

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 011 733**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 35/768 (2015.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 35/761 (2015.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2016** **PCT/EP2016/052991**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2016** **WO16128542**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2016** **E 16704208 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2025** **EP 3256156**

54 Título: **Vacuna inmunoterapéutica y terapia combinada de anticuerpos**

30 Prioridad:

13.02.2015 EP 15305215
16.04.2015 EP 15305570

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2025

73 Titular/es:

TRANSGENE (100.00%)
Parc d'Innovation Boulevard Gonthier
d'Andernach
67400 Illkirch Graffenstaden, FR

72 Inventor/es:

SLOS, PHILIPPE;
HORTELANO, JULIE;
RITTNER, KAROLA y
PREVILLE, XAVIER

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 3 011 733 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna inmunoterapéutica y terapia combinada de anticuerpos

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere en general a combinaciones novedosas que comprenden uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios y al menos una vacuna terapéutica (más específicamente una vacuna vectorizada que codifica antígeno(s)). Las realizaciones también incluyen composiciones y kits que comprenden dichos componentes, así como métodos para tratar, prevenir o inhibir enfermedades proliferativas e infecciosas. La invención reviste un interés muy especial en el campo de la inmunoterapia, concretamente para potenciar la respuesta inmunitaria del huésped y, en particular, para alterar la tolerancia inmunitaria. La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Técnica antecedente

Utilizar el sistema inmunitario del huésped para erradicar organismos infecciosos persistentes y células malignas es un planteamiento prometedor. Este tipo específico de estrategia de vacunación suele denominarse inmunoterapia. Ampliamente utilizada en la vacunación tradicional, la inmunoterapia ha mostrado algunos resultados prometedores en la terapia para tratar enfermedades graves, crónicas y potencialmente mortales.

Numerosos grupos de investigación han estudiado la inmunoterapia como posible modalidad para tratar el cáncer en un intento de estimular el sistema inmunitario y así rechazar y destruir los tumores. Durante décadas se ha descrito en la literatura un gran número de tratamientos inmunoterapéuticos que utilizan diversos enfoques, por ejemplo, células cancerosas, partes de células, antígenos purificados y antígenos vectorizados. Las vacunas celulares suelen estar compuestas por células cancerosas que se han extraído del paciente durante la cirugía y se han alterado en el laboratorio para hacerlas más susceptibles de ser atacadas por el sistema inmunitario del paciente antes de reintroducirlas en él. Alternativamente, se pueden utilizar células inmunitarias obtenidas de la sangre del paciente que han sido expuestas a células cancerosas o antígenos asociados, cultivadas en presencia de quimiocinas que las convierten en células dendríticas antes de ser devueltas al paciente mediante infusión intravenosa con el fin de ayudar a otras células del sistema inmunitario a atacar a las células cancerosas. La vacuna Provenge[®] (sipuleucel-T), basada en células dendríticas, se probó en ensayos clínicos avanzados para tratar el cáncer de próstata avanzado y recibió la aprobación de la FDA en 2010. Sin embargo, estas vacunas celulares deben fabricarse individualmente para cada paciente y el proceso de producción es así complejo y costoso.

Las vacunas antigénicas se componen de sólo uno o unos pocos antígenos proteicos o peptídicos específicos para un determinado tipo de cánceres o agentes patógenos. Una vez administrados, podrán inducir respuestas inmunológicas específicas contra estos antígenos y reforzar el sistema inmunitario del paciente. Varias vacunas peptídicas candidatas alcanzaron el desarrollo clínico. Por ejemplo, el liposomal vaccine Stimuvax[®] incorpora lipopéptidos generados a partir de la glicoproteína mucina 1 (MUC1), ampliamente expresada por los cánceres comunes. Aunque en los ensayos clínicos no proporcionó una mejora significativa de la supervivencia global en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) avanzado, no obstante, sí se observaron efectos en algunos subgrupos de pacientes.

Las vacunas basadas en vectores han demostrado ser muy prometedoras y desempeñan un papel importante en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Los vectores se utilizan para introducir el antígeno en el organismo. Normalmente, los vectores proceden de virus, bacterias, células de levadura, u otras estructuras que han sido alteradas para que dejen de ser nocivas para el paciente (por ejemplo, inactivadas, atenuadas, etc.). El vector vírico ideal debe ser seguro y permitir una presentación eficaz de los antígenos codificados al sistema inmunitario. Además, el sistema vectorial debe cumplir criterios que permitan su producción a gran escala. Los vectores virales vivos son atractivos por su capacidad tanto para expresar antígenos de una variedad de patógenos y tejidos tumorales como para facilitar la presentación de antígenos a través de la vía endógena, que ha demostrado ser importante para la inducción eficiente de respuestas inmunes celulares (Reyes-Sandoval, 2007, Immunology 121(2): 158-65). Así pues, hasta la fecha han surgido varios vectores virales, todos ellos con ventajas y límites relativos en función de la aplicación propuesta (véanse, por ejemplo, Harrop y Carroll, 2006, Front Biosci., 11, 804-817; Inchauspe et al., 2009, Int Rev Immunol 28(1): 7-19; Torresi et al., 2011, J. Hepatol. 54(6): 1273-85). También se han realizado importantes esfuerzos de investigación para desarrollar plásmidos de ADN codificantes de antígenos y el dispositivo de administración asociado para estimular respuestas inmunitarias protectoras (por ejemplo, véase Reyes-Sandoval y Ertl, 2001, Curr Mol Med 1(2): 217-43).

Por ejemplo, los vectores de adenovirus (Ad) con replicación defectuosa se han utilizado ampliamente porque los Ad infectan células en replicación y en no replicación, tienen un amplio tropismo tisular, se propagan eficientemente en líneas celulares de empaquetado adecuadas y el proceso de producción es escalable y asequible (Boukhebz et al., 2014, Vaccine 32(26): 3256-63). La cepa Ankara del virus vaccinia atenuado no replicativo (MVA) también es un candidato atractivo, ya que ha demostrado inducir respuestas inmunitarias celulares sólidas con un excelente perfil de seguridad tanto en el campo del cáncer como en el de las enfermedades infecciosas (Boukhebz et al., 2012, Hum Vaccin Immunother 8(12): 1746-57; Habersetzer et al., 2011, Gastroenterology 141(3): 890-99; Fournillier et al., 2007, Vaccine 25(42): 7339-53; Drexler et al., 2004, Curr Opin Biotechnol 15(6): 506-12). El MVA se ha atenuado en más de

570 pasajes en fibroblastos de embrión de pollo, lo que ha provocado la pérdida del 15% de su genoma. En consecuencia, la MVA es incapaz de producir viriones maduros en la mayoría de las células de mamíferos, lo que se traduce en un menor riesgo de diseminación y una mayor inmunogenicidad debido a la pérdida de varios genes de defensa antiinmunitaria (Sutter et al., 1994, Vaccine 12(11): 1032-40).

Sin embargo, la capacidad del sistema inmunitario para luchar contra las enfermedades infecciosas crónicas y los cánceres es limitada. A veces, el sistema inmunitario no detecta el cáncer o las células infectadas como extrañas porque las células no son lo suficientemente diferentes de las células normales. En otros casos, la respuesta puede no ser lo suficientemente fuerte como para destruir las células enfermas, especialmente en pacientes inmunodeprimidos. Finalmente, el sistema inmunitario podría ser ineficaz debido a que las células enfermas han evolucionado diferentes formas de eludir el sistema inmunitario.

Uno de los principales mecanismos de supresión inmunitaria es un proceso conocido como "agotamiento de las células T", que resulta de la exposición crónica a antígenos y se caracteriza por la regulación hacia arriba de los receptores inhibidores. Estos receptores inhibidores actúan como puntos de control inmunitarios para evitar reacciones inmunitarias incontroladas. En la bibliografía se han descrito varios puntos de control inmunitario que actúan en distintos niveles de la inmunidad de las células T, como la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1), la proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), el gen 3 de activación de linfocitos (LAG3), el atenuador de linfocitos B y T, la inmunoglobulina de células T, la proteína 3 que contiene el dominio mucina (TIM-3) y la inmunoglobulina de dominio V supresora de la activación de células T (VISTA). También se ha informado de que la interacción de PD-1 con sus ligandos PDL-1 y PDL-2 desempeña un papel fundamental en el agotamiento de las células T (Maier et al., 2007, J. Immunol. 178: 2714-20; Tzeng et al., 2012, PLoS One 7: e39179).

Sea cual sea el mecanismo de acción, estos puntos de control inmunitarios pueden inhibir el desarrollo de una respuesta inmunitaria eficaz. Existe un interés creciente por bloquear estos puntos de control inmunitarios como medio de inhibir la tolerancia del sistema inmunitario y rescatar así las células T agotadas (Leach et al., 1996, Science 271: 1734-6). En la última década se ha desarrollado un gran número de anticuerpos antagonistas (por ejemplo, anti LAG3, -PD-L1, -CTLA-4, -PD1, etc.) y tres de ellos ya están comercializados. El primero en llegar al mercado fue el anticuerpo monoclonal-CTLA-4-específico ipilimumab (nombre comercial de Yervoy, Bristol-Myers Squibb (BMS)) que ha sido aprobado para el melanoma irresecable o metastásico. BMS informó de que, de 1.861 pacientes con melanoma tratados con ipilimumab, el 22% y el 17% siguen vivos 3 y 7 años después, respectivamente. El anticuerpo anti-PDL nivolumab (nombre comercial de Opdivo, BMS) se aprobó en Japón en julio de 2014 para el melanoma maligno. Los datos provisionales de fase II mostraron una tasa de respuesta del 32% en el melanoma metastásico pretratado, con menos eventos adversos de alto grado que Ipilimumab. El pembrolizumab anti-PD-1 (nombre comercial Keytruda, Merck), obtuvo la aprobación acelerada de la FDA para el tratamiento del melanoma irresecable o metastásico. Los anticuerpos comercializados también se encuentran en ensayos clínicos para otras indicaciones, incluido el NSCLC (cáncer de pulmón no microcítico), así como una variedad de otros inhibidores de puntos de control inmunitarios dirigidos a PD-1 (por ejemplo, pidilizumab, CureTech), CTLA-4 (por ejemplo, Tremelimumab (AstraZeneca), PD-L1 (por ejemplo, MPDL3280A, Roche), KIR (lirilumab, BMS), IDO1 (por ejemplo, indoximod, NewLink genetics) y otros.

También se están llevando a cabo estudios preclínicos con anticuerpos antagonistas en el campo de las enfermedades infecciosas (véase, por ejemplo, Barber et al., 2006, Nature 439: 682-7; Cecchinato et al., 2008, J. Immunol 180: 5439-47) y se contemplaron combinaciones con diferentes plataformas de vectores (ADN, MVA, lentivirus, vaccinia, etc.). En particular, se demostró que la combinación del bloqueo de PD-L1 con un virus vaccinia que expresaba el epítipo LMCV (virus de la cronomeningitis linfocítica) mejoraba la función de las células T CD8+ específicas del epítipo durante la infección vírica persistente (Ha et al., 2008, JEM 205: 543-55).

La administración de anticuerpos anti-PD-1 junto con un vector de adenovirus gag del VIS en macacos ingenuos provocó un aumento de las células T específicas de Gag (Finnefrock et al., 2009, J. Immunol. 182: 980-7). El documento WO2004/058801 se refiere al tratamiento del cáncer utilizando un vector MVA recombinante que codifica el polipéptido oncogénico p53 en combinación con anticuerpos anti-CTLA4 e inmunomoduladores oligodesoxinucleótidos CpG. La combinación de un vector MVA recombinante que codifica p53 con un anticuerpo anti CTLA4, para tratar cánceres, también está divulgada por Espenschied et al., The Journal of Immunology, 2003. En este caso, la administración de la vacuna MVA comienza después de la del anticuerpo anti CTLA-4. Madan et al., Oncoimmunology, 2012 y Madan et al, Lancet Oncology, 2012, describen el uso combinado de la vacuna PROSTVAC (combinación de un virus Vaccinia ((rV)-PSA- TRICOM, que codifica el antígeno del cáncer PSA y moléculas de coestimulación (LFA-3 (CD58), ICAM-1 y B7.1 (CD80)) y un virus de la viruela aviar que codifica los mismos genes heterólogos ((rF)-PSA-TRICOM)) y un anticuerpo anti-CTLA-4, en el tratamiento del cáncer de próstata. En este caso, la molécula coestimuladora B7.1 codificada por los virus vaccinia y de la viruela aviar se dirige a la misma vía que el anticuerpo anti-CTLA-4 utilizado en combinación, administrándose el anticuerpo anti-CTLA-4 para contrarrestar la competencia entre B7.1 y CTLA-4 por la unión a CD28 en las células T.

Cabe esperar que el cáncer y las enfermedades infecciosas sigan siendo una grave amenaza para la salud mundial durante muchos años. A pesar de la disponibilidad de antibióticos y vacunas, las enfermedades infecciosas causan 100.000 muertes al año en todo el mundo (datos OMS 2002). Por otra parte, los tumores malignos, y especialmente los metastásicos, suelen ser resistentes a las terapias convencionales, lo que explica la importante morbilidad de algunos cánceres. La descripción anterior ilustra claramente que el diseño de terapias eficaces es una tarea difícil

debido a los numerosos mecanismos establecidos por el organismo del huésped para escapar de las células efectoras inmunitarias.

Sumario de la invención

En el contexto de la invención, los inventores identificaron un producto combinado capaz de potenciar las respuestas inmunitarias del paciente y/o restaurar la inmunidad mediada por células T agotada. Los elementos esenciales de un producto combinado de este tipo son una vacuna terapéutica y un inhibidor del punto de control inmunitario. Los inventores descubrieron sorprendentemente que las administraciones de un vector MVA que codifica un antígeno modelo (PGal) en combinación con anticuerpos anti-CTLA4 o anti-PD-1 son sorprendentemente eficaces para reducir el volumen de los tumores implantados en un modelo animal de cáncer humano y aumentar la tasa de supervivencia de esos animales. La capacidad de tales combinaciones para proporcionar efectos antitumorales es una buena indicación de que la presente invención puede ser útil para tratar a sujetos humanos contra una variedad de enfermedades, y especialmente enfermedades infecciosas y proliferativas.

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Cualquier parte de la descripción que no entre en el ámbito de las reivindicaciones adjuntas tiene carácter meramente ilustrativo. En particular, cualquier materia denominada "divulgación" y que no esté comprendida en el ámbito de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención.

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere al producto combinado de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia.

En un primer aspecto, la invención proporciona un producto de combinación que comprende al menos una vacuna terapéutica y uno o más modulador(es) de puntos de control inmunitarios para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa o infecciosa en un sujeto humano, tal como se define en las reivindicaciones.

La presente divulgación también describe una composición que comprende la vacuna terapéutica y el (los) modulador(es) del punto de control inmunitario, así como la utilización o método de tratamiento que utiliza dicha composición, especialmente para tratar enfermedades infecciosas y proliferativas como el cáncer.

Otros y más aspectos, características y ventajas de la presente invención se desprenderán de la siguiente descripción de las realizaciones actualmente preferidas de la invención. Estas realizaciones se dan con el propósito de divulgación.

Descripción detallada de la invención

Como se ha descrito anteriormente, los inventores identificaron un producto combinado que comprende al menos (i) una vacuna terapéutica y (ii) uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios.

Tal y como se utilizan en toda la solicitud, los términos "un" y "una" se utilizan en el sentido de que significan "al menos uno", "al menos un primero", "uno o más" o "una pluralidad" de los componentes o pasos referenciados, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una vacuna terapéutica" incluye una pluralidad de vacunas terapéuticas, incluidas sus mezclas.

El término "uno o más" se refiere a uno o a un número superior a uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, etc.).

El término "y/o", dondequiera que se utilice aquí, incluye el significado de "y", "o" y "todos o cualquier otra combinación de los elementos conectados por dicho término".

El término "aproximadamente" o "aproximadamente" significa dentro del 10%, preferiblemente dentro del 8%, y más preferiblemente dentro del 5% de un valor o intervalo dado.

Como se utiliza en el presente documento, cuando se utilizan para definir productos, composiciones y métodos, los términos "que comprende" (y cualquier forma de comprender, como "comprende" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de tener, como "tiene" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de incluir, como "incluye" e "incluye") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, como "contiene" y "contiene") son abiertos y no excluyen elementos o pasos del método adicionales no mencionados. Así, un polipéptido "comprende" una secuencia de aminoácidos cuando la secuencia de aminoácidos puede formar parte de la secuencia final de aminoácidos del polipéptido. "Consistente esencialmente en" significa excluir otros componentes o pasos de cualquier importancia esencial. Por lo tanto, una composición que consista esencialmente en los componentes mencionados no excluiría trazas de contaminantes y portadores farmacéuticamente aceptables. Un polipéptido "consiste esencialmente en" una secuencia de aminoácidos cuando dicha secuencia de aminoácidos está presente con, opcionalmente, sólo unos pocos residuos de aminoácidos adicionales. "Constituido por" significa excluir más que elementos traza de otros componentes o etapas. Por ejemplo, un polipéptido "consiste en" una secuencia de aminoácidos cuando el polipéptido no contiene más aminoácidos que la secuencia de aminoácidos mencionada.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se refieren a polímeros de residuos de aminoácidos que comprenden al menos nueve o más aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. El polímero puede ser lineal, ramificado o cíclico y puede comprender análogos naturales y/o aminoácidos y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Como indicación general, si el polímero de aminoácidos tiene más de 50 residuos de aminoácidos, se denomina

preferiblemente polipéptido o proteína, mientras que, si tiene 50 aminoácidos o menos, se denomina "péptido".

En el contexto de la presente invención, los términos "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "polinucleótido" y "secuencia de nucleótidos" se utilizan indistintamente y definen un polímero de cualquier longitud de polidesoxirribonucleótidos (ADN) (por ejemplo, ADNc, ADN genómico, plásmidos, vectores, genomas virales, sondas, cebadores y cualquier mezcla de los mismos) o polirribonucleótidos (ARN) (por ejemplo, ARNm, ARN antisentido, ARNsi) o polirribonucleótidos mixtos. Abarcan polinucleótidos de cadena simple o doble, lineales o circulares, naturales o sintéticos, modificados o no. Además, un polinucleótido puede comprender nucleótidos no naturales y puede estar interrumpido por componentes no nucleotídicos.

Los términos "análogo", "mutante" o "variante" como se utilizan en el presente documento se refieren a un componente (polipéptido o ácido nucleico) que presenta una o más modificaciones con respecto a su homólogo nativo. Puede contemplarse cualquier modificación(es), incluida la sustitución, inserción y/o supresión de uno o más residuos de nucleótidos/aminoácidos. Cuando se contemplan varias mutaciones, éstas pueden afectar a residuos consecutivos y/o a residuos no consecutivos. La(s) mutación(es) puede(n) generarse de diversas formas conocidas por los expertos en la materia, como la mutagénesis dirigida al lugar (por ejemplo, utilizando el sistema de mutagénesis in vitro Sculptor(TM) de Amersham, Les Ulis, Francia), la mutagénesis por PCR, la mezcla de ADN y mediante técnicas químicas sintéticas (por ejemplo, dando lugar a una molécula sintética de ácido nucleico). Se prefieren los análogos que conservan un grado de identidad de secuencia de al menos el 80%, preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90%, y aún más preferiblemente al menos el 98% de identidad con la secuencia del homólogo nativo.

De manera general, el término "identidad" se refiere a una correspondencia aminoácido-aminoácido o nucleótido-nucleótido entre dos secuencias polipeptídicas o de ácido nucleico. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es función del número de posiciones idénticas que comparten las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos que es necesario introducir para un alineamiento global óptimo y la longitud de cada hueco. Existen varios programas informáticos y algoritmos matemáticos para determinar el porcentaje de identidad entre secuencias de aminoácidos, como por ejemplo el algoritmo de Needleman et Wunsch. J.Mol. Biol. 48,443-453, 1970, el programa Blast disponible en el NCBI o ALIGN en Atlas of Protein Sequence and Structure (Dayhoffed, 1981, Supl., 3.): 482-9) o el software de agujas disponible en ebi.ac.uk en todo el mundo con el nombre "Align". También existen programas para determinar la identidad entre secuencias de nucleótidos en bases de datos especializadas (por ejemplo, Genbank, el paquete de análisis de secuencias de Wisconsin, los programas BESTFIT, FASTA y GAP). A título ilustrativo, "al menos un 80% de identidad" significa 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aislado" se refiere a un componente (por ejemplo, un polipéptido, péptido, polinucleótido, vector, etc.), que se retira de su entorno natural (es decir, se separa de al menos otro(s) componente(s) con el(los) que está(n) naturalmente asociado(s) o que se encuentra(n) en la naturaleza). Un componente aislado se refiere a un componente que se mantiene en un contexto heterólogo o purificado (parcial o sustancialmente). Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico está aislada cuando está separada de secuencias normalmente asociadas a ella en la naturaleza (por ejemplo, disociada de un cromosoma o un genoma), pero puede estar asociada a secuencias heterólogas (por ejemplo, dentro de un vector recombinante).

Los términos "obtenido de", "originario de" u "originar" se utilizan para identificar la fuente original de un componente (por ejemplo, un polipéptido, péptido, polinucleótido, vector, etc.), pero no pretenden limitar el método por el que se fabrica el componente, que puede ser, por ejemplo, por síntesis química o por medios recombinantes.

El término "combinación", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier disposición posible de dos o más entidades (por ejemplo, al menos la vacuna terapéutica y el modulador o moduladores de puntos de control inmunitarios descritos en el presente documento).

Una "vacuna terapéutica" como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia (por ejemplo, polipéptido, polisacárido, ácido nucleico, etc.), incluida una sustancia compleja (por ejemplo, células, mezclas de células, organismos vivos o muertos como bacterias, virus y otros microorganismos, etc.), parte de la misma (por ejemplo, fragmento inmunogénico, epítipo, pared celular, flagelos, etc.) o análogos de la misma, que sea capaz de ser el objetivo de una respuesta inmunitaria. El término abarca "antígenos" (es decir, antígenos nativos, así como fragmentos y análogos de los mismos).

El término "modulador del punto de control inmunitario" se refiere a una molécula capaz de modular la función de una proteína del punto de control inmunitario de forma positiva o negativa (en particular la interacción entre una célula presentadora de antígeno (APC) y una célula efectora T inmunitaria).

El término "sujeto" se refiere generalmente a un organismo para el que cualquier producto y método de la invención es necesario o puede ser beneficioso. Típicamente, el organismo es un mamífero, particularmente un mamífero seleccionado del grupo que consiste en animales domésticos, animales de granja, animales de deporte, y primates. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano al que se le ha diagnosticado que padece o corre el riesgo de padecer una afección patológica, como una enfermedad infecciosa causada por un organismo patógeno o asociada a él, o una

enfermedad proliferativa como el cáncer. Los términos "sujeto" y "pacientes" pueden utilizarse indistintamente cuando se refieren a un organismo humano y engloban a hombres y mujeres. El sujeto a tratar puede ser un recién nacido, un lactante, un adulto joven o un adulto.

Descripción detallada de la invención

- 5 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Cualquier parte de la descripción que no entre en el ámbito de las reivindicaciones adjuntas tiene carácter meramente ilustrativo. En particular, cualquier materia denominada "divulgación" y que no esté comprendida en el ámbito de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención.

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere al producto combinado de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia.

- 10 En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona un producto combinado que comprende al menos (i) una vacuna terapéutica y (ii) uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios.

