

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 857 704**

51 Int. Cl.:

A61K 41/00 (2010.01)

A61N 5/10 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 47/64 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2016 PCT/EP2016/000303**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2016 WO16134838**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2016 E 16706528 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2021 EP 3261673**

54 Título: **Vacunación/radioterapia combinadas para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

23.02.2015 WO PCT/EP2015/000507

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

29.09.2021

73 Titular/es:

INSTITUT CURIE (16.6%)

26, rue d'Ulm

75005 Paris, FR;

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (16.6%);**

INSTITUT GUSTAVE ROUSSY (16.6%);

**ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS
(APHP) (16.6%);**

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (16.6%) y**

UNIVERSITÉ DE PARIS (16.6%)

72 Inventor/es:

DEUTSCH, ERIC;

LUDGER, JOHANNES;

MONDINI, MICHÈLE;

NIZARD, MEVYN;

PERFETTINI, JEAN-LUC;

TARTOUR, ERIC y

TRAN, THI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 857 704 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

Vacunación/radioterapia combinadas para el tratamiento del cáncer

La presente solicitud internacional reivindica la prioridad de la solicitud de patente europea EP 15000507.2 solicitada el 23 de febrero de 2015.

5 Campo de la invención:

La presente invención se refiere al tratamiento del cáncer y más preferiblemente al cáncer positivo para VPH. El trabajo que condujo a esta invención ha recibido financiación del Séptimo Programa Marco de la Unión Europea (FP7/2007-2013) bajo el acuerdo de subvención n.º 304810 y de Cancéropole Ile de France (Proyecto HPV-CAN 2011-2013).

Antecedentes de la invención:

10 El virus del papiloma humano (VPH) es la enfermedad de transmisión sexual más común en los países occidentales. La infección de las mucosas con los tipos 16 y 18 del VPH se ha reconocido desde hace mucho tiempo como un factor de riesgo importante de neoplasias malignas tales como el carcinoma de células escamosas de cuello uterino, anal, de pene, vaginal, y de cabeza y cuello (HNSCC). La carga mundial de cánceres atribuibles a infección por VPH se estima en 600.000 casos/año en todo el mundo y representa hasta el 50-80% de los cánceres orofaríngeos con una
15 tasa en constante aumento.

Las primeras indicaciones de una participación del virus del papiloma humano (VPH) en la etiología de los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) se obtuvieron a principios de la década de 1980. Posteriormente, se encontró una asociación específica del VPH con tumores en el anillo amigdalino de Waldeyer. La investigación ha demostrado que los HNSCC positivos para VPH representan un subgrupo diferenciado de tumores malignos con mejores resultados en comparación con los HNSCC negativos para VPH; esto es resultado de una combinación de rasgos biológicos peculiares y características favorables del paciente (pacientes más jóvenes y un papel menor de abuso de tabaco y alcohol). Desde 2000, varios estudios más grandes (n>90) confirmaron una asociación entre el VPH, especialmente el VPH16, y el HNSCC, tales como los carcinomas de células escamosas orofaríngeas (OPSCC). Actualmente, se aplica tanto el análisis de carga viral como de la expresión del oncogén viral para identificar HNSCC con VPH16 biológicamente activo, cuyo papel oncogénico está respaldado por la expresión de E6 y E7.
20

Debido a su pronóstico, los pacientes con HNSCC positivo para VPH tienen más probabilidades de obtener un beneficio duradero de la radioterapia, que ahora se reconoce como una opción valiosa para HNSCC.

En realidad, los HNSCC en estadios I-II se tratan con una dosis de radiación que depende del tamaño del tumor; sin embargo, para la enfermedad en estadio temprano, pueden utilizarse dosis de 66-74 Gy (2,0 Gy/fracción; todos los días de lunes a viernes en 7 semanas) con resultados adecuados. Para los estadios posteriores III-IV, se utilizan dosis de radioterapia similares pero en combinación con quimioterapia o después de cirugía.
30

Debido a la creciente incidencia de cánceres relacionados con el VPH y los resultados prometedores de la radioterapia, existe la necesidad de optimizar aún más los tratamientos de radioterapia integrando estrategias novedosas para mejorar la eficacia biológica de la radioterapia y limitar las toxicidades relacionadas con el escalado de la dosis en este subconjunto de pacientes.
35

Descripción detallada de la invención:

Los inventores establecieron que una combinación de una vacuna contra el tumor y de radioterapia da como resultado una fuerte sinergia que conduce a la curación de la mayoría de los animales, permitiendo dicha sinergia reducir a la mitad la dosis de radioterapia.

40 Mientras que los inventores establecieron previamente que una inmunización intranasal con dicha vacuna contra el cáncer era necesaria para provocar una respuesta antitumoral sostenida en un modelo murino de cáncer de cabeza y cuello positivo para VPH, ahora muestran que, en combinación con radioterapia, una administración parenteral de dicha vacuna conduce a una fuerte respuesta inmunitaria que conduce a la regresión del tumor.

La eficacia de dicho tratamiento evita la aparición de metástasis y también su progresión.

45 Finalmente, los inventores muestran que la inmunización con dicha vacuna contra el cáncer puede iniciarse antes de la irradiación sin afectar la eficacia del tratamiento.

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición para su uso en la prevención o el tratamiento de un sujeto que padece un cáncer positivo para VPH en combinación con radioterapia, en donde dicha composición comprende un conjugado, eventualmente asociado con un portador farmacéuticamente aceptable, comprendiendo dicho conjugado:
50

- i) la subunidad B de la toxina Shiga (STxB), un fragmento de la misma que tiene una longitud de al menos 50 aminoácidos, fragmento que se une al receptor de glucolípidos Gb3 con una K_D igual o inferior a 10^{-7} M o un

derivado del mismo correspondiente a una secuencia de aminoácidos que se une al receptor de glucolípidos Gb3 con una K_D igual o inferior a 10^{-7} M y que tiene un porcentaje de identidad de al menos el 95% en comparación con la SEQ id n.º: 1 de aminoácidos; y

ii) al menos un epítipo de VPH asociado con dicho cáncer.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" denota un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino o un primate, y lo más preferiblemente un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, un "epítipo asociado con un cáncer" se refiere a un epítipo derivado de un antígeno expresado en un cáncer.

10 Para un cáncer positivo para VPH, también se pueden citar las proteínas VPH-16 o VPH-18, tal como las proteínas E6 o E7.

15 La toxina Shiga es una toxina bacteriana de la familia de subunidades AB_5 que es secretada por *Shigella dysenteriae*. La subunidad A es el resto tóxico e inhibe la síntesis de proteínas en las células diana eucariotas superiores después de transferirse al citoplasma de dichas células. La subunidad B es una proteína homopentámera (fragmentos 5B) y es responsable de la unión de la toxina a y de la internalización en células diana al interactuar con el glucolípidos Gb3 que se encuentra en las membranas plasmáticas de estas células. El fragmento B no es tóxico, pero conserva las características de transporte intracelular de la holotoxina que, en muchas células que expresan Gb3, se transporta de forma retrógrada desde las membranas plasmáticas al citosol, a través de los endosomas. También se informa que el receptor de glucolípidos Gb3 que permite dicho transporte, se expresa preferentemente en algunos tumores derivados ectodérmicos (plasma) y en algunos linfomas de Burkitt, y también se conoce como CD 77.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "subunidad B de la toxina Shiga" o "STxB" corresponde al polipéptido que tiene el número de acceso 1410186B y la secuencia SEQ id n.º 1: MKKTLIAAS LSFFSASALA TPDCVTGKVE YTKYNDDDTF TVKVGDKELF TNRWNLQSL LSAQITGMTV TIKTNACHNG GGRSEVIFR

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "fragmento" se refiere a un polipéptido que tiene una longitud de preferiblemente al menos 60 aminoácidos, y lo más preferiblemente de al menos 65 aminoácidos, fragmento que se une preferiblemente al receptor de glucolípidos Gb3 con una K_D igual o inferior a 10^{-8} M. Preferiblemente, dicho fragmento de STxB se refiere a la secuencia SEQ id n.º 2: TPDCVTGKVE YTKYNDDDTF TVKVGDKELF TNRWNLQSL LSAQITGMTV TIKTNACHNG GGRSEVIFR

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "derivados de STxB" se refiere a una secuencia de aminoácidos que se une preferiblemente al receptor de glucolípidos Gb3 con una K_D igual o inferior a 10^{-8} M, y que tiene preferiblemente un porcentaje de identidad de al menos el 97,5% (es decir, correspondiente a aproximadamente 2 sustituciones de aminoácidos) en comparación con la SEQ id n.º: 1 de aminoácidos, y más preferiblemente de al menos el 98,5% (es decir correspondiente a aproximadamente 1 sustitución de aminoácidos). Tales derivados pueden ser identificados simplemente por el experto en la técnica en vista de su conocimiento personal y de la enseñanza de la presente solicitud de patente. También se entenderá que pueden reemplazarse aminoácidos naturales por aminoácidos modificados químicamente. Normalmente, tales aminoácidos modificados químicamente aumentan la vida media del polipéptido.

35 Tal como se usa en el presente documento, "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos, significa el porcentaje de aminoácidos idénticos, entre las dos secuencias que van a compararse, obtenido con la mejor alineación de dichas secuencias, siendo este porcentaje puramente estadístico y distribuyéndose las diferencias entre estas dos secuencias aleatoriamente a lo largo de las secuencias de aminoácidos. Tal como se usa en el presente documento, "mejor alineación" o "alineación óptima" significa la alineación para la cual el porcentaje de identidad determinado (véase a continuación) es el más alto. Habitualmente se realiza la comparación de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos comparando estas secuencias que se han alineado previamente según la mejor alineación; esta comparación se realiza en segmentos de comparación con el fin de identificar y comparar las regiones locales de similitud. La mejor alineación de secuencias para realizar la comparación puede realizarse, además de forma manual, utilizando el algoritmo de homología global desarrollado por SMITH y WATERMAN (Ad. App. Math., vol.2, pág.: 482, 1981), utilizando el algoritmo de homología local desarrollado por NEDDLEMAN y WUNSCH (J. Mol. Biol., vol. 48, pág.: 443, 1970), utilizando el método de similitudes desarrollado por PEARSON y LIPMAN (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.85, pág.: 2444, 1988), utilizando software informáticos que usan dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA en el Wisconsin Genetics software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, EE. UU.), utilizando los algoritmos de alineación múltiple MUSCLE (Edgar, Robert C., Nucleic Acids Research, vol. 32, pág.: 1792, 2004). Para conseguir la mejor alineación local, se puede utilizar preferiblemente el software BLAST con la matriz BLOSUM 62. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina comparando estas dos secuencias alineadas de manera óptima, pudiendo las secuencias de aminoácidos abarcar adiciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia con el fin de conseguir el alineamiento óptimo entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas entre estas dos secuencias, y dividiendo este número entre el número total de

posiciones comparadas, y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

En una realización preferida, el epítipo de VPH es un epítipo de VPH16.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "cáncer positivo para VPH" se refiere a una neoplasia maligna asociada con una infección por VPH y que expresa por tanto antígeno del VPH. Como ejemplo, tales neoplasias malignas pueden incluir carcinoma de células escamosas de cuello uterino, anal, de pene, vaginal, de y cabeza y cuello (HNSCC). Preferiblemente, dicho cáncer positivo para VPH es un HNSCC positivo para VPH.

