implantación tumoral y tratamiento con MVA-BN-HER2 y anticuerpos

Se compraron ratones BALB/c hembra (6-8 semanas de edad, ~ 20 g) de Simonsen Laboratories, Gilroy, CA. En el modelo de tumor sólido, se implantaron ratones BALB/c hembra en el día 1 con células CT26-HER-2 ($1,0 \times 10^5$, i.d. en el flanco dorsal). Se trataron ratones en el día 1 y 15 con MVA-BN-HER2 (1E7 unidades infecciosas en 100 μ L de TBS, por escarificación de la cola [e.c.] o por vía subcutánea [s.c.] en la base de la cola). Se compraron los siguientes anticuerpos de Bio X Cell (West, Lebanon, NH): anti-Tim-3 (RMT3-23), anti-CTLA-4 (9D9), anti-PD-1 (RMP1-14) y anti-LAG-3 (C9B7W). Todos los anticuerpos se inyectaron i.p. a 200 μ g por ratón en 100 μ L de PBS en los días 1 y 15, a menos que se indicara lo contrario. Se midieron dos veces a la semana los tumores y se calculó el volumen tumoral según la fórmula: volumen tumoral (mm^3) = (longitud \times anchura²)/2.

Se reunieron sangre completa, tumor/pulmones o bazo (4 ratones/grupo) para el análisis de citometría de flujo. Se prepararon esplenocitos prensando los bazo entre dos portaobjetos de vidrio congelados y lisando los glóbulos rojos

con tampón de lisis ACK (Life Technologies, Grand Island, NY). Se trocearon los pulmones y tumores asociados hasta trozos de ~1-2 mm³ y se digirieron más hasta suspensiones de células individuales durante 1 h a 37 °C en DMEM con 10 % de FBS, 50 U/mL de DNasa I y 250 U/mL de colagenasa I (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ). Se lisaron los glóbulos rojos en tanto los pulmones como la sangre completa con tampón de lisis RBC (eBioscience). Se tiñeron las suspensiones de células individuales según protocolos habituales de tinción superficial.

Se compraron anticuerpos contra las siguientes proteínas de BD Bioscience (San Jose, CA): CD3e (500A2), CD4 (RM4-5), CD8a (53-6.7); BioLegend (San Diego, CA): CD3e (145-2C11), LAG-3 (C9B7W), PD-1 (CD279, 29F.1A12), Tim-3 (RMT3-23); o eBioscience (San Diego, CA): ICOS (7E.17G9), CD16/CD32 (93).

Todas las muestras se adquirieron en BD LSRII o Fortessa y se analizaron usando FlowJo versión 9.6.2 (TreeStar Inc., Ashland, OR).

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando GraphPad Prism versión 6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Ejemplo 3

Aumento en la expresión de Tim-3 con tratamiento con MVA-BN-HER2

Se midió la expresión de Tim-3 por citometría de flujo en ratones después del día 1 y 15 de tratamiento con MVA-BN-HER2 (1E7 unidades infecciosas, e.c.) como se describe en el Ejemplo 2. Mostrado en la Figura 1, los resultados demuestran un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ que expresan TIM-3 después del tratamiento con MVA-BN-HER2.

Ejemplo 4

El tratamiento con MVA-BN-HER2 y anti-Tim-3 reduce el crecimiento tumoral

Se implantaron i.d. ratones con tumores CT26-HER-2 en el día 1 y se trataron con MVA-BN-HER2 (1E7 unidades infecciosas, e.c.) y anti-Tim-3 (200 µg, i.p.) en los días 1 y 15 como se describe en el Ejemplo 2. Mostrado en la Figura 2, los resultados demuestran que el tratamiento con MVA-BN-HER2 en combinación con anti-Tim-3 redujo el crecimiento tumoral.

Mostrado en la figura 2, los resultados demuestran que el tratamiento con MVA-BN-HER2 y anti-Tim-3 redujo el crecimiento y el volumen tumoral.

Ejemplo 5

El tratamiento con MVA-BN-HER2 y anti-Tim-3 y anti-PD-1 reduce el crecimiento tumoral

Se implantaron i.d. ratones con tumores CT26-HER-2 en el día 1 y se trataron con MVA-BN-HER2 (1E7 unidades infecciosas, e.c.) y anti-Tim-3 y anti-PD-1 (200 µg de cada uno, i.p.) en los días 1 y 15 como se describe en el Ejemplo 2. Mostrado en la Figura 3, los resultados demuestran que el tratamiento con MVA-BN-HER2 en combinación con anti-Tim-3 y anti-PD-1 redujo el crecimiento tumoral.

Ejemplo 6

El tratamiento con MVA-BN-HER2 y anti-Tim-3 y LAG-3 reduce el crecimiento tumoral

Se implantaron i.d. ratones con tumores CT26-HER-2 en el día 1 y se trataron con MVA-BN-HER2 (1E7 unidades infecciosas, e.c.) y anti-Tim-3 y anti-LAG-3 (200 µg de cada uno, i.p.) en los días 1 y 15 como se describe en el Ejemplo 2. Mostrado en la Figura 4, los resultados demuestran que el tratamiento con MVA-BN-HER2 en combinación con anti-Tim-3 y anti-LAG-3 redujo el crecimiento tumoral.

Ejemplo 7

El tratamiento con MVA-BN-HER2 y anti-Tim-3 y anti-CTLA-4 reduce el crecimiento tumoral

Se implantaron i.d. ratones con tumores CT26-HER-2 en el día 1 y se trataron con MVA-BN-HER2 (1E7 unidades infecciosas, s.c.) y anti-Tim-3 (200 µg, i.p.) y anti-CTLA-4 (22 µg, i.p.) en los días 1 y 15 como se describe en el Ejemplo 2. Mostrado en la Figura 5, los resultados demuestran que el tratamiento con MVA-BN-HER2 en combinación con anti-Tim-3 y anti-LAG-3 redujo el crecimiento tumoral. *** p<0,001, **** p<0,0001, ANOVA bilateral.

Ejemplo 8

Inducción de una respuesta antitumoral en ratones tratados con PROSTVAC y anticuerpos

Se implantaron ratones BALB/c macho (6-8 semanas de edad, ~20 g, Simonsen Laboratories, Gilroy CA) en el día 1 con células E6 (1,5×10⁵, i.d. en el flanco posterior). Se trataron ratones en el día 1 con PROSTVAC-V (2E7 unidades

infecciosas, s.c. en la base de la cola) y en los días 8 y 15 con PROSTVAC-F (1E8 unidades infecciosas, s.c. en la base de la cola). Se trataron ratones i.p. con anti-PD-1 y o anti-LAG-3 como se describe en el Ejemplo 2.