Producto de combinación

- 15 En el contexto de la presente divulgación, dicha disposición incluye una mezcla de las entidades individuales (por ejemplo, una composición única), lo que significa que las entidades individuales que componen la combinación se colocan juntas en un recipiente común antes de su administración al sujeto. Por el contrario, las combinaciones distintas se refieren al caso en que las entidades individuales no se mezclan entre sí, lo que significa que se encuentran en envases separados (por ejemplo, composiciones distintas) para su administración conjunta, ya sea de forma concomitante, secuencial o intercalada.

- 20 Las combinaciones ejemplares incluyen, pero no se limitan a, la combinación de polipéptidos (por ejemplo, una vacuna terapéutica basada en péptidos o proteínas y uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios en forma de polipéptido recombinante) o la combinación de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo una vacuna terapéutica vectorizada y uno o más vectores diseñados para codificar y expresar moduladores de puntos de control inmunitarios), así como una combinación de polipéptidos y moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, una vacuna terapéutica vectorizada y uno o más polipéptidos moduladores de puntos de control inmunitarios recombinantes). A título ilustrativo, una única composición puede adoptar la forma de a) una mezcla de la vacuna terapéutica con uno o más polipéptido(s) modulador(es) del punto de control inmunitario; b) una mezcla de la vacuna terapéutica con vector(es) que codifican el uno o más modulador(es) del punto de control inmunitario o c) un diseño específico (por ejemplo, la vacuna terapéutica codifica tanto el polipéptido(s) de interés terapéutico como el uno o más modulador(es) del punto de control inmunitario). La presente invención abarca combinaciones que comprenden concentraciones molares iguales de cada entidad, así como combinaciones con concentraciones muy diferentes de las distintas entidades. Se aprecia que la concentración óptima de cada entidad de la combinación puede ser determinada por el artesano experto en la materia. Preferiblemente, la combinación es sinérgica y proporciona una mayor eficacia (por ejemplo, un aumento de la supervivencia) que cada entidad por separado.

- 35 En el contexto de la invención, el producto combinado puede utilizarse con fines profilácticos (por ejemplo, para reducir el riesgo de padecer una enfermedad o afección patológica determinada) y/o terapéuticos (por ejemplo, en un sujeto al que se le ha diagnosticado una enfermedad o afección patológica determinada). Es preferente la utilización terapéutica.

Vacuna terapéutica

- 40 La "vacuna terapéutica", tal como se utiliza en el presente documento, es un producto biológico diseñado para provocar o aumentar la inmunidad frente a un objetivo concreto (por ejemplo, células cancerosas o infectadas, etc.) mediante la presencia o expresión de un polipéptido de interés que se espera que cause un efecto beneficioso sobre el curso o un síntoma de la enfermedad o afección patológica cuando se administra adecuadamente a un sujeto.

En el contexto de la divulgación se pueden utilizar varios tipos de vacunas terapéuticas, incluidas, entre otras, vacunas basadas en células, vacunas basadas en péptidos o polipéptidos y vacunas basadas en vectores.

- 45 Pueden obtenerse ejemplos representativos de vacunas basadas en células, por ejemplo

- A partir de células madre (como la SL-701 desarrollada por Stemline Therapeutics para el tratamiento del glioblastoma);

- 50 • A partir de células especializadas como las células inmunitarias que se reprograman in vitro para atacar a las células cancerosas (por ejemplo, la vacuna de células dendríticas desarrollada por Immunocellular Therapeutics dirigida a seis antígenos asociados a tumores (TAA) implicados en el glioblastoma, y la vacuna Provenge, aprobada para tratar el cáncer de próstata avanzado);

- A partir de células cancerosas del paciente alteradas en laboratorio para hacerlas más susceptibles de ser atacadas por el sistema inmunitario del paciente; o

• A partir de microorganismos que han sido diseñados para ser avirulentos o atenuados mediante la desactivación de sus propiedades virulentas y, opcionalmente, para expresar polipéptidos de interés. Ejemplos bien conocidos de tales microorganismos incluyen, sin limitación, bacterias (por ejemplo, *Mycobacterium*; *Lactobacillus* (por ejemplo, *Lactococcus lactis*); *Listeria* (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*) *Salmonella* y *Pseudomona* por ejemplo *Listeria monocytogenes*) *Salmonella* y *Pseudomona*), y levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*). Ejemplos representativos de vacunas terapéuticas de bacterias y levaduras incluyen *Mycobacterium bovis* BCG y Tarmogens^R desarrolladas por Globelmmune a partir de levaduras modificadas genéticamente que expresan uno o más antígenos asociados a la enfermedad.

Típicamente, la vacuna peptídica o polipeptídica incluye péptido(s)/polipéptido(s) antigénico(s) opcionalmente mezclado a un adyuvante. Se puede citar a título ilustrativo el Newax E75 desarrollado por Galena y Genentech para el cáncer de mama.

En el contexto de la presente divulgación, se prefieren las vacunas basadas en vectores. El término "vector" como se utiliza en el presente documento se refiere a un vehículo, preferiblemente una molécula de ácido nucleico o una partícula vírica que contiene los elementos necesarios para permitir la liberación, propagación y/o expresión de moléculas biológicas dentro de una célula o sujeto huésped. A efectos de la presente divulgación, los vectores pueden ser de origen genético natural, sintético o artificial, o alguna combinación de elementos genéticos naturales y artificiales. Este término engloba los vectores extracromosómicos (por ejemplo, que permanecen en el citosol o el núcleo celular) y los vectores de integración (por ejemplo, diseñados para integrarse en el genoma celular), así como los vectores de clonación y expresión.

En un ejemplo de la presente divulgación, la vacuna terapéutica comprende un plásmido recombinante o un vector viral. Un "vector plasmídico", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una construcción de ADN replicable. Por lo general, los vectores plasmídicos contienen genes marcadores seleccionables que permiten seleccionar a favor o en contra de las células huésped portadoras del vector plasmídico en presencia de un fármaco selectivo correspondiente. Se conocen en la técnica diversos genes marcadores seleccionables positivos y negativos. A título ilustrativo, puede utilizarse un gen de resistencia a antibióticos como gen marcador seleccionable positivo que permita la selección de las células que contienen el plásmido en presencia del antibiótico correspondiente. Los vectores plasmídicos adecuados incluyen, entre otros, pREP4, pCEP4 (Invitrogene), pCI (Promega), pCDM8 (Seed, 1987, Nature 329: 840), pMT2PC (Kaufman et al., 1987, EMBO J. 6: 187-95), pVAX (Invitrogen) y pgWiz (Gene Therapy System Inc; Himoudi et al., 2002, J. Virol. 76: 12735-46).

El término "vector viral" o "virus" o "viriones" o "virus terapéutico", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un vector de ácido nucleico que incluye al menos un elemento del genoma de un virus que permite el empaquetamiento en una partícula viral. En el contexto de la presente invención, estos términos deben entenderse en sentido amplio, incluyendo el vector de ácido nucleico (por ejemplo, ADN vectorial), así como las partículas víricas generadas a partir del mismo, y especialmente las partículas víricas infecciosas. El término "infeccioso" se refiere a la capacidad de un vector vírico para infectar y penetrar en una célula o sujeto huésped.

Los vectores virales pueden ser aptos para la replicación o selectivos (por ejemplo, diseñados para replicarse mejor o de forma selectiva en células hospedadoras específicas), o pueden estar genéticamente inhabilitados para ser defectuosos en la replicación o tener problemas de replicación. Preferiblemente, la vacuna terapéutica incluida en la combinación aquí descrita es un vector vírico de replicación defectuosa o de replicación alterada, lo que significa que no puede replicarse de forma significativa en células normales, especialmente en células humanas normales. La alteración o deficiencia de las funciones de replicación puede evaluarse por medios convencionales, como la medición de la síntesis de ADN y/o del título viral en células no permisivas. El vector viral puede volverse defectuoso para la replicación mediante la supresión parcial o total o la inactivación de regiones críticas para la replicación viral. Estos vectores virales de replicación defectuosa o alterada suelen requerir, para su propagación, líneas celulares permisivas que aporten o complementen las funciones ausentes o alteradas.

Los vectores virales pueden diseñarse a partir de una variedad de virus y, en particular, del grupo de virus formado por adenovirus, virus asociados a adenovirus (AAV), poxvirus, virus del herpes, virus del sarampión, virus espumoso, alfavirus, virus de la estomatitis vesicular, virus de la enfermedad de Newcastle, virus picorna, virus Sindi, etc). Se pueden utilizar tanto cepas parentales como sus derivados (es decir, un virus modificado en comparación con una cepa parental de dicho virus, por ejemplo, por truncamiento, delección, sustitución y/o inserción de uno o más nucleótidos contiguos o no dentro del genoma viral). La(s) modificación(es) puede(n) estar dentro de genes virales endógenos (por ejemplo, secuencias codificantes y/o reguladoras) y/o dentro de regiones intergénicas. Además, la(s) modificación(es) puede(n) ser silenciosa(s) o no (por ejemplo, dando lugar a un producto génico viral modificado). La(s) modificación(es) puede(n) realizarse de diversas formas conocidas por los expertos en la materia mediante técnicas convencionales de biología molecular.

Preferiblemente, las modificaciones abarcadas por la presente divulgación afectan, por ejemplo, a la virulencia, toxicidad o patogenicidad del virus en comparación con un virus sin dicha modificación, pero no inhiben completamente la infección y la producción de nuevos virus al menos en células permisivas. Dicha(s) modificación(es) conduce(n) preferiblemente a la síntesis de una proteína defectuosa (o a la falta de síntesis) de modo que no pueda(n) garantizar

la actividad de la proteína producida en condiciones normales por el gen no modificado. En la bibliografía se dan a conocer modificaciones ejemplares, con una preferencia específica por las que alteran genes virales implicados en el metabolismo del ADN, la virulencia del huésped y la vía del IFN (véase, por ejemplo, Guse et al., 2011, Expert Opinion Biol. Ther.11(5):595-608). Otras modificaciones adecuadas incluyen la inserción de gen(es) exógeno(s) (por ejemplo, molécula(s) de ácido nucleico de interés) como se describe a continuación en el presente documento.

Un vector viral particularmente adecuado para ser incluido en la vacuna terapéutica utilizada en el presente documento se obtiene a partir de un poxvirus. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "poxvirus" se refiere a un virus perteneciente a la familia *Poxviridae* con preferencia por la subfamilia *Chordopoxvirinae* dirigida a hospedadores vertebrados que incluye varios géneros como *Orthopoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Leporipoxvirus* y *Suipoxvirus*. Se prefieren los *Orthopoxvirus* en el contexto de la presente divulgación, así como los *Avipoxvirus*, incluidos el Canarypoxvirus (por ejemplo, ALVAC) y el Fowlpoxvirus (por ejemplo, el vector FP9).

En un ejemplo preferente de la divulgación, la vacuna terapéutica comprende un vector poxviral perteneciente al género *Orthopoxvirus* y aún más preferiblemente a la especie del virus vaccinia (VV). Los virus vaccinia son virus grandes, complejos y envueltos, con un genoma de ADN lineal de doble cadena de aproximadamente 200kb de longitud que codifica numerosas enzimas y factores virales que permiten al virus replicarse independientemente de la maquinaria de la célula huésped. Existen dos partículas víricas infecciosas distintas: el IMV intracelular (virión maduro intracelular) rodeado de una envoltura lipídica única que permanece en el citosol de las células infectadas hasta la lisis y el EEV de doble envoltura (virión extracelular envuelto) que brota de la célula infectada. En el contexto de la presente divulgación puede utilizarse cualquier cepa de virus vaccinia, incluidas, sin limitación, las cepas Western Reserve (WR), Copenhagen (Cop), Lister, L1VP, Wyeth, Tashkent, Tian Tan, Brighton, Ankara, MVA (virus vaccinia modificado Ankara), LC16M8, LC16M0, etc. y cualquier derivado de las mismas. En la invención, la vacuna terapéutica comprende un MVA como se define en las reivindicaciones.

Los poxvirus de ingeniería pueden utilizarse con modificaciones destinadas a mejorar la seguridad (por ejemplo, mayor atenuación) y/o la eficacia (por ejemplo, mayor selectividad para las células cancerosas y/o menor toxicidad en las células sanas) del virus resultante. Se pueden citar más particularmente modificaciones defectuosas en la timidina quinasa (J2R; véase Weir y Moss, 1983, número de acceso Genbank AAA48082), la desoxiuridina trifosfatasa (F2L), la hemaglutinina viral (A56R); la subunidad pequeña (F4L) y/o la grande (I4L) de la ribonucleótido reductasa, el inhibidor de serina proteasa (B13R/B14R) y la proteína de unión al complemento 4b (C3L). Ejemplos representativos de VV adecuados para su uso en la presente divulgación incluyen NYVAC (US 5.494.807), así como VV con defecto de TK, TK y F2L (WO2009/065547) y TK y I4L (WO2009/065546). La nomenclatura genética utilizada en el presente documento es la de la cepa Vaccinia de Copenhagen. También se utiliza en el presente documento para los genes homólogos de otros poxvirus, a menos que se indique lo contrario. Sin embargo, la nomenclatura de los genes puede ser diferente según la cepa de viruela, pero la correspondencia entre Copenhagen y otras cepas de vaccinia suele estar disponible en la literatura.

Las secuencias del genoma de varios *Poxviridae*, están disponibles en el arte en bancos de datos especializados como Genbank. Por ejemplo, las cepas del virus vaccinia Western Reserve, Copenhagen, los genomas de Cowpoxvirus y Canarypoxvirus están disponibles en Genbank con los números de acceso NC_006998, M35027, NC_003663, NC_005309, respectivamente. Un vector vírico especialmente apropiado en el contexto de la presente invención es el MVA debido a su fenotipo altamente atenuado (Mayr et al., 1975, Infection 3: 6-14; Sutter y Moss, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 10847-51), una respuesta IFN-tipo 1 más pronunciada generada tras la infección en comparación con los vectores no atenuados y la disponibilidad de la secuencia de su genoma en la literatura (Antoine et al., 1998, Virol. 244: 365- 96) y en Genbank (con el número de acceso U94848).

Otros vectores virales apropiados en el contexto de la divulgación son morbillivirus que pueden obtenerse de la familia *paramyxoviridae*, con una preferencia específica por el virus del sarampión. Existen diversas cepas atenuadas (Brandler et al, 2008, CIMID, 31.X.2009): 271; Singh et al., 1999, J. Virol. 73(6): 4823), como y sin limitación, las cepas Edmonston A y B (Griffin et al., 2001, Field's in Virology, 1401-1441), la cepa Schwarz (Schwarz A, 1962, Am J Dis Child, 103: 216), las cepas S-191 o C-47 (Zhang et al., 2009, J Med Virol. 81 (8): 1477). También se puede utilizar el virus recombinante de la enfermedad de Newcastle (NDV) (Bukreyev y Collins, 2008, Curr Opin Mol Ther 10: 46-55) con una preferencia específica por una cepa atenuada de la misma como la MTH-68 que ya se utilizaba en pacientes con cáncer (Csatary et al., 1999, Anti Cancer Res 19: 635-8) y NDV-HUJ, que mostraron resultados prometedores en pacientes con glioblastoma (isracast.com 1 de marzo de 2006).

Otro vector viral adecuado para su utilización en la presente divulgación es un vector adenoviral. Puede derivarse de una variedad de adenovirus humanos o animales (por ejemplo, caninos, ovinos, simios, etc.) y puede emplearse cualquier serotipo. También puede ser un adenovirus quimérico (WO2005/001103). Un experto reconocerá que los elementos derivados de múltiples serotipos pueden combinarse en un único adenovirus.

De forma deseable, el vector adenoviral procede de un Ad humano, incluidos los de serotipos raros, o de un primate (por ejemplo, chimpancé, gorila). Ejemplos representativos de adenovirus humanos incluyen el subgénero C (por ejemplo, Ad2, Ad5 y Ad6), el subgénero B (por ejemplo, Ad3, Ad7, Ad1, Ad14, Ad34, Ad35 y Ad50), el subgénero D (por ejemplo, Ad19, Ad24, Ad26, Ad48 y Ad49) y el subgénero E (Ad4). Ejemplos representativos de Ad de chimpancé incluyen sin limitación AdCh3 (Peruzzi et al., 2009, Vaccine 27: 1293-300) y AdCh63 (Dudareva et al, 2009, Vaccine

27: 3501-4) y cualquiera de los descritos en la técnica (véanse, por ejemplo, WO2010/086189; WO2009/105084; WO2009/073104; WO2009/073103; WO2005/071093; y WO03/046124). En la actualidad, varios adenovirus están bien caracterizados genética y bioquímicamente (Hoffmann et al., 2007, Human Gene Ther. 18: 51-62). Una secuencia genómica ejemplar del adenovirus humano de tipo 5 (Ad5) se encuentra en GenBank Accession M73260 y en Chroboczek et al. (1992, Virol. 186: 280-5).

Preferiblemente, el adenovirus empleado en esta divulgación es de replicación defectuosa, por ejemplo, por delección total o parcial de la región EI. Una delección EI apropiada se extiende desde aproximadamente las posiciones 459 a 3510 por referencia a la secuencia del Ad5 divulgada en el GenBank bajo el número de acceso M 73260. Preferiblemente, el virus conserva un gen pIX viral funcional. El genoma adenoviral puede incluir modificaciones adicionales (por ejemplo, la supresión total o parcial de otras regiones esenciales E2 y/o E4, como se describe en W094/28152; Lusky et al, 1998, J. Virol 72.): 2022). Además, la región E3 no esencial también puede mutar o eliminarse.

Más preferiblemente, el adenovirus incluido en la vacuna terapéutica de la divulgación es un adenovirus humano del serotipo 5 (Ad5), defectuoso para la función EI y/o E3 y que comprende una molécula de ácido nucleico de interés insertada en la región EI.

La presente invención también abarca vectores o partículas víricas complejas con lípidos o polímeros (por ejemplo, polietilenglicol) para formar estructuras particuladas como liposomas, lipoplejos o nanopartículas, así como vectores o partículas víricas modificados para permitir la orientación preferente a una célula huésped específica. Un rasgo característico de los vectores dirigidos es la presencia en su superficie de un ligando capaz de reconocer y unirse a un componente celular y expuesto a la superficie. Ejemplos de ligandos adecuados incluyen anticuerpos o fragmentos de los mismos dirigidos a marcadores específicos de células, tejidos y patógenos. La marcación puede llevarse a cabo insertando genéticamente el ligando en un polipéptido presente en la superficie del virus (por ejemplo, en la fibra adenoviral o en el polipéptido expuesto al IMV pl4 poxviral, etc.) o modificando químicamente la envoltura de la superficie viral. Además, cuando se utiliza una vacuna terapéutica basada en un virus, dicho virus puede estar vivo, atenuado, inactivado o muerto.

Polipéptidos de interés

La vacuna terapéutica comprendida en el producto combinado de la presente divulgación contiene o codifica preferiblemente uno o más polipéptidos de interés terapéutico que pueden compensar síntomas patológicos, por ejemplo, actuando a través de efectos tóxicos para limitar o eliminar células nocivas del organismo, mejorando la inmunidad o invirtiendo mecanismos de agotamiento inmunitario. Dichos polipéptidos pueden estar codificados por genes nativos o genes obtenidos a partir de estos últimos tras modificación(es) adecuada(s) de la secuencia. El polipéptido de interés puede ser de origen mamífero (por ejemplo, humano) o no (por ejemplo, de origen bacteriano o vírico). En el contexto de la invención, la vacuna terapéutica comprende un MVA que codifica uno o más polipéptidos de interés terapéutico como se define en las reivindicaciones.

Ventajosamente, la vacuna terapéutica en uso en la presente divulgación comprende o codifica uno o más polipéptido(s) seleccionado(s) del grupo que consiste en productos génicos suicidas, polipéptidos inmunoestimuladores y polipéptidos antigénicos. Los polipéptidos antigénicos preferentes para su utilización en el presente documento son los antígenos asociados a tumores y los antígenos de organismos patógenos. Preferiblemente, el 5 polipéptido de interés no es un factor de transcripción oncogénico como p53.

Genes suicidas

El término "gen suicida" se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína (por ejemplo, una enzima) capaz de convertir un precursor de un fármaco en un compuesto citotóxico. Los genes suicidas apropiados para su utilización 10 en esta divulgación se describen en la tabla siguiente con el profármaco (o precursor de fármaco) correspondiente y el fármaco activo (citotóxico).

Tabla 1

Enzima	Profármaco	Fármaco activo
Timidina fosforilasa	5-FU	5-FdUMP
	5'-DFUR	5-FU
Quinasa de deoxicitidina	Gemcitabina	Monofosfato de
Deaminasa de Citidina	5'-DFCR	5'-DFUR
Deaminasa de citosina	5-FC	5-FU
Uracil fosforibosiltransferasa	5-FU	5-FUMP

Timidina fosforilasa	5-FU	5-FdUMP
Quinasa de Timidina(HSV)	Ganciclovir	Nucleótico de trifosfato Ganciclovir
Nitroreductasa	CB1954	5-(Aziridin-il)-4-hidroxi- amino-2-nitro-benzamida
Citocromo P450	Ifosfamida	Mostaza isofosforamida
	Ciclofosfamida	Mostaza fosforamida
Fosforilasa de nucleósido de purina	Fludarabina	2-Fluoroadenina
Fosfatasa alcalina	Fosfato de etopósido	Etopósido
	Mitomicina C fosfato	Mitomicina C
	M-(4-fonooxi- fenilacetil)doxorubicina	Doxorrubicina
Carboxipeptidasa	Metotrexato-aminoácidos	Metotrexato
Amidasa de Penicilina	/V-(fenilacetil) doxorubicina	Doxorrubicina
P-Lactamasa	C-DOX	Doxorrubicina

Deseablemente, la vacuna terapéutica de la divulgación comprende o codifica un polipéptido 15 que tiene al menos actividad de deaminasa de citosina (CDasa). La molécula de ácido nucleico que codifica la CDasa puede obtenerse de cualquier procariota y eucariota inferior como *Saccharomyces cerevisiae* (gen FCY1), *Candida Albicans* (gen FCA1) y *Escherichia coli* (gen codA).

Alternativamente o en combinación, la vacuna terapéutica de la divulgación comprende o codifica un polipéptido que tiene actividad uracilo fosforribosil transferasa (UPRTasa). La molécula de ácido nucleico que codifica la UPRTasa puede obtenerse de *E. coli* (Andersen et al., 1992, European J. Biochem. 204: 51-56), *Lactococcus lactis* (Martinussen et al., 1994, J. Bacteriol. 176: 6457-63), *Mycobacterium bovis* (Kim et al., 1997, Biochem. Mol. Biol. Internat. 41: 1117-24), *Bacillus subtilis* (Martinussen et al., 1995, J. Bacteriol. 177: 271-4) y levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae* FUR1 divulgado por Kern et al., 1990, Gene 88: 149-57).

La secuencia de nucleótidos de dichas moléculas de ácido nucleico que codifican CDasa y UPRTasa y los aminoácidos de la enzima codificada están disponibles en bancos de datos especializados (SWISSPROT EMBL, Genbank, Medline y similares). También pueden utilizarse análogos funcionales. Dichos análogos tienen preferiblemente una secuencia de aminoácidos con un grado de identidad de al menos el 70%, ventajosamente de al menos el 80%, preferiblemente de al menos el 90%, y más preferiblemente de al menos el 95% con el polipéptido nativo. Está al alcance del experto diseñar análogos a partir de los datos publicados y probar la actividad enzimática en un sistema acelular o celular según las técnicas convencionales (véase, por ejemplo, EP998568). Para propósitos ilustrativos, los análogos funcionales adecuados comprenden el mutante N-terminal truncado de FUR1 descrito en el documento EP998568 (con una delección de los 35 primeros residuos hasta el segundo residuo Met presente en la posición 36 en la proteína nativa) que presenta una actividad UPRTasa superior a la de la enzima nativa, así como las fusiones FCY1::FUR1 denominadas FCU1 (secuencia de aminoácidos representada en el identificador de secuencia SEQ. ID NO: 1 de WO2009/065546) y FCU1-8 descritos en WO96/16183, EP998568 y WO2005/07857.