Ahora bien, dicho cáncer también puede corresponder a metástasis.

Por tanto, dicho cáncer positivo para VPH puede ser una metástasis.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "epítipo de VPH16" se refiere a la secuencia peptídica de VPH16, que puede presentarse mediante MHC de clase II. Preferiblemente, dicho epítipo de VPH16 es un epítipo de VPH16 de la proteína E6 o E7 de VPH16. La secuencia de la proteína E6 de VPH16 es bien conocida por el experto en la técnica. Como ejemplo, se puede citar la secuencia de la proteína E6 con los números de acceso AHK23256.1, AIQ82784.1, AGM34407.1, ACJ66714.1 o AAO85408.1. La secuencia de la proteína E7 de VPH16 también es bien conocida por el experto en la técnica. Como ejemplo, se puede citar la secuencia de la proteína E7 con los números de acceso AHK23257.1, AIQ82815.1, AGM34442.1, ACR25131.1 o ACJ66717.1.

15 El experto en la técnica también puede identificar de manera simple el epítipo de VPH16 entre la proteína E6 o E7. Como ejemplo, se pueden citar los descritos en los documentos WO 02/090382 o WO2008147187 que describen epítipos de VPH16 E6 y E7, o en el documento WO 02/070006 que describe el péptido que consiste en los aminoácidos 127-142 de la proteína E6 de VPH16, el péptido que consiste en los aminoácidos 35-50 de la proteína E7 de VPH16, el péptido que consiste en los aminoácidos 43-77 de la proteína E7 de VPH16 o el péptido que consiste en aminoácidos 50-62 de la proteína E7 de VPH 16. También se puede citar el epítipo descrito en STRANG *et al.* (J Gen. Virol., vol. 71, pág: 423-31, 1990) correspondiente a un péptido que consiste en los aminoácidos 42-57 de la proteína E6 de VPH16, o el descrito en ALTMANN *et al.* (Eur. J. Cancer, vol. 28, pág: 326-33, 1992) correspondiente al péptido que consiste en los aminoácidos 5-18 de la proteína E7 de VPH16, el péptido que consiste en los aminoácidos 17-34 de la proteína E7 de VPH 16 y el péptido que consiste en los aminoácidos 69-82 de la proteína E7 de VPH 16. También se puede citar el péptido que consiste en los aminoácidos 43-57 o 49-57 de la proteína E7 de VPH16 descrita en ADOTEVI *et al.* (J. Immunol., vol., pág: 3371-3379, 2007).

20 Ventajosamente, dicho epítipo de VPH16 procede de la proteína E7 de VPH16, y se selecciona del grupo que comprende los péptidos que consisten en los aminoácidos 5-18, 17-34, 35-50, 43-57, 43-77, 49-57, 50-62, 69-82 de la proteína E7 de VPH 16. Preferiblemente, dicho epítipo de VPH16 consiste en los aminoácidos 43-57 de la proteína E7 de VPH 16 (SEQ id n.º 3; GQAEPDRAHYNIVTF).

25 El conjugado comprende un pentámero de STxB, fragmento o derivado del mismo. En este conjugado, i) la subunidad B de la toxina Shiga (STxB), un fragmento o un derivado de la misma; y ii) el al menos un epítipo de VPH16 también puede unirse covalentemente usando agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales o en una proteína de fusión. Naturalmente, los aminoácidos naturales de dicho conjugado pueden reemplazarse por aminoácidos modificados químicamente. Normalmente, tales aminoácidos modificados químicamente permiten aumentar la vida media del polipéptido.

30 En una realización particular, i) la subunidad B de la toxina Shiga (STxB), un fragmento o un derivado de la misma; y ii) el al menos un epítipo asociado con cáncer se unen covalentemente usando agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales.

35 Los agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales son bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como los métodos que los usan, e incluyen, como ejemplos, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida, N-succinimidil (2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil (N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidilsuberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzono).

40 Preferiblemente, i) la subunidad B de la toxina Shiga (STxB), un fragmento o un derivado de la misma se refiere a las secuencias descritas en el documento WO 02/060937, en donde se añade un residuo de cisteína en el extremo C-terminal. Como ejemplo, dichos derivados de STxB se refieren a la SEQ id n.º 4 y la SEQ id n.º 5, preferiblemente la SEQ id n.º 5.

SEQ id n.º 4	MKKTLLIAAS TVKVGDKELF GGRSEVIFRC	LSFFSASALA TNRWNLQSL	TPDCVTGKVE LSAQITGMTV	YTKYNDDDTF TIKTNACHNG
SEQ id n.º 5	TPDCVTGKVE LSAQITGMTV	YTKYNDDDTF TIKTNACHNG	TVKVGDKELF GGRSEVIFRC	TNRWNLQSL

En una realización particular, i) la subunidad B de la toxina Shiga (STxB), un fragmento o un derivado de la misma; y ii) el al menos un epítipo asociado con cáncer se unen covalentemente en una proteína de fusión.

5 El término "proteína de fusión", también conocida como proteína quimérica, se refiere a una proteína creada mediante la unión de i) la subunidad de toxina B de Shiga (STxB), un fragmento o un derivado de la misma; y ii) el al menos un epítipo asociado con cáncer, que originalmente se codifican para polipéptidos independientes.

Ambas secuencias pueden estar separadas o no por una secuencia de aminoácidos "enlazadora".

En una realización particular, las secuencias i) y ii) no están separadas por ningún enlazador tal como para el conjugado descrito en los documentos WO 99/03881 y Haicheur *et al* (J Immunology vol.165(6) pág.3301-3308 2000).

10 Dicha secuencia de aminoácidos "enlazadora" puede tener una longitud suficiente para garantizar que la proteína de fusión forme estructuras secundarias y terciarias adecuadas. La longitud de la secuencia de aminoácidos enlazadora puede variar sin afectar significativamente la actividad biológica de la proteína de fusión. Normalmente, la longitud del enlazador está comprendida entre 5 y 30 aminoácidos, preferiblemente entre 10 y 30 aminoácidos, más preferiblemente entre 15 y 30 aminoácidos.

15 Las secuencias de aminoácidos enlazadoras preferidas son aquellas que permiten que el conjugado adopte una conformación apropiada. Las secuencias de aminoácidos enlazadoras más adecuadas (1) adoptarán una conformación extendida flexible, (2) no mostrarán propensión a desarrollar una estructura secundaria ordenada que puede interactuar con los dominios funcionales de proteínas de fusión, y (3) tendrán un mínimo carácter hidrófobo o cargado que puede promover la interacción con los dominios proteicos funcionales. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos enlazadora comprende aminoácidos casi neutros seleccionados del grupo que comprende Gly (G), Asn (N), Ser (S), Thr (T), Ala (A), Leu (L) y Gln (Q), lo más preferiblemente del grupo que comprende Gly (G), Asn (N) y Ser (S). En las patentes estadounidenses n.ºs 5.073.627 y 5.108.910 se describen ejemplos de secuencias enlazadoras.

25 La composición comprende una "cantidad eficaz" del conjugado, cantidad eficaz que es suficiente para inducir una respuesta inmunitaria frente al menos un epítipo asociado con cáncer, preferiblemente suficiente para inducir la regresión del crecimiento tumoral, especialmente en combinación con radioterapia. Las dosis utilizadas para la administración pueden adaptarse en función de diversos parámetros, en particular en función del modo de administración utilizado, de la patología relevante o alternativamente de la duración deseada del tratamiento. Naturalmente, la forma de la composición farmacéutica, la vía de administración, la dosificación y la pauta dependen naturalmente de la afección que va a tratarse, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del sujeto, etc.

30 Los intervalos de dosis eficaces proporcionadas a continuación no pretenden limitar la invención y representan intervalos de dosis preferidos. Sin embargo, la dosis preferida puede adaptarse al sujeto individual, como entenderá y determinará un experto en la técnica, sin experimentación indebida.

35 En vista de la notable eficacia de dicho conjugado, el experto en la técnica puede planificar el uso de pequeñas dosis para tratar a un sujeto que padece un cáncer. Como ejemplo no limitativo, el conjugado puede administrarse por vía parenteral mediante inyección a una dosis en un intervalo de entre 10 µg y 1000 µg, preferiblemente en un intervalo de entre 100 µg y 300 µg. Ahora bien, dicha administración de conjugado puede realizarse una vez, o repetirse una o varias veces durante el tratamiento del sujeto.

40 La terapia con radiación o radioterapia es el uso médico de irradiación, es decir, radiación ionizante, como parte del tratamiento contra el cáncer para controlar las células malignas. Se utiliza como tratamiento paliativo o como tratamiento terapéutico. La radioterapia está aceptada como terapia convencional importante para tratar diversos tipos de cánceres. Se sabe que la terapia con vacunas o anticuerpos puede combinarse con radioterapia como, por ejemplo, se muestra en el documento WO2012/177624 A2.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "radioterapia" se usa para el tratamiento de enfermedades de naturaleza oncológica con irradiación que corresponde a radiación ionizante. La radiación ionizante deposita energía que daña o destruye células en el área que se está tratando (el tejido diana) al dañar su material genético, lo que hace imposible que estas células sigan creciendo. La radioterapia puede utilizarse para tratar cánceres de tumores sólidos localizados de piel, lengua, laringe, cerebro, mama, pulmón o cuello uterino. Un tipo de radioterapia que se utiliza habitualmente implica fotones, por ejemplo rayos X. Dependiendo de la cantidad de energía que posean, los rayos pueden usarse para destruir las células cancerosas en la superficie o más profundamente del cuerpo. Cuanto mayor