Ejemplo 9

Inducción de una respuesta antitumoral en ratones tratados con PROSTVAC y anti-PD-1

- 5 Se implantaron i.d. ratones BALB/c con tumores E6 y se trataron con PROSTVAC y anti-PD-1 como se describe en el Ejemplo 8. Los resultados se muestran en la Figura 6.

Ejemplo 10

Inducción de una respuesta antitumoral en ratones tratados con PROSTVAC y anti-LAG-3

- 10 Se implantaron i.d. ratones BALB/c con tumores E6 y se trataron con PROSTVAC y anti-LAG-3 como se describe en el Ejemplo 8. Los resultados se muestran en la Figura 7.

Ejemplo 11

Inducción de una respuesta antitumoral en ratones tratados con PROSTVAC y anti-PD-1 y anti-LAG-3

Se implantaron i.d. ratones BALB/c con tumores E6 y se trataron con PROSTVAC y anti-PD-1 y anti-LAG-3 como se describe en el Ejemplo 7. Los resultados se muestran en la Figura 8.

Ejemplo 12

MVA-BN-CV301 con anti-CTLA-4 y anti-PD-1 aumenta la tasa de supervivencia global

- 20 Se implantaron ratones C57/BL6 hembra (6-8 semanas de edad, ~ 20 g, Simonsen Laboratories, Gilroy, CA) en el día 1 i.v. con $1,0 \times 10^6$ células MC38-MUC1 en 300 μ L de DPBS que forma tumores en los pulmones. Se trataron ratones con MVA-BN-CV301 (4E5 unidades infecciosas por vía subcutánea, s.c. por encima de la base de la cola) y se trataron con anti-CTLA-4 y anti-PD-1 (200 μ g de cada uno) i.p. en los días 4 y 18. MVA-BN-CV301

Resultados. Mostrado en la Figura 9, los resultados demuestran que MVA-BN-CV301 en combinación con anti-CTLA-4 y anti-PD-1 aumentó significativamente la tasa de supervivencia global de los sujetos en comparación con el tratamiento de cánceres con cualquiera de MVA-BN-CV301 o anti-CTLA-4 y anti-PD-1 solo.

Ejemplo 13

La primovacunación-refuerzo heterólogo amplifica las respuestas de linfocitos T específicas de PSA

- 25 Se trataron machos BALB/c (5/grupo) cada dos semanas con: Tampón (control), PROSTVAC-V (VVV) (2E6 unidades infecciosas, s.c. en la base de la cola), PROSTVAC-F (FFF) (1E7 unidades infecciosas, s.c. en la base de la cola), o recibieron una primovacunación de PROSTVAC-V seguida por 2 refuerzos con PROSTVAC-F (VFF). Se ensayaron mezclas de esplenocitos para respuestas específicas de PSA por ELISPOT de IFN γ como se describe en Mandl et al., Cancer Immunol. Immunother (2012), 61:19-29.

- 30 Los resultados se muestran en la Figura 12. (A, B) y actividad citotóxica por citometría de flujo (% de linfocitos T CD8 CD107+ IFN γ +) (C). Se determinaron los títulos de IgG anti-PSA por ELISA para cada ratón individual (D). Para ELISPOT, los esplenocitos se re-estimularon con péptidos CD4 o CD8 específicos de PSA o controles (controles no mostrados a las concentraciones indicadas). Las respuestas que fueron demasiado numerosas para ser contadas se presentaron como 1000 puntos/millón de células. Se determinó la significación estadística por RM-ANOVA con la prueba a posteriori de Tukey a 0,01 μ M. ****P < 0,001 en comparación con el control (A y B). Para identificar linfocitos T CD8+ citotóxicos, los esplenocitos se re-estimularon durante la noche con un péptido CD8 específico de PSA en presencia de anticuerpo anti-CD107. Los gráficos muestran datos representativos de cuatro experimentos realizados independientemente.

- 40 Mostrado en la Figura 10, la pauta heteróloga de primovacunación-refuerzo con virus de la variolovacuna seguido por una o más dosis de refuerzo del virus de la viruela aviar produjeron una frecuencia mucho más alta de linfocitos T CD4 específicos de PSA que producen IFN γ (Figura 10A) y linfocitos T CD8 (Figuras 10B y 11A) en comparación con pautas posológicas homólogas de VVV o FFF.

- 45 Además, los linfocitos T específicos de PSA de la dosis de VFF fueron de avidez más alta (Fig. 10A y 10B), como se evidencia por frecuencias más altas de linfocitos T que responden a las concentraciones de péptido 0,01 μ M más bajas en ELISPOT. Y, lo que es más importante, el número de CTL CD8 específicos de PSA funcionalmente activos resultantes de la pauta heteróloga de VFF de primovacunación-refuerzo era 7 a 20 veces superior al generado por cualquier pauta posológica homóloga (Figura 10C).

- 50 A diferencia de las respuestas de linfocitos T, la pauta heteróloga de primovacunación-refuerzo no mejoró las respuestas específicas de anticuerpos contra PSA (Figura 10 D). Estos resultados indican que la dosis de VFF

heteróloga genera respuestas de linfocitos T CD4 y CD8 específicas de PSA de mayor magnitud y mayor calidad como se mide por mayor avidéz y elevada actividad de CTL CD8. Como se describe en el presente documento, esto contribuye a respuestas antitumorales específicas anti-PSA mejoradas tras la dosis heteróloga de PROSTVAC-V/F.

Ejemplo 14

5 **La primovacunación-refuerzo heterólogo mejora la calidad de las respuestas de linfocitos T específicas de PSA**

Se trataron BALB/c macho (5/grupo) como se describe en el Ejemplo 40. Se recogieron los bazo 14 días después del último tratamiento, y se re-estimularon mezclas de esplenocitos durante la noche con PSA OPL o controles (controles no mostrados). Las células se tiñeron para IFN γ , TNF α e IL-2 intracelular antes del análisis de citometría de flujo. (A) Los diagramas de sectores se ponderan en tamaño para reflejar los números de células detectadas (se indica los números totales de CD8 específicos de PSA por millón de linfocitos T debajo de cada gráfico). (B) Cantidad de producción de IFN γ en una base por célula como se mide por intensidad media de fluorescencia (IMF). Los gráficos muestran datos representativos de dos experimentos independientemente realizados.

Mostrado en la Figura 11, se observaron características distintivas adicionales en la calidad de la respuesta de linfocitos T CD8 específicos de PSA cuando linfocitos T CD8 específicos de PSA se analizaron para la producción multicitocina de IFN γ , TNF α e IL-2 por citometría de flujo (Figura 11). Usando expresión de citocinas, se han clasificado linfocitos T CD8 de memoria como linfocitos T de memoria efectores CD8 doble positivo (IFN γ + TNF α +, TEM y como linfocitos T CD8 de memoria central triple positivo (IFN γ + TNF α + IL-2+; TCM). Véase, por ejemplo, Nat Rev Immunol 2008, 8:247-258.