Polipéptidos inmunoestimuladores

Como se utiliza en el presente documento, el término "polipéptido inmunoestimulador" se refiere a un polipéptido que tiene la capacidad de estimular el sistema inmunitario, de forma específica o no específica. Un gran número de proteínas son conocidas en la técnica por su capacidad para ejercer un efecto inmunoestimulante. Los ejemplos de proteínas inmunoestimuladoras adecuadas en el contexto de la divulgación incluyen, sin limitación, citocinas, con una preferencia específica por las interleucinas (por ejemplo IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-24), quimiocinas (por ejemplo, CXCL10, CXCL9, CXCL11), interferones (por ejemplo, IFN α , IFN β , IFN γ), factor de necrosis tumoral (TNF), factores estimulantes de colonias (por ejemplo, GM-CSF, C-CSF, M-CSF...), proteínas expuestas a APC (por Antigen Presenting Cell) (por ejemplo, B7.1, B7.2 y similares), factores de crecimiento (factor de crecimiento transformante TGF, factor de crecimiento de fibroblastos FGF, factores de crecimiento endotelial vascular VEGF y similares), antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o II, inductores o inhibidores de la apoptosis (por ejemplo, Bax, Bcl2, BclX...) e inmunotoxinas. Preferiblemente, la proteína inmunoestimulante es una interleucina o un factor estimulante de colonias (por ejemplo, GM-CSF).

Polipéptidos antigénicos

En una realización de la divulgación, la vacuna terapéutica contiene o codifica un antígeno relacionado con la enfermedad a tratar. El término "antigénico" se refiere a la capacidad de provocar o estimular una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una inmunidad celular y/o humoral). El antígeno estimula el sistema inmunitario del organismo para que reconozca el objetivo como extraño, de modo que el sistema inmunitario pueda reconocerla y destruirla más fácilmente

cuando se encuentre con ella más adelante. La presente invención abarca polipéptidos antigénicos nativos (presentes en/sobre organismos o células vivos o muertos), así como versiones modificadas de los mismos (análogos, fragmentos) y combinaciones de los mismos, tal como se describe en el presente documento.

En el contexto de la divulgación, los antígenos preferidos contenidos o codificados por la vacuna terapéutica son antígenos específicos del tumor o relacionados con el tumor (es decir, antígenos asociados al tumor), así como antígenos de organismos patógenos como virus, bacterias, parásitos y similares, así como alérgenos.

Los polipéptidos antigénicos virales incluyen, por ejemplo, antígenos de los virus de la hepatitis A, B, C, D y E, de los virus de la inmunodeficiencia (por ejemplo, HIV), virus del herpes, citomegalovirus, varicela zoster, virus del papiloma, virus de Epstein Barr, virus de la gripe, virus parainfluenza, adenovirus, virus coxsackie, virus picorna, rotavirus, virus sincitial respiratorio, virus de la viruela, rinovirus, virus de la rubéola, papovirus, virus de las paperas, virus del sarampión. Algunos ejemplos no limitantes de antígenos del HIV incluyen gp120 gp40, gp160, p24, gag, pol, env, vif, vpr, vpu, tat, rev, nef tat, nef. Algunos ejemplos no limitantes de antígenos de virus del herpes humano incluyen gH, gL, gM, gB, gC, gK, gE o gD o proteína Temprana Inmediata como ICP27, ICP47, ICP4, ICP36 de HSV1 o HSV2. Algunos ejemplos no limitantes de antígenos de citomegalovirus incluyen gB. Algunos ejemplos no limitantes de derivados del virus de Epstein Barr (EBV) incluyen la gp350. Algunos ejemplos no limitantes de antígenos del virus de la Varicela Zóster incluyen gp1, 11, 111 e IE63. Algunos ejemplos no limitantes de antígenos del virus de la hepatitis C incluyen la proteína env E1 o E2, la proteína del núcleo, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b, p7. Algunos ejemplos no limitantes de antígenos de virus del papiloma humano (HPV) incluyen L1, L2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7. Los antígenos derivados de otros patógenos víricos, como el virus respiratorio sincitial (por ejemplo, las proteínas F y G), el virus de la parainfluenza, el virus del sarampión, el virus de las paperas, los flavivirus (por ejemplo, el virus de la fiebre amarilla, el virus del dengue, el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, el virus de la encefalitis japonesa) y las células del virus de la gripe (por ejemplo, las proteínas HA, NP, NA o M) también pueden utilizarse de acuerdo con la presente divulgación.

Los polipéptidos antigénicos bacterianos incluyen, por ejemplo, antígenos de micobacterias causantes de tuberculosis y lepra, neumococos, bacilos gramnegativos aerobios, micoplasmas, estafilococos, estreptococos, salmonelas, clamidias, neisseriae y similares.

Los polipéptidos antigénicos parasitarios incluyen, por ejemplo, antígenos de la malaria, la leishmaniasis, la tripanosomiasis, la toxoplasmosis, la esquistosomiasis y la filariasis.

Los polipéptidos alérgenos se refieren a cualquier sustancia que pueda inducir una respuesta alérgica o asmática en un sujeto susceptible. Entre los alérgenos se encuentran el polen, los venenos de insectos, el polvo de caspa de animales, las esporas de hongos y los fármacos (por ejemplo, la penicilina).

Los polipéptidos antigénicos asociados a tumores (TAA) incluyen varias categorías de antígenos, por ejemplo, los que normalmente no se expresan (es decir no se expresan) en las células normales, los que sólo se expresan a niveles bajos o en determinadas fases de diferenciación y los que se expresan temporalmente, como los antígenos embrionarios y fetales, así como los resultantes de la mutación de genes celulares, como los oncogenes (por ejemplo, el oncogen Ras activado), los protooncogenes (por ejemplo, de la familia ErbB) o las proteínas resultantes de translocaciones cromosómicas. Dichos antígenos asociados a tumores también abarcan antígenos codificados por organismos patógenos que son capaces de inducir un estado maligno en un sujeto (especialmente un sujeto infectado crónicamente) como virus tumorales de ARN y ADN (por ejemplo, HPV, HCV, EBV, etc.) y bacterias (por ejemplo, *Helicobacter pylori*). Algunos ejemplos no limitantes de antígenos asociados a tumores incluyen, sin limitación, MART-1/Melan-A, gp100, Dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), proteína de unión a adenosina deaminasa (ADA), ciclofilina b, Antígeno asociado colorrectal (CRC)- C017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus epítomos inmunogénicos CAP-1 y CAP-2, etv6, aml1, antígeno prostático específico (PSA) y sus epítomos inmunogénicos PSA-1, PSA-2 y PSA-3, antígeno de membrana prostático específico (PSMA), receptor de células T/cadena CD3-zeta, antígenos tumorales de la familia MAGE (por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), GAGE-familia de antígenos tumorales (por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC (por ejemplo MUC1, MUC16, etc.; véase por ejemplo el documento US6.4.1). por ejemplo US6,054,438; WO98/04727; o WO98/37095), HER2/neu, p21ras, RCAS1, alfa-fetoproteína, E-cadherina, alfa-catenina, beta-catenina y gamma-catenina, p120ctn, gp100.sup.Pmel17, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína coli de la poliposis adenomatosa (APC), fodrina, conexina 37, Ig-idiotipo, p15, gp75, gangliósidos GM2 y GD2, familia Smad de antígenos tumorales glicógeno fosforilasa cerebral, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7, y c-erbB-2 y antígenos víricos como los antígenos E6 y E7 del HPV-16 y HPV-18 y el antígeno nuclear codificado por el EBV (EBNA)-I, así como marcadores (beta-galactosidasa, luciferasa....).

La presente divulgación también abarca la vacuna terapéutica que comprende/expresa dos o más polipéptidos de interés como los descritos anteriormente, por ejemplo, al menos dos antígenos, al menos un antígeno y un polipéptido inmunoestimulador, al menos dos antígenos y un polipéptido inmunoestimulador, etc.

Una vacuna terapéutica preferida comprendida en el producto de combinación de la divulgación comprende o codifica uno o más polipéptidos de interés seleccionados del grupo que consiste en:

- El antígeno MUC-1
- Antígenos E6 y E7 del HPV, en particular sus variantes no oncogénicas;
- 5 • La IL-2 humana
- El GM-CSF humano;
- El gen suicida FCU-1;
- antígenos del HBV, en particular pol del HBV, HBsAg y/o núcleo;
- 10 • antígenos de micobacterias (por ejemplo, MtB o M bovis), en particular uno o más seleccionados del grupo que consiste en RpfB, RpfD, Ag85A, Ag85B, ESAT6, CFP10, TB10.4, Rv0III, Rv0287, Rv0569, Rv1733, Rv1813, Rv2029, Rv2626, Rv3407, Rv3477, Rv3478, y
- Los antígenos NS del HCV (por ejemplo, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b).

La vacuna terapéutica comprendida en el producto de combinación para su utilización según la invención codifica uno o más polipéptidos de interés como se ha descrito anteriormente y como se define en las reivindicaciones.

- 15 La presente invención y divulgación abarcan la utilización/expresión de polipéptido(s) nativo(s) de interés, así como análogos de los mismos (por ejemplo, fragmentos de los mismos como péptidos; y modificados), especialmente cuando el polipéptido nativo ejerce propiedades no deseadas (por ejemplo, propiedades oncogénicas o transformadoras, citotoxicidad, etc.). Por ejemplo, para evitar la oncogenicidad de los polipéptidos E6 y E7 del HPV, se pueden utilizar o expresar análogos no oncogénicos que muestren una capacidad reducida para unirse a p53 y Rb,
- 20 respectivamente. Tales análogos no oncogénicos se describen, por ejemplo, en Munger et al. (1989, EMBO J. 8: 4099-105); Crook et al. (1991, Cell 67: 547-56); Heck et al. (1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 4442-6); Munger et al. (1991, J. Virol. 65: 3943-8); Phelps et al. (1992, J. Virol. 66, 2418- 27) y WO99/03885. Una variante HPV-16 E6 no oncogénica que es adecuada para los fines de la presente invención se suprime de uno o más residuos de aminoácidos situados desde aproximadamente la posición 118 hasta aproximadamente la posición 122 (+1 que representa el primer residuo de metionina del polipéptido HPV-16 E6 nativo), con una preferencia especial por la supresión completa de los residuos 118 a 122 (CPEEK). Una variante no oncogénica de HPV-16 E7 que es adecuada para el propósito de la presente invención se suprime de uno o más residuos de aminoácidos situados desde aproximadamente la posición 21 hasta aproximadamente la posición 26 (+1 que representa el primer aminoácido del polipéptido nativo HPV-16 E7, con una preferencia especial por la supresión completa de los residuos 21 a 26 (DLYCYE). En una realización, podría ser ventajoso modificar o incluir características adicionales al polipéptido de interés para mejorar su actividad inmunogénica y/o terapéutica. Por ejemplo, puede ser útil asociarse (por ejemplo, por mezcla, fusión o expresión independiente) en una misma vacuna terapéutica (en particular, una vacuna terapéutica basada en vectores):

- Una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno (por ejemplo, un TAA, o un antígeno de un organismo patógeno como se ha descrito anteriormente), y
- 35 • Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido inmunoestimulador como una citoquina o una interleucina (por ejemplo, IL-2; factor de necrosis tumoral (TNF); interferón (IFN); factor estimulante de colonias (CSF), o factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

- También se puede utilizar o expresar con el polipéptido de interés uno o más péptidos o polipéptidos capaces de aumentar la inmunogenicidad. Tales péptidos o polipéptidos se han descrito en la literatura e incluyen, sin limitación,
- 40 la calreticulina (Cheng et al., 2001, J. Clin. Invest. 108: 669-78), la proteína de choque térmico 70 (HSP70) de Mycobacterium tuberculosis (Chen et al., 2000, Cancer Res. 60: 1035-42), ubiquitina (Rodríguez et al., 1997, J. Virol. 71: 8497-503), toxina bacteriana como el dominio de translocación de la exotoxina A de Pseudomonas aeruginosa (ETA(dIII)) (Hung et al., 2001 Cancer Res. 61: 3698-703) así como el epítipo T_H Pan-Dr (Sidney et al., 1994, Immunity 1: 751), el epítipo GCG de pstSI (Vordermeier et al., 1992, Eur. J. Immunol. 22: 2631), toxoide tetánico P2TT (Panina-Bordignon et al., 1989, Eur. J. Immunol. 19: 2237) y P30TT (Demotz et al., 1993, Eur. J. Immunol. 23: 425) péptidos, y
- 45 epítipo de la gripe (Lamb et al., 1982, Nature 300: 66 ; Rothbard et al., 1989, Int. Immunol. 1: 479).

- Otras características estructurales adecuadas son las que son beneficiosas para la síntesis, el procesamiento, la estabilidad y la solubilidad del polipéptido de interés que se utiliza en la vacuna terapéutica de la invención o divulgación, o se expresa mediante ella; por ejemplo, las destinadas a modificar los sitios potenciales de escisión, los
- 50 sitios potenciales de glicosilación y/o el anclaje de membrana para mejorar la presentación MHC de clase I y/o MHC de clase II. La presentación en membrana puede lograrse incorporando al polipéptido de interés una secuencia de anclaje a membrana y una secuencia secretora (es decir, un péptido señal) si el polipéptido nativo carece de ella. Brevemente, los péptidos señal suelen comprender entre 15 a 35 aminoácidos esencialmente hidrófobos que son eliminados por una endopeptidasa específica localizada en el ER (retículo endoplásmico) para dar lugar al polipéptido

maduro. Los péptidos transmembrana también son altamente hidrófobos por naturaleza y sirven para anclar los polipéptidos dentro de la membrana celular. La elección de los péptidos transmembrana y/o señal que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención o divulgación es muy amplia. Pueden obtenerse a partir de polipéptidos celulares o virales, como los de las inmunoglobulinas, el activador tisular del plasminógeno, la insulina, la glicoproteína de la rabia, la glicoproteína de la envoltura del virus HIV o la proteína F del virus del sarampión o pueden ser sintéticos. Preferiblemente, la secuencia secretora se inserta en el N-terminal del polipéptido corriente abajo del codón de iniciación de la traducción y la secuencia de anclaje de membrana en el C-terminal, preferiblemente inmediatamente aguas arriba del codón de parada.

Vector recombinante

Preferiblemente, en la presente divulgación, la vacuna terapéutica comprende un vector recombinante diseñado para expresar al menos una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés como se describe en el presente documento. Puede generarse fácilmente de varias formas conocidas por los expertos en la materia (por ejemplo, clonación, amplificación por PCR, mezcla de ADN). Por ejemplo, dicha molécula de ácido nucleico puede aislarse independientemente de cualquier fuente disponible (por ejemplo, materiales biológicos descritos en la técnica, bibliotecas de ADNc y genómicas, genomas virales o cualquier vector de la técnica anterior que se sepa que lo incluye) utilizando los datos de secuencia disponibles para el experto y la información de secuencia proporcionada en el presente documento, y luego clonarse adecuadamente mediante técnicas convencionales de biología molecular. Alternativamente, también pueden generarse por síntesis química en proceso automatizado (por ejemplo, ensamblados a partir de oligonucleótidos sintéticos superpuestos o gen sintético). Preferiblemente, dicha molécula de ácido nucleico de interés se obtiene a partir de ADNc y no comprende secuencias intrónicas. La(s) modificación(es) puede(n) generarse de diversas formas conocidas por los expertos en la materia, como la síntesis química, la mutagénesis dirigida al lugar, la mutagénesis por PCR, etc.

Además, la molécula de ácido nucleico puede optimizarse para proporcionar una expresión de alto nivel en una célula huésped o sujeto concreto. De hecho, se ha observado que los patrones de uso de codones de los organismos son muy poco aleatorios y el uso de codones puede ser muy diferente entre distintos huéspedes. Como el gen terapéutico puede ser de origen procariota (por ejemplo, antígeno bacteriano o vírico) o eucariota inferior (por ejemplo, el gen suicida), puede tener un patrón de utilización de codones inadecuado para una expresión eficiente en células eucariotas superiores (por ejemplo, humanas). Típicamente, la optimización del codón se realiza sustituyendo uno o más codones "nativos" correspondientes a un codón utilizado con poca frecuencia por uno o más codones que codifican el mismo aminoácido que se utiliza con más frecuencia en el sujeto a tratar. No es necesario sustituir todos los codones nativos correspondientes a codones de uso infrecuente, ya que se puede lograr una mayor expresión incluso con una sustitución parcial.

Además de la optimización de la utilización de codones, la expresión también puede mejorarse mediante modificaciones adicionales de la secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede modificarse para evitar la agrupación de codones raros y no óptimos presentes en áreas concentradas y/o para suprimir o modificar elementos de secuencia "negativos" que se espera que influyan negativamente en los niveles de expresión. Tales elementos de secuencia negativos incluyen, sin limitación, las regiones que tienen un contenido de GC muy alto (>80%) o muy bajo (<30%); tramos de secuencia ricos en AT o ricos en GC; secuencias de repetición directa o invertida inestables; estructuras secundarias R A; y/o elementos reguladores crípticos internos como cajas TATA internas, sitios chi, sitios de entrada de ribosomas, y/o sitios donantes/aceptores de empalme.

Además, cuando se van a expresar moléculas de ácido nucleico homólogas, dichas secuencias homólogas pueden degenerarse sobre la molécula de ácido nucleico de longitud completa o porción(es) de la misma para reducir la homología de secuencia. De hecho, es aconsejable degenerar las porciones de secuencias de ácido nucleico que muestran un alto grado de identidad de secuencia (por ejemplo, el mismo antígeno obtenido a partir de varios serotipos de un virus dado, como los antígenos E6 y/o E7 del HPV-16 y HPV-18; antígenos solapados, como los antígenos del HBV) para evitar problemas de recombinación homóloga durante el proceso de producción, y la persona experta es capaz de identificar dichas porciones mediante alineación de secuencias.

La molécula o moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido o polipéptidos de interés pueden insertarse en el vector, por ejemplo, dentro de un gen viral, una región intergénica, en un gen o región no esencial o en lugar de secuencias virales. Las condiciones generales para construir y producir poxvirus recombinantes son bien conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, WO2010/130753; WO03/008533; US 6,998,252; US 5,972,597 y US 6,440,422). La molécula o moléculas de ácido nucleico de interés se insertan preferiblemente dentro del genoma poxviral en un locus no esencial. El gen de la timidina quinasa es especialmente apropiado para su inserción en los vectores de vaccinia de Copenhague y la delección II o III para su inserción en el vector MVA (WO97/02355; Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol. 72: 1031-8). Las condiciones generales para construir y producir virus del sarampión recombinantes son bien conocidas en la técnica. La inserción de la molécula o moléculas de ácido nucleico de interés entre los genes P y M o entre los genes H y L es particularmente apropiada. Las condiciones generales para construir y producir adenovirus recombinantes son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Chartier et al., 1996, J. Virol. 70: 4805-10 y WO96/17070). La región EI o E3 es el sitio preferido de inserción de la molécula o moléculas de ácido nucleico a expresar, que puede posicionarse en orientación sentido o antisentido con respecto a la dirección transcripcional natural de la región en cuestión.

En la invención, la vacuna terapéutica comprende un MVA seleccionado del grupo que consiste en:

- Un virus MVA que codifica el TAA MUC-1 y la IL-2 humana;
- Un virus MVA que codifica una fusión de los antígenos NS3 y NS4 del HCV y el antígeno NS5b;
- Un virus MVA que codifica antígenos E6 y E7 no oncogénicos del HPV-16 anclados a la membrana e IL-2 humana;
- Un virus MVA que codifica el gen FCU1); y
- Un virus MVA que codifica una combinación de antígenos de la TB.

En una realización particularmente preferente, la vacuna terapéutica se selecciona del grupo que consiste en:

- Un virus MVA que codifica el TAA MUC-1 y la IL-2 humana representada por el TG4010 descrito en WO92/07000, US 5.861.381 y Limacher y Quiox (2012, OncoImmunology 1(5): 791-2);
- Un virus MVA que codifica una fusión de los antígenos NS3 y NS4 del HCV y el antígeno NS5b (representado por el TG4040 descrito en el documento WO2004/111082);
- Un virus MVA que codifica los antígenos no oncogénicos E6 y E7 del HPV-16 anclados a la membrana y la IL-2 humana representada por el TG4001 descrito en el documento WO99/03885;
- Un virus MVA que codifica el gen FCU1 representado por TG4023 (WO99/54481); y
- Un virus MVA que codifica una combinación de antígenos de la tuberculosis (como se describe en el documento WO2014/009438).

Expresión de la molécula o moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido o polipéptidos de interés.

De acuerdo con la presente invención, la(s) molécula(s) de ácido nucleico expresada(s) por la vacuna terapéutica para su utilización en la invención está(n) operablemente unida(s) a elementos reguladores adecuados para su expresión en una célula huésped o sujeto deseado.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "elementos reguladores" o "secuencia reguladora" se refiere a cualquier elemento que permita, contribuya o module la expresión de la molécula o moléculas de ácido nucleico en una célula huésped o sujeto determinado, incluyendo la replicación, duplicación, transcripción, empalme, traducción, estabilidad y/o transporte del ácido o ácidos nucleicos o sus derivados (es decir, mARN). Tal y como se utiliza en el presente documento, "enlazados de forma operativa" significa que los elementos enlazados están dispuestos de forma que funcionan conjuntamente para los fines previstos. Por ejemplo, un promotor está operativamente ligado a una molécula de ácido nucleico si el promotor efectúa la transcripción desde el inicio de la transcripción hasta el terminador de dicha molécula de ácido nucleico en una célula huésped permisiva.

Los expertos en la materia apreciarán que la elección de las secuencias reguladoras puede depender de factores como la propia molécula o moléculas de ácido nucleico, el vector a partir del cual se expresan, el nivel de expresión deseado, etc. El promotor reviste especial importancia. En el contexto de la invención, puede ser constitutiva dirigir la expresión de la molécula o moléculas de ácido nucleico en muchos tipos de células o específicos de ciertos tipos de células o tejidos o regulados en respuesta a eventos específicos o factores exógenos (por ejemplo, por temperatura, aditivo nutritivo, hormona, etc.) o según la fase de un ciclo viral (por ejemplo, tardía o temprana). También se pueden utilizar promotores que se repriman durante la fase de producción en respuesta a eventos específicos o factores exógenos, con el fin de optimizar la producción de la vacuna terapéutica y evitar la toxicidad potencial del polipéptido o polipéptidos expresados.

Los promotores constitutivos adecuados para la expresión en adenovirus recombinantes y vectores plasmídicos incluyen, entre otros, el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) (US 5.168.062), el promotor del RSV, el promotor tardío principal del adenovirus, el promotor de la fosfogliceroquinasa (PGK) (Adra et al., 1987, Gene 60: 65-74), el promotor de la timidina quinasa (TK) del virus del herpes simple (HSV)-I y el promotor de la polimerasa T7 (WO98/10088). Los promotores del virus vaccinia están especialmente adaptados para la expresión en poxvirus recombinantes. Ejemplos representativos incluyen, sin limitación, la vaccinia 7.5K, H5R, 11K7.5 (Erbs et al., 2008, Cancer Gene Ther. 15(1): 18-28), TK, pB2R, p28, p11 y K1L, así como promotores sintéticos como los descritos en Chakrabarti et al. (1997, Biotechniques 23:1094-7; Hammond et al., 1997, J. Virol Methods 66: 135-8; y Kumar y Boyle, 1990, Virology 179: 151-8), así como promotores quiméricos tempranos/tardíos. Los promotores adecuados para los virus del sarampión incluyen, sin limitación, cualquier promotor que dirija la expresión de las unidades de transcripción del sarampión (Brandler y Tangy, 2008, CIMID 31: 271).