- 5 sea la energía del haz de rayos X, más profundamente pueden penetrar los rayos X en el tejido diana. Los aceleradores lineales y los betatrones producen rayos X de energía cada vez mayor. El uso de máquinas para focalizar la radiación (tal como rayos X) en el sitio del cáncer se llama radioterapia de haz externo. Los rayos gamma son otra forma de fotones utilizados en radioterapia. Los rayos gamma se producen espontáneamente cuando determinados elementos (tal como radio, uranio y cobalto 60) liberan radiación a medida que se descomponen, o se extinguen.
- Otra técnica para suministrar radiación a células cancerosas es colocar implantes radiactivos directamente en un tumor o cavidad corporal. A esto se le llama radioterapia interna.
- 10 La braquiterapia, la irradiación intersticial y la irradiación intracavitaria son tipos de radioterapia interna. En este tratamiento, la dosis de radiación se concentra en un área pequeña, y el paciente permanece en el hospital durante unos pocos días. La radioterapia interna se usa con frecuencia para los cánceres de lengua, útero y cuello uterino.
- Una técnica adicional es la irradiación intraoperatoria, en la que se dirige una gran dosis de radiación externa al tumor y al tejido circundante durante la cirugía.
- 15 Otro enfoque es la radioterapia con haz de partículas. Este tipo de terapia se diferencia de la radioterapia con fotones en que implica el uso de partículas subatómicas de movimiento rápido para tratar cánceres localizados. Algunas partículas (neutrones, piones, e iones pesados) depositan más energía a lo largo del camino que toman a través del tejido que los rayos X o los rayos gamma, provocando así más daño a las células que impactan. Este tipo de radiación a menudo se denomina radiación de alta transferencia de energía lineal (alta LET). Los radio-sensibilizadores hacen que las células tumorales sean más propensas a ser dañadas, y los radio-protectores protegen los tejidos normales de los efectos de la radiación.
- 20 Un experto en la técnica de la radioterapia sabe cómo determinar un programa de dosificación y aplicación apropiado, dependiendo de la naturaleza de la enfermedad y la constitución del paciente. En particular, el experto sabe cómo valorar la toxicidad limitante de la dosis (DLT) y cómo determinar la dosis máxima tolerada (MTD) en consecuencia.
- 25 Más particularmente, la cantidad de radiación utilizada en la radioterapia con fotones se mide en gris (Gy) y varía según el tipo y el estadio del cáncer que se está tratando. Para los casos curativos, la dosis típica para un tumor epitelial sólido oscila entre 60 y 80 Gy. Los oncólogos radioterapeutas consideran muchos otros factores al seleccionar una dosis, que incluye si el paciente está recibiendo quimioterapia, comorbilidades del paciente, si la radioterapia se está administrando antes o después de la cirugía, y el grado de éxito de la cirugía. Además, la dosis total a menudo se fracciona (se distribuye a lo largo del tiempo) por varias razones importantes. De hecho, el fraccionamiento permite que las células normales tengan tiempo de recuperarse, mientras que las células tumorales son generalmente menos eficaces en la reparación entre fracciones. El fraccionamiento también permite que las células tumorales que se encontraban en una fase relativamente radiorresistente del ciclo celular durante un tratamiento pasen a una fase sensible del ciclo antes de proporcionar la siguiente fracción. De manera similar, las células tumorales que eran crónica o agudamente hipóxicas (y por lo tanto más radiorresistentes) pueden reoxigenarse entre fracciones, mejorando la destrucción de células tumorales. Las pautas de fraccionamiento se individualizan entre diferentes centros de radioterapia e incluso entre médicos individuales. En América del Norte, Australia y Europa, el programa de fraccionamiento típico para adultos es de 1,8 a 2 Gy por día, cinco días a la semana. En algunos tipos de cáncer, la prolongación del programa de fracciones durante demasiado tiempo puede permitir que el tumor comience a repoblarse, y para estos tipos de tumores, incluyendo los cánceres de células escamosas de cabeza y cuello y del cuello uterino, el tratamiento con radiación se completa preferiblemente dentro de una determinada cantidad de tiempo.
- 30 En algunos casos, se utilizan dos fracciones por día cerca del final de un curso de tratamiento. Este programa, conocido como pauta de refuerzo concomitante o hiperfraccionamiento, se usa en tumores que se regeneran más rápidamente cuando son más pequeños. En particular, los tumores en la cabeza y el cuello muestran este comportamiento.
- 35 Los inventores han establecido que el tratamiento combinado con el conjugado y la radioterapia permite reducir a la mitad las dosis de radioterapia para obtener una curación.
- 40 Por tanto, en otra realización preferida, y debido a la eficacia del método de la invención, la radioterapia puede aplicarse a una dosis en un intervalo de desde aproximadamente 10 hasta 55 Gy, preferiblemente de desde aproximadamente 15 hasta 50 Gy, tal como de 20 a 40 Gy, concretamente desde aproximadamente 20 hasta 35 Gy, y más concretamente desde aproximadamente 25 hasta 30 Gy.
- 45 Tal como se usa en el presente documento, el término "en combinación" se refiere al uso de más de un agente terapéutico, radioterapia y el conjugado en el presente caso. El uso del término "en combinación" no restringe el orden en el que dichos agentes terapéuticos se administran al sujeto. Puede administrarse un primer agente terapéutico, tal como un conjugado, antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), concomitantemente con, o después de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas después) la administración de radioterapia, a un sujeto con cáncer.
- 50
- 55

Por tanto, la composición y la radioterapia pueden administrarse a la vez, por separado, o secuencialmente.

Los inventores han establecido que la combinación es muy eficaz al administrar la primera dosis del conjugado de vacuna antes de la irradiación. Este enfoque facilitará la implementación de vacunas en futuras estrategias clínicas, ya que los pacientes con un diagnóstico confirmado de cáncer positivo para VPH se beneficiarían inmediatamente de la administración de la vacuna mientras esperan el tratamiento de radioterapia.

Por tanto, en una tercera realización preferida, la composición se administra antes de la irradiación, preferiblemente en un momento de 1 minuto a 14 días antes de la irradiación, lo más preferiblemente de 3 a 7 días antes de la irradiación. En consecuencia, dicha composición se administra en un sujeto que no ha recibido radioterapia, preferiblemente que no ha recibido irradiación desde al menos de 1 minuto a 14 días, preferiblemente al menos 1 a 3 días.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que son fisiológicamente tolerables y normalmente no producen reacciones alérgicas o indeseables similares, tales como malestar gástrico, mareos y similares cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, tal como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que puede aprobarse por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o que figura en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

El término "portador" se refiere a un disolvente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares.

El conjugado puede solubilizarse en un tampón o agua o incorporarse en emulsiones, microemulsiones, hidrogeles (por ejemplo, hidrogeles a base de copolímeros de tribloques PLGA-PEG-PLGA), en microesferas, en nanoesferas, en micropartículas, en nanopartículas (por ejemplo, poli(ácido láctico-co-glicólico) micropartículas (p. ej. poli(ácido láctico) (PLA); poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA); microesferas, nanoesferas, micropartículas o nanopartículas de poliglutamato), en liposomas, u otras formulaciones galénicas. En todos los casos, la formulación debe ser estéril y fluida en la medida de su capacidad de inyección aceptable. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

El conjugado puede formularse en una composición en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El portador también puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Los conjugados de la invención también pueden modificarse, mediante pegilación como ejemplo, para aumentar su biodisponibilidad.

La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio.

La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina, polioles, y formulaciones covalentes y no covalentes que mejoran la vida media.

Hay numerosas causas de inestabilidad o degradación peptídicas, incluyendo la hidrólisis y la desnaturalización. La interacción hidrófoba puede provocar aglutinación de moléculas (es decir, agregación). Pueden añadirse estabilizadores para reducir o prevenir tales problemas.

Los estabilizadores incluyen ciclodextrina y derivados de la misma (véase la patente estadounidense n.º 5.730.969). También pueden añadirse conservantes adecuados tales como sacarosa, manitol, sorbitol, trehalosa, dextrano y glicerina para estabilizar la formulación final. Puede añadirse a la formulación un estabilizador seleccionado de tensioactivos iónicos y no iónicos, D-glucosa, D-galactosa, D-xilosa, ácido D-galacturónico, trehalosa, dextranos,

hidroxietil almidones, y mezclas de los mismos. La adición de sal de metal alcalino o cloruro de magnesio puede estabilizar un péptido. El péptido también puede estabilizarse poniéndolo en contacto con un sacárido seleccionado del grupo que consiste en dextrano, ácido condroitín sulfúrico, almidón, glucógeno, dextrina, y sal de ácido algínico. Otros azúcares que pueden añadirse incluyen monosacáridos, disacáridos, alcoholes de azúcar, y mezclas de los mismos (por ejemplo, glucosa, manosa, galactosa, fructosa, sacarosa, maltosa, lactosa, manitol, xilitol). Los polioles pueden estabilizar un péptido, y son miscibles con agua o solubles en agua. Pueden ser polioles adecuados polihidroalcoholes, monosacáridos y disacáridos que incluyen manitol, glicerol, etilenglicol, propilenglicol, trimetilglicol, vinilpirrolidona, glucosa, fructosa, arabinosa, manosa, maltosa, sacarosa, y polímeros de los mismos. Diversos excipientes también pueden estabilizar péptidos, incluyendo albúmina sérica, aminoácidos, heparina, ácidos grasos y fosfolípidos, tensioactivos, metales, polioles, agentes reductores, agentes quelantes de metales, polivinilpirrolidona, gelatina hidrolizada, y sulfato de amonio.

La composición puede formularse para inyección, por ejemplo inyección local, administración transmucosal (es decir, intranasal...), inhalación, administración oral y más generalmente cualquier formulación que el experto en la técnica considere apropiada para lograr la terapia deseada.

Ahora bien, mientras que los inventores han establecido a priori que la vacuna contra el VPH induce una respuesta inmunitaria suficiente sólo por administración intranasal; ahora muestran que una administración parenteral en combinación con radioterapia induce una respuesta inmunitaria suficiente como para destruir el cáncer diana.

Por tanto, en aun otra realización preferida, la composición es para su uso en la prevención o el tratamiento de un sujeto que padece un cáncer atribuible a infección por VPH mediante administración parenteral.

Tal como se usa en el presente documento, el término "parenteral" incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal o intraperitoneal.

Por tanto, la composición usada contiene vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación destinada a inyectarse. Éstas pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o suero fisiológico, permiten la constitución de soluciones inyectables. Se describen portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.

Otras realizaciones y ventajas de la presente invención se ilustran en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

1) Producción de la vacuna StTxB-E7:

Se produjo la vacuna StTxB-E7 mediante el acoplamiento químico del péptido E7₄₃₋₅₇ N-bromoacetilado (SEQ id n.º...; GQAEPDRAHYNIVTF) y el grupo sulfhidrilo de la subunidad B recombinante no tóxica de la toxina Shiga (SEQ id n.º...) tal como se describe en HIACHEUR *et al.* (Journal of immunology, vol.165 (6), pág: 3301-8, 2000).

2) Modelos de tumores de cabeza y cuello y metástasis pulmonares

Se adquirieron ratones hembra C57BL/6 (edad, de 7 a 8 semanas) de JANVIER CERT y se alojaron en la instalación de animales GUSTAVE ROUSSY. Todos los procedimientos con animales se realizaron según los protocolos aprobados por el Comité Ético CEEA 26 y según las recomendaciones para el uso y cuidado apropiados de animales de laboratorio.

Para establecer un modelo de implantación de tumores de cabeza y cuello, se utilizaron células TC1/Luc. Estas células TC1/Luc que expresan luciferasa de luciérnaga, generadas mediante la transducción retroviral de E6/E7 de VPH16 y c-H-ras de células epiteliales pulmonares de origen C57BL/6, fueron amablemente proporcionadas por T.C. WU (Johns Hopkins Medical Institutions, Baltimore, MD, EE.UU.). Las células se cultivaron *in vitro* en RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, piruvato de sodio al 1%, aminoácidos no esenciales al 1% y HEPES 10 mM y se hicieron crecer a 37°C con CO₂ al 5%. Luego, se iniciaron injertos tumorales singénicos mediante la inyección (día 0) de 0,1 ml de suspensión de PBS que contenía 5×10⁵ células TC1/Luc en un sitio de la submucosa del labio interno derecho de los ratones. Para los experimentos de reexposición, se inyectaron a ratones en el labio interno izquierdo. Las metástasis pulmonares se establecieron inyectando 10⁶ células TC1/Luc suspendidas en 0,2 ml de PBS en la vena de la cola.