Además del aumento de magnitud de la respuesta de linfocitos T CD8 (Fig. 10 y Fig. 11A), se reveló un pronunciado desplazamiento en la calidad de la respuesta de linfocitos T CD8 por la mayor proporción de TEM doble positivo y TCM triple positivo (Fig. 11A) como resultado de la pauta heteróloga de PROSTVAC-V/F en comparación con la pauta posológica homóloga. La primovacunación con una dosis de PROSTVAC-V 5 veces mayor no dio ningún beneficio adicional en la magnitud o la calidad de la respuesta de linfocitos T CD8 (datos no mostrados). Los linfocitos T CD8 adicionales TEM doble positivo y TCM triple positivo produjeron mayores niveles de IFN γ en una base por célula que las células positivas individuales (Fig. 11B). Este aumento de la producción de IFN γ se observó en linfocitos T CD8 TEM y TCM independientemente de la pauta posológica.

Además, mostrado en la Figura 11, MVA-BN-HER2 induce linfocitos T específicos de antígeno de tumor que producen IFN γ . Se contempla por la presente divulgación que los TIL (linfocitos infiltrantes de tumor) inducidos por el virus que secretan IFN γ pueden conducir al aumento de PD-1 y/o PD-L1 en células tumorales; que respalda el bloqueo de esta vía en combinación con el tratamiento con virus.

Ejemplo 15

Inmunoenfoque de la respuesta de linfocitos T hacia PSA

Se trataron ratones como se describe en el Ejemplo 13. Se ensayaron mezclas de esplenocitos para la actividad citotóxica específica del virus de la variolovacuna (VV) (paneles derechos A y C) o específica de PSA (paneles derechos A y C) por citometría de flujo (% de linfocitos T CD8 CD107+ IFN γ +) 14 días después del último tratamiento. Los esplenocitos se re-estimularon durante la noche con los péptidos E3L y F2L de la variolovacuna o con PSA OPL en presencia de anticuerpo anti-CD107. Al día siguiente, las células se tiñeron intracelularmente para IFN γ y con los marcadores superficiales CD127 y KLRG1. Se determinó el % de SLEC y DPEC citotóxico específico de antígeno por modulación en células (CD8+CD127-KLRG1+) y (CD8+CD127+KLRG1+), respectivamente. Los gráficos muestran datos representativos de dos experimentos realizados independientemente. Los resultados se muestran en la Figura 12.

Se analizó el impacto de la pauta posológica heteróloga virus de la variolovacuna PROSTVAC Viruela aviar/F en comparación con la dosis homóloga sobre las capacidades citotóxicas de los subconjuntos de linfocitos T efectores específicos de vector frente a específicos de PSA. La dosis de VVV homólogo generó un número relativamente alto de SLEC citotóxico específico de la variolovacuna (~50 %) y DPEC (~20 %) (Figura. 12A y 12C), sin embargo, menos del 10 % de los linfocitos T CD8 citotóxicos SLEC o DPEC fueron específicos de PSA. En cambio, 65 % de SLEC y 30 % de los linfocitos T de memoria efectores DPEC altamente activos fueron CTL específicos de PSA tras la dosis de VFF heterólogo, mientras que menos del 10 % constituyeron CTL específicos de la variolovacuna (Figuras 12A y 12C). Por tanto, la pauta heteróloga PROSTVAC-V/F produjo una mejora de 100 veces en la relación de respuestas de linfocitos T SLEC y DPEC dirigidas a PSA con respecto a dirigidas a la variolovacuna (Figuras 12B y 12D). Otra vez, la primovacunación con 5 veces más PROSTVAC-V no produjo ningún beneficio adicional (datos no mostrados).

Mostrado en la Figura 12, se observaron características distintivas adicionales en la calidad de la respuesta de linfocitos T CD8 específicos de PSA cuando los linfocitos T CD8 específicos de PSA se analizaron para la producción multicitocina de IFN γ , TNF α e IL-2 por citometría de flujo (Figura 12). Usando expresión de citocinas, los linfocitos T de memoria CD8 se han clasificado como linfocitos T de memoria efectores CD8 doble positivo (IFN γ + TNF α +, TEM)

y como linfocitos T de memoria central CD8 triple positivo (IFN γ + TNF α + IL-2+; TCM). Véase, por ejemplo, Nat Rev Immunol 2008, 8:247-258.

Además del aumento de magnitud de la respuesta de linfocitos CD8 T (Fig. 11 y Fig. 12A), se reveló un pronunciado desplazamiento en la calidad de la respuesta de linfocitos T CD8 por la mayor proporción de TEM doble positivo y TCM triple positivo (Fig. 12A) como resultado de la pauta heteróloga de PROSTVAC-V/F en comparación con la pauta posológica homóloga. La primovacuna con una dosis de PROSTVAC-V 5 veces mayor no dio ningún beneficio adicional en la magnitud o la calidad de la respuesta de linfocitos T CD8 (datos no mostrados). Los linfocitos T CD8 adicionales TEM doble positivo y TCM triple positivo produjeron mayores niveles de IFN γ en una base por célula que las células positivas individuales (Fig. 12B). Este aumento de la producción de IFN γ se observó en linfocitos T CD8 TEM y TCM independientemente de la pauta posológica.