Los expertos en la materia apreciarán que los elementos reguladores que controlan la expresión de la molécula o moléculas de ácido nucleico de interés pueden comprender además elementos adicionales para la iniciación,

regulación y/o terminación adecuadas de la transcripción (por ejemplo, secuencias de terminación de la transcripción poliA), el transporte de ARNm (por ejemplo, secuencias de señal de localización nuclear), el procesamiento (por ejemplo, señales de empalme) y la estabilidad (por ejemplo, intrones y secuencias 5' y 3' no codificantes). por ejemplo, secuencias señal de localización nuclear), procesamiento (por ejemplo, señales de empalme) y estabilidad (por ejemplo, intrones y secuencias no codificantes 5' y 3'), traducción (por ejemplo, un Met iniciador, secuencias líder tripartitas, sitios de unión a ribosomas IRES, péptidos señal, etc.) y etapas de purificación (por ejemplo, una etiqueta). En una realización preferida, la vacuna terapéutica para utilización en la invención comprende un vector MVA que contiene insertado en su genoma (preferiblemente en delección II) una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a tumor como MUC-1 (preferiblemente bajo el control transcripcional del promotor temprano/tardío de vaccinia pH5R) y una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido inmunoestimulador como la IL-2 humana (preferiblemente bajo el control transcripcional del promotor temprano/tardío de vaccinia p7.5). Más preferiblemente, el antígeno MUC1 codificado comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica a SEQ ID NO: 1. Aún más preferiblemente, el antígeno MUC1 está codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80% idéntica a SEQ ID NO: 2.

Producción de una vacuna terapéutica a base de virus

Preferiblemente, la vacuna terapéutica presente en el producto combinado de la presente divulgación es un vector viral. Normalmente, los vectores virales se producen en una línea celular huésped adecuada mediante técnicas convencionales que incluyen a) preparar una célula huésped productora (por ejemplo, permisiva), b) transfectar o infectar las células huésped productoras preparadas, c) cultivar la célula huésped transfectada o infectada en condiciones adecuadas para permitir la producción del vector (por ejemplo, partículas virales infecciosas), d) recuperar el vector producido a partir del cultivo de dicha célula y, opcionalmente, e) purificar dicho vector recuperado.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "célula huésped" debe entenderse en sentido amplio, sin ninguna limitación relativa a la organización particular en tejidos, órganos o células aisladas. Dichas células pueden ser de un único tipo o un grupo de diferentes tipos, como líneas celulares cultivadas, células primarias y células en división. El término "células huésped" incluye células procariotas, células eucariotas inferiores como la levadura, y otras células eucariotas como células de insecto, células vegetales y de mamífero (por ejemplo, humanas o no humanas), así como células productoras capaces de producir la vacuna terapéutica basada en plásmidos o virus y/o el modulador o moduladores de puntos de control inmunitario para su uso en la invención. Este término también incluye las células que pueden ser o han sido receptoras del producto de combinación descrito en el presente documento, así como la progenie de dichas células.

En el paso a), las células productoras adecuadas dependen del tipo de vector viral que se vaya a amplificar. Los adenovirus recombinantes con replicación defectuosa suelen propagarse y producirse en una célula que suministra en trans la(s) proteína(s) adenoviral(es) codificada(s) por aquellos genes que han sido suprimidos o inactivados en el adenovirus con replicación defectuosa, permitiendo así que el virus se replique en la célula. Entre las líneas celulares adecuadas para complementar los adenovirus suprimidos por E1 se encuentran las células HEK-293 (Graham et al., 1997, J. Gen. Virol. 36: 59-72), así como las células HER-96 y PER-C6 (por ejemplo, Fallaux et al., 1998, Human Gene Ther. 9: 1909-1917; WO97/00326) y E1 A549 (Imler et al., 1996, Gene Ther. 3: 75- 84) o cualquier derivado de estas líneas celulares. Pero también puede utilizarse cualquier otra línea celular descrita en la técnica, especialmente las líneas celulares aprobadas para producir productos de uso humano. Las partículas adenovirales infecciosas pueden recuperarse del sobrenadante del cultivo y/o de las células tras la lisis. Pueden purificarse aún más según técnicas estándar (ultracentrifugación en un gradiente de cloruro de cesio, cromatografía, etc., como se describe, por ejemplo, en los documentos WO96/27677, WO98/00524, WO98/22588, WO98/26048, WO00/40702, EP1016711 y WO00/50573).

El MVA está estrictamente restringido al hospedador y se amplifica típicamente en células aviares, ya sean células aviares primarias (como fibroblastos de embrión de pollo (CEF) preparados a partir de embriones de pollo obtenidos de huevos fecundados) o líneas celulares aviares immortalizadas, y en particular una línea celular de Cairina moschata immortalizada con un gen TERT de pato (véanse, por ejemplo WO2010/130756 y WO2012/001075); una línea celular aviar producida según el proceso descrito en WO2007/077256 o WO2009/004016; una línea celular aviar immortalizada con una combinación de genes virales y/o celulares (véase, por ejemplo, WO2005/042728); una célula immortalizada espontáneamente (por ejemplo la línea celular DF1 de pollo divulgada en US5.879.924); o células immortalizadas que derivan de células embrionarias por separación progresiva de factores de crecimiento y capa alimentadora (por ejemplo las líneas celulares Ebx de pollo divulgadas en WO2005/007840 y WO2008/129058).

Para otras cepas de virus vaccinia u otros poxvirus, además de células primarias aviares (como CEF) y líneas celulares aviares, se dispone de muchas otras líneas celulares no aviares para su producción, incluidas líneas celulares humanas como HeLa (ATCC-CRM-CCL-2™ o ATCC-CCL-2.2™), MRC-5, HEK-293; líneas celulares de hámster como BHK-21 (ATCC CCL-10), y células Vero. En una realización preferida de la divulgación, el virus vaccinia distinto del MVA se amplifica en células HeLa (véase, por ejemplo, WO2010/130753).

Las células productoras se cultivan preferiblemente en un medio libre de productos de origen animal o humano, utilizando un medio químicamente definido sin productos de origen animal o humano. En particular, aunque los factores de crecimiento pueden estar presentes, son preferiblemente producidos recombinantemente y no purificados a partir

de material animal. Los expertos en la materia pueden seleccionar fácilmente un medio apropiado sin animales en función de las células productoras seleccionadas. Estos medios están disponibles en el mercado. En particular, cuando las CEF se utilizan como células productoras, pueden cultivarse en medio de cultivo celular VP-SFM (Invitrogen). Las células productoras se cultivan preferiblemente a una temperatura comprendida entre +30°C y +38°C (más preferiblemente a unos +37°C) durante entre 1 y 8 días (preferiblemente de 1 a 5 días para las CEF y de 2 a 7 días para las células inmortalizadas) antes de la infección. En caso necesario, pueden realizarse varios pases de 1 a 8 días para aumentar el número total de células.

En el paso b), las células productoras son infectadas por el vector viral en condiciones apropiadas (en particular, utilizando una multiplicidad de infección (MOI) apropiada para permitir la infección productiva de las células productoras. En particular, cuando la vacuna terapéutica se basa en MVA y se amplifica utilizando CEF, puede sembrarse en el recipiente de cultivo celular que contiene CEF a una MOI que, preferiblemente, está comprendida entre 0,001 y 0,1 (más preferiblemente alrededor de 0,05). El paso de infección también se realiza preferiblemente en un medio (que puede ser el mismo o diferente del medio utilizado para el cultivo de las células productoras) libre de productos de origen animal o humano, utilizando un medio químicamente definido sin productos de origen animal o humano.

En el paso c), las células productoras infectadas se cultivan en condiciones apropiadas bien conocidas por los expertos en la materia hasta que se produce la progenie del vector viral (por ejemplo, partículas virales infecciosas). El cultivo de células productoras infectadas también se realiza preferiblemente en un medio (que puede ser el mismo o diferente del medio utilizado para el cultivo de células productoras y/o para el paso de infección) libre de productos de origen animal o humano (utilizando un medio químicamente definido sin productos de origen animal o humano) a una temperatura entre +30°C y +37°C, durante 1 a 5 días.

En el paso d), el vector viral producido en el paso c) se recoge del sobrenadante del cultivo y/o de las células productoras. La recuperación de las células productoras (y opcionalmente también del sobrenadante del cultivo), puede requerir un paso que permita la disrupción de la membrana de la célula productora para permitir la liberación del vector de las células productoras. La disrupción de la membrana de la célula productora puede inducirse mediante diversas técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica, entre las que se incluyen: congelación/descongelación, lisis hipotónica, sonicación, microfluidización, u homogeneización a alta velocidad.

A continuación, los vectores virales pueden purificarse aún más, utilizando pasos de purificación bien conocidos en la técnica. Se pueden prever varias etapas de purificación, como la clarificación, el tratamiento enzimático (por ejemplo, con endonucleasas, proteasas, etc.), los pasos cromatográficos y de filtración. En la técnica se describen métodos adecuados (por ejemplo, WO2007/147528; WO2008/138533, WO2009/100521, WO2010/130753, WO2013/022764).

Modulador(es) del punto de control inmunitario

En la literatura se describen puntos de control inmunitarios y moduladores de los mismos, así como métodos de utilización de dichos compuestos. Las proteínas del "punto de control inmunitario" participan directa o indirectamente en una vía inmunitaria que, en condiciones fisiológicas normales, es crucial para evitar reacciones inmunitarias incontroladas y, por tanto, para el mantenimiento de la autotolerancia y/o la protección de los tejidos. Pero en condiciones patológicas, desempeñan un papel fundamental en el agotamiento de las células T.

El modulador o moduladores de puntos de control inmunitarios utilizados en la divulgación pueden actuar independientemente en cualquier paso de la inmunidad mediada por células T, incluida la selección clonal de células específicas de antígeno, la activación de células T, la proliferación, el tráfico a sitios de antígeno e inflamación, la ejecución de la función efectora directa y la señalización a través de citocinas y ligandos de membrana. Cada uno de estos pasos está regulado por señales estimuladoras e inhibidoras que contrarrestan y afinan la respuesta. En el contexto de la presente divulgación, el término engloba (i) modulador(es) de punto de control inmunitario capaz(es) de regular hacia abajo, al menos parcialmente, la función de un punto de control inmunitario inhibidor (por ejemplo, mediante la unión directa o la inhibición de la unión de un ligando a dicho punto de control inmunitario) para ejercer una función antagonista y, de este modo, antagonizar una señal inhibitoria mediada por un punto de control inmunitario, así como (ii) moduladores de puntos de control inmunitarios capaces de regular hacia arriba, al menos parcialmente, la función de un punto de control inmunitario estimulador para ejercer una función agonista y, de este modo, amplificar una señal estimuladora mediada por un punto de control inmunitario.

El modulador o moduladores de puntos de control inmunitarios en utilización en la divulgación pueden ser independientemente un polipéptido o una molécula de ácido nucleico; con una preferencia específica por ligandos peptídicos, dominios solubles de receptores naturales, ARNi, moléculas antisentido, anticuerpos y andamiajes proteicos.

En la invención, el modulador del punto de control inmunitario es un anticuerpo como se define en las reivindicaciones. En el contexto de la invención, "anticuerpo" ("Ab") se utiliza en el sentido más amplio y abarca los anticuerpos naturales y los creados por el hombre, así como los anticuerpos de longitud completa o los fragmentos funcionales o análogos de los mismos que son capaces de unirse al punto de control inmunitario o epítipo objetivo (conservando así la porción de unión al objetivo). El anticuerpo utilizado en la invención puede ser de cualquier origen, por ejemplo, humano,

humanizado, animal (por ejemplo, anticuerpo de roedor o camélido) o quimérico. Puede ser de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, etc.). Además, puede estar glicosilada o no glicosilada. El término anticuerpo también incluye anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos siempre que presenten la especificidad de unión descrita en el presente documento.

5 A efectos ilustrativos, los anticuerpos de longitud completa son glicoproteínas que comprenden al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada que se compone de tres dominios CHI, CH2 y CH3 (opcionalmente con una bisagra entre CHI y CH2). Cada cadena ligera se compone de una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera que comprende un dominio CL. Las regiones VH y VL comprenden regiones hipervariables, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), e intercaladas con regiones más conservadas denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR en el siguiente orden: FR1- CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Las regiones CDR de las cadenas pesada y ligera son determinantes para la especificidad de unión.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo no humano (por ejemplo, murino, de camello, de rata, etc.) cuya secuencia proteica se ha modificado para aumentar su similitud con un anticuerpo humano (es decir, producido naturalmente en humanos). El proceso de humanización es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Pestra et al., 1997, Cancer Res. 57(20): 4593-9; US 5.225.539; US 5.530.101; US 6.180.370; WO2012/110360). Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal desarrollado para uso humano puede humanizarse sustituyendo uno o más residuos de las regiones FR para que se parezca a la secuencia de inmunoglobulina humana, mientras que la gran mayoría de los residuos de las regiones variables (especialmente las CDR) no se modifican y corresponden a los de una inmunoglobulina no humana. Como orientación general, el número de estas sustituciones de aminoácidos en las regiones FR no suele ser superior a 20 en cada región variable VH o VL.

20 Como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende uno o más elemento(s) de una especie y uno o más elemento(s) de otra especie, por ejemplo, un anticuerpo no humano que comprende al menos una porción de una región constante (Fc) de una inmunoglobulina humana.

25 Los fragmentos de anticuerpos pueden diseñarse para su uso en la combinación según la invención o la divulgación. Ejemplos representativos incluyen sin limitación Fab, Fab', F(ab')₂, dAb, Fd, Fv, scFv, di-scFv, diacuerpo y cualquier otro anticuerpo artificial. Más concretamente:

- 30 (i) un fragmento Fab está representado por un fragmento monovalente formado por los dominios VL, VH, CL y CHI;
- (ii) un fragmento F(ab')₂ está representado por un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por al menos un puente disulfuro en la región bisagra;
- (iii) un fragmento Fd está formado por los dominios VH y CHI;
- (iv) un fragmento Fv está formado por los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo,
- 35 (v) un fragmento dAb consiste en un único fragmento de dominio variable (dominio VH o VL);
- (vi) un Fv de cadena única (scFv) comprende los dos dominios de un fragmento Fv, VL y VH, que se fusionan entre sí, opcionalmente con un enlazador para formar una única cadena proteica (véase, por ejemplo, Bird et al., 1988, Science 242: 423-6; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83; US 4.946.778; US 5.258.498); y
- 40 (vii) cualquier otro anticuerpo artificial.

Los métodos para preparar anticuerpos, fragmentos y análogos de los mismos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988, Antibodies - A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY). En una realización, dicho anticuerpo puede generarse en un animal huésped con el modulador del punto de control inmunitario dirigido. Alternativamente, puede producirse a partir de hibridomas (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, 1975, Nature 256: 495-7; Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-30; Cole et al. en Monoclonal antibodies and Cancer Therapy; Alan Liss pp77-96), técnicas recombinantes (por ejemplo, utilizando métodos de visualización de fagos), síntesis de péptidos y escisión enzimática. Los fragmentos de anticuerpos pueden producirse mediante la técnica recombinante descrita en el presente documento. También pueden producirse por escisión proteolítica con enzimas como la papaína para producir fragmentos Fab o la pepsina para producir fragmentos F(ab')₂, tal como se describe en la bibliografía (véase, por ejemplo, Wahl et al., 1983, J. Nucl. Med. 24: 316-25). Los análogos (o fragmentos de los mismos) pueden generarse mediante métodos convencionales de biología molecular (PCR, técnicas de mutagénesis). En caso necesario, la funcionalidad de estos fragmentos y análogos puede evaluarse del mismo modo que la de los anticuerpos intactos (por ejemplo, mediante un ensayo ELISA estándar).

55 En una realización preferida, al menos uno de los uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios para su utilización en la presente invención es un anticuerpo monoclonal, con una preferencia específica por un anticuerpo

humano (en el que ambas regiones marco se derivan de secuencias de inmunoglobina de línea germinal humana) o un anticuerpo humanizado según un proceso de humanización bien conocido.

De forma deseable, el modulador o moduladores de puntos de control inmunitarios utilizados en la presente divulgación antagonizan al menos parcialmente (por ejemplo más del 50%) la actividad de punto(s) de control inmunitario inhibitorio(s), en particular los mediados por cualquiera de los siguientes PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, Tim3, BTLA, SLAM, 2B4, CD160, KLRG-1 y CTLA4, con una preferencia específica por un anticuerpo monoclonal humano o humanizado que se une específicamente a cualquiera de dichas proteínas objetivo. El término "se une específicamente a" se refiere a la capacidad de una especificidad y afinidad de unión para un objetivo o epítipo particular incluso en presencia de una población heterogénea de otras proteínas y biología. Así, en las condiciones de ensayo designadas, el anticuerpo se une preferencialmente a su objetivo y no se une en una cantidad significativa a otros componentes presentes en una muestra de ensayo o en un sujeto. Preferiblemente, dicho anticuerpo muestra una unión de alta afinidad a su objetivo con una constante de disociación de equilibrio igual o inferior a 1×10^{-6} M (por ejemplo, al menos $0,5 \times 10^{-6}$, 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} , 1×10^{-10} , etc). Alternativamente, el modulador o moduladores de puntos de control inmunitarios utilizados en la presente divulgación ejercen una función agonista en el sentido de que son capaces de estimular o reforzar señales estimuladoras, en particular las mediadas por CD28 con una preferencia específica por cualquiera de los puntos de control inmunitarios ICOS, CD137 (4-1BB), OX40, CD27, CD40 y GITR. Los ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos a los puntos de control inmunitarios son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ELISA, inmunotransferencias de Western, RIA y citometría de flujo. La cinética de unión (por ejemplo, la afinidad de unión) de los anticuerpos también puede evaluarse mediante ensayos estándar conocidos en la técnica, como el análisis Biacore.

En la invención, al menos uno de los uno o más moduladores del punto de control para su uso en esta invención es un anticuerpo capaz de antagonizar al menos parcialmente la proteína Muerte Programada 1 (PD-1), y que se une específicamente a PD-1 humana. PD-1 forma parte de la superfamilia de genes de inmunoglobulina (Ig) y es miembro de la familia CD28. Se trata de una proteína transmembrana de tipo 1 de 55 kDa que se expresa en células experimentadas con antígenos (por ejemplo, células B activadas, células T y células mieloides) (Agata et al., 1996, Int. Immunol. 8: 765-72; Okazaki et al., 2002, Curr. Opin. Immunol. 14: 391779-82; Bennett et al., 2003, J. Immunol 170: 711-8). En un contexto normal, actúa limitando la actividad de las células T en el momento de la respuesta inflamatoria, protegiendo así los tejidos normales de la destrucción (Topalian, 2012, Curr. Opin. Immunol. 24: 207-12). Se han identificado dos ligandos para PD-1, PD-L1 (ligando de muerte programada 1) y PD-L2 (ligando de muerte programada 2) respectivamente (Freeman et al., 2000, J. Exp. Med. 192: 1027-34; Carter et al., 2002, Eur. J. Immunol. 32: 634-43). PD-L1 se identificó en el 20-50% de los cánceres humanos (Dong et al., 2002, Nat. Med. 8: 787-9). La interacción entre PD-1 y PD-L1 provocó una disminución de los linfocitos infiltrados en el tumor, una disminución de la proliferación mediada por receptores de células T y una evasión inmunitaria por parte de las células cancerosas (Dong et al., 2003, J. Mol. Med. 81: 281-7; Blank et al., 2005, Cancer Immunol. Immunother. 54: 307-314). Las secuencias completas de nucleótidos y aminoácidos de la PD-1 se encuentran en los números de acceso del GenBank U64863 y NP_005009.2. Existen varios anticuerpos anti PD1 disponibles en la técnica (véanse, por ejemplo, los descritos en WO2004/004771; WO2004/056875; WO2006/121168; WO2008/156712; WO2009/014708; WO2009/114335; WO2013/043569; y WO2014/047350). Los anticuerpos anti PD-1 preferentes en el contexto de esta invención están aprobados por la FDA o en fase de desarrollo clínico avanzado y se puede utilizar en particular un anticuerpo anti PD-1 seleccionado del grupo que consiste en Nivolumab (también denominado BMS-936558 en fase de desarrollo por Bristol Myer Squibb), Lanbrolizumab (también denominado MK-3475 en fase de desarrollo por Merck) y Pidilizumab (también denominado CT-011 en fase de desarrollo por CureTech).

Otro ejemplo preferente de modulador de punto de control inmunitario está representado por un modulador capaz de antagonizar al menos parcialmente el ligando de PD-1 denominado PD-L1, y especialmente un anticuerpo que reconoce PD-L1 humano. Existen varios anticuerpos anti PD-L1 disponibles en la técnica (véanse, por ejemplo, los descritos en el documento EP1907000). Los anticuerpos anti PD-L1 preferentes están aprobados por la FDA o en fase de desarrollo clínico avanzado (por ejemplo, MPDL3280A en desarrollo por Genentech/Roche y BMS-936559 en desarrollo por Bristol Myer Squibb).

Otro ejemplo preferente de modulador de punto de control inmunitario está representado por un modulador capaz de antagonizar al menos parcialmente la proteína CTLA-4, y especialmente un anticuerpo que reconoce CTLA-4 humano. CTLA4 (del antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico) también conocido como CD152 fue identificado en 1987 (Brunet et al., 1987, Nature 328: 267-70) y está codificado por el gen CTLA4 (Dariavach et al., Eur. J. Immunol. 18: 1901-5). Se expresa en la superficie de las células T, donde regula principalmente la amplitud de las primeras fases de activación de las células T. Trabajos recientes han sugerido que CTLA-4 puede funcionar *in vivo* capturando y eliminando B7-1 y B7-2 de las membranas de las células presentadoras de antígenos, con lo que estas no estarían disponibles para la activación de CD28 (Qureshi et al., Science, 2011, 332: 600-3). La secuencia completa del ácido nucleico CTLA-4 se encuentra en el GenBank Accession No. U00006. Se dispone de varios anticuerpos anti CTLA-4 en la técnica (véanse, por ejemplo, los descritos en el documento US 8.491.895). Los anticuerpos anti CTLA-4 preferentes están aprobados por la FDA o en fase de desarrollo clínico avanzado. Cabe citar, en particular, el ipilimumab comercializado por Bristol Myer Squibb como Yervoy (véanse, por ejemplo, los documentos US 6.984.720 y US 8.017.114), el tremelimumab en fase de desarrollo por Pfizer (véanse, por ejemplo, los documentos US 7.109.003 y US 8.143.379) y los anticuerpos antiCTLA4 de cadena única (véanse, por ejemplo, los documentos WO97/20574 y WO2007/123737).

El modulador del punto de control inmunitario para antagonizar el receptor TIM3 también puede utilizarse en el producto combinado de la presente divulgación (véase, por ejemplo, Ngiow et al., 2011, Cancer Res. 71: 3540- 51; US2012-0189617).

- 5 Otro modulador del punto de control inmunitario para antagonizar el receptor LAG3 también puede utilizarse en la combinación de la presente divulgación (véanse, por ejemplo, Toni-Jun et al., 2011, 2014, póster LB266 de ACCR; Woo et al., 2012, Cancer Res. 72: 917-27).