3) Potencialización de la radioterapia utilizando la vacuna STxB-E7

Luego, se sometió a los ratones a los tratamientos terapéuticos descritos en el esquema de la figura 1, con 10 ratones por grupo. Brevemente, se administró el adyuvante de la mucosa α-galactosilceramida (KRN7000, FUNAKOSHI, 20 µg por ratón) por vía intraperitoneal en el día 3 solo o junto con la primera dosis de vacuna STxB-E7 (1 µg por ratón). Luego, los ratones recibieron o no una irradiación local de un solo haz en la región de la cabeza y el cuello usando un irradiador de rayos X Varian de 200 kV. Esta irradiación selectiva de los injertos tumorales se realizó mediante la

interposición de un protector de plomo de 4 cm de grosor y correspondió a una única fracción de 7,5 Gy. Los ratones tratados con KRN7000 se usaron como grupos de control ya que KRN7000, ya sea solo o en combinación con radioterapia, no afectó al crecimiento tumoral (datos no mostrados).

5 Para monitorizar el crecimiento tumoral, se realizaron imágenes de bioluminiscencia usando el XENOGEN *IN VIVO* IMAGING SYSTEM 50 (IVIS; CALIPER LIFE SCIENCES). Se colocaron ratones en posición supina en la cámara de formación de imágenes 5 minutos después de la inyección intraperitoneal de luciferina de luciérnaga; las imágenes se adquirieron a lo largo de un período de 15 a 30 segundos mientras los ratones estaban bajo sedación mediante la administración continua de isoflurano. Las imágenes fotográficas y las imágenes en color de bioluminiscencia se superpusieron, y se realizó la cuantificación de la señal utilizando el software LIVINGIMAGE V 4.3.1 (CALIPER LIFE SCIENCES). Se analizó la señal bioluminiscente como medida del tamaño tumoral utilizando un análisis ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Simultáneamente, se analizaron los datos de supervivencia usando las pruebas de Kaplan-Meier y Log-rank para la distribución de la supervivencia. Se valoraron las correlaciones usando la prueba de correlación de Pearson, y se realizaron análisis estadísticos usando PRISM Versión 6 (GRAPHPAD).

15 La figura 2A muestra la señal tumoral determinada mediante formación de imágenes bioluminiscentes *in vivo* tras la inyección de ratones con células TC1/Luc con el tiempo, y la figura 2B muestra (***) $p < 0,001$) las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para los diferentes grupos.

Los resultados de formación de imágenes *in vivo* bioluminiscentes mostraron que los ratones desarrollaron tumores de crecimiento rápido (figura 2A) que dieron como resultado la supervivencia de los ratones de control durante sólo dos semanas después de la inyección con células TC1/Luc (figura 2B). El tratamiento con una dosis única de IR de 7,5 Gy dio como resultado un retraso del crecimiento tumoral limitado y una supervivencia mejorada no significativa (figura 2B).

La inmunización sistémica con STxB-E7 solo aumentó parcialmente el control tumoral, mientras que su combinación con radioterapia local condujo a una respuesta antitumoral eficaz con el 70% de los ratones aún vivos 70 días después del injerto tumoral (figura 2B, $p < 0,001$ frente a control). Además, el volumen tumoral de los ratones tratados con la terapia combinada fue significativamente menor en comparación con el de los ratones tratados con terapia única (IR o STxB-E7) (figura 2A, $p < 0,01$, ANOVA de una vía). Finalmente, la mayoría de los ratones del grupo de terapia de combinación tuvieron una eliminación tumoral completa que duró hasta el final del período de observación de 90 días (datos no mostrados). Es de destacar que cuando los tumores se irradiaron con una dosis de 10,4 Gy en 4 fracciones consecutivas (2,6 Gy/día), lo que representa la dosis biológicamente equivalente (BED) de 7,5 Gy en una única fracción calculada utilizando el modelo cuadrático lineal con un $\alpha/\beta = 10$, los resultados fueron similares (datos no mostrados).

Estos datos indican que el enfoque terapéutico novedoso basado en la combinación de STxB-E7 con radioterapia dio como resultado la eliminación completa de la mayoría de tumores tratados en un modelo relevante de HNSCC, incluso después de un período de observación de 18 meses. Esta nueva estrategia de radiovacunación actúa de forma sinérgica con IR de dosis única o fraccionada, lo cual es de particular relevancia porque la radioterapia fraccionada es el pilar para el tratamiento del HNSCC. Además, la posibilidad de utilizar dosis bajas de irradiación podría ser una herramienta valiosa para las estrategias de desintensificación del tratamiento en la clínica, ya que puede limitar el riesgo de complicaciones tardías.

40 4) Células T CD8⁺ que infiltran el tumor y específicas para antígeno esplénico inducidas por irradiación y vacunación combinadas

Ya que la población de células T CD8⁺ desempeña un papel fundamental en el control tumoral de TC1, se analizó la presencia de células T CD8⁺ específicas para anti-E7₄₉₋₅₇/D^p en tumores.

Para este análisis, se trataron 4 grupos de 5 ratones tal como se describió anteriormente y luego se disociaron sus tumores y bazo el día 14, se lavaron dos veces en PBS y luego se incubaron con el bloque del receptor Fc CD16/CD32 (EBIOSCIENCE). Luego, los tumores se marcaron con el tetrámero de E7₄₉₋₅₇/D^p según las recomendaciones del fabricante (BECKMAN COULTER IMMUNOMICS) y el anticuerpo anti-CD8. Las células se incubaron durante 35 minutos a 4°C con el tetrámero marcado con PE. Después de la incubación y los lavados, las células se marcaron utilizando el ensayo de viabilidad de células vivas/muertas (LIFE TECHNOLOGIES) y mAbs anti-CD8 (APC-Cy7, EBIOSCIENCE), PD1 (FITC, EBIOSCIENCE), CTLA4 (Brilliant Violet 421, BIOLEGEND) y Tim3 (APC, EBIOSCIENCE) durante 20 minutos para fenotipar las células T CD8⁺ positivas para tetrámero. Se usaron tetrámeros irrelevantes que reconocen un péptido derivado de LCMV en el contexto de moléculas de D^p. Se detectaron las células CD8⁺ mediante citometría de flujo y se expresaron como porcentaje del total de células vivas utilizando el software FLOWJO (TREE STAR).

Las figuras 3A y 3B muestran las células T CD8⁺ específicas para E7 detectadas intratumoralmente expresadas como el porcentaje de células CD8⁺ totales y el porcentaje de tetrámero de E7 H-2Db por células T CD8⁺.

La figura 4 muestra el porcentaje de tetrámero de E7 H-2Db por células T CD8⁺ en el bazo de dichos ratones.

La figura 5 muestra los tamaños tumorales obtenidos mediante formación de imágenes IVIS *in vivo* en el día del sacrificio representadas frente al porcentaje de CD8⁺ específicas para E7 que infiltran el tumor * $p < 0,05$; ANOVA de una vía seguido de la prueba posterior de Tukey.

5 Los resultados muestran que los niveles de CD8⁺ intratumorales totales eran bajos en los tumores de control, y en este grupo casi no se encontraron células T CD8⁺ específicas para E7 (figura 3). La irradiación por sí sola no fue suficiente para alterar el infiltrado de CD8⁺, mientras que la vacunación reguló al alza el porcentaje de células T CD8⁺ específicas para E7⁴⁹⁻⁵⁷, como lo demuestra el análisis del tetrámero de E7. Cuando se añadió IR a la inmunización con STxB-E7, la infiltración de células T CD8⁺ se impulsó significativamente (figura 3A). La mayoría de las células T CD8⁺ eran específicas de antígeno, ya que el nivel de linfocitos T CD8⁺ positivo para el tetrámero de E7 alcanzaron un sorprendente 67% en este grupo (figura 3B).

10 El análisis cualitativo del infiltrado de CD8⁺ específico para E7 mediante la identificación de las subpoblaciones positivas de PD1, CTLA4 y Tim3 no revela ninguna diferencia significativa entre los grupos de tratamiento (datos no mostrados). Ahora bien, la inducción de una respuesta de células T CD8⁺ específica no se limitó al tumor sino que fue sistémica. De hecho, la combinación de IR y vacunación dio como resultado la respuesta dirigida por antígeno más alta en comparación con el tratamiento con vacuna solo (figura 4). Además, el nivel de linfocitos CD8⁺ específicos de E7 se correlacionó inversamente con el tamaño tumoral ($p < 0,05$, prueba de correlación de Pearson, figura 5), lo que sugiere un papel central de los linfocitos T CD8⁺ en la respuesta antitumoral en el modelo tumoral preclínico de HNSCC.

15 Para validar mecánicamente el papel de las células T CD8⁺ en este entorno terapéutico, se inyectó a los ratones sometidos a irradiación y vacunación combinadas por vía intraperitoneal con 100 μg por ratón de mAb anti-CD8 (clon 2.43; BIOXCELL) o mAb de control de isotipo el día 7 (un día antes de la irradiación) para reducir las células T CD8⁺, tal como se informó anteriormente (SANDOVAL *et al.*, Science Translational Medicine, vol.5(172), pág: 172ra20, 2013).

20 Las figuras 6A y B muestran la formación de imágenes bioluminiscentes *in vivo* y las curvas de Kaplan, respectivamente, los ratones (N=5) inyectados con mAb anti-CD8 o mAb de control de isotipo el día 7 (un día antes de la irradiación) para reducir las células T CD8⁺ (** $p < 0,001$, ANOVA de una vía seguido de prueba posterior de Tukey de los tamaños tumorales en el día 14). Se muestra uno de los dos experimentos representativos.

25 Los resultados muestran que la administración de mAbs anti-CD8 tiene un efecto drástico sobre la respuesta antitumoral, lo que da como resultado una pérdida completa de eficacia del tratamiento combinado sobre el tamaño tumoral y la supervivencia, ya que todos los ratones con CD8⁺ reducidas tuvieron que sacrificarse junto con los controles (figuras 6A y B).

30 Estos datos indican claramente que se requieren linfocitos T CD8⁺ para provocar la respuesta antitumoral desencadenada por la combinación de irradiación y vacunación.

5) Memoria de células T y combinación de STxB-E7/radioterapia:

35 Debido a que la mayoría de los ratones que recibieron la combinación de STxB-E7 e IR sorprendentemente mostraron una remisión completa del tumor (figura 2B), se preguntó si la respuesta de las células T CD8⁺ sostenida observada en este grupo daba como resultado el desarrollo de una memoria de células T eficaz.

40 Para someter a prueba esta hipótesis, se expuso a cuatro ratones que todavía estaban libres de tumor 90 días después del injerto tumoral, según lo observado mediante la obtención de imágenes *in vivo* como anteriormente, de nuevo con células TC1/Luc en la submucosa del labio interno opuesto; se utilizó el lado opuesto para evitar posibles sesgos debidos a la respuesta local. Se confirmó que cuatro días después de la segunda inyección, todos los ratones fueron injertados correctamente con células tumorales localizadas en el labio interno izquierdo.