Ejemplo 16

Terapia de combinación con CTLA-4 después del inmunoenfoque

Se tratan BALB/c macho (5/grupo) cada dos semanas con: Tampón (control), primovacuna con PROSTVAC-V seguido por 2 refuerzos con PROSTVAC-F (VFF) como se describe en el Ejemplo 40. Se tratan i.p. ratones con anti-CTLA-4 (60 μ g) en los días 1, 15 y 29 (A), o en los días 15 y 29 (B), o en los días 16 y 30 (C) o en los días 17 y 31.(D). Se analizan respuestas de linfocitos T específicas de PSA como se describe en los Ejemplos 13, 14 y 15.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación para su uso en el tratamiento de un paciente humano con cáncer que comprende: (a) un poxvirus recombinante que codifica un polipéptido que comprende al menos un antígeno asociado a tumor (AAT); y (b) un antagonista de TIM-3 que es un anticuerpo, un ARN antisentido o un ARNip.
- 5 2. La combinación para el uso de la reivindicación 1, en donde el antagonista de TIM-3 es un anticuerpo anti-TIM-3.
3. La combinación para el uso de la reivindicación 1 o 2, que comprende además (c) un antagonista de una molécula de punto de control inmunitario seleccionada del grupo que consiste en: PD-1, LAG-3, CTLA-4 y combinaciones de los mismos, en donde el antagonista es un anticuerpo, un ARN antisentido o un ARNip.
- 10 4. La combinación para el uso de la reivindicación 3, en donde el antagonista de PD-1 comprende un anticuerpo anti-PD-1.
5. La combinación para el uso de la reivindicación 3, en donde el antagonista de CTLA-4 es un anticuerpo que inhibe la función de CTLA-4.
6. La combinación para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el poxvirus se selecciona de un orthopoxvirus y un avipoxvirus.
- 15 7. La combinación para el uso de la reivindicación 6, en donde el orthopoxvirus es un virus de la variolovacuna, preferentemente un virus modificado de la variolovacuna de Ankara (MVA), más preferentemente MVA-BN.
8. La combinación para el uso de la reivindicación 6, en donde el avipoxvirus es un virus de la viruela aviar.
9. La combinación para el uso de las reivindicaciones 1-8, en donde el al menos un AAT se selecciona del grupo que consiste en: carcinoembrionario (CEA), asociado a la superficie celular de mucina 1 (MUC-1), fosfatasa ácida prostática (PAP), antígeno prostático específico (PSA), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2), survivina, proteína 1 relacionada con tirosina (tyrp1), proteína 1 relacionada con tirosina (tyrp2), antígeno Brachyury y combinaciones de los mismos.
- 20 10. La combinación para el uso de las reivindicaciones 1-9, en donde el al menos un AAT es CEA y MUC-1.
11. La combinación para el uso de las reivindicaciones 1-10, en donde el tratamiento del cáncer se dirige contra cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, tiroides, melanoma, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de hígado, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de ovario o cáncer colorrectal.
- 25 12. La combinación para el uso de las reivindicaciones 1-11, en donde la combinación se administra como parte de una pauta homóloga o heteróloga de primovacunación-refuerzo;
- en donde la pauta homóloga de primovacunación-refuerzo comprende una primera dosis de primovacunación del poxvirus recombinante en combinación con el antagonista del punto de control inmunitario y una o más dosis de refuerzo posteriores de un mismo poxvirus recombinante en combinación con el antagonista del punto de control inmunitario; y
- 30 en donde la pauta heteróloga de primovacunación-refuerzo comprende una primera dosis de primovacunación del poxvirus recombinante en combinación con el antagonista del punto de control inmunitario y una o más dosis de refuerzo posteriores de un poxvirus recombinante diferente en combinación con el antagonista del punto de control inmunitario.
- 35