Otro ejemplo de modulador del punto de control inmunitario está representado por un agonista de OX40, como el ligando agonista de OX40 (OX40L) (véanse, por ejemplo, los documentos US 5,457,035, US 7,622,444; WO03/082919) o un anticuerpo dirigido al receptor de OX40 (véanse, por ejemplo, los documentos US 7,291,331 y WO03/106498).

- 10 Otros ejemplos de moduladores de puntos de control inmunitarios son los anticuerpos anti-KIR o anti-CD96 dirigidos contra los receptores inhibidores albergados por las células T CD8+ y las células NK.

La presente invención abarca una combinación que comprende más de un modulador(es) del punto de control inmunitario. Un ejemplo preferente incluye, sin limitación, el uso de un anticuerpo anti-CTLA-4 con un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 en combinación con la vacuna terapéutica descrita en el presente documento.

- 15 Las moléculas de ácido nucleico que codifican la(s) porción(es) relevante(s) del modulador de punto de control inmunitario deseado pueden obtenerse mediante técnicas estándar de biología molecular utilizando datos de secuencias accesibles en la técnica y la información proporcionada en el presente documento. Por ejemplo, los ADNc que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo o sus CDR pueden aislarse del hibridoma productor, de bibliotecas de genes de inmunoglobulinas o de cualquier fuente disponible.

- 20 En un ejemplo, el (los) modulador(es) de puntos de control inmunitario para su utilización en la presente divulgación puede(n) estar comprendido(s) en la vacuna terapéutica descrita en el presente documento. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico codificante puede insertarse en una vacuna terapéutica basada en un vector (por ejemplo, en un vector viral codificador de antígenos). En este contexto, las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido o polipéptidos de interés y el modulador o moduladores del punto de control inmunitario se expresan preferiblemente de forma independiente utilizando elementos reguladores distintos. Alternativamente, el modulador o moduladores del punto de control inmunitario para su utilización en la presente divulgación pueden expresarse a partir de un sistema de vectores independiente como uno de los descritos en el presente documento en relación con la vacuna terapéutica para su administración separada o concomitante al sujeto que la necesite.

- 25 Alternativamente, el modulador o moduladores del punto de control inmunitario para su utilización en la presente invención pueden producirse por medios recombinantes utilizando vectores de expresión y células huésped adecuados para su administración como polipéptido recombinante al sujeto que lo necesite.

Producción de moduladores de puntos de control inmunitarios

- 30 La inserción en el vector de expresión puede realizarse mediante biología molecular rutinaria, por ejemplo, como se describe en Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory). La inserción en una vacuna terapéutica basada en virus puede realizarse mediante recombinación homóloga, como se describe en Chartier et al. (1996, J. Virol. 70: 4805-10) y Paul et al. (2002, Cancer Gene Ther. 9: 470-7).

- 35 Puede utilizarse o construirse una variedad de sistemas huésped-vector para expresar uno o más modulador(es) de punto de control inmunitario para utilización en la presente invención, incluyendo organismos procariotas tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* o *Bacillus subtilis*); levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*); sistemas celulares de insectos (por ejemplo, células Sf 9 y baculovirus); sistemas celulares de plantas (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor CaMV; virus del mosaico del tabaco TMV) y sistemas celulares de mamíferos (por ejemplo, células cultivadas). Típicamente, dichos vectores están disponibles comercialmente (por ejemplo, en Invitrogen, Stratagene, Amersham Biosciences, Promega, etc.) o en instituciones depositarias como la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md.) o han sido objeto de numerosas publicaciones que describen su secuencia, organización y métodos de producción, lo que permite al artesano aplicarlos. A efectos generales, dichos vectores suelen comprender uno o más elementos que permiten el mantenimiento, la propagación o la expresión de la molécula de ácido nucleico en la célula huésped. Los elementos representativos incluyen, sin limitación, gen(es) marcador(es) para facilitar la identificación y el aislamiento de las células huésped recombinantes (por ejemplo, por complementación de una auxotrofia celular o por resistencia a los antibióticos), elementos estabilizadores (por ejemplo, el sistema DAP descrito en U.S. 5,198,343) y elementos integradores (por ejemplo, secuencias virales LTR y transposones).

- 40 Entre los vectores plasmídicos adecuados para su uso en sistemas procariotas se incluyen, sin limitación, pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pbluescript (Stratagene), p Poly (Lathé et al., 1987, Gene 57: 193- 201), pTrc (Amann et al., 1988, Gene 69: 301-15); pET lid (Studier et al., 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185: 60-89); pIN (Inouye et al., 1985, Nucleic Acids Res. 13: 3101-9; Van Heeke et al., 1989, J. Biol. Chem. 264: 5503-9); y vectores pGEX en los que la molécula de ácido nucleico puede expresarse en fusión con glutatión S-transferasa (GST) (Amersham Biosciences Product). Los vectores adecuados para la expresión en levaduras (por ejemplo, S.

cerevisiae) incluyen, entre otros, pYepSecI (Baldari et al., 1987, EMBO J. 6: 229-34), pMFa (Kujan et al., 1982, Cell 30: 933-43), pJRY88 (Schultz et al., 1987, Gene 54: 113-23), pYES2 (Invitrogen Corporation) y pTEF-MF (Dualsystems Biotech Product). También pueden utilizarse plásmidos y vectores virales como los descritos en el presente documento en relación con la vacuna terapéutica para producir el modulador o moduladores de puntos de control inmunitario por medios recombinantes.

Las tecnologías de ADN recombinante también pueden utilizarse para mejorar la expresión de la molécula de ácido nucleico que codifica el modulador del punto de control inmunitario en la célula huésped, por ejemplo, utilizando vectores de alto número de copias, sustituyendo o modificando una o más secuencias reguladoras de la transcripción (por ejemplo, promotor, potenciador y similares), optimizando la utilización de codones y suprimiendo secuencias negativas que puedan desestabilizar la transcripción, como se describe en el presente documento en relación con la molécula o moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido o polipéptidos de interés).

Como antes, la molécula de ácido nucleico que codifica el modulador del punto de control inmunitario está en una forma adecuada para su expresión en una célula huésped, lo que significa que la molécula de ácido nucleico se coloca bajo el control de una o más secuencias reguladoras, apropiadas para el vector, la célula huésped y/o el nivel de expresión deseado como se ha descrito anteriormente. Promotores constitutivos (por ejemplo PGK, promotores de CMV, etc.), promotores eucarióticos inducibles regulados por compuestos suministrados exógenamente (por ejemplo, os promotores pTAC inducibles por TRP e IPTG, el promotor de metalotioneína (MT) inducible por zinc, el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), el promotor reprimible por tetraciclina e inducible por rapamicina, etc.) pueden utilizarse así como cualquiera de los promotores descritos a continuación en el presente documento para la expresión de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés.

Los métodos para la producción recombinante del modulador del punto de control inmunitario son convencionales en la técnica. Típicamente, tales métodos comprenden (a) introducir el vector de expresión descrito en el presente documento en una célula productora adecuada para producir una célula productora transfectada o infectada, (b) cultivar *in vitro* dicha célula productora transfectada o infectada en condiciones adecuadas para su crecimiento, (c) recuperar el modulador de punto de control inmunitario del cultivo celular, y (d) opcionalmente, purificar el modulador de punto de control inmunitario recuperado.

Las células productoras incluyen células procariotas, células eucariotas inferiores como las levaduras, y otras células eucariotas como las células de insectos, plantas y mamíferos (por ejemplo, células humanas o no humanas). Las células *E. coli* preferentes incluyen sin limitación *E. coli* BL21 (Amersham Biosciences). Las células productoras de levadura preferentes incluyen sin limitación *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia pastoris*. Las células productoras de mamíferos preferentes incluyen, sin limitación, células BHK-21 (riñón de hámster bebé), CV-1 (línea celular de riñón de mono africano), células COS (por ejemplo, COS-7), células de ovario de hámster chino (CHO), células NIH/3T3 de ratón, células HeLa, células Vero, células HEK293 y células PERC.6, así como las células de hibridoma correspondientes.

La transfección/infección de células huésped productoras es convencional y puede utilizar compuestos adicionales para mejorar la eficacia de la transfección y/o la estabilidad del vector. Estos compuestos están ampliamente documentados en la literatura, como los polímeros poli catiónicos (por ejemplo, quitosano, polimetacrilato, PEI, etc.), los lípidos catiónicos (por ejemplo, DC-Chol/DOPE, transfectam lipofectin ahora disponible en Promega) y los liposomas.

Las células productoras pueden cultivarse en biorreactores de fermentación convencionales, matraces y placas de Petri. El cultivo puede realizarse a una temperatura, pH y contenido de oxígeno adecuados para una célula huésped determinada. No se intentará describir aquí en detalle los distintos métodos conocidos para la producción de proteínas en células procariotas y eucariotas. La producción del modulador de puntos de control inmunitarios puede ser periplásmica, intracelular o, preferiblemente, secretada fuera de la célula productora (por ejemplo, en el medio de cultivo). Si es necesario, especialmente cuando el modulador de puntos de control inmunitario no se secreta fuera de la célula productora o cuando no se secreta completamente, puede recuperarse mediante procedimientos de lisis estándar, incluyendo congelación-descongelación, sonicación, disrupción mecánica, uso de agentes lisantes y similares. Si se secreta, puede recuperarse directamente del medio de cultivo.

Opcionalmente, el modulador de punto de control inmunitario puede purificarse mediante métodos de purificación bien conocidos, como precipitación con sulfato de amonio, extracción ácida, electroforesis en gel, filtración y métodos cromatográficos (por ejemplo, fase inversa, exclusión por tamaño, intercambio iónico, afinidad, fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba o hidroxipatita, etc.). Las condiciones y la tecnología utilizadas para purificar una proteína concreta dependerán de factores como la carga neta, el peso molecular, la hidrofobicidad, la hidrofilia y serán evidentes para los expertos en la materia. Además, el nivel de purificación dependerá del uso previsto. También se entiende que, dependiendo de la célula productora, las proteínas moduladoras del punto de control inmunitario pueden tener varios patrones de glicosilación, o pueden no estar glicosiladas (por ejemplo, cuando se producen en bacterias) como se describe en el presente documento.

De forma deseable, el modulador de puntos de control inmunitario utilizado en la presente invención está al menos parcialmente purificado, en el sentido de que está sustancialmente libre de otros anticuerpos con diferentes

especificidades antigénicas y/u otro material celular. Además, el modulador del punto de control inmunitario puede formularse según las condiciones utilizadas convencionalmente en la técnica (por ejemplo, WO2009/073569).

De acuerdo con la presente invención, pueden introducirse diversas modificaciones en el inhibidor de puntos de control inmunitarios para aumentar su semivida biológica, su afinidad, su estabilidad y/o su producción. Por ejemplo, puede incluirse un péptido señal para facilitar la secreción del modulador de punto de control inmunitario en un cultivo celular tal como se describe en el presente documento. Como ejemplo adicional, también puede añadirse un péptido marcador (normalmente una secuencia peptídica corta capaz de ser reconocida por antisueros o compuestos disponibles) para facilitar la purificación del modulador de puntos de control inmunitarios recombinante. En el contexto de la invención se puede utilizar una amplia variedad de péptidos de etiquetado, incluyendo, sin limitación, el etiquetado PK, el octapéptido FLAG, el etiquetado MYC, el etiquetado HIS (normalmente un tramo de 4 a 10 residuos de histidina) y la etiqueta e (US 6.686.152). El (los) péptido(s) marcado(s) puede(n) colocarse independientemente en el extremo N de la proteína o alternativamente en su extremo C o alternativamente internamente o en cualquiera de estas posiciones cuando se emplean varias etiquetas. Los péptidos etiquetados pueden detectarse mediante ensayos de inmunodetección utilizando anticuerpos anti-etiqueta.

Otro enfoque que puede seguirse en el contexto de la presente invención es el acoplamiento del modulador del punto de control inmunitario a un agente externo, como un agente radiosensibilizador, un agente citotóxico y/o un agente de etiquetado. El acoplamiento puede ser covalente o no. En el presente documento, el término "radiosensibilizador" se refiere a una molécula que hace que las células sean más sensibles a la radioterapia. Los radiosensibilizadores incluyen, entre otros, metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomicina C, RSU 1069, SR 4233, E09, RB 6145, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina (BUdR), 5-yododesoxiuridina (IUdR), bromodesoxicidina, fluorodesoxiuridina (FUdR), hidroxiaurea y cisplatino. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "agente citotóxico" se refiere a un compuesto que es directamente tóxico para las células, impidiendo su reproducción o crecimiento, como las toxinas (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma). Tal como se utiliza en el presente documento, "un agente de etiquetado" se refiere a un compuesto detectable. El agente de etiquetado puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, etiquetas de isótopos radiactivos o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la modificación química de un compuesto sustrato que sea detectable.

Otra modificación es la pegilación, por ejemplo, para aumentar la semivida biológica del anticuerpo. Los métodos para pegilar proteínas son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, EP154316; EP401384; WO98/15293, WO01/23001, etc.).

Producto y terapia de combinación

El término "combinación de terapia" y cualquier variación como "uso combinado" se refiere a la acción de administrar en el mismo sujeto al menos las dos entidades descritas en el presente documento.

En un ejemplo, la presente divulgación se refiere a un producto de combinación en forma de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos la vacuna terapéutica y una o más entidades moduladoras de puntos de control inmunitarios descritas en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La presente invención se refiere a composiciones distintas para uso combinado, una que comprende al menos una cantidad terapéuticamente eficaz de la vacuna terapéutica y un vehículo farmacéuticamente aceptable y otra que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En la divulgación, se puede proceder con una o más administración(es) de cada entidad (o composición(es) de la misma) que pueden ser concomitantes, secuenciales o intercaladas a través de la misma o diferentes vías.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" corresponde a la cantidad de cada una de las entidades activas (vacuna terapéutica y uno o más moduladores del punto de control inmunitario) incluidas en la combinación o composición que es suficiente para producir uno o más resultados beneficiosos. Dicha cantidad terapéuticamente eficaz puede variar en función de diversos parámetros, como el modo de administración; la edad y el peso del sujeto; la naturaleza y el alcance de los síntomas; la capacidad del sujeto para responder al tratamiento, el tipo de tratamiento concurrente; la frecuencia del tratamiento y/o la necesidad de prevención o terapia, etc.

Cuando se trata de un uso "profiláctico", la combinación se administra a una dosis suficiente para prevenir o retrasar la aparición y/o el establecimiento y/o la recaída de una afección patológica, especialmente en un sujeto de riesgo. Para uso "terapéutico", tanto la vacuna terapéutica como el modulador o moduladores de puntos de control inmunitarios se administran a un sujeto al que se le ha diagnosticado una enfermedad o afección patológica con el objetivo de tratarla, opcionalmente en asociación con una o más modalidades terapéuticas convencionales.

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos los portadores, disolventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de absorción y similares compatibles con la administración en mamíferos y, en particular, en seres humanos.

Cada una de las vacunas terapéuticas y uno o más moduladores del punto de control inmunitario o sus composiciones pueden colocarse independientemente en un disolvente o diluyente apropiado para uso humano o animal. En particular,

cada uno o ambos pueden formularse de manera que se garantice su estabilidad, en particular en las condiciones de fabricación y almacenamiento a largo plazo (es decir, durante al menos 6 meses, con preferencia durante al menos dos años) a temperatura de congelación (por ejemplo, -70°C , -20°C), de refrigeración (por ejemplo, 4°C) o ambiente (por ejemplo, $20-25^{\circ}\text{C}$). Dichas formulaciones suelen incluir un portador líquido, como las soluciones acuosas. Puede utilizarse solución salina fisiológica, solución de Ringer, solución de Hank, solución de sacáridos (por ejemplo, glucosa, trehalosa, sacarosa, dextrosa, etc.) y otras soluciones acuosas salinas fisiológicamente equilibradas (véase, por ejemplo, la edición más reciente de Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams&Wilkins). También son adecuados los aceites animales o vegetales, minerales o sintéticos. Ventajosamente, la formulación apropiada para la vacuna terapéutica y el (los) modulador(es) del punto de control inmunitario o su(s) composición(es) está(n) convenientemente tamponada(s) para uso humano, preferiblemente a pH fisiológico o ligeramente básico (por ejemplo, de aproximadamente pH 7 a aproximadamente pH 9 con una preferencia específica por un pH comprendido entre 7 y 8 y más particularmente próximo a 7,5). Entre los tampones adecuados se incluyen, sin limitación, TRIS (tris(hidroximetil)metilamina), TRIS-HCl (tris(hidroximetil)metilamina-HCl), HEPES (ácido 4-2-hidroxietil-l-piperazinaetanosulfónico), tampón fosfato (por ejemplo PBS), ACES (ácido N-(2-acetamido)-aminoetanosulfónico), PIPES (ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico)), MOPSO (ácido 3-(N-morfolino)-2-hidroxipropanosulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanesulfónico), TES (ácido 2-[[tris(hidroximetil)metil]amino]etanosulfónico), DIPSO (ácido 3-[bis(2-hidroxietil)amino]-2-hidroxipropanol-sulfónico), MOBS (ácido 4-(N-morfolino)butanosulfónico), TAPSO (ácido 3-[N-Tris(hidroximetil)metilamino]-2-hidroxipropanosulfónico), HEPPSO (ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-l-(2-hidroxil)-propanosulfónico), POPSO (ácido 2-hidroxil-3-[4-(2-hidroxil-3-sulfopropil)piperazin-l-il]propano-l-sulfónico), TEA (tri-etanolamina), EPPS (ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-3-propanosulfónico) y TRICINA (N-[Tris(hidroximetil)-metil]-glicina). Preferiblemente, dicho tampón se selecciona entre TRIS-HCl, TRIS, Tricina, HEPES y tampón fosfato que comprende una mezcla de Na_2HPO_4 y KH_2PO_4 o una mezcla de Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 . Dicho tampón (en particular los mencionados anteriormente y especialmente TRIS-HCl) está presente preferiblemente en una concentración de 10 a 50 mM. Podría ser beneficioso incluir también en dichas formulaciones una sal monovalente para garantizar una presión osmótica adecuada. Dicha sal monovalente puede seleccionarse especialmente entre NaCl y KCl, preferiblemente dicha sal monovalente es NaCl, preferiblemente en una concentración de 10 a 500 mM.

La formulación apropiada para su utilización en el contexto de la presente invención, y especialmente la formulación líquida o congelada, también puede incluir un crioprotector para proteger la vacuna terapéutica y/o el (los) modulador(es) del punto de control inmunitario (en particular la composición a base de virus) a baja temperatura de almacenamiento, como a aproximadamente $+5^{\circ}\text{C}$ e inferior. Entre los crioprotectores adecuados se encuentran, sin limitación, la sacarosa (o sacarosa), la trehalosa, la maltosa, la lactosa, el manitol, el sorbitol y el glicerol, preferiblemente en una concentración del 0,5 al 20% (peso en g/volumen en L, denominado p/v). Por ejemplo, la sacarosa está presente preferiblemente en una concentración del 5 al 15% (p/v), con una preferencia específica por aproximadamente el 10%.

La formulación apropiada para su utilización en la presente invención y especialmente la formulación líquida puede comprender además un agente quelante farmacéuticamente aceptable, y en particular un agente quelante de dicaciones para mejorar la estabilidad. El agente quelante farmacéuticamente aceptable puede seleccionarse entre el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), ácido dimercaptosuccínico (DMSA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS). El agente quelante farmacéuticamente aceptable está preferiblemente presente en una concentración de al menos 50 μM con una preferencia específica por una concentración de 50 a 1.000 μM . Preferiblemente, dicho agente quelante farmacéuticamente aceptable es EDTA presente en una concentración cercana a 150 μM .

Pueden estar presentes compuestos adicionales para aumentar la estabilidad de la vacuna terapéutica formulada y/o del modulador o moduladores del punto de control inmunitario o de su composición o composiciones. Tales compuestos adicionales incluyen, sin limitación, alcohol C2-C3 (deseablemente en una concentración de 0,05 a 5% (volumen/volumen o v/v)), glutamato sódico (deseablemente en una concentración inferior a 10 mM), tensioactivo no iónico (Evans et al. 2004, J Pharm Sci. 93:2458-75, Shi et al., 2005, J Pharm Sci. 94:1538-51, US7,456,009, US2007/0161085) como Tween 80 (también conocido como polisorbato 80) a una concentración baja, inferior al 0,1%. Se ha observado que sales divalentes como MgCl_2 o CaCl_2 inducen la estabilización de diversos productos biológicos en estado líquido (véase Evans et al. 2004, J Pharm Sci. 93:2458-75 y US7,456,009). Se ha descubierto que los aminoácidos, y en particular la histidina, la arginina o la metionina, inducen la estabilización de varios virus en estado líquido (véase Evans et al., 2004, J Pharm Sci. 93:2458-75, US7,456,009, US2007/0161085, US7,914,979, WO2014/029702 y WO2014/053571).

La presencia de polímeros de alto peso molecular, como el dextrano o la polivinilpirrolidona (PVP), es especialmente adecuada para las formulaciones liofilizadas. Las formulaciones liofilizadas se obtienen generalmente mediante un proceso que implica el secado al vacío y la liofilización (véase, por ejemplo, WO03/053463; WO2006/0850082; WO2007/056847; WO2008/114021) y la presencia de estos polímeros ayuda a la formación de la torta durante la liofilización (véase EP1418942 y WO2014/053571).

Para conservar la vacuna terapéutica y/o el modulador o moduladores del punto de control inmunitario o su composición o composiciones, pueden utilizarse de forma independiente diversas formulaciones disponibles en la

técnica, ya sea en forma congelada, líquida o liofilizada (por ejemplo, WO98/02522, WO00/29024, WO00/34444, WO01/66137, WO03/053463, WO2006/0850082, WO2007/056847 y WO2008/114021, etc.). A título ilustrativo, la histidina estéril, el citrato de acetato o los tampones de fosfato salinos que contienen tensioactivos como el polisorbato 80 y protectores como la sacarosa o el manitol se adaptan a la conservación de anticuerpos recombinantes, y las formulaciones tamponadas que incluyen NaCl y/o azúcar se adaptan particularmente a la conservación de la vacuna terapéutica vectorizada (por ejemplo Tris-HCl 10 mM pH 8 con sacarosa 5 % *lyv/v*), glutamato sódico 10 mM, y NaCl 50 mM o solución salina tamponada con fosfato con glicerol (10%) y NaCl).

La formulación puede adaptarse en función del modo de administración para garantizar una distribución adecuada o una liberación retardada *in vivo*. Pueden utilizarse polímeros biodegradables y biocompatibles, como el etilvinilacetato, los polianhídridos, el ácido poliglicólico, el colágeno, los poliortoésteres, el ácido poliláctico y el polietilenglicol. En la técnica se describen muchos métodos para la preparación de tales formulaciones (por ejemplo, J. R. Robinson en "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978; WO01/23001; WO2006/93924; WO2009/53937). Las cápsulas y gránulos gastroresistentes son particularmente apropiados para la administración oral, los supositorios para la administración rectal o vaginal, opcionalmente en combinación con potenciadores de la absorción útiles para aumentar el tamaño del poro de las membranas mucosas. Tales potenciadores de la absorción suelen ser sustancias que presentan similitudes estructurales con los dominios fosfolípidicos de las membranas mucosas (como el desoxicolato sódico, el glucocolato sódico, la dimetil-beta-ciclodextrina, la lauril-l-lisofosfatidilcolina).

Cada vacuna terapéutica y/o modulador(es) del punto de control inmunitario o su(s) composición(es) también puede(n) contener excipientes farmacéuticamente aceptables para proporcionar propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables, incluyendo, por ejemplo, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, esterilidad, estabilidad, disolución, liberación o absorción en el sujeto, o administración a un órgano concreto.