La figura 7 muestra los resultados de la formación de imágenes bioluminiscentes *in vivo* que establecen la señal tumoral tras la primera y segunda exposiciones a TC1/Luc.

45 Los resultados muestran que cinco días tras la segunda exposición a TC1/Luc, y sin ningún tratamiento adicional, la actividad de la luciferasa estaba completamente ausente, lo que indica una eliminación espontánea de las células tumorales. Por el contrario, los ratones sin tratamiento previo utilizados como controles positivos mostraron una curva de crecimiento tumoral similar a las descritas anteriormente (datos no mostrados). Cuando se sacrificó a los ratones para recoger los bazos 14 días después de la segunda exposición a TC1/Luc, se observaron los mismos resultados (datos no mostrados). El análisis citofluorimétrico mostró que los ratones reexpuestos mostraron altos porcentajes de células T CD8⁺ específicas para E7 en niveles similares a los de los ratones al final del tratamiento combinado (datos no mostrados). Finalmente, se realizó un experimento similar en tres ratones que se volvieron a exponer a células TC1/Luc 18 meses después del primer tratamiento, lo que nuevamente dio como resultado el rechazo espontáneo completo de las células tumorales (datos no mostrados).

55 Estos datos indican que una combinación de irradiación local e inmunización provoca una memoria de células T CD8⁺ que es suficiente para ejercer una respuesta antitumoral completa.

Esta fuerte respuesta antitumoral también puede explicarse por el hecho de que, a diferencia de otros estudios, la combinación de dosis bajas de irradiación y la vacuna contra el cáncer utilizada en este caso no dio como resultado un aumento de células inmunosupresoras en el microentorno tumoral (datos no mostrados).

6) Formación de metástasis y combinación de STxB-E7/radioterapia:

5 También era importante evaluar si la respuesta inmunitaria provocada por una terapia combinada eficaz proporcionaba protección frente a la posible formación de metástasis.

10 Esto se sometió a prueba mediante la inyección por vía intravenosa de células TC1/Luc para inducir el desarrollo de metástasis pulmonares. La presencia de metástasis se confirmó mediante análisis de formación de imágenes *in vivo* que mostró que, en ratones sin tratamiento previo, una señal bioluminiscente localizada en los pulmones ya era detectable cuatro días después de la inyección de células TC1/Luc (datos no mostrados). El tamaño de las metástasis pulmonares aumentó rápidamente hasta el día 15, cuando los ratones tuvieron que ser sacrificados.

15 Para esta evaluación, los resultados han mostrado que, en ratones que ya habían experimentado una remisión completa del tumor de cabeza y cuello tras la administración de la combinación de STxB-E7 e IR (grupo de reexposición), la señal tumoral en los pulmones ya era menor en el día 4 en comparación con los ratones sin tratamiento previo. Las células TC1/Luc se eliminaron espontáneamente a partir del día 8 y los cuatro ratones sometido a prueba permanecieron libres de metástasis hasta el final del período de observación de 60 días (datos no mostrados).

Estos datos indican que la combinación de irradiación local e inmunización es suficiente para ejercer una respuesta antitumoral completa no solo en recidivas locales, sino también en metástasis a distancia.

20 En consecuencia, esta estrategia de combinación representa una herramienta clínica prometedora, ya que un paciente tratado con esta terapia de combinación que experimenta una remisión tumoral probablemente estará protegido frente a cualquier recaída local o a distancia.

7) Remodelación de vasos tumorales y perfusión tumoral

25 Se valoró la estructura vascular tumoral y su activación en los diferentes grupos de tratamiento mediante inmunohistoquímica (IHC). Para ello, se tomaron muestras de tumores 9 o 14 días después de la irradiación. Luego, estos tumores se incluyeron en OCT para su análisis adicional.

30 Luego, se realizó la detección en portaobjetos tumorales de alfa actina de músculo liso (α SMA) utilizando un protocolo convencional validado en un aparato de tinción automática VENTANA DISCOVERY ULTRA (ROCHE TISSUE DIAGNOSTICS, Ab primario ref ab5694, ABCAM) según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron protocolos de tinción manual en secciones congeladas de OCT para detectar CD31 (BD PHARMINGEN) e ICAM-1 (ABCAM). Todos los portaobjetos se tiñeron por contraste con hematoxilina. Se detectó NG2 (Ab primario: MILLIPORE) por inmunofluorescencia. Después, se cuantificó la tinción de CD31 y α SMA usando el algoritmo para la detección de vasos en el paquete de software Tissue Studio de DEFINIENS. Los vasos se detectaron automáticamente según sus propiedades espectrales de tinción IHC en las regiones de interés que se habían seleccionado manualmente. El porcentaje del área teñida para NG2 se midió usando el software IMAGEJ V1.41. La tinción ICAM1 se determinó utilizando una puntuación semicuantitativa basada en el área de tinción (menos de 1 por campo=0; 1-2 por campo=1; 3 o más por campo=2) y la intensidad (sin tinción=0; débil=1; moderada=2; fuerte=3).

35 La figura 8 muestra la cuantificación del área teñida de anticuerpos para α SMA (A) o NG2 (B) en el tumor muestreado en el día 9 (D9) o 14 (D14). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ANOVA de una vía seguido de prueba posterior de Tukey.

40 En vista de la tinción inmunohistoquímica obtenida con CD31, los resultados establecieron que no hubo diferencias significativas en la superficie de los vasos tumorales y la densidad provocada por los diversos tratamientos a las 24 h (día 9) o 6 días después de la irradiación (día 14) (datos no mostrados). Por el contrario, cuando se analizaron los niveles de pericitos realizando tinción de α SMA, se observó un aumento significativo en la superficie teñida en los tumores de ratones tratados tanto con STxB-E7 como con IR el día 14 (figura 8A). Debido a que se reconoce que los pericitos son reguladores clave de la estructura vascular y debido a que la extensión de su cobertura sobre los vasos tumorales normalmente disminuye en comparación con tejidos normales, estos datos sugieren que el tratamiento combinado induce una restauración de la funcionalidad vascular. Esta hipótesis se confirmó además por el aumento de la tinción de NG2 (un marcador de pericito alternativo) observado el día 14 en ratones tratados tanto con irradiación local como con vacunación (figura 8B).

45 Para valorar la permeabilidad vascular, se administraron 0,2 ml de colorante azul de Evans (0,5%) a ratones mediante inyección en la vena de la cola. Los ratones se sacrificaron 30 minutos después de dicha inyección. Se recogieron muestras tumorales diseccionadas y se eluyó azul de Evans en formaldehído (0,5 ml para 50 mg de tejido) a 58°C durante la noche. La concentración del colorante acumulado para cada alícuota se cuantificó mediante el uso de un espectrofotómetro leyendo la absorbancia a 610 nm restando la absorbancia de referencia a 450 nm.

55 La figura 9 muestra la absorbancia media \pm DEM relacionada con las perfusiones tumorales medias dependiendo de su tratamiento el día 9 (D9) o el día 14 (D14). * $p < 0,05$ ANOVA de una vía seguido de prueba posterior de Tukey.

La figura 10 ilustra los datos obtenidos mediante la formación de imágenes *in vivo* IVIS en el día del sacrificio representada frente a la absorbancia en el día 14 para ratones individuales para mostrar la correlación entre la perfusión y el tamaño tumorales ($p < 0,001$, prueba de correlación de Pearson).

5 Estas observaciones fueron respaldadas por el ensayo de Miles, una prueba funcional que se realiza para evaluar la perfusión tumoral. A las 24 horas después de la irradiación (día 9), la perfusión de los tumores aún no se vio afectada por los tratamientos (figura 9, panel izquierdo); sin embargo, el día 14 después de la exposición al tumor, la perfusión del tumor se incrementó significativamente sólo con el tratamiento combinado en comparación con las terapias tanto de control como únicas (figura 9, panel derecho). Este aumento observado se correlacionó inversamente con la señal bioluminiscente ($p < 0,05$, prueba de correlación de Pearson, figura 10), lo que indica que la perfusión estaba
10 relacionada con el tamaño tumoral en este momento.

Finalmente, se evaluó la activación de vasos detectando la expresión de ICAM-1 en los tumores mediante IHC. La ICAM-1 es una proteína transmembrana implicada en la detención y transmigración de leucocitos de los vasos sanguíneos, que está regulada al alza en tumores de ratones sometidos a los diferentes tratamientos.

15 La figura 11 muestra la cuantificación de la expresión de ICAM-1 basada en una puntuación a partir de la tinción inmunohistoquímica. *** $p < 0,001$ ANOVA de una vía seguido de prueba posterior de Tukey.

Los resultados muestran que la ICAM1 se regula principalmente al alza en el grupo de combinación (figura 11).

Tomados en conjunto, estos datos indican que la combinación de inmunización con STxB-E7 e IR promueve la normalización y activación de los vasos tumorales, favoreciendo así el reclutamiento e infiltración de leucocitos en el tejido tumoral. Por tanto, para el primero, una terapia de combinación basada en irradiación local y vacunación induce
20 una perfusión tumoral aumentada, que se acompaña de una cobertura de pericitos y expresión de ICAM-1 aumentadas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)
 Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP)
 Institut Curie
 Université René Descartes - Paris V
 Institut National de la Santé et de la Recherche Scientifique (INSERM)
- 10 <120> VACUNACIÓN/RADIOTERAPIA COMBINADAS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER
 <130> STX-B-0001-PCT1
 <150> EP 15000507.2
 <151> 23-02-2015
- 15 <160> 5
 <170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> 1
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Shigella dysenteriae
- 25 <400> 1
 Met Lys Lys Thr Leu Leu Ile Ala Ala Ser Leu Ser Phe Phe Ser Ala
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Ala Thr Pro Asp Cys Val Thr Gly Lys Val Glu Tyr Thr
 20 25 30
 Lys Tyr Asn Asp Asp Asp Thr Phe Thr Val Lys Val Gly Asp Lys Glu
 35 40 45
 Leu Phe Thr Asn Arg Trp Asn Leu Gln Ser Leu Leu Leu Ser Ala Gln
 50 55 60
 Ile Thr Gly Met Thr Val Thr Ile Lys Thr Asn Ala Cys His Asn Gly
 65 70 75 80
 Gly Gly Arg Ser Glu Val Ile Phe Arg
 85
- 30 <210> 2
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
 <223> fragmento de la subunidad B de la toxina de Shigella dysenteriae
 <400> 2
 Thr Pro Asp Cys Val Thr Gly Lys Val Glu Tyr Thr Lys Tyr Asn Asp
 1 5 10 15
 Asp Asp Thr Phe Thr Val Lys Val Gly Asp Lys Glu Leu Phe Thr Asn
 20 25 30

ES 2 857 704 T3

Arg Trp Asn Leu Gln Ser Leu Leu Leu Ser Ala Gln Ile Thr Gly Met
 35 40 45

Thr Val Thr Ile Lys Thr Asn Ala Cys His Asn Gly Gly Gly Arg Ser
 50 55 60

Glu Val Ile Phe Arg
 65

5 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> aminoácidos 43-57 de la proteína E7 de VPH 16
 <400> 3

Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
 1 5 10 15

15 <210> 4
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> derivado de la subunidad B de la toxina de Shigella dysenteriae
 <400> 4

Met Lys Lys Thr Leu Leu Ile Ala Ala Ser Leu Ser Phe Phe Ser Ala
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Ala Thr Pro Asp Cys Val Thr Gly Lys Val Glu Tyr Thr
 20 25 30

Lys Tyr Asn Asp Asp Asp Thr Phe Thr Val Lys Val Gly Asp Lys Glu
 35 40 45

Leu Phe Thr Asn Arg Trp Asn Leu Gln Ser Leu Leu Leu Ser Ala Gln
 50 55 60

Ile Thr Gly Met Thr Val Thr Ile Lys Thr Asn Ala Cys His Asn Gly
 65 70 75 80

25 Gly Gly Arg Ser Glu Val Ile Phe Arg Cys
 85 90

30 <210> 5
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> derivado de la subunidad B de la toxina de Shigella dysenteriae
 <400> 5

ES 2 857 704 T3

Thr Pro Asp Cys Val Thr Gly Lys Val Glu Tyr Thr Lys Tyr Asn Asp
1 5 10 15

Asp Asp Thr Phe Thr Val Lys Val Gly Asp Lys Glu Leu Phe Thr Asn
20 25 30

Arg Trp Asn Leu Gln Ser Leu Leu Leu Ser Ala Gln Ile Thr Gly Met
35 40 45

Thr Val Thr Ile Lys Thr Asn Ala Cys His Asn Gly Gly Gly Arg Ser
50 55 60

Glu Val Ile Phe Arg Cys
65 70

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en la prevención o el tratamiento de un sujeto que padece un cáncer positivo para VPH en combinación con radioterapia, en donde dicha composición comprende un conjugado, eventualmente asociado con un portador farmacéuticamente aceptable, comprendiendo dicho conjugado:
 - 5 i) la subunidad B de la toxina Shiga (STxB), un fragmento de la misma que tiene una longitud de al menos 50 aminoácidos, fragmento que se une al receptor de glucolípidos Gb3 con una K_D igual o inferior a 10^{-7} M o un derivado del mismo correspondiente a una secuencia de aminoácidos que se une al receptor de glucolípidos Gb3 con una K_D igual o inferior a 10^{-7} M y que tiene un porcentaje de identidad de al menos el 95% en comparación con la SEQ id n.º: 1 de aminoácidos; y
 - 10 ii) al menos un epítipo de VPH asociado a dicho cáncer.
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde el cáncer positivo para VPH es un HNSCC positivo para VPH.
3. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde el cáncer positivo para VPH es una metástasis.
4. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la subunidad B de la toxina Shiga (STxB) tiene la secuencia SEQ id n.º 1, y un fragmento de STxB se refiere a la secuencia SEQ id n.º 2.
- 15 5. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho al menos un epítipo de VPH es un epítipo de VPH16.
6. La composición para su uso según la reivindicación 5, en donde dicho al menos un epítipo de VPH16 es de la proteína E6 o E7 de VPH16, preferiblemente dicho epítipo de VPH16 es de la proteína E7 de VPH16 y se selecciona del grupo que comprende los péptidos que consisten en los aminoácidos 5- 18, 17-34, 35-50, 43-57, 43-77, 49-57, 50-62, 69-82 de la proteína E7 de VPH 16.
- 20 7. La composición para su uso según la reivindicación 6, en donde, preferiblemente, dicho epítipo de VPH16 consiste en los aminoácidos 43-57 de la proteína E7 de VPH 16 (SEQ id n.º 3; GQAEPDRAHYNIVTF).
8. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde i) la subunidad B de la toxina Shiga (STxB), fragmento o derivado de la misma; y ii) el al menos un epítipo asociado a cáncer de VPH se unen covalentemente usando agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales o en una proteína de fusión.
- 25 9. La composición para su uso según la reivindicación 8, en donde i) la subunidad de toxina B de Shiga (STxB), fragmento o derivado de la misma; y ii) el al menos un epítipo asociado al cáncer de VPH se unen covalentemente usando agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales.
- 30 10. La composición para su uso según la reivindicación 9, en donde i) los derivados de la subunidad B de la toxina Shiga (STxB) se refieren a la SEQ id n.º 4 y la SEQ id n.º 5, preferiblemente a la SEQ id n.º 5.
11. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde i) la subunidad B de la toxina Shiga (STxB), fragmento o derivado de la misma; y ii) el al menos un epítipo asociado a cáncer de VPH se unen covalentemente en una proteína de fusión.
- 35 12. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la radioterapia puede aplicarse a una dosis en un intervalo de desde aproximadamente 10 hasta 55 Gy, preferiblemente desde aproximadamente 15 hasta 50 Gy, tal como de 20 a 40 Gy, concretamente desde aproximadamente 20 hasta 35 Gy, y más concretamente desde aproximadamente 25 hasta 30 Gy.
- 40 13. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la composición y la radioterapia se administran a la vez, por separado, o secuencialmente.
14. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la composición se administra antes de la irradiación.
- 45 15. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la composición es para su uso en la prevención o el tratamiento de un sujeto que padece un cáncer mediante una administración parenteral.