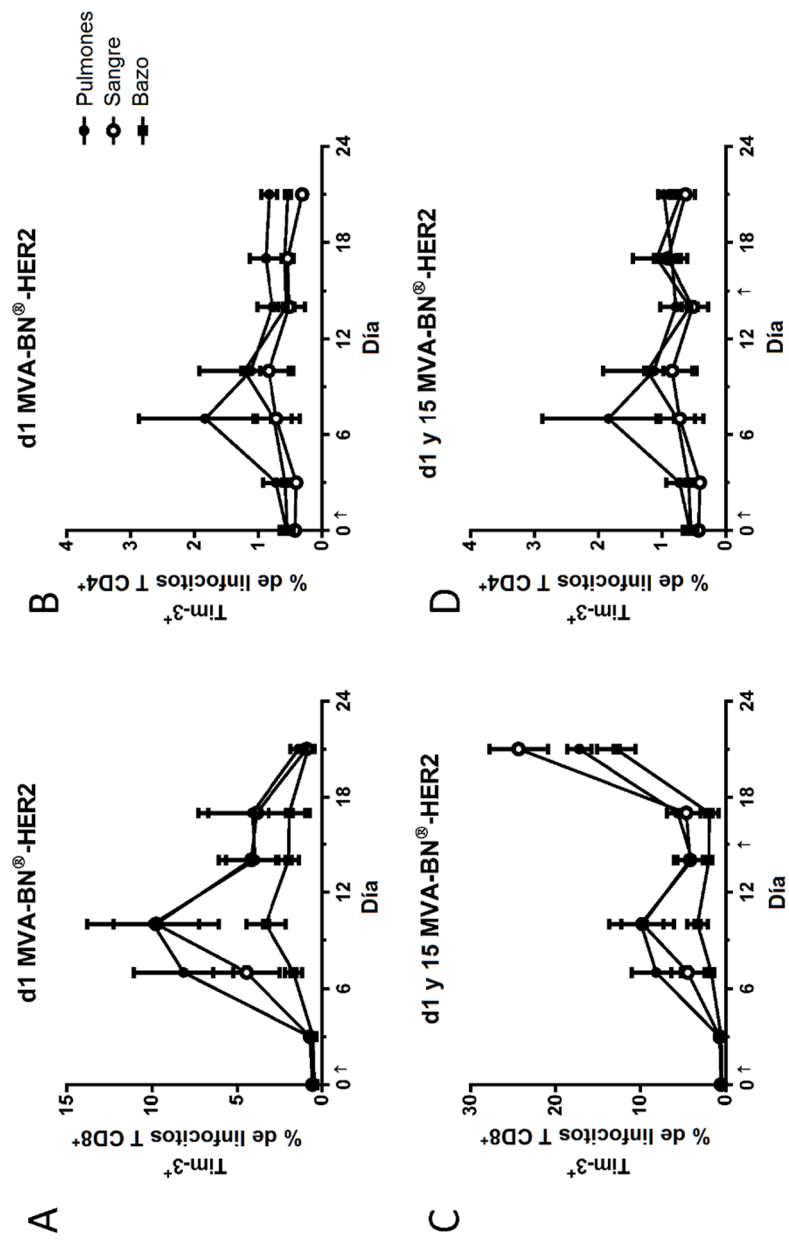


Figura 1

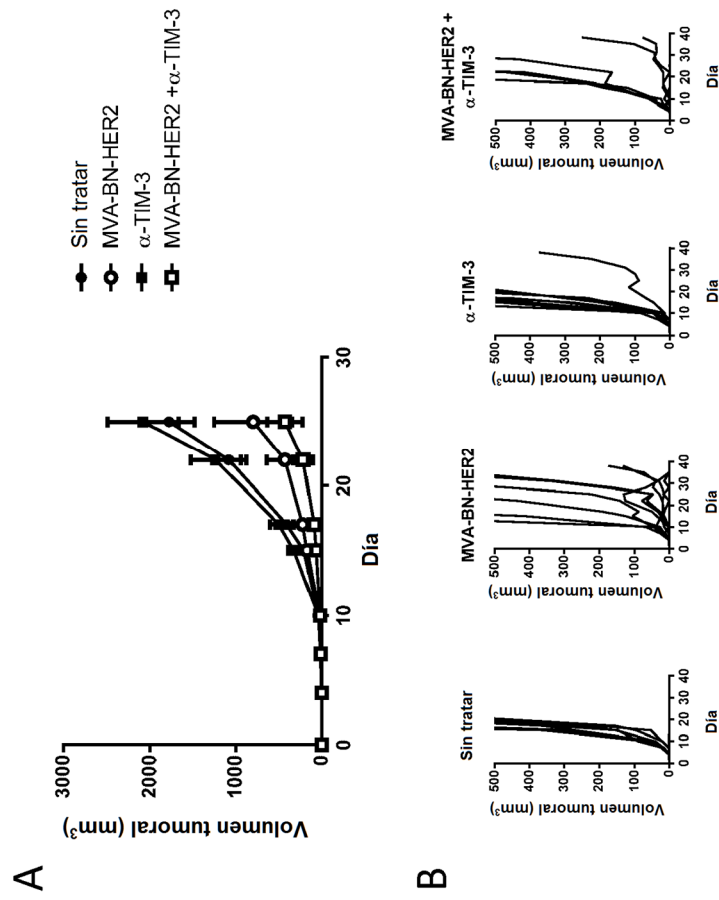


Figura 2

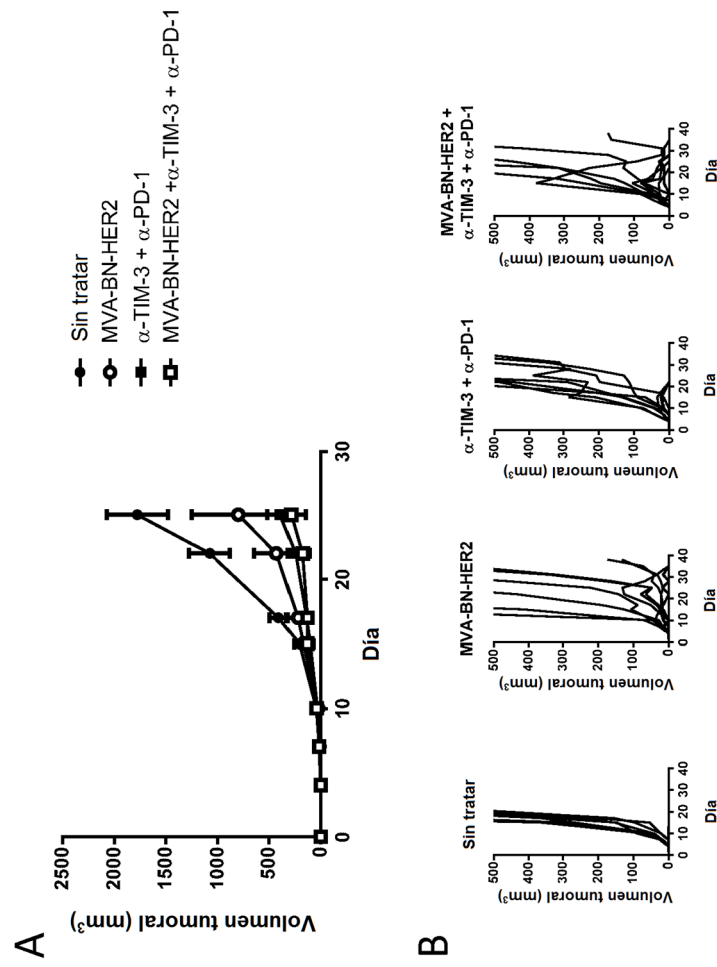


Figura 3