La dosis adecuada de la vacuna terapéutica y del modulador o moduladores de puntos de control inmunitarios, así como las relaciones óptimas de cada entidad, pueden determinarse mediante técnicas bien conocidas en la técnica. El profesional puede afinar los cálculos necesarios para adaptar la dosis adecuada para un sujeto o un grupo de sujetos, a la luz de las circunstancias pertinentes.

La dosis adecuada del modulador o moduladores del punto de control inmunitario varía de aproximadamente 0,01mg/kg a aproximadamente 50mg/kg, ventajosamente de aproximadamente 0,1mg/kg a aproximadamente 30mg/kg, deseablemente de aproximadamente 0,5mg/kg a aproximadamente 25mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 1mg/kg a aproximadamente 20mg/kg, más preferiblemente de aproximadamente 2mg/kg a aproximadamente 15mg/kg, con una preferencia específica por dosis de aproximadamente 3mg/kg a aproximadamente 10mg/kg cuando se usa por inyección parenteral. Sin embargo, las dosis pueden adaptarse a la vía de administración y al sujeto a tratar mediante un factor de variación comprendido entre 1,5 y 100. En algunas realizaciones, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado cae dentro de los rangos indicados.

La dosificación adecuada para una vacuna terapéutica basada en virus varía de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{13} vp (partículas virales), iu (unidad infecciosa) o pfu (unidades formadoras de placa) dependiendo de la técnica cuantitativa utilizada. Como orientación general, son adecuadas dosis de adenovirus de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 5×10^{12} vp, preferiblemente de aproximadamente 10^7 vp a aproximadamente 10^{12} vp, más preferiblemente de aproximadamente 10^8 vp a aproximadamente 5×10^{11} vp; dosis de aproximadamente 5×10^8 vp a aproximadamente 10^{11} vp siendo particularmente preferentes sobre todo para uso humano. Las dosis individuales que son adecuadas para la vacuna terapéutica basada en MVA comprenden de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{12} pfu, preferiblemente de aproximadamente 10^5 pfu a aproximadamente 10^{11} pfu, más preferiblemente de aproximadamente 10^6 pfu a aproximadamente 10^{10} pfu; dosis de aproximadamente 10^7 pfu a aproximadamente 10^9 pfu siendo particularmente preferentes sobre todo para uso humano. Las dosis individuales que son adecuadas para la vacuna terapéutica basada en Vaccinia comprenden de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{13} pfu, preferiblemente de aproximadamente 10^6 pfu a aproximadamente 10^{11} pfu, más preferiblemente de aproximadamente 10^7 pfu a aproximadamente 10^{10} pfu; dosis de aproximadamente 10^8 pfu a aproximadamente 5×10^9 v siendo particularmente preferentes sobre todo para uso humano. La cantidad de virus presente en una muestra puede determinarse mediante técnicas rutinarias de titulación, por ejemplo, contando el número de placas tras la infección de células permisivas (por ejemplo 293 o PER6C6 para Ad, BHK-21 o CEF para MVA, HeLa para VV), midiendo la absorbancia A260 (títulos vp), o aún mediante inmunofluorescencia cuantitativa, por ejemplo, utilizando anticuerpos antiviral (títulos iu). La dosificación adecuada para una vacuna terapéutica basada en plásmidos varía de 10 µg a 20 mg, ventajosamente de 100 µg a 10 mg y preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 5 mg.

Administración

El producto de combinación de la divulgación es adecuado para una administración única o una serie de administraciones. En particular, cuando se contemplan composiciones distintas, la vacuna terapéutica y el modulador o moduladores del punto de control inmunitario pueden administrarse juntos o por separado al sujeto y en una dosis única o en dosis múltiples. Las administraciones pueden ser concomitantes (por ejemplo, mezcladas en la misma

composición o en diferentes composiciones administradas aproximadamente al mismo tiempo), secuenciales (vacuna terapéutica seguida de modulador del punto de control inmunitario o *viceversa*) o intercaladas (administraciones entremezcladas a diversos intervalos) y realizadas por la misma o diferentes vías en el mismo sitio o en sitios alternativos. En la invención, las administraciones de la vacuna terapéutica y del uno o más inhibidores de puntos de control inmunitarios se intercalan y se definen en las reivindicaciones.

Cualquiera de las vías de administración convencionales es aplicable en el contexto de la invención o divulgación, incluidas las vías parenteral, tópica o mucosa, para el producto de combinación o composición(es). Las vías parenterales están destinadas a la administración en forma de inyección o infusión y abarcan tanto las vías sistémicas como las locales. Los tipos de inyección parenteral que pueden utilizarse para administrar el producto combinado son la intravenosa (en una vena, como la vena porta que alimenta el hígado), la intravascular (en un vaso sanguíneo), la intraarterial (en una arteria como la arteria hepática), la intradérmica (en la dermis), la subcutánea (bajo la piel), la intramuscular (en el músculo), la intraperitoneal (en el peritoneo) y la intratumoral (en un tumor o en sus proximidades) o incluso mediante escarificación. Las infusiones suelen administrarse por vía intravenosa. Las administraciones mucosas incluyen, sin limitación, la vía oral/alimentaria, intranasal, intratraqueal, intrapulmonar, intravaginal o intra rectal. La administración tópica también puede realizarse mediante medios transdérmicos (por ejemplo, parches y similares). Las vías de administración preferentes para el modulador o moduladores de puntos de control inmunitarios son la intravenosa (por ejemplo, inyección intravenosa o infusión) y la intratumoral. Las vías de administración preferentes para la vacuna terapéutica incluyen la intravenosa, intramuscular, subcutánea e intratumoral. Por ejemplo, las inoculaciones intratumorales de la vacuna terapéutica podrían combinarse ventajosamente con inyecciones intravenosas del modulador o moduladores del punto de control inmunitario.

Para la administración se pueden utilizar jeringas y agujas convencionales (por ejemplo, agujas de inyección Quadrafuse) o cualquier compuesto o dispositivo disponible en la técnica capaz de facilitar o mejorar la administración del agente o agentes activos en el sujeto (por ejemplo, electroporación para facilitar la administración intramuscular). Una alternativa es el uso de un dispositivo de inyección sin aguja para administrar al menos una de las entidades activas comprendidas en el producto combinado (por ejemplo, el dispositivo Biojector™). También pueden preverse parches transdérmicos.

En un ejemplo de la divulgación, la vacuna terapéutica y el modulador o moduladores de puntos de control inmunitarios o su composición o composiciones se administran secuencialmente, por ejemplo, las vacunas se administran primero y el modulador o moduladores de puntos de control inmunitarios después, o vice-versa (el modulador o moduladores de puntos de control inmunitarios se administran primero y la vacuna terapéutica después). La secuencia puede variar. Por ejemplo, el orden de las administraciones puede invertirse o mantenerse en el mismo orden en cada momento de la administración.

También se puede proceder mediante administraciones intercaladas de la vacuna terapéutica y del modulador o moduladores del punto de control inmunitario. El periodo de tiempo entre la primera administración de la vacuna terapéutica y la primera administración del modulador o moduladores del punto de control inmunitario puede variar desde aproximadamente varios minutos hasta varias semanas. También es posible proceder para cada entidad mediante ciclos secuenciales de administraciones que se repiten tras un periodo de descanso. Los intervalos entre cada administración pueden ser de una hora a un año (por ejemplo, 24h, 48h, 72h, semanal, quincenal, mensual o anual). Los intervalos también pueden ser irregulares (por ejemplo, tras la medición de anticuerpos monoclonales en los niveles sanguíneos del paciente). Las dosis pueden variar para cada administración dentro del intervalo descrito anteriormente. Preferiblemente, el intervalo de tiempo entre cada administración de vacuna terapéutica puede variar de aproximadamente 1 día a aproximadamente 8 semanas, ventajosamente de aproximadamente 2 días a aproximadamente 6 semanas, preferiblemente de aproximadamente 3 días a aproximadamente 4 semanas y aún más preferiblemente de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 3 semanas con una preferencia específica por aproximadamente una semana. En combinación, el intervalo de tiempo entre cada administración de modulador(es) del punto de control inmunitario puede variar de aproximadamente 2 días a aproximadamente 8 semanas, ventajosamente de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 6 semanas, preferiblemente cada 3 semanas.

En la invención, la(s) administración(es) de la vacuna terapéutica comienza(n) antes de la(s) administración(es) de dicho(s) modulador(es) de punto de control inmunitario y el periodo de tiempo entre la primera administración de la vacuna terapéutica y la primera administración del(de los) modulador(es) de punto de control inmunitario es de varias semanas; y el intervalo de tiempo entre cada administración de vacuna terapéutica es de 1 semana a 3 semanas; y el intervalo de tiempo entre cada administración de modulador(es) de punto de control inmunitario es de 1 semana a 6 semanas.

Un esquema terapéutico preferente implica de 4 a 15 (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15) administraciones de 10^7 a 10^9 pfu de una vacuna terapéutica basada en MVA con un intervalo aproximado de 1 a 3 semanas intercaladas con 2 a 6 administraciones de 3 a 10 mg/kg de anticuerpo(s) antipunto de control inmunitario cada 2 o 3 semanas. A título ilustrativo, un esquema de administración preferente comprende administraciones subcutáneas de un vector MVA que expresa MUC1 (tal como TG4010) a una dosis de aproximadamente 10^8 pfu semanales durante 6 semanas y luego cada tres semanas intercaladas con administraciones intravenosas de un anticuerpo anti-CTLA4 tal como ipilimumab a una dosis de aproximadamente 3 mg/kg cada 3 semanas para un total de cuatro dosis.

El producto combinado o composición de la divulgación es para utilización en el tratamiento o prevención de enfermedades o condiciones patológicas, especialmente aquellas causadas por un organismo patógeno o una división celular no deseada según las modalidades aquí descritas. Una "enfermedad" (y cualquier forma de enfermedad como "trastorno" o "condición patológica") se caracteriza normalmente por síntomas identificables. Las enfermedades ejemplares incluyen, pero no se limitan a, las enfermedades infecciosas que resultan de una infección con un organismo patógeno (por ejemplo, bacterias, parásitos, virus, hongos, etc.) y las enfermedades proliferativas que implican una proliferación anormal de las células, como las enfermedades neoplásicas (por ejemplo, cáncer), la artritis reumatoide y la reestenosis.

La presente divulgación también se refiere a un método de tratamiento que comprende administrar un producto o composición(es) de combinación de vacuna terapéutica y/o uno o más modulador(es) de punto de control inmunitario en una cantidad suficiente para tratar o prevenir una enfermedad o una afección patológica en un sujeto que lo necesite o aliviar uno o más síntomas relacionados o asociados con las enfermedades y la afección patológica, según las modalidades descritas en el presente documento. En la invención, la enfermedad o condición patológica a tratar es una enfermedad proliferativa o infecciosa (por ejemplo, especialmente una infección crónica). En consecuencia, la presente invención también se refiere a un método para inhibir el crecimiento de células tumorales que comprende la administración de un producto combinado de vacuna terapéutica y uno o más modulador(es) de puntos de control inmunitario a un sujeto que lo necesite, tal como se define en las reivindicaciones. En el contexto de la invención, los métodos y la utilización según la invención tienen como objetivo ralentizar, curar, mejorar o controlar la aparición o la progresión de la enfermedad objetivo.

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "cáncer" incluye, pero no se limita a, tumores sólidos y tumores hematopoyéticos. El término "cáncer" engloba tanto los cánceres primarios como los metastásicos. Ejemplos representativos de cánceres que pueden tratarse utilizando la combinación y los métodos de la invención incluyen, sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia y más particularmente cáncer de hueso, cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer orofaríngeo, cáncer laríngeo, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza o cuello, cáncer de piel, cáncer de células escamosas, melanoma, cáncer de útero, cáncer de cuello de útero, carcinoma de endometrio, cáncer de vulva, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer del sistema endocrino, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, glioblastoma y diversos tipos del sistema nervioso central (CNS), etc. La presente invención es particularmente útil para el tratamiento de cánceres que expresan PD-L1 (Iwai et al., 2005, Int. Immunol. 17: 133-44), especialmente los metastásicos y los que sobre expresan MUC1 (especialmente la forma hipoglicosilada de los mismos) tales como cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de célula clara), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata resistente a hormonas), cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama metastásico), cáncer colorrectal, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico), cáncer de hígado (por ejemplo, hepatocarcinoma), cáncer gástrico, carcinoma de vías biliares, cáncer de endometrio, cáncer de páncreas y cáncer de ovario. Preferiblemente, dicho cáncer es un cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCL).

Ejemplos representativos de enfermedades infecciosas que pueden tratarse utilizando la combinación y los métodos de la invención incluyen, sin limitación, a) enfermedades víricas como las resultantes de la infección por un virus del herpes (HSV1, HSV2 o VVZ), un virus del papiloma (HPV), un poxvirus causante de variola o varicela, un enterovirus, un retrovirus como el HIV causante del SIDA, un citomegalovirus, un flavivirus (por ejemplo, el causante de la encefalitis japonesa, la hepatitis C, el dengue y la fiebre amarilla), un hepadnavirus (por ejemplo, el HBV), un ortomixovirus (por ejemplo, el virus de la gripe), un paramixovirus (por ejemplo, el parainfluenzavirus, el virus de las paperas, el virus del sarampión y el virus respiratorio sincitial (RSV)), un coronavirus (por ejemplo, SARS), el rabdovirus y el rotavirus; b) enfermedades resultantes de una infección por bacterias, por ejemplo, Escherichia, Enterobacter, Salmonella, Staphylococcus, Shigella, Listeria, Aerobacter, Helicobacter, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Streptococcus, Chlamydia, Mycoplasma, Pneumococcus, Neisseria, Clostridium, Bacillus, Corynebacterium, Mycobacterium, Campylobacter, Vibrio, Serratia, Providencia, Chromobacterium, Brucella, Yersinia, Haemophilus o Bordetella; y c) enfermedades fúngicas, incluidas pero no limitadas a candidiasis, aspergilosis, histoplasmosis, meningitis criptocócica; y d) enfermedades parasitarias, incluidas pero no limitadas a paludismo, neumonía por Pneumocystis carinii, leishmaniosis, criptosporidiosis, toxoplasmosis e infección por tripanosomas.

Típicamente, tras la administración según las modalidades aquí descritas, el producto de combinación proporciona un beneficio terapéutico al sujeto tratado sobre el estado de línea base o sobre el estado esperado si no se tratara, lo que puede evidenciarse por una mejora observable del estado clínico sobre el estado basal o sobre el estado esperado si no se tratara en combinación según se describe en el presente documento. Una mejora del estado clínico puede evaluarse fácilmente mediante cualquier medición clínica pertinente utilizada habitualmente por los médicos u otro personal sanitario cualificado. En el contexto de la invención, el beneficio terapéutico puede ser transitorio (durante uno o un par de meses tras el cese de la administración) o sostenido (durante varios meses o años). Dado que el curso natural del estado clínico puede variar considerablemente de un sujeto a otro, no se requiere que el beneficio terapéutico se observe en cada sujeto tratado, sino en un número significativo de sujetos (por ejemplo, las diferencias estadísticamente significativas entre dos grupos pueden determinarse mediante cualquier prueba estadística conocida en la técnica, como la prueba paramétrica de Tukey, la prueba de Kruskal-Wallis, la prueba U según Mann y Whitney, la prueba t de Student, la prueba de Wilcoxon, etc.).

Cuando el método está destinado a tratar una enfermedad proliferativa, en particular el cáncer, un beneficio terapéutico puede evidenciarse por ejemplo por una reducción del número de tumores; una reducción del tamaño del tumor, una reducción del número o extensión de las metástasis, un aumento de la duración de la remisión, una estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de la enfermedad, un retraso o ralentización de la enfermedad progresión o gravedad, una supervivencia prolongada, una mejor respuesta al tratamiento estándar, una mejora de la calidad de vida, una reducción de la mortalidad, etc.

Cuando el método está destinado a tratar una enfermedad infecciosa, un beneficio terapéutico puede evidenciarse, por ejemplo, por una disminución de la cantidad del organismo patógeno infectante cuantificado en sangre, plasma o suero de un sujeto tratado, y/o una estabilización (no empeoramiento) del estado de la enfermedad infecciosa (por ejemplo, estabilización de las condiciones típicamente asociadas con la enfermedad infecciosa, como el estado inflamatorio), y/o la reducción del nivel de marcadores específicos de la serie (por ejemplo, disminución de la alanina aminotransferasa (ALT) y/o de la aspartato aminotransferasa (AST) asociadas con el mal estado del hígado que suele observarse en la hepatitis C crónica), la disminución del nivel de cualquier antígeno asociado con la aparición de una enfermedad infecciosa y/o la aparición o la modificación del nivel de anticuerpos contra el organismo patógeno y/o una mejor respuesta del sujeto tratado a las terapias convencionales (por ejemplo, antibióticos) y/o una prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe el tratamiento combinado.

Para evaluar un beneficio clínico pueden utilizarse las mediciones adecuadas, como análisis de sangre, análisis de fluidos biológicos y biopsias, así como técnicas de imagen médica. Pueden realizarse antes de la administración (línea de base) y en varios momentos durante el tratamiento y tras su interrupción. A modo de orientación general, estas mediciones se evalúan de forma rutinaria en laboratorios médicos y hospitales y existe un gran número de kits disponibles comercialmente (por ejemplo, inmunoensayos, ensayos de PCR cuantitativa).

Preferiblemente, el producto combinado se utiliza o administra para provocar o estimular y/o redirigir una respuesta inmunitaria en el sujeto tratado. En consecuencia, la presente divulgación también abarca un método para provocar o estimular y/o reorientar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, frente a células tumorales o infectadas) que comprende la administración de un producto combinado o composición(es) de vacuna terapéutica y/o uno o más modulador(es) de punto de control inmunitario a un sujeto que lo necesite, en una cantidad suficiente según las modalidades descritas en el presente documento para activar la inmunidad del paciente.

En una realización particular, el producto combinado y el método o métodos pueden emplearse según las modalidades descritas en el presente documento para romper la tolerancia inmunitaria que suele darse en sujetos infectados crónicamente y cancerosos.

La respuesta inmunitaria provocada, estimulada o redirigida puede ser específica (es decir, dirigida a epítopos/antígenos) y/o inespecífica (innata), humoral y/o celular. En el contexto de la invención, la respuesta inmunitaria es preferiblemente una respuesta de células T mediada por CD4+ o CD8+, o ambas, dirigida a polipéptido(s)/epítipo(s), en particular asociados con un tumor o un organismo patógeno infectante.

La capacidad del producto de combinación descrito en el presente documento para provocar, estimular o redirigir una respuesta inmunitaria puede evaluarse *in vitro* (por ejemplo, utilizando muestras biológicas recogidas del sujeto) o *in vivo* utilizando una variedad de ensayos directos o indirectos que son estándar en la técnica. Para una descripción general de las técnicas disponibles para evaluar el inicio y la activación de una respuesta inmunitaria, véase, por ejemplo, Coligan et al. (1992 y 1994, *Current Protocols in Immunology*; ed J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health o ediciones posteriores). La capacidad de estimular una respuesta humoral puede estar determinada por la unión de anticuerpos y/o la competencia en la unión (véase, por ejemplo, Harlow, 1989, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press). La evaluación de la inmunidad inespecífica puede realizarse, por ejemplo, midiendo las células NK/NKT (por ejemplo, la representatividad y el nivel de activación), así como las cascadas de producción de citocinas y/o quimiocinas relacionadas con el IFN, la activación de los TLR y otros marcadores de la inmunidad innata (Scott-Algara et al., 2010 *PLOS One* 5(1), e8761; Zhou et al., 2006, *Blood* 107, 2461-2469; Chan, 2008, *Eur. J. Immunol.* 38, 2964-2968). La evaluación de la inmunidad celular puede realizarse, por ejemplo, mediante la cuantificación de la(s) citocina(s) producida(s) por células T activadas, incluidas las derivadas de células T CD4+ y CD8+, utilizando bioensayos rutinarios (por ejemplo, caracterización y/o cuantificación de células T mediante ELISpot, mediante citometría de flujo multiparamétrica o ICS, mediante análisis del perfil de citocinas utilizando tecnologías multiplex o ELISA), mediante la determinación de la capacidad proliferativa de las células T (por ejemplo, ensayos de proliferación de células T mediante ensayo de incorporación de timidina [³H]), mediante ensayo de la capacidad citotóxica de linfocitos T antígeno-específicos en un sujeto sensibilizado o mediante inmunización de modelos animales apropiados. Por ejemplo, las técnicas utilizadas habitualmente en los laboratorios (por ejemplo, la citometría de flujo o la histología) pueden emplearse para realizar la vigilancia de tumores. También se pueden utilizar varios anticuerpos disponibles para identificar diferentes poblaciones de células inmunitarias implicadas en la respuesta antitumoral presentes en los sujetos tratados, como células T citotóxicas, células T citotóxicas activadas, células asesinas naturales y células asesinas naturales activadas.

Si se desea, el producto combinado, o los métodos de la invención pueden utilizarse o llevarse a cabo en asociación con una o más modalidades terapéuticas convencionales que estén disponibles para tratar o prevenir la enfermedad o condición patológica a tratar o prevenir (por ejemplo, quimioterapia, radiación, y/o cirugía). Dicha terapia

convencional puede administrarse al sujeto de forma secuencial o concomitante con la combinación o método según la invención.

Ejemplos representativos de fármacos terapéuticos convencionales que pueden ser útiles en asociación con el producto combinado o el método de la invención incluyen, entre otros, nitrosoureas, antibióticos, antimetabolitos, antimitóticos, fármacos antivirales (por ejemplo, interferón alfa), anticuerpos monoclonales, inhibidores de la señalización, así como fármacos quimioterapéuticos utilizados habitualmente en la terapia del cáncer. Se puede citar más concretamente:

- 5 ✓ agentes alquilantes como, por ejemplo, mitomicina C, ciclofosfamida, busulfán, ifosfamida, isosfamida, melfalán, hexametilmelamina, tiotepa, clorambucil, o dacarbazina;
- 10 ✓ antimetabolitos como, por ejemplo, gemcitabina, capecitabina, 5-fluorouracilo, citarabina, 2-fluorodesoxicidina, metotrexato, idatrexato, tomudex o trimetrexato;
- ✓ inhibidores de la topoisomerasa II como, por ejemplo, doxorrubicina, epirubicina, etopósido, tenipósido o mitoxantrona;
- 15 ✓ inhibidores de la topoisomerasa I como, por ejemplo, el irinotecán (CPT-11), la 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (SN-38) o el topotecán;
- ✓ fármacos antimitóticos como, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina o vinorelbina; derivados del platino como, por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino, espiroplatino o carboplatino; inhibidores de los receptores de tirosina cinasa como sunitinib (Pfizer), sorafenib (Bayer), gefitinib, erlotinib y lapatinib; y
- 20 ✓ anticuerpos (en particular antineoplásicos cetuximab, panitumumab, zalutumumab, nimotuzumab, matuzumab) o inhibidores del Receptor-2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (en particular trastuzumab); y agentes que afectan a la angiogénesis como, por ejemplo, inhibidores del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (en particular bevacizumab o ranibizumab);
- ✓ antibióticos utilizados convencionalmente contra organismos patógenos infecciosos, como los aminoglucósidos, las ansamicinas, los carbapenémicos, las cefalosporinas, los glucopéptidos, los macrólidos, las penicilinas, las cionolonas y las tetraciclinas, entre otros; cabe citar, en particular, los antibióticos utilizados
- 25 actualmente en la terapia de primera línea para tratar una infección por *Mtb*, como la isoniazida, las rifamicinas (por ejemplo, la rifampicina, la rifapentina y la rifabutina), el etambutol, la estreptomina, la pirazinamida y las fluoroquinolonas, así como los utilizados en la terapia de "segunda línea" por ejemplo rifampicina, rifapentina y rifabutina), etambutol, estreptomina, pirazinamida y fluoroquinolonas, así como los
- 30 utilizados en la terapia de "segunda línea" en sujetos infectados por *Mtb* que han demostrado resistencia a los fármacos, como ofloxacina, ciprofloxacina, etionamida, ácido aminosalicílico, cicloserina, amikacina, kanamicina y capreomicina;
- ✓ Tratamiento antivírico como el interferón alfa (IFNa y derivado pegilado) y análogos de nucleósidos/nucleótidos (NUC). Por ejemplo, la lamivudina, el entecavir, la telbivudina, el adefovir y el
- 35 tenofovir se utilizan actualmente para tratar el HBV. Otros antivirales son los inhibidores de la proteasa (por ejemplo, los inhibidores de la serina proteasa como el VX950 de Vertex), los inhibidores de la polimerasa y los inhibidores de la helicasa, que son adecuados para tratar la hepatitis C;
- ✓ Agonistas TLR e inhibidores de la N-glicosilación;
- ✓ Interleucinas (por ejemplo, IL-2, IL-6, IL-15, IL-24, etc.), interferones (por ejemplo, IFNa, IFNP o IFNy), factor de necrosis tumoral (TNF), factores estimulantes de colonias (por ejemplo, GM-CSF, C-CSF, M-CSF, etc.) y quimiocinas (por ejemplo, CXCL10, CXCL9, CXCL11, etc.);
- 40 ✓ ARNsi y oligonucleótidos antisentido dirigidos contra genes de organismos patógenos infecciosos o genes celulares asociados a la enfermedad objetivo.