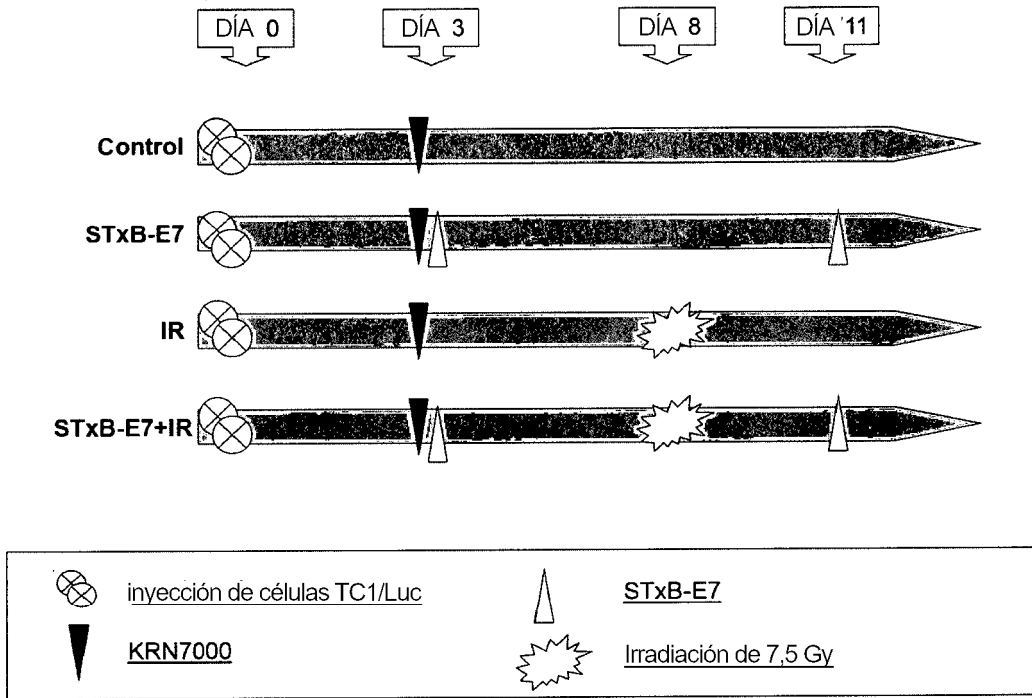


Figura 1

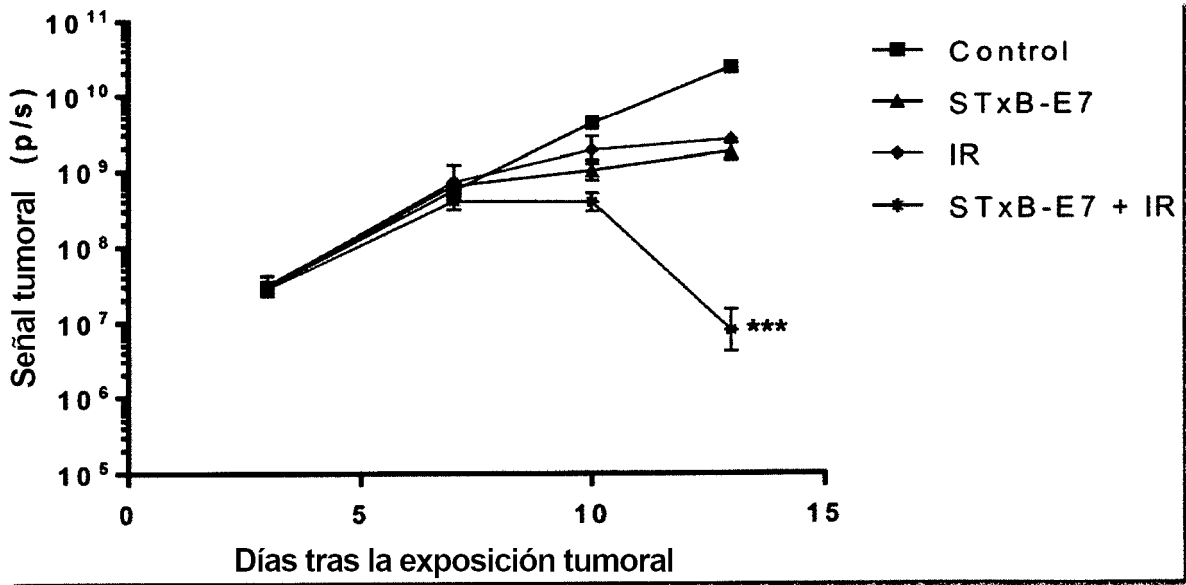


Figura 2A

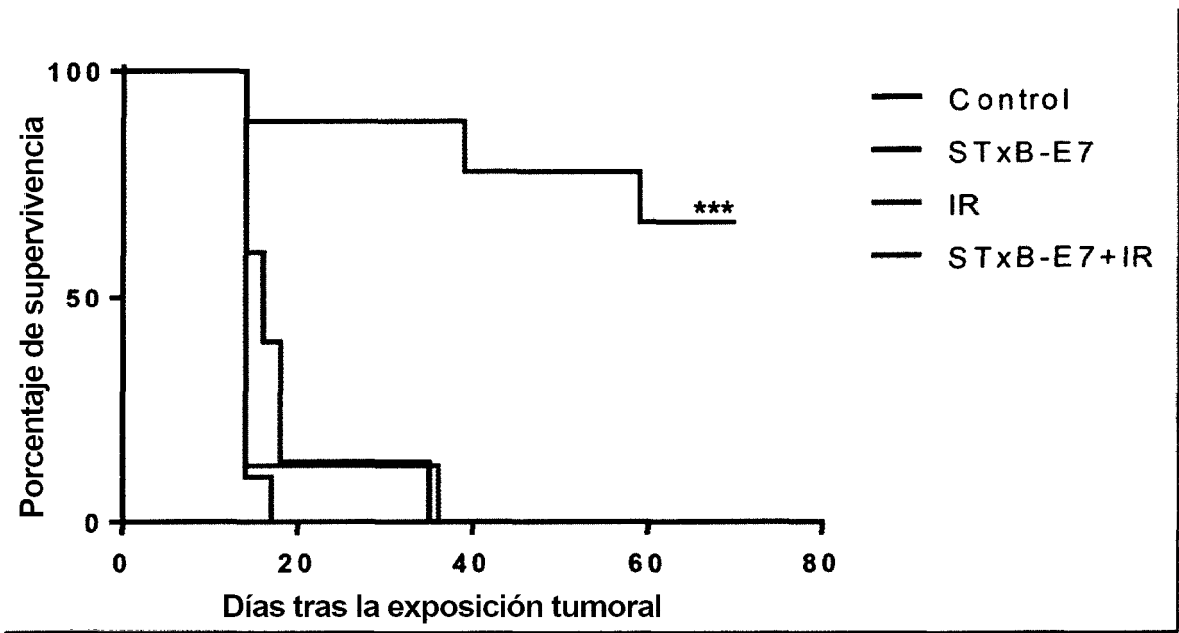


Figura 2B

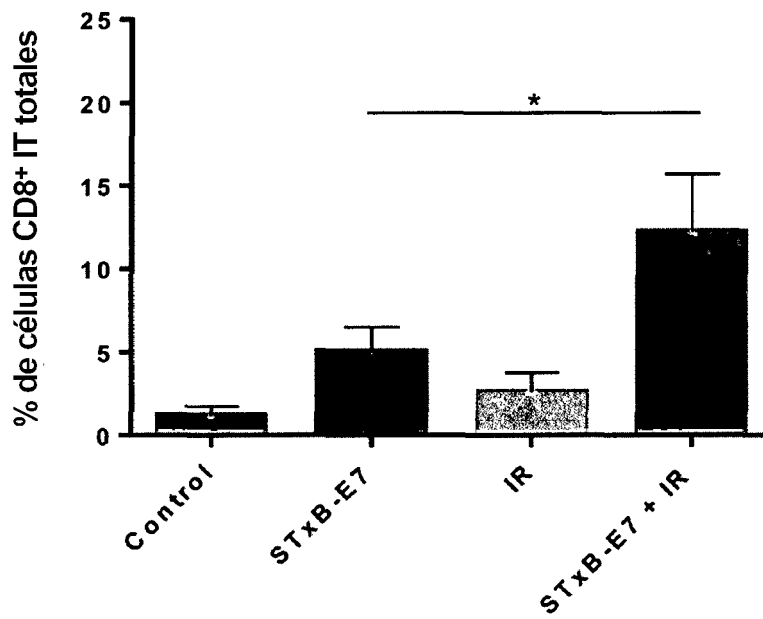


Figura 3A

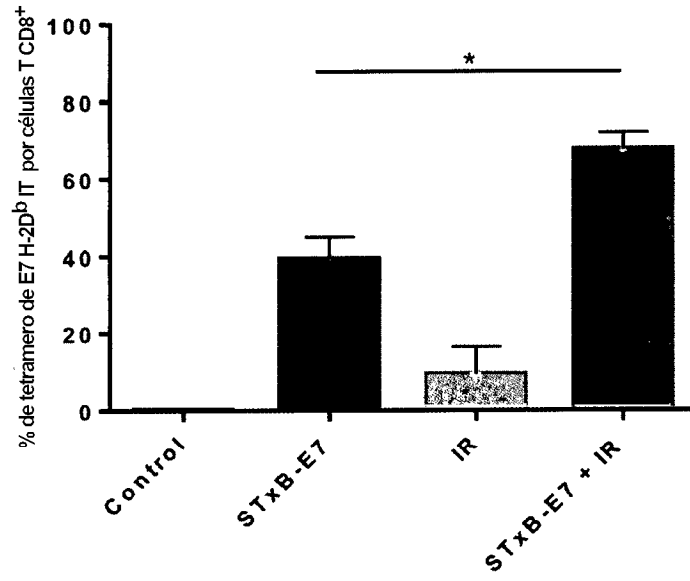


Figura 3B

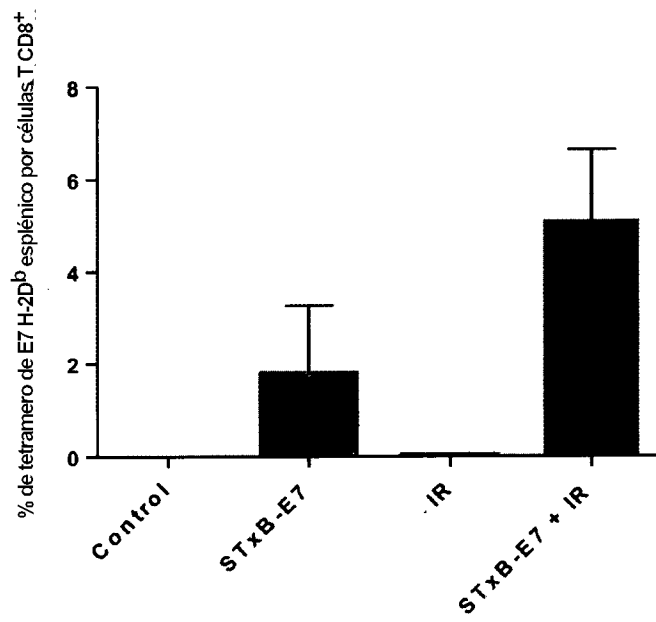


Figura 4

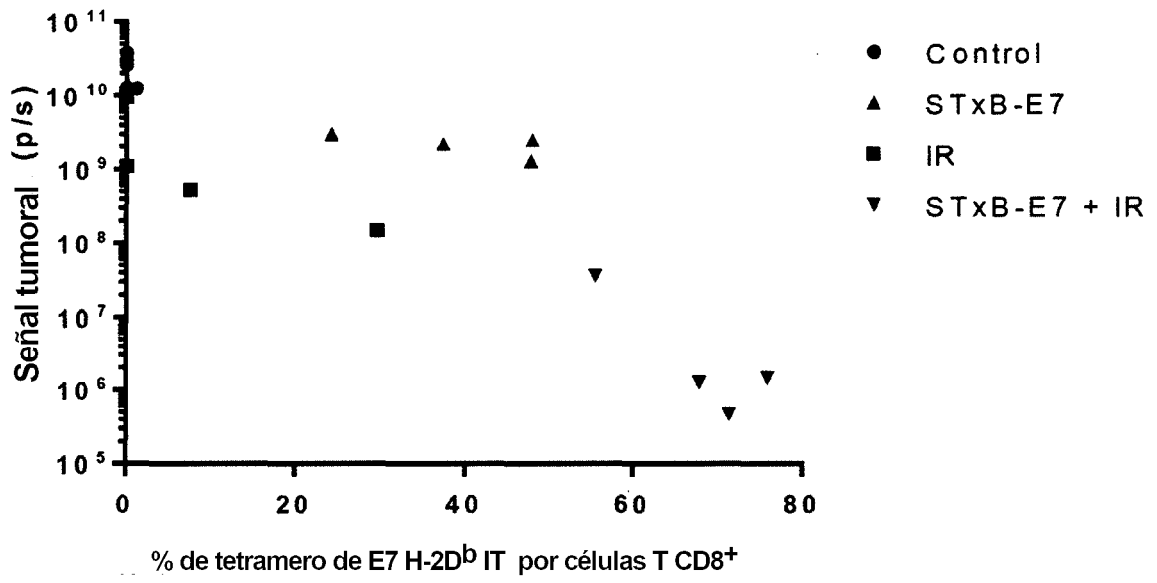


Figura 5