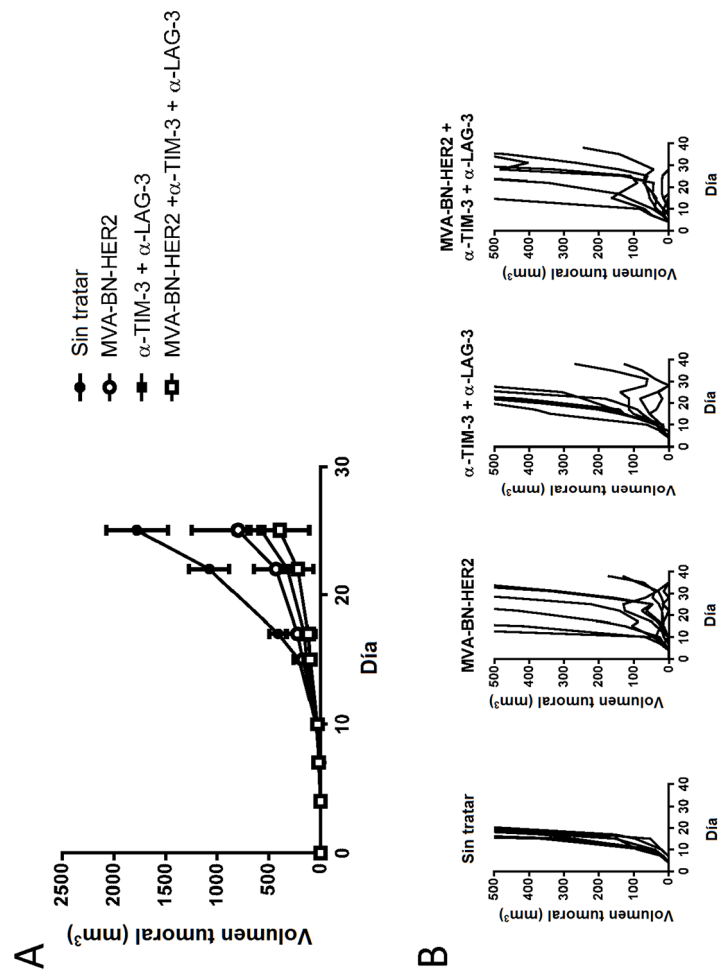


Figura 4

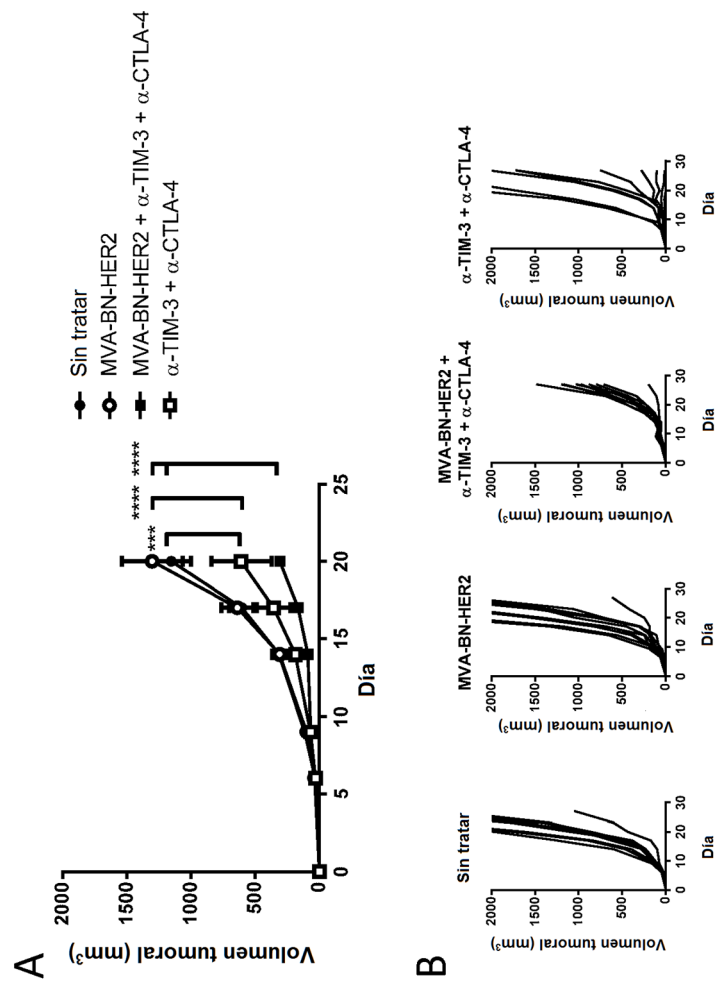


Figura 5

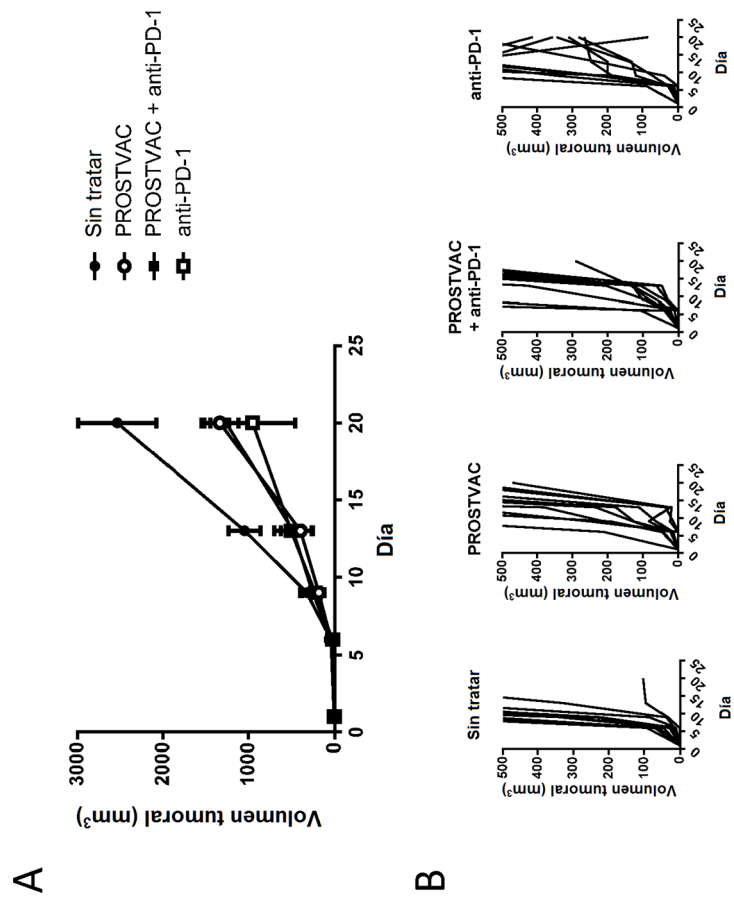


Figura 6