Según una realización ventajosa, especialmente cuando la vacuna terapéutica está armada con un gen suicida, el

45 producto de combinación o los métodos según la presente invención pueden utilizarse en asociación con el profármaco correspondiente (véase la Tabla 1). El profármaco se administra de acuerdo con la práctica habitual (por ejemplo, por vía oral, sistemáticamente, etc.). Preferiblemente, la administración del profármaco tiene lugar después de la administración de la vacuna terapéutica (por ejemplo, al menos 3 días después de la administración de la vacuna terapéutica que codifica el gen suicida). Se prefiere la vía oral. Es posible administrar una dosis única de profármaco

50 o dosis repetidas durante un tiempo suficiente para que se produzca el metabolito tóxico en el sujeto. A título ilustrativo, es adecuada una dosis de 50 a 500 mg/kg/día, ventajosamente, una dosis de 200 mg/kg/día o, preferiblemente, una dosis de 100 mg/kg/día.

El producto combinado y el método de la invención también pueden utilizarse en combinación con uno o más adyuvante(s) o "inmunoestimulante" para mejorar la inmunidad (especialmente una inmunidad mediada por células T),

por ejemplo, a través de receptores tipo Toll (TLR) como TLR-7, TLR-8 y TLR-9. A título ilustrativo, tales adyuvantes incluyen, sin limitación, alumbre, emulsión de aceite mineral como, Freund's completa e incompleta (IFA), lipopolisacáridos (Ribi et al., 1986, Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p407-419), saponinas como ISCOMATRIX, AbISCO, QS21 (Sumino et al., 1998, J. Virol. 72: 4931; WO98/56415), compuestos de imidazo-quinolina como Imiquimod (Suader, 2000, J. Am Acad Dermatol. 43:S6), S-27609 (Smorlesi, 2005, Gene Ther. 12: 1324) y compuestos relacionados como los descritos en WO2007/147529; péptidos catiónicos como IC-31 (Kritsch et al., 2005, J. Chromatogr Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 822: 263-70), polisacáridos como Adjuvax y escualenos como MF59. Otros adyuvantes adecuados incluyen ARN ds como NAB2 con Lipofectin (Claudepierre et al., 2014, J. Virol 88: 5242-55) o 3pARN (Hornung et al., 2006, Science 314: 994-7), ambos estimulan las respuestas de IFN α a través de la activación de la helicasa citoplasmática MDA-5 y RIG-1.

Alternativamente o en combinación, la combinación o método según la invención también puede utilizarse en asociación con radioterapia. Los expertos en la materia pueden formular fácilmente protocolos y parámetros de radioterapia adecuados (véase, por ejemplo, Perez y Brady, 1992, Principles and Practice of Radiation Oncology, 2nd Ed. JB Lippincott Co; utilizando las adaptaciones y modificaciones apropiadas que resulten evidentes para los expertos en la materia). Los tipos de radiación que pueden utilizarse en el tratamiento del cáncer son bien conocidos en la técnica e incluyen haces de electrones, fotones de alta energía procedentes de un acelerador lineal o de fuentes radiactivas como el cobalto o el cesio, protones, y neutrones.

La presente divulgación también proporciona kits que incluyen las entidades activas del producto combinado de la divulgación en forma de kit. Un kit es una combinación empaquetada, opcionalmente, que incluye instrucciones de uso opcionalmente con otros componentes. En un ejemplo, un kit incluye al menos la vacuna terapéutica descrita en el presente documento en un envase y uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios descritos en el presente documento en otro envase. Dichos recipientes son preferiblemente frascos estériles de vidrio o plástico. Un kit preferente comprende una vacuna terapéutica basada en MVA (por ejemplo, un virus MVA que expresa el antígeno MUC1 asociado al tumor y la IL-2 humana) y un modulador o moduladores del punto de control inmunitario que se unen específicamente a CTLA-4 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA-4, como ipilimumab). Otro kit preferente comprende una vacuna terapéutica basada en MVA (por ejemplo, un virus MVA que expresa el antígeno MUC1 asociado al tumor y la IL-2 humana) y un modulador o moduladores del punto de control inmunitario que se unen específicamente a PD-1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1, como nivolumab o pembrolizumab). Otro kit preferente comprende una vacuna terapéutica basada en MVA (por ejemplo, un virus MVA que expresa el antígeno MUC1 asociado al tumor y la IL-2 humana) y un modulador o moduladores del punto de control inmunitario que se unen específicamente a PD-L1 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1, como MPDL3280A o BMS936559). Opcionalmente, el kit puede incluir dispositivos adecuados para llevar a cabo la administración de los agentes activos. El kit también puede incluir un prospecto con información relativa a las composiciones o componentes individuales y formas de dosificación del kit.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 ilustra los efectos sobre el volumen tumoral (Figura 1A) y la supervivencia de los ratones (Figura 1B) en un modelo tumoral subcutáneo CT26-CL25 de la administración del tampón de formulación (vehículo), MVATG18124 solo, el clon anti PD-1 RMP1.14 solo, una combinación tanto de MVATG18124 como del clon anti PD-1 RMP1.14 y una combinación tanto de MVATG18124 como del control de isotipo IgG2a de rata.

Figura 2 ilustra los efectos sobre la supervivencia de los ratones en el modelo de tumor metastásico CT26-CL25 de la administración de un MVA vacío (MVATGN33.1), MVATG18124 solo, un anticuerpo anti CTLA-4 solo, su control de isotipo IgG2b, una combinación de ambos MVATG18124 y anti CTLA-4 y una combinación de ambos MVATG18124 y el control de isotipo IgG2b.

Figura 3A ilustra el porcentaje de células CD8⁺CD3^{dim} reguladas (denominadas CD8^{dim}CD3^{dim} después en el presente documento) en pulmones disociados obtenidos de pulmones no tratados (es decir, ingenuos) o ratones tratados con MVATG18124, anti-CTLA-4 y tanto MVATG18124 como anti-CTLA-4. **La Figura 3B** ilustra un ejemplo de población CD8^{dim}CD3^{dim} (denominada CD8⁺CD3^{dim} en la Figura) en células pulmonares manchas de punto CD3/CD8 de ratones tratados con anti CTLA-4 y MVATG18124.

Figura 4 representa la población de células CD8^{dim}CD3^{dim} positivas para IFN- γ obtenida tras la inducción de ConA en muestras de pulmón obtenidas de ratones no tratados (es decir, ingenuos) o ratones tratados con MVATG18124, anti-CTLA-4 y ambos. **Figura 4A:** Inducción del pliegue inducido por ConA del porcentaje de células IFN γ ⁺ CD8^{dim}CD3^{dim} tras la incubación de células pulmonares con bmDCs para facilitar la activación. **Figura 4B:** Inducción del porcentaje de células CD8^{dim}CD3^{dim} IFN γ ⁺ inducida por ConA tras la incubación de células pulmonares con anti-CD28 para facilitar la activación.

Figura 5 ilustra el análisis ELISPOT de linfocitos esplénicos estimulados con el péptido específico de p-gal T9L3 mostró respuesta específica de p-gal en linfocitos esplénicos tratados con MVATG18124. Los datos brutos se transformaron en un gráfico de histograma. Los resultados se expresan como número de unidades formadoras de manchas (sfu) por 1×10^6 esplenocitos (media) para cada triplicado o cuatriplicado.

Figura 6 representa la inducción de células IFN- γ , CD107a y KLRG1 positivas en la población de células CD8^{dim}CD3^{dim} obtenida en muestras de pulmón estimuladas con el péptido T9L-3 (sombreado) o el péptido irrelevante T8G (punteado) tras el tratamiento con un vector vacío MVATGN33.1 solo o en combinación con anti-CTLA-4, MVATG18124 solo o en combinación con anti-CTLA-4 o anti-CTLA-4 solo.

Figura 7 ilustra el efecto proporcionado por el tratamiento con TG4010 sobre la supervivencia de los ratones y el volumen tumoral en un modelo de tumor CT26-MUC1. **Figura 7A:** Modelo de tumor de pulmón CT26-MUC1. Las células CT26-MUC1 se inyectaron iv. Los días 2 y 9, se inyectaron por vía intravenosa $5 \cdot 10^7$ pfu de TG4010, vector MVA vacío (MVATGN33.1) o tampón (SO8). Los ratones se pesaban dos veces por semana y se sacrificaban cuando perdían un 10% de peso. Se controló el porcentaje de supervivencia. **Figura 7B:** Modelo tumoral CT26-MUC1 s.c. Células CT26-MUC1 fueron inyectadas s.c. Los días 2 y 9, se inyectaron s.c. en el mismo flanco $1 \cdot 10^7$ pfu de TG4010, vector MVA vacío (MVATGN33.1) o tampón (SO8). Los ratones fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 2.000 mm³. Se muestran los volúmenes tumorales medios con SEM.

Figura 8 ilustra el efecto sobre la supervivencia de los ratones (**Figura 8A**) y el volumen tumoral (**Figura 8B**) proporcionado por el tratamiento con TG4010 en combinación con el anticuerpo anti PD-1 en el modelo de tumor s.c. CT26-MUC1. Los ratones BALB/c fueron inyectados s.c. con $2 \cdot 10^5$ células CT26-MUC1. En los días 2 y 9 después de la implantación del tumor, los ratones fueron tratados sc con TG4010 (también llamado MVATG9931) o un vector de control vacío a la dosis subóptima de $1 \cdot 10^6$ pfu seguida de la administración i.p. de 250 μ g anti PD-1 (RMP1.14, IgG2a, BioXCell) en los días 10, 13, 15 y 17. Los ratones fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 2.000 mm³. El porcentaje de supervivencia y los volúmenes tumorales medios se controlaron a lo largo del tiempo.

Figura 9 ilustra la supervivencia de ratones BALB/C inyectados s.c. con células tumorales CT26-MUC1 e inmunizados con dos inyecciones de 1×10^7 PFU de MVATGN33.1 o MVATG9931 los días D2 y D9 seguidas de administraciones i.p. de 250 μ g de Ab anti-PD-1 los días D10, D13, D15 y D17. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)

Ejemplos

Nos propusimos combinar enfoques de bloqueo de puntos de control inmunitarios con vectores terapéuticos de MVA con el objetivo de inducir una respuesta inmunitaria de células T específica de antígeno con MVA y liberar los frenos de la generación de células T con anticuerpos de puntos de control inmunitarios. Las pruebas preclínicas de los efectos sinérgicos de los bloqueantes de puntos de control inmunitarios combinados con vectores virales debían demostrarse en modelos tumorales de ratón. Esto implica el uso de i) anticuerpos antipunto de control inmunitario específicos de murino y ii) un vector MVA que exprese el antígeno.

El vector MVA elegido para estos estudios (MVATG18124) contiene el gen bacteriano LacZ que codifica el modelo Ag de la beta-galactosidasa (SEQ ID NO: 3) bajo el control del promotor del poxvirus pH5R (SEQ ID NO: 4). El promotor pH5R se aisló mediante amplificación por PCR a partir de la cepa Copenhagen del virus Vaccinia utilizando los cebadores apropiados. El gen *E. Coli* LacZ se obtuvo mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores otgl9678 (SEQ ID NO: 5) y otgl9679 (SEQ ID NO: 6) con pCMVBeta (Clontech) como molde de ADN. Los genes pH5R y LacZ se clonaron en un plásmido lanzadera entre las secuencias MVA que se extienden de las posiciones 142006 a 142987 y de las posiciones 142992 a 143992 según la secuencia EF675191.1 del GenBank. MVATG18124 se generó en células de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) por transfección del plásmido lanzadera en CEF previamente infectadas con MVA, lo que dio lugar a la recombinación homóloga entre el ADN del plásmido lanzadera y el genoma MVA y a la inserción del casete pH5R-LacZ en la delección III. Los clones recombinantes de MVA se aislaron utilizando tecnología convencional (Lullo et al., 2010, J Virol Methods 163: 195-204) y los clones seleccionados se controlaron mediante PCR y luego se amplificaron en células CEF. Las existencias de virus se valoraron en células DF1 mediante ensayo de placa. La ausencia de mutación en el ADN insertado y en la región circundante se comprobó mediante secuenciación del ADN.

En primer lugar, se eligió como objetivo el bloqueador del punto de control inmunitario PD-1 murino (mPD-1) con un anticuerpo adecuado. Se eligió el anticuerpo anti mPD-1 de rata RMP1-14 (BioXcell). Se demostró que este anticuerpo bloquea la interacción de mPDI con sus ligandos (Yamazaki et al., 2005, J. Immunol. 175(3): 1586-92).

La combinación de inhibidores de mPD-1 con el antígeno MVATG18124 se probó *in vivo* en dos modelos de ratón, respectivamente modelos de tumor metastásico y subcutáneo. La línea celular de carcinoma de colon CT26.CL25 (ATCC CRL-2639), transducida con el gen LacZ y, por tanto, con expresión estable de beta-galactosidasa, se inyectó por vía subcutánea para generar tumores palpables (modelo subcutáneo) o por vía intravenosa para generar metástasis pulmonares. A continuación, se trató a los ratones con MVATG18124 que expresaba beta-galactosidasa y bloqueantes de puntos de control inmunitarios específicos de murinos como anticuerpos anti PD-1 o anti CTLA-4.

EJEMPLO 1 de referencia: Combinación de MVATG18124 con anti-PD-1 Mab

La combinación del inhibidor de mPD-1 (clon comercial RMP1-14; BioXCell) con MVATG18124 que expresa beta-gal se probó *in vivo* en un modelo de tumor subcutáneo. Los ratones Balb/c fueron inyectados subcutáneamente con 2×10^5 células CT26.CL25. Los días 2 y 9 después de la implantación celular, los ratones fueron inmunizados por vía intravenosa con 1×10^4 pfu de MVATG18124 o vehículo de formulación como control negativo en combinación con 4 administraciones intraperitoneales (ip) en los días 10, 13, 15 y 17 de 250 μ g ya sea de anticuerpo murino anti PD-1

RMP1.14 (BioXcell) o su control de isotipo IgG2a (clon 2A3) . En otros términos, se probaron 5 grupos de 10 ratones; un primer grupo tratado con MVATG18124 recibiendo 2 inyecciones iv (grupo 1); un segundo grupo tratado con 4 inyecciones ip de anticuerpo anti-PD-1 (grupo 2); un tercer grupo tratado tanto con MVATG18124 como con anticuerpo anti-PD-1 que recibió 2 inyecciones iv del MVATG18124 terapéutico y 4 inyecciones ip de anticuerpo anti-PD-1 (grupo 3); un cuarto grupo que recibió 2 inyecciones iv del MVATG18124 terapéutico y 4 inyecciones ip de anticuerpo isotipo (grupo 4) y un grupo de control que recibió el tampón de formulación (grupo 5). El crecimiento tumoral y la supervivencia se midieron a lo largo del tiempo, como se ilustra en la Figura 1.

Como era de esperar, el volumen tumoral aumentó muy rápidamente en el grupo de control que recibió tampón de formulación. También se observó un rápido crecimiento tumoral en el grupo que recibió el anticuerpo mPD-1. Se observó un ligero retraso en el volumen tumoral en los grupos que recibieron MVATG18124 solo o en combinación con el control de isotipo. El crecimiento tumoral se redujo considerablemente en el grupo de "combinación" inyectado con anticuerpos MVATG18124 y mPD-1 (Figura 1A). Los efectos sobre la supervivencia de los ratones son más pronunciados, ya que aproximadamente el 70% de los ratones tratados con anticuerpos MVATG18124 y mPD-1 siguen vivos más de 100 días después de la implantación del tumor, frente al 10% del grupo de animales tratados con MVATG18124 (diferencias significativas). Por el contrario, los animales de control, los tratados con anticuerpos y los tratados con isotipos murieron en menos de 50 días (Figura 1B).

EJEMPLO 2 de referencia: Combinación de MVATG18124 con anti-CTLA-4 Mab

La combinación del inhibidor de CTLA-4 (clon comercial 9D9; BioXCell) con la expresión de antígenos MVATG18124 se probó *in vivo* en un modelo metastásico CT26-CL25. Se inyectaron por vía intravenosa (iv) 2×10^5 células CT26.CL25 en ratones Balb/c. Los días 2 y 9, se administró por vía intravenosa MVATG18124, que codifica la betagalactosidasa, o su vector vacío de control MVAN33.1, a una dosis de 1.10^4 pfu. 250 µg del anticuerpo murino anti-CTLA4 9D9 (BioXCell) o su control de isotipo IgG2b (clon MPC-11 BioXCell) fueron inyectados intraperitonealmente (ip) en los días 3 y 10. La supervivencia de los ratones se siguió durante más de 60 días. La dosis viral de 1.10^4 pfu se identificó como la dosis óptima para aumentar las tasas de supervivencia en este modelo tumoral (datos no mostrados).

Como se ilustra en la Figura 2, el tratamiento con anticuerpos anti CTLA4 o su control de isotipo solo mostró efectos débiles comparables a los observados con el vector MVA vacío MVATGN33.1 (35% de supervivencia en el día 20 para los tres grupos). Por el contrario, el tratamiento con MVATG18124 solo o en combinación con el control de isotipo aumentó la supervivencia de los ratones (35% de supervivencia en el día 35 para ambos grupos). El grupo de ratones tratados con la combinación de MVATG18124 y anticuerpos anti-CTLA4 aumentó considerablemente el porcentaje de supervivencia del 35% a más de 60 días.

Así, hemos demostrado claramente un claro efecto antitumoral del tratamiento de la vacuna inmunoterapéutica basada en MVA y el bloqueador de puntos de control inmunitario anti CTLA4.

EJEMPLO 3: Estudios de poblaciones de células linfoides en pulmones disociados de ratones tratados

Determinación de células CDS^{dim} CD8^{dim} IFN γ positivas

Se examinó la respuesta celular en ratones tratados con el anticuerpo anti-CTLA-4, con el MVA que expresaba el antígeno o con ambos, así como en ratones no tratados (es decir, ingenuos). Cinco ratones BALB/c por grupo fueron inyectados iv con MVATG18 124 (1.10^4 pfu) los días 1 y 8 o ip con 250 µg anti CTLA-4 (clon 9D9, BioXCell) los días 2 y 9 o ambos. Los ratones fueron sacrificados el día 15 y se aislaron los pulmones. Se juntaron los pulmones de los 5 ratones por grupo, se cortaron en trozos pequeños en tubos C (Miltenyi) y se disociaron enzimáticamente con un kit de disociación tisular (Miltenyi, 130-096-730) utilizando el OctoMACS suave (Miltenyi) según las recomendaciones del fabricante.

Las células derivadas del pulmón se sembraron a 2.10^6 células/pocillo (placa de 96 pocillos) en medio específico para células T (TexMACS, Miltenyi). Las células se activaron mediante co-cultivo con células dendríticas murinas derivadas de médula ósea cargadas de péptidos (bmDCs): las bmDCs de ratones BALB/c se generaron a partir de células de médula ósea maduras en presencia de GM-CSF murino (Peprotech, 100 µg/ml) durante 10 días. Alternativamente, se facilitó la activación mediante incubación con 1µg de anti CD28 (clon PV-1). La concanavalina A (ConA, 5µg/ml) sirvió como activador inespecífico. Se añadió anticuerpo anti CD107a (clon eBioID4B) para marcar las células degranulantes. La secreción de citoquinas se bloqueó tras una hora de incubación añadiendo GolgiPlug /Brefeldin (1:1.000, BD Biosciences). Tras 5 horas de incubación total, se lavaron las células y se tiñeron para determinar su viabilidad (LiveDead, kit de tinción de células muertas con violeta fijable) y los marcadores de superficie CD8a (clon 53-6.7) y CD3s (clon 145-2C11). Las células se tiñeron intracelularmente para IFN- γ (clon XMG1.2) utilizando el kit BD Cytofix /Cytoperm (BD Biosciences). Las células se fijaron y analizaron mediante citometría de flujo (Navios, Beckman Coulter).

El tratamiento combinado de MVATG18124 y anti CTLA-4 en ratones BALB/c ingenuos conduce a la aparición de una subpoblación de células linfocitarias denominadas CD8^{dim}CD3^{dim} en el pulmón. La Figura 3B representa un ejemplo de población CD8^{dim}CD3^{dim} en células pulmonares CD3/CD8 mancha de puntos de ratones tratados con anti CTLA-4 y MVATG18124. En la Figura 3A se ilustran los porcentajes de linfocitos vivos CD8^{dim}CD3^{dim} reguladas en dos experimentos independientes. Más concretamente, la población de CD8^{dim}CD3^{dim} se incrementó claramente tras el

tratamiento con MVATG18124 y aún más tras el tratamiento combinatorio con MVATG18124 + anti CTLA-4.

A continuación, se evaluó el porcentaje de células intracelulares IFN γ en la población CD8^{dim}CD3^{dim}. Dentro de esta población CD8^{dim}CD3^{dim}, la mayor inducción de células IFN- γ se observó en los ratones tratados con MVATG18124 + anti CTLA-4 (Figuras 4A y 4B).

- 5 En resumen, el tratamiento combinatorio de MVATG18124 y anti CTLA-4 en ratones BALB/c ingenuos conduce a la aparición de una población de células linfocitarias CD8^{dim}CD3^{dim} en el pulmón. Tras la estimulación con ConA y un alto porcentaje de CD8^{dim}CD3^{dim} de ratones tratados con MVATG18124 + anti CTLA-4 pueden ser inducidos a secretar IFN- γ .

La población de células CD3^{dim}CD8^{dim} se analizó con mayor detalle.

- 10 ✓ En el curso de nuestros análisis, observamos que la población CD3^{dim}CD8^{dim} era positiva para la lectina de células asesinas como receptor G1 (KLRG1⁺) y negativa o baja para CD127 (IL-7Ra) (CD127^{bajo}). Este fenotipo se asocia con células efectoras de vida corta (SLEC) experimentadas con antígenos (Obar et al., 2011, J Immunol., doi: 10.4049/jimmunol.1102335; Sarkar et al., 2008, J Exp Med 205(3): 625-40).
- 15 ✓ La población CD3^{dim}CD8^{dim} KLRG1⁺ infiltrada/presente en el pulmón de ratones tratados con MVATG18124 y anti CTLA-4 responde a un estímulo antígeno-específico con secreción de IFN- γ y degranulación (CD107a).