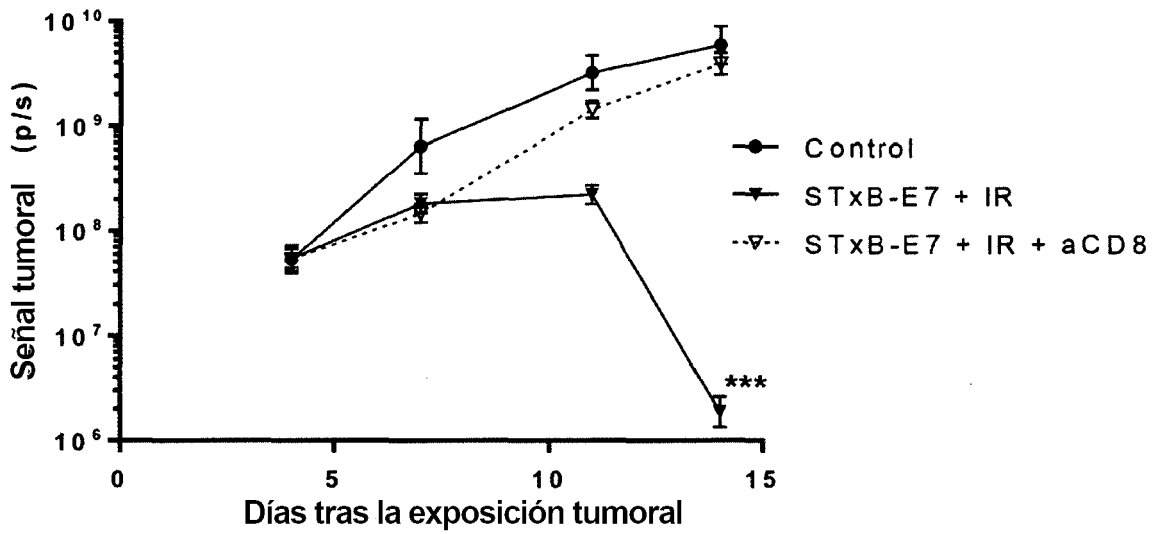


Figura 6A

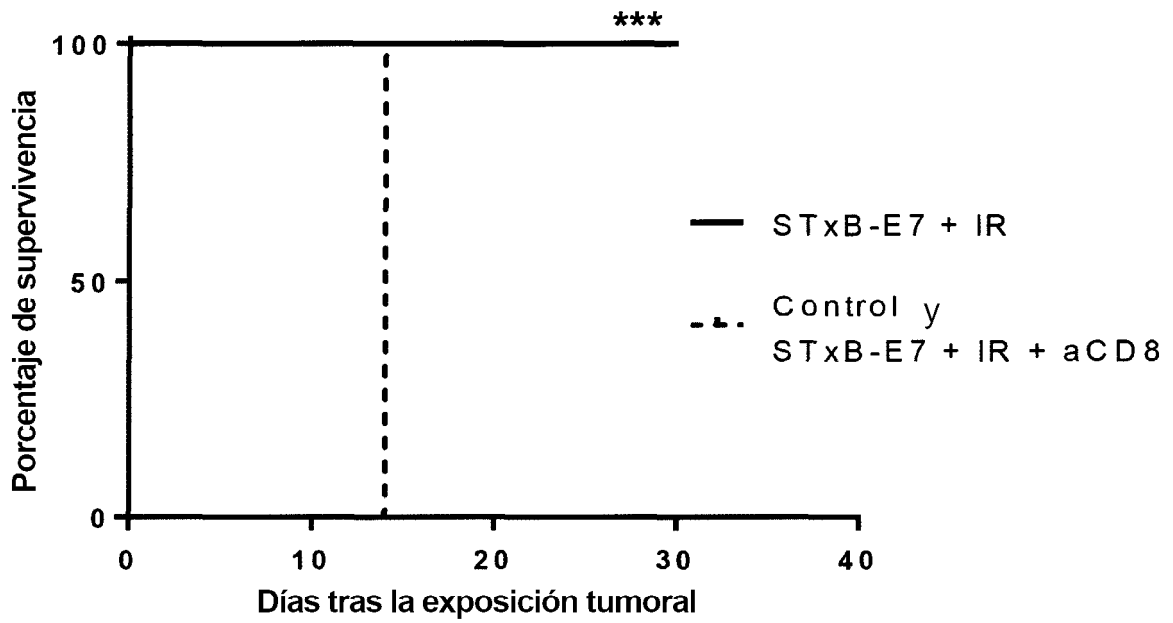


Figura 6B

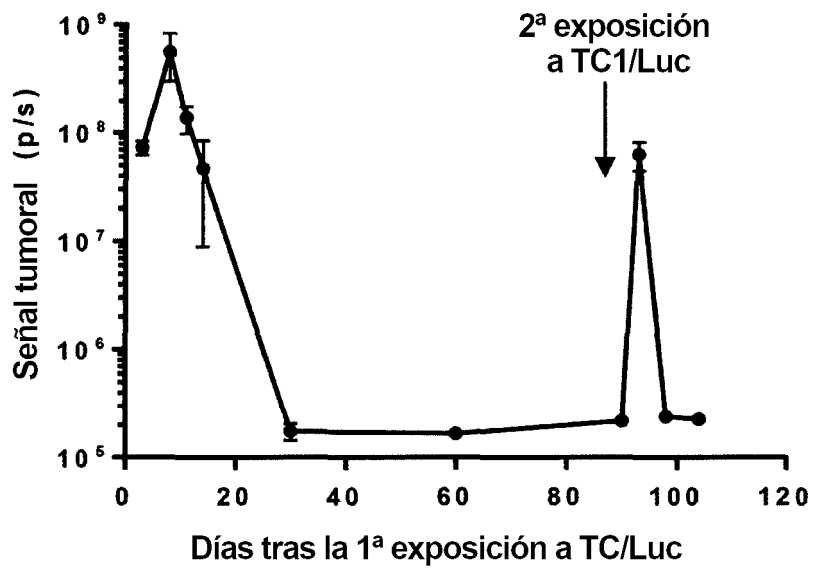


Figura 7

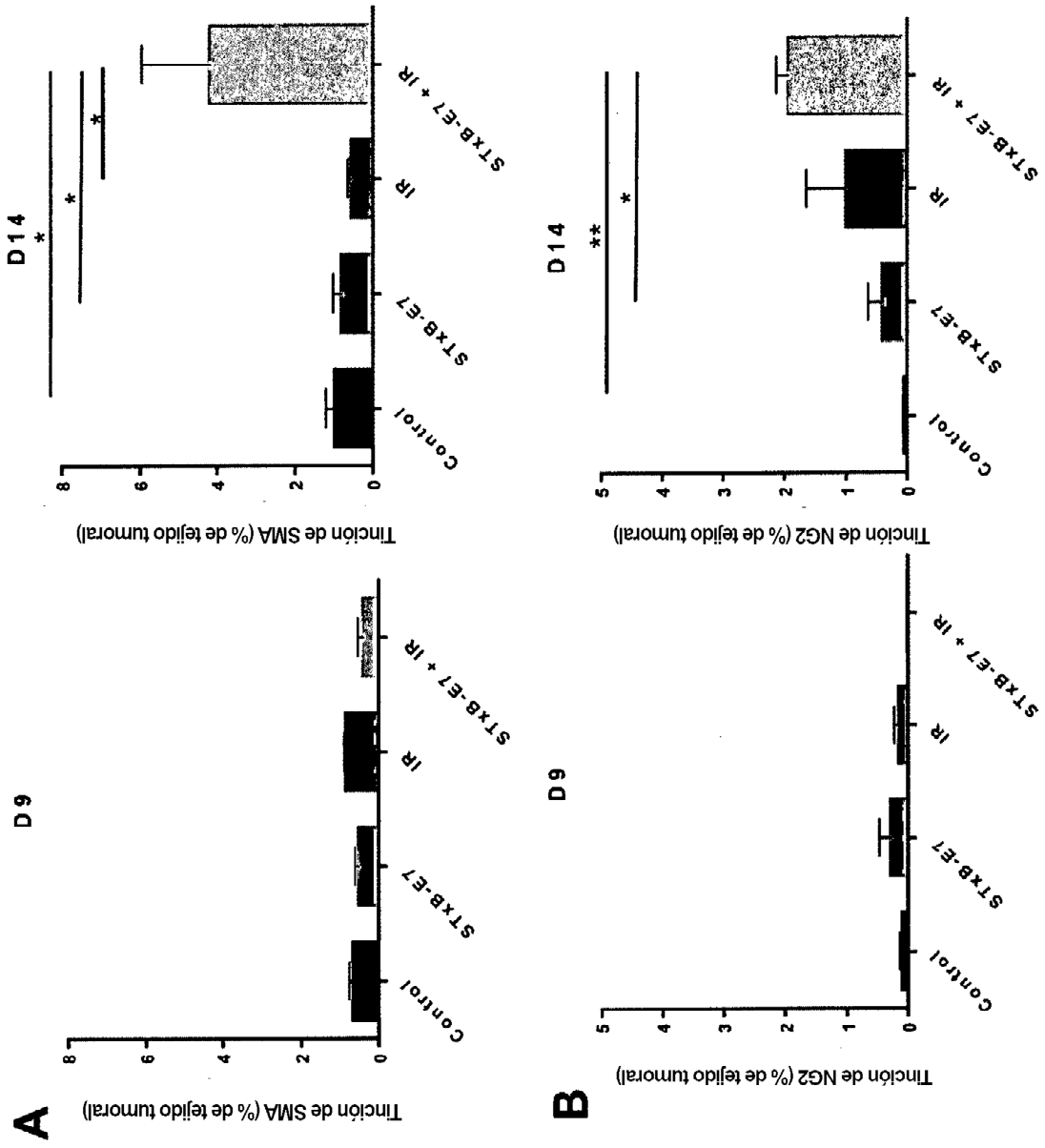


Figura 8

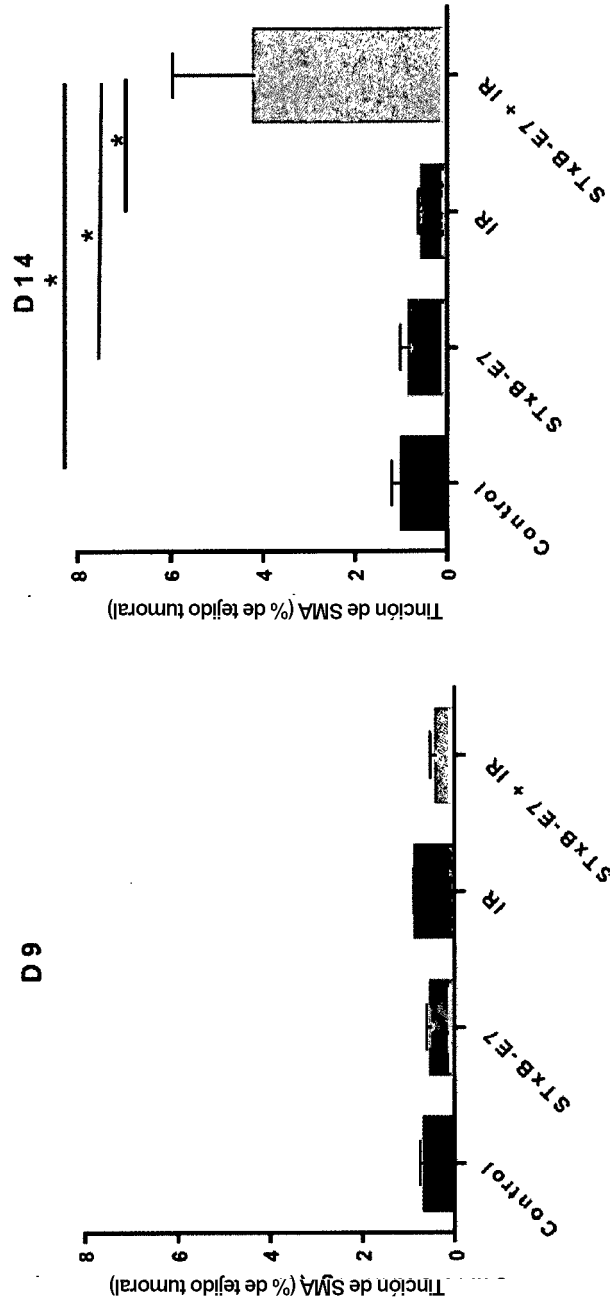


Figura 9

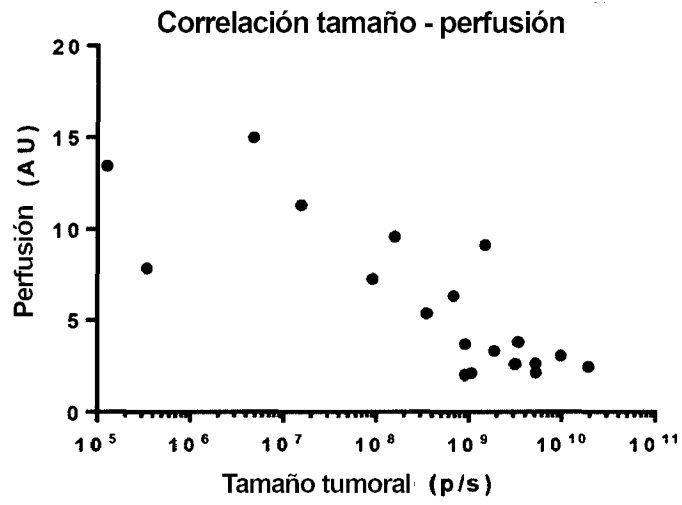


Figura 10

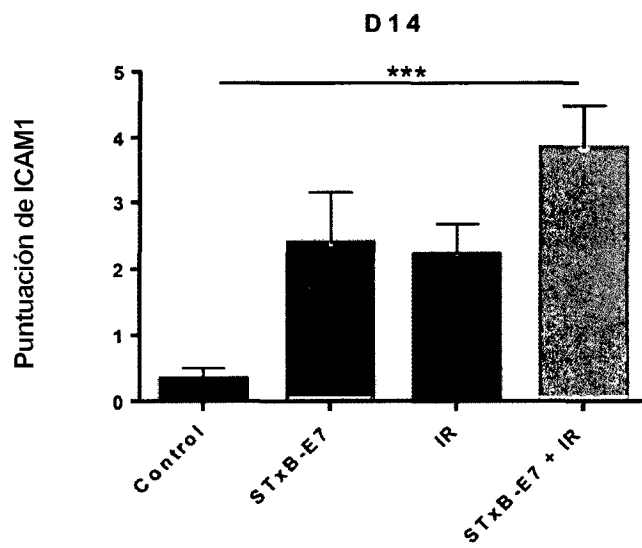


Figura 11