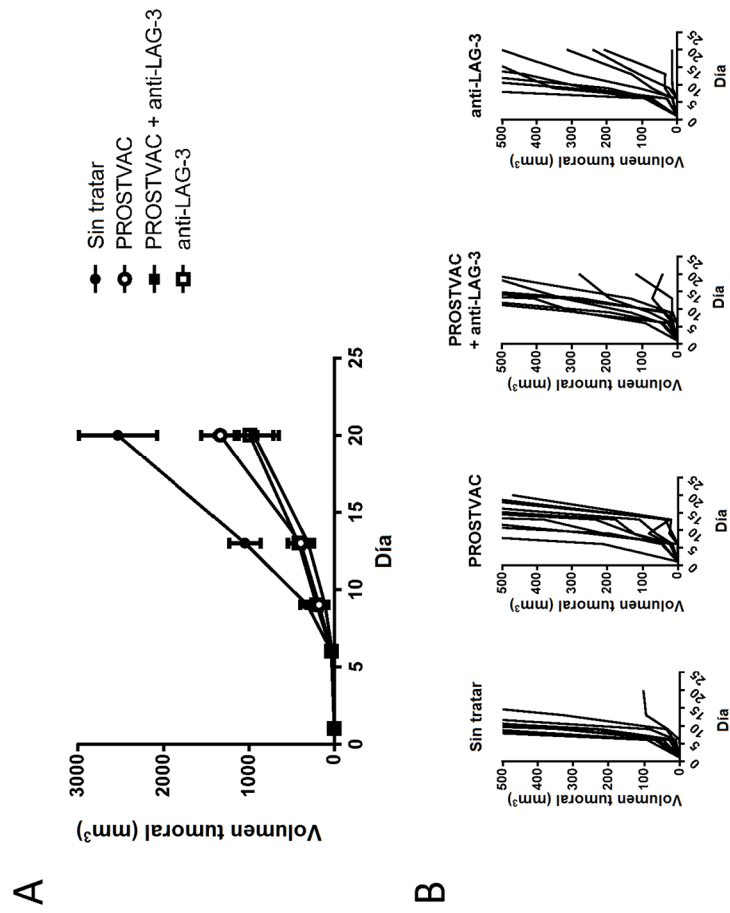


Figura 7

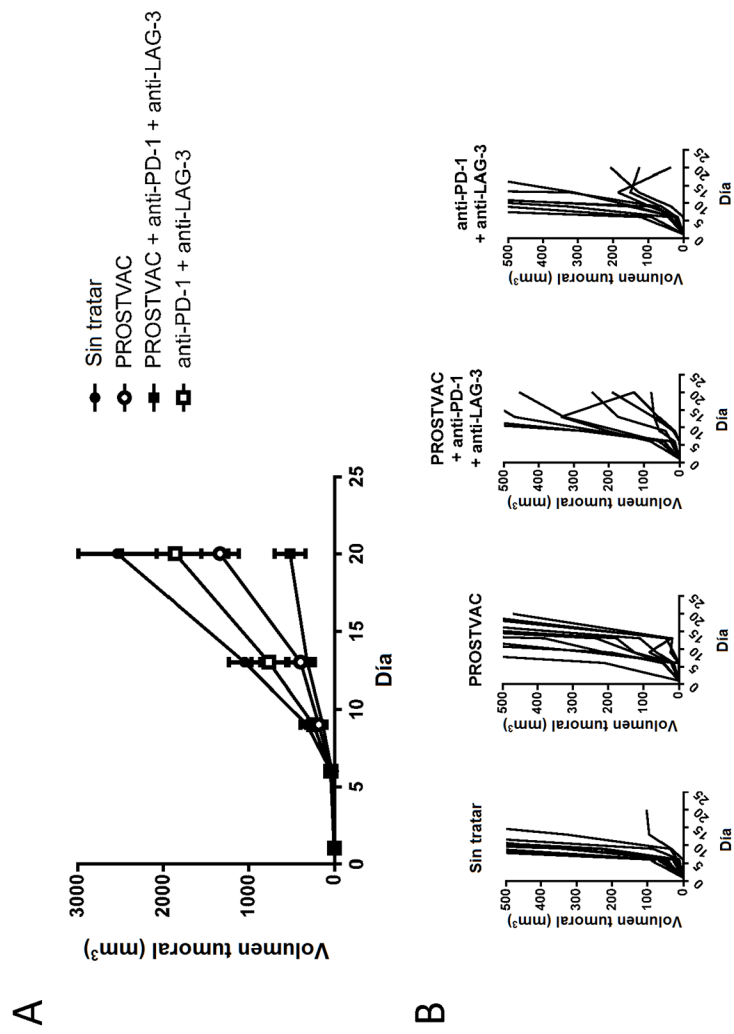


Figura 8

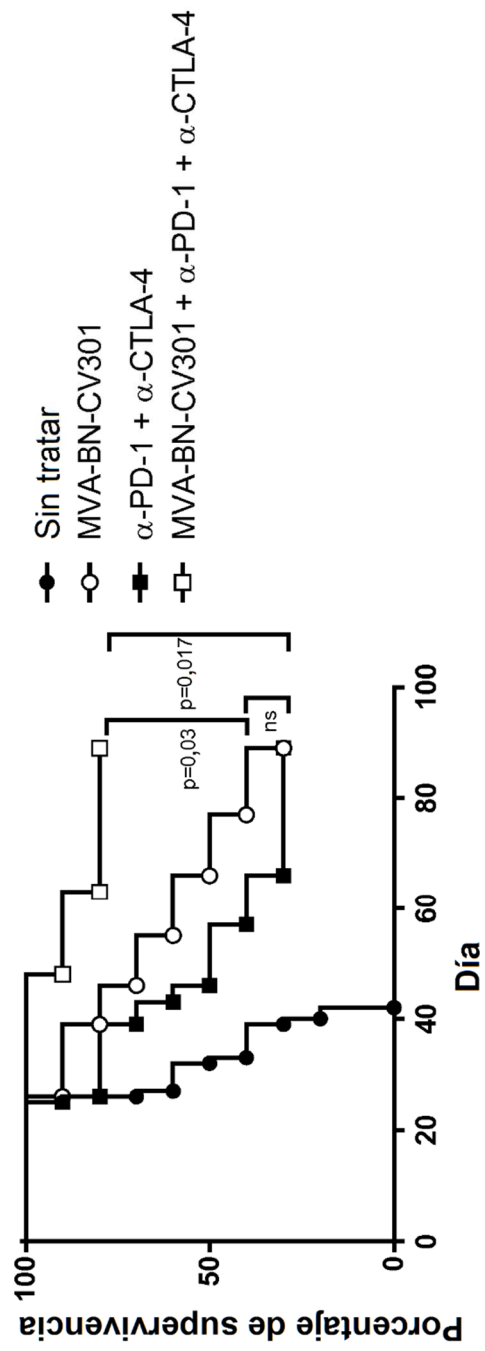


Figura 9