Determinación de células IFN- γ , CD107a y KLRG1 positivas en la población de células CD8^{dim}CD3^{dim}.

- 20 Como se ha descrito anteriormente, los ratones BALB/c fueron inyectados i.v. con MVA- β -gal o un vector vacío MVATGN33.1 a 1.10⁴ pfu. Los días 3 y 10, los ratones recibieron 250 μ g anti CTLA-4 i.p. Los pulmones se tomaron el día 14 y se disociaron enzimáticamente. Las células derivadas del pulmón se sembraron a 2.10⁶ células/pocillo (placa de 96 pocillos) en medio específico para células T (TexMACS, Miltenyi), se activaron mediante incubación con 1 μ g de anti CD28 (clon PV-1) y se estimularon con un péptido específico de P-gal (T9L-3) o un péptido de control (T8G) en presencia de anticuerpo anti CD107a (clon eBio1D4B) para marcar las células degranuladoras. La secreción de citoquinas se bloqueó tras una hora de incubación añadiendo GolgiPlug /Brefeldin (1:1.000, BD Biosciences). Tras un tiempo total de incubación de 5 h, las células se lavaron y se tiñeron para determinar su viabilidad (LiveDead, kit de tinción de células muertas con violeta fijable) y para los marcadores de superficie CD8a (clon 53-6.7), CD3s (clon 145-2C11) y KLRG1 (clon 2F1/KLRG1). Las células se tiñeron intracelularmente para IFN- γ (clon XMGI.2) utilizando el kit BD Cytofix /Cytoperm (BD Biosciences). Las células se fijaron y analizaron por citometría de flujo (Navios, Beckman Coulter). Después de 5 horas, las células y teñidas CD8a.

- 30 El tratamiento con MVATG18124 o con un vector de control vacío, y aún más la combinación de MVATG18124 y anti CTLA-4 en ratones BALB/c ingenuos conducen a la aparición de una población de linfocitos CD8^{dim}CD3^{dim}KLRG1⁺ en el pulmón. Tras la estimulación ex vivo con el péptido p-gal T9L-3, esta población secretó IFN γ y degranuló (CD107a) y, como se ilustra en la Figura 6, el porcentaje fue mayor tras el tratamiento con MVATG18124 y anti CTLA-4 que en los otros grupos tratados con el vector de control (MVATGN33.1 solo o con anti CTLA-4), con MVATG18124 solo o con anti CTLA-4 solo. Como era de esperar, la estimulación con un péptido irrelevante (péptido T8G) no produjo tal inducción.

En conclusión, el tratamiento con MVATG18124 y anti CTLA-4 aumenta la respuesta específica b-gal en una población celular CD3^{dim}CD8^{dim}KLRG1⁺ en el pulmón.

EJEMPLO 4 de referencia: Secreción de IFN-gamma

- 40 Además, se investigó el número de linfocitos esplénicos secretores de IFN γ tras el tratamiento de ratones BALB/c con MVATG18124 o MVAN33.1 a 1.10⁴ pfu (D1 y 8) y anti CTLA-4 o su control de isotipo (D2 y D9, 250 μ g ip). La medición se realizó el día 14 mediante el ensayo ELISpot (inmunoabsorción ligada a enzimas de puntos).

Preparación de placa

- 45 El día anterior a los experimentos, las placas ELISpot de membrana (Millipore, ref. MSIPS4W10) se humedecieron previamente con 15 μ l de etanol al 35% por pocillo con un tiempo máximo de incubación de 2 min. Las placas se lavaron cinco veces con 200 μ l por pocillo de agua estéril.

- 50 Las placas ELISpot se recubrieron con un anticuerpo monoclonal IFN- γ de rata anti-ratón (AN18 Mabtech, ref. 3321-3-1000) diluido a 15 μ g/ml en DPBS estéril (Sigma, ref. D8357) (100 μ l/pocillo). Se cubrieron las placas y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces con PBS estéril (200 μ l/pocillo) y se saturaron durante 1 h a 37 °C con 200 μ l/pocillo de medio RPMI 1640 completo (medio RPMI1640, (Sigma R0883); L-Glutamina 2 mM, (Sigma G6392); Gentamicina 0.01 g/L (Schering Plough U570036); Suero Ternera Fetal 10 % (JRH 12003-1000M) 550 μ l de una solución 5x10⁻² M bmercaptoetanol).

Preparación de las muestras

Para la evaluación ex vivo de la frecuencia de las células T CD8⁺ específicas inducidas por la inmunización, los

animales eutanasiados fueron esplenectomizados 7 días después de la última inmunización. Los bazo del mismo grupo se agruparon en un colador celular en un pocillo de una placa de cultivo de 6 pocillos que contenía 5 ml de medio completo. Los bazo se aplastaron con un pistón de jeringa y se desechó el colador celular. Los esplenocitos se recogieron con 8 ml de medio completo y se transfirieron a un tubo falcon de 15 ml. La suspensión de esplenocitos se colocó sobre 4 ml de medio celular de separación Lympholyte®-M (Cedarlane, ref. CL5O35) y se centrifugó (20 min, 1.500 xg, temperatura ambiente). Se recogió la interfase que contenía linfocitos y se enjuagó tres veces con 10 ml de PBS. Entre cada paso de aclarado, se centrifugaron las células (4 min a 400 xg) y se desecharon los sobrenadantes. Los glóbulos rojos restantes se lisaron añadiendo sobre el precipitado de linfocitos 2 ml de tampón de lisis de RBC 1 x (solución 10 x: Solución lisante BD Pharm Lyse™, ref. 555899) diluida en agua estéril. Cada tubo se agitó suavemente en vórtex inmediatamente después de añadir la solución de lisis y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La lisis se remató añadiendo 10 ml de DPBS seguido de centrifugación 4 min a 400 xg, las células se resuspendieron en 10 ml de medio RPMI 1640 completo. Las células se contaron con un contador celular Z2 (Beckman Coulter) y la concentración celular se ajustó a 1×10^7 células por ml en medio RPMI 1640 completo.

Ensayo

Para realizar el ensayo ELISpot, se añadieron 100 µl de suspensión de linfocitos de cada grupo (1×10^6 células) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos recubierta. Una condición dada se probó por triplicado o por cuadruplicado. Se añadieron 100 microlitros de los diferentes péptidos indicados (2 µg/ml en medio RPMI 1640 completo) a la suspensión celular. ConA (Sigma, ref. C5275) se utilizó como control positivo (5 µg/ml de concentración final) el péptido específico de MVA (S9L-8) se utilizó como control de inmunización. A continuación, las placas se incubaron a 37 °C en un 5 % de CO₂ durante 16 a 20 horas. A continuación, las placas se lavaron tres veces con DPBS (200 µl). El anticuerpo monoclonal anti-ratón IFN-γ biotinilado de rata (Mabtech, ref.3321-6-1000) se diluyó a 1 µg/ml en tampón de mezcla de anticuerpos (PBS, 0,5% SVF) y se distribuyó a 100 µl/pocillo. Las placas se incubaron 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad y después se lavaron tres veces en DPBS (200 µl). Cien microlitros de Extravidina-Fosfatasa alcalina (SIGMA, ref. E2636) (Diluida 1/5.000 en tampón de mezcla de anticuerpos) se añadieron a cada pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, las placas se lavaron tres veces en DPBS (200 µl). Se añadieron 100 microlitros de BCIP/NBT (Sigma, ref. B5655, una cápsula en 10 ml de agua MilliQ.) a cada pocillo hasta que se formaran manchas azules y, a continuación, las placas se lavaron a fondo con agua del grifo y se secaron.

Adquisición de datos

Los puntos se contaron con un lector ELISpot (CTL Immunospot reader, S5 UV). Se realizó un control de calidad visual (comparando los escaneados de la máquina y las placas) en cada pocillo para garantizar que los recuentos proporcionados por el lector ELISpot coinciden con la realidad de la imagen. Los resultados se expresaron como número de unidades formadoras de manchas (pfu) por 1×10^6 linfocitos esplénicos (media) para cada triplicado o cuadruplicado. La respuesta ELISpot específica se determinó con el método DFR(eq) (Moodie et al., Cancer Immunol Immunother. 2010 Oct;59(10):1489-501) o con un punto de corte empírico calculado como el número medio de puntos de los pocillos en blanco más dos veces la desviación estándar de este número medio de puntos.

Como se muestra en la Figura 5, el análisis ELISpot de linfocitos esplénicos estimulados con el péptido específico de p-gal T9L3 mostró una respuesta específica de p-gal en linfocitos esplénicos tratados con MVATG18124. Las respuestas específicas aumentaron aún más tras el tratamiento combinatorio con anti CTLA-4, pero no con su control de isotipo. La estimulación con el péptido inespecífico T8G no mostró ningún aumento de las células secretoras de IFN-γ.

EJEMPLO 5: Efecto combinatorio de TG4010 (MVA-MUC1-IL-2) y anti PD-1 (RMP1.14) en un modelo tumoral MU1-positivo basado en CT26

TG4010 es un vector MVA que codifica la secuencia completa de ADNc de MUC1 e IL-2 humanas. La eficacia antitumoral proporcionada por este vector se probó en una línea celular MUC1-positiva basada en CT26 que da lugar a tumores MUC1-positivos tras inyección s.c., así como a tumores pulmonares tras inyección i.v.

Generación de la línea celular CT26-MUC1 La línea celular de carcinoma de colon murino CT26 WT (ATCC CRL-2638) se transfectó de forma estable con el plásmido pTG5077 que codifica la secuencia completa de ADNc de MUC1 humano bajo el control del promotor CMV, así como un gen de resistencia a G418 bajo el control del promotor SV40. Las células CT26 se transfectaron mediante Lipofectamine LTX con pTG5077, y se cultivaron en presencia de 0,4 mg/ml de G418 para seleccionar transfectantes estables. Después de 14 días, las células vivas se marcaron con un anticuerpo monoclonal contra MUC1 (H23 + segundo anticuerpo Goat anti ratón -FITC). Las células positivas se clasificaron (FACS ARIA), se transfirieron a placas de 96 pocillos a 1 célula/pocillo. Se analizó la expresión estable de MUC1 en los clones en crecimiento mediante citometría de flujo hasta el día 60 después de la transfección. A continuación, se comprobó la capacidad de cuatro clones que expresaban MUC1 de forma estable para inducir el crecimiento tumoral en ratones BALB/c tras inyección sc y tras inyección iv. Se retuvo un clon tras verificar que los tumores implantados s.c. y los tumores de pulmón obtenidos tras inyección iv eran MUC1-positivos.

Eficacia terapéutica de TG4010 en el modelo tumoral CT26-MUC1

Se inyectaron $2 \cdot 10^5$ células CT26-MUC1 s.c. o i.v. en ratones BALB/c para generar tumores sc o tumores pulmonares, respectivamente. Los días 2 y 9 después del desafío tumoral, los ratones fueron tratados s.c. o i.v., respectivamente, con $1 \cdot 10^7$ TG4010 o el vector vacío de control MVATGN33.1. El volumen tumoral medio o el porcentaje de supervivencia se controlaron a lo largo del tiempo. TG4010 mostró una mejora significativa de la supervivencia en el modelo de tumor de pulmón iv/iv ($p=0,00642$) y una reducción significativa del crecimiento tumoral en el modelo de tumor sc/sc (véanse las Figuras 7A y 7B, respectivamente).

Eficacia terapéutica de TG4010 en combinación con anti-PDI en el modelo tumoral CT26-MUC1

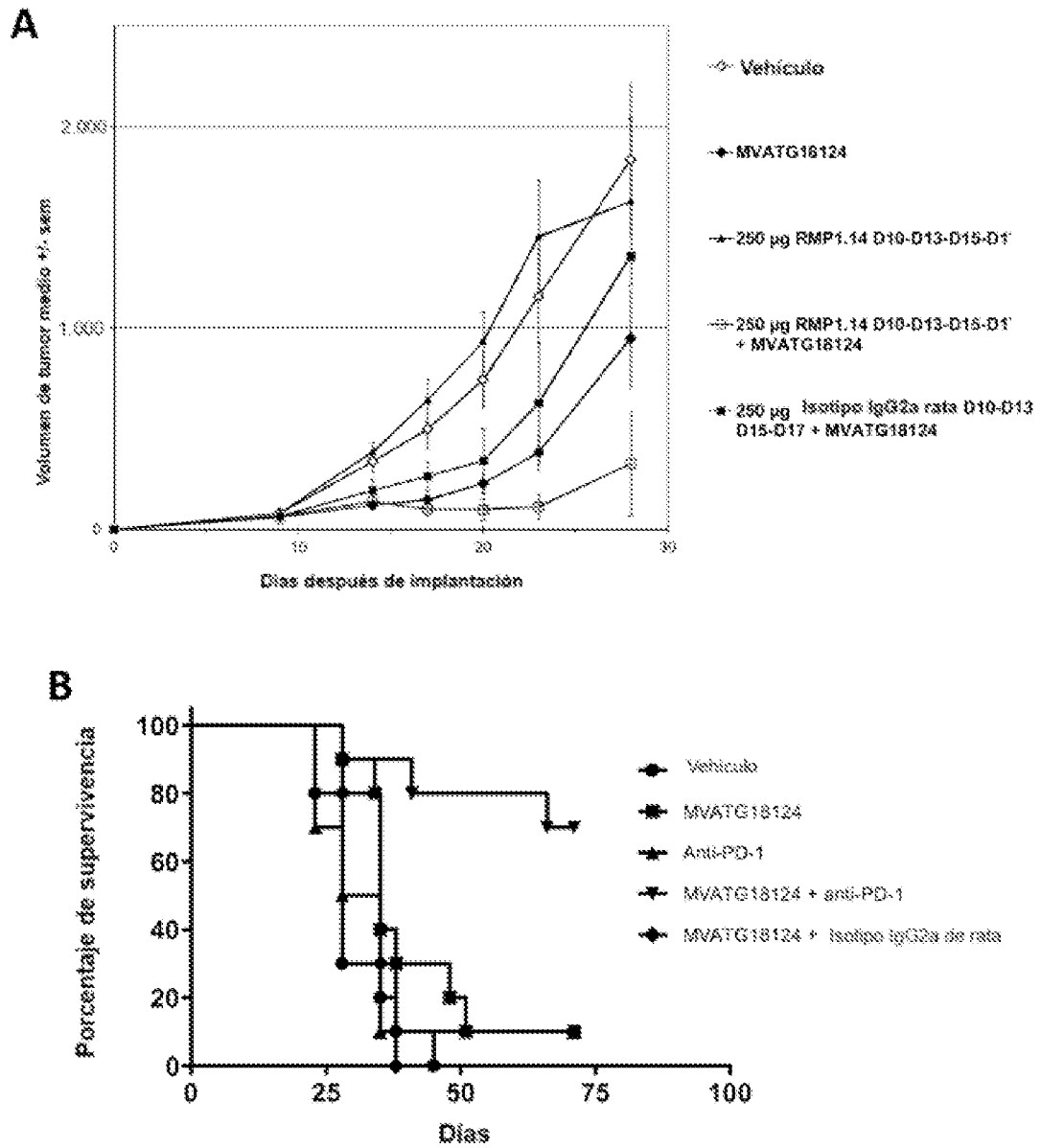
Los ratones BALB/c fueron inyectados s.c. con $2 \cdot 10^5$ células CT26.MUC1. Los días 2 y 9 después de la implantación del tumor, los ratones fueron tratados sc con TG4010 (también designado MVATG9931) o un vector de control vacío (MVATGN33.1) a la dosis subóptima de $1 \cdot 10^6$ pfu. Los días 10, 13, 15 y 17, los ratones recibieron 250 µg anti PD-1 (RMP1.14, IgG2a, BioXCell). Los ratones fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 2.000 mm^3 . Se realizó un seguimiento del volumen tumoral y la supervivencia de los animales a lo largo del tiempo.

Como se ilustra en la Figura 8B, los tumores empezaron a crecer en el día 16 y el volumen tumoral aumentó rápida y regularmente con el tiempo en el grupo de control que recibió tampón de formulación, como era de esperar. Se observó un retraso en el crecimiento tumoral en los grupos que recibieron anticuerpo mPD-1, TG4010 solo y MVATGN33.1 vacío solo o con anti-PD-1. Por el contrario, el crecimiento tumoral se redujo considerablemente en el grupo de "combinación" inyectado tanto con TG4010 como con el anticuerpo mPD-1. También se observan efectos sobre la supervivencia de los ratones, como se muestra en la Figura 8A. De hecho, alrededor del 70% de los ratones tratados tanto con TG4010y el anticuerpo mPD-1 siguen vivos más de 60 días después de la implantación del tumor, mientras que aproximadamente el 10% y el 20% de los animales tratados con el control vacío (sin o con el anticuerpo anti-PD-1) seguían vivos. Sólo el 30 y el 40% de los animales tratados respectivamente con TG4010 solo o con anticuerpo anti-PD- 1 sobrevivieron 2 meses tras la implantación del tumor. En cambio, el grupo de control tratado con tampón de formulación murió en menos de 45 días. El aumento de la supervivencia proporcionado por el tratamiento combinatorio se mantuvo a lo largo del tiempo (120 días después de la implantación del tumor) (datos no mostrados).

También se llevó a cabo el mismo experimento anterior, salvo que los ratones fueron tratados con 2 inyecciones de $1 \cdot 10^7$ pfu de MVATG9931 (es decir, TG4010) o del vector de control negativo MVATGN33.1, opcionalmente seguidas de cuatro administraciones i.p. de 250µg de anti-PDI. Sin embargo, como se ilustra en la Figura 9, se aprecia un aumento sustancial de la mediana de supervivencia de 70 días para el tratamiento combinatorio en comparación con los 46 y 49,5 días de los ratones tratados con MVATG9931 y anti-PD-1, respectivamente. Obsérvese también que el aumento de la supervivencia es significativo ($p = 0,008$) cuando se compara la combinación de MVATG9931 y tratamientos anti-PD-1 con el virus vacío de control MVATGN33.1 y modalidades anti-PD-1, lo que sugiere una interacción específica de MUC-I a esta dosis de virus. A la dosis más alta de 1×10^7 PFU para MVATG9931, la mejor actividad terapéutica entre todas las condiciones ensayadas se consigue para la combinación con significación alcanzada frente a cada modalidad de tratamiento por sí sola ($p = 0,014$ frente a MVATG9931 y $p < 0,001$ frente a anti-PD-1; Fig. 9). En conclusión, la combinación de MVATG9931 con un anticuerpo anti-PD-1 permitió obtener el mejor índice terapéutico en el ectópico CT26-MUC1 en comparación con cada tratamiento por separado, lo que allana el camino para la evaluación clínica de este enfoque terapéutico combinado

REIVINDICACIONES

1. Producto combinado que comprende al menos (i) una vacuna terapéutica y (ii) uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios como composiciones distintas, para su utilización en el tratamiento de una enfermedad proliferativa o infecciosa en un sujeto humano;
- 5 en la que dicha vacuna terapéutica comprende un virus MVA que codifica el antígeno MUC-1 y la IL-2; un virus MVA que codifica una fusión de los antígenos NS3 y NS4 del HCV y el antígeno NS5b; un virus MVA que codifica los antígenos no oncogénicos E6 y E7 anclados a la membrana del HPV-16 y la IL-2; un virus MVA que codifica el gen suicida FCU1; o un virus MVA que codifica una combinación de antígenos de la tuberculosis; y
- 10 en el que al menos uno de dichos uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios es un anticuerpo capaz de antagonizar al menos parcialmente la proteína Muerte Programada 1 (PD-1) y que se une específicamente a PD-1 humana; y
- en el que la administración de dicha vacuna terapéutica comienza antes de la administración de dicho modulador de puntos de control inmunitario y el periodo de tiempo entre la primera administración de la vacuna terapéutica y la primera administración del modulador de puntos de control inmunitario es de varias semanas; y
- 15 en el que las administraciones de dicha vacuna terapéutica y dicho uno o más inhibidores de puntos de control inmunitarios se intercalan; y
- en el que el intervalo de tiempo entre cada administración de vacuna terapéutica es de 1 semana a 3 semanas; y el intervalo de tiempo entre cada administración de modulador(es) del punto de control inmunitario es de 1 semana a 6 semanas.
- 20 2. El producto combinado para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho uno o más modulador(es) del punto de control inmunitario es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado que se une específicamente a PD-1.
3. El producto combinado para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en Nivolumab, Lanbrolizumab y pidilizumab.
- 25 4. El producto combinado para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende de 0,5mg/kg a 25mg/kg del modulador o moduladores del punto de control inmunitario, preferiblemente de 1mg/kg a 20mg/kg, más preferiblemente de 2mg/kg a 15mg/kg, con una preferencia específica por dosis de 3mg/kg a 10mg/kg.
5. El producto de combinación para utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha combinación comprende de 10⁶ pfu a 10¹⁰ pfu; y preferiblemente de 10⁷ pfu a 10⁹ pfu de un vector MVA.
- 30 6. El producto combinado para su utilización según la reivindicación 5, en el que el modulador o moduladores del punto de control inmunitario comprendidos en dicha combinación se administran por vía intravenosa o intratumoral y en el que la vacuna terapéutica comprendida en dicha combinación se administra por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea o intratumoral.
7. El producto combinado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende de 4 a 15 administraciones de 10⁷ a 10⁹ pfu de una vacuna terapéutica basada en MVA a intervalos de aproximadamente 1 a 3 semanas intercaladas con 2 a 6 administraciones de 3 a 10 mg/kg de anticuerpo(s) antipunto de control inmunitario cada 2 o 3 semanas.
- 35 8. El producto combinado para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha enfermedad proliferativa es un cáncer y especialmente cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer gástrico, carcinoma de vías biliares, cáncer de endometrio, cáncer de páncreas y cáncer de ovario, especialmente un cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCL) y en la que dicha enfermedad infecciosa es el resultado de una infección con un virus seleccionado del grupo que consiste en virus del herpes virus del papiloma, poxvirus, retrovirus, HCV, HBV y virus de la gripe
- 40



Figuras 1A y 1B

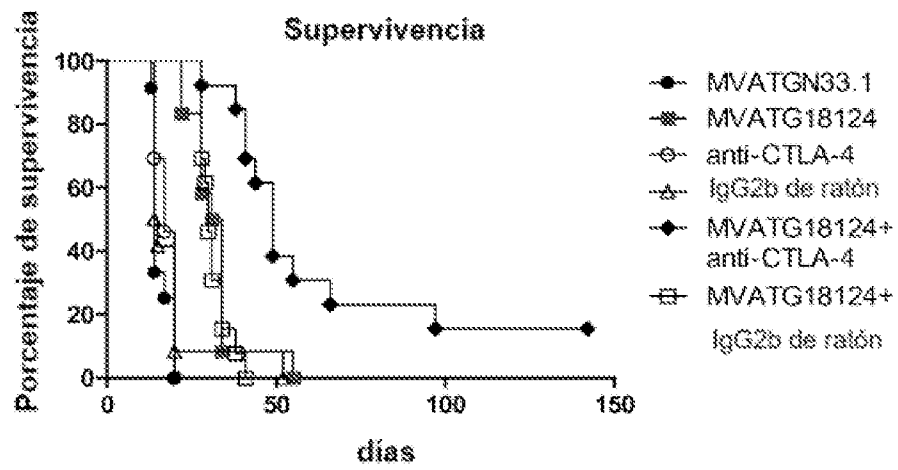