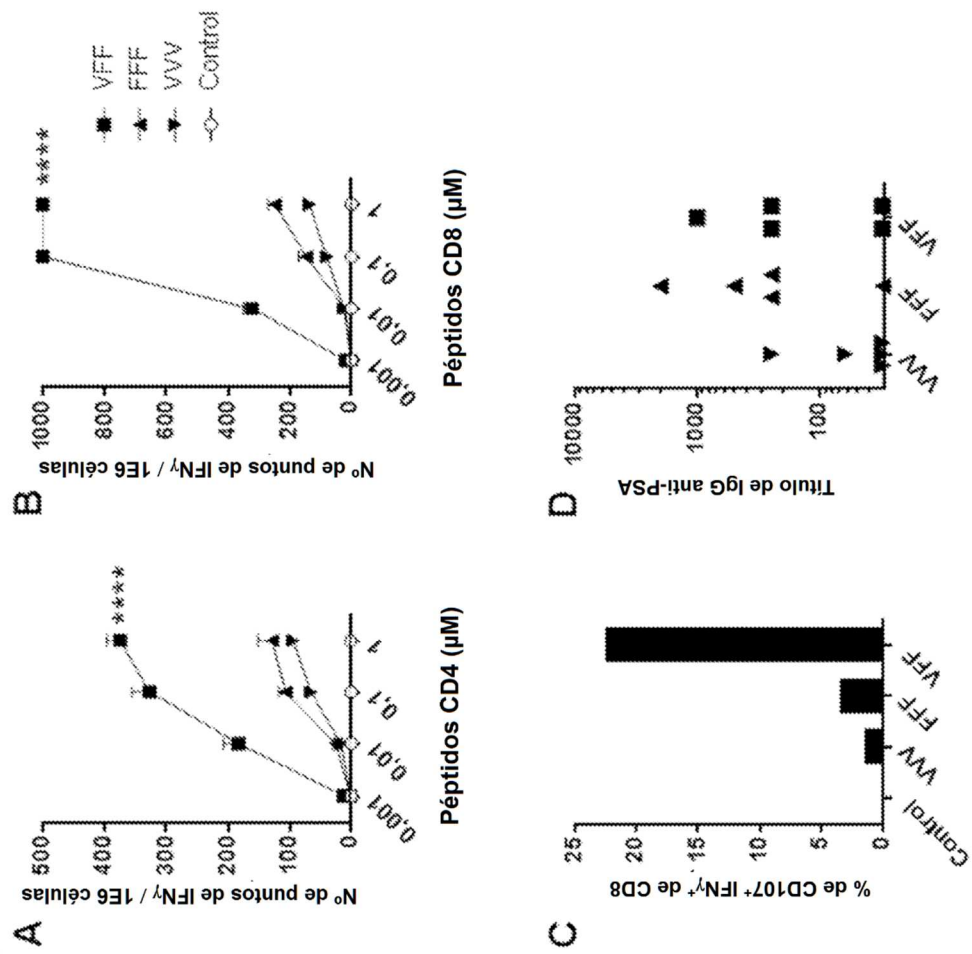


Figura 10

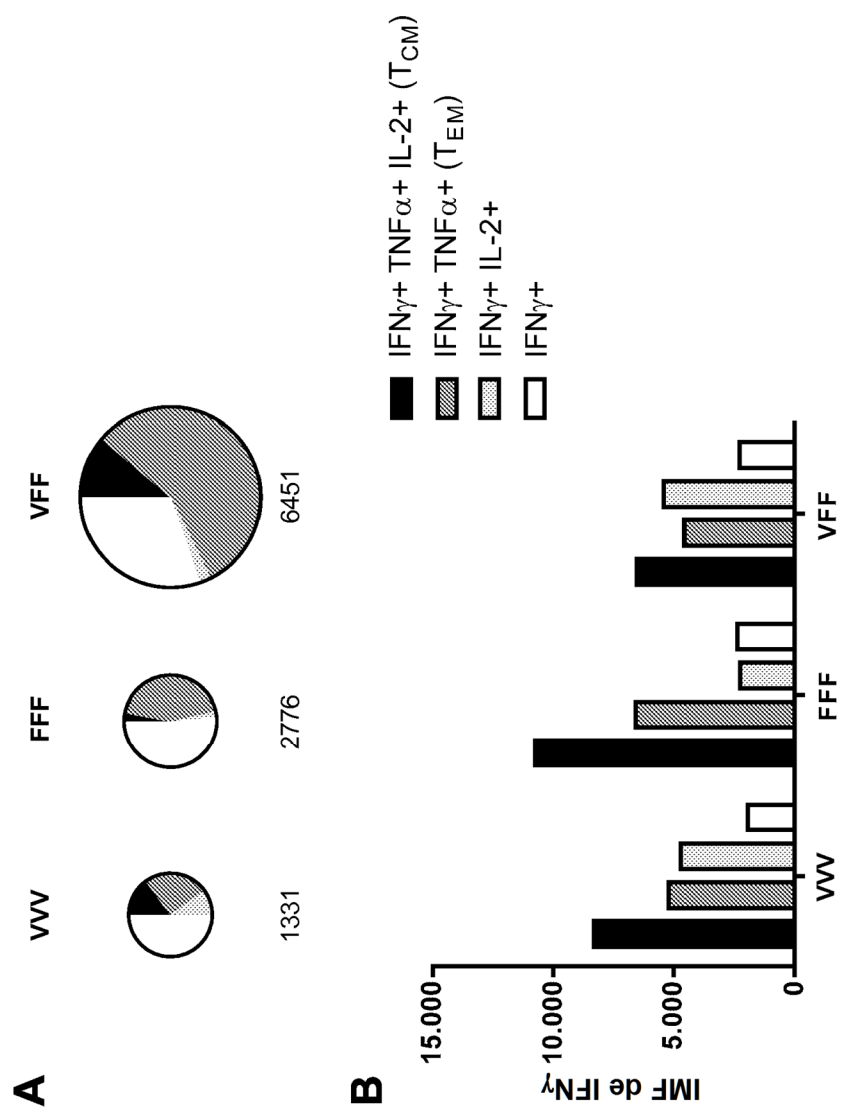


Figura 11

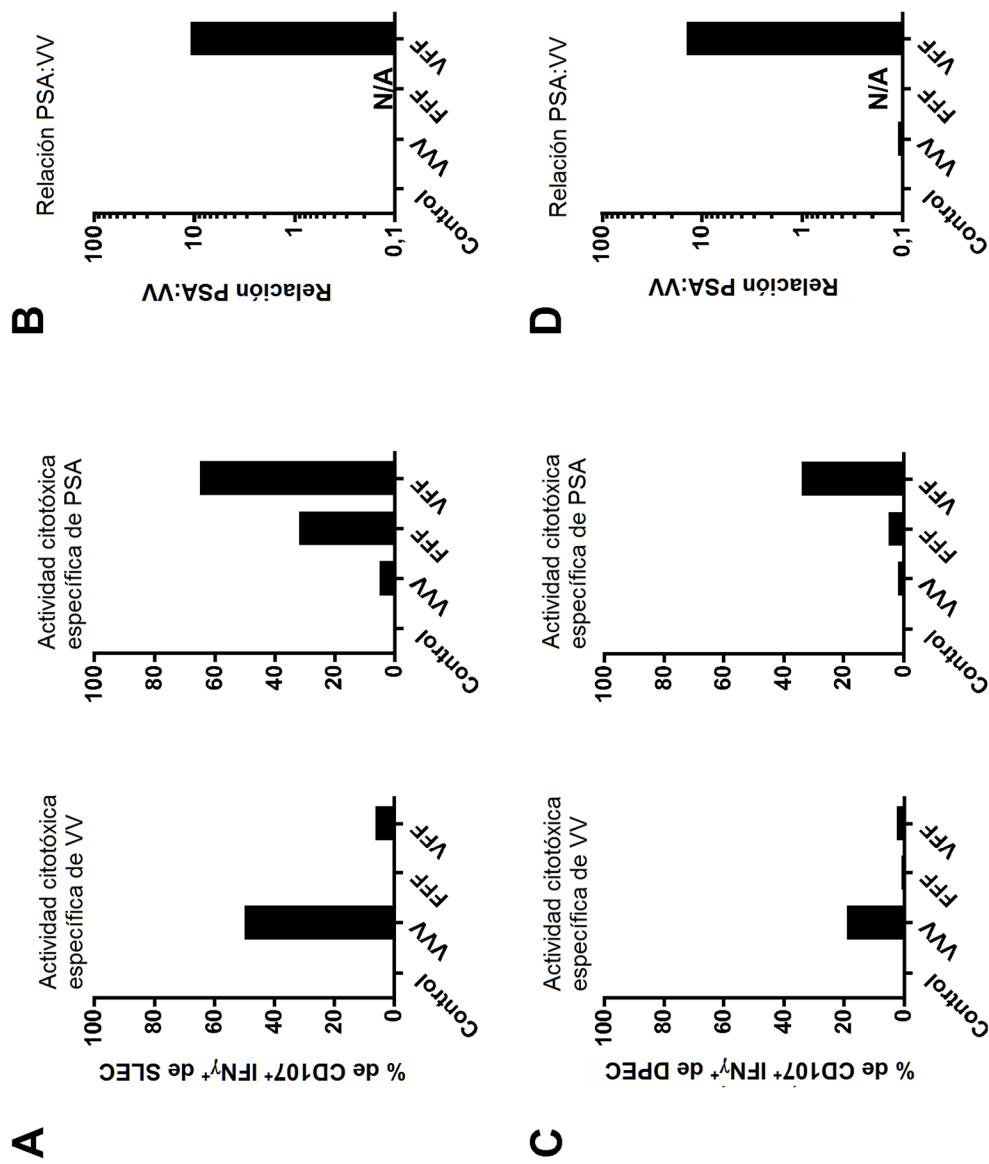


Figura 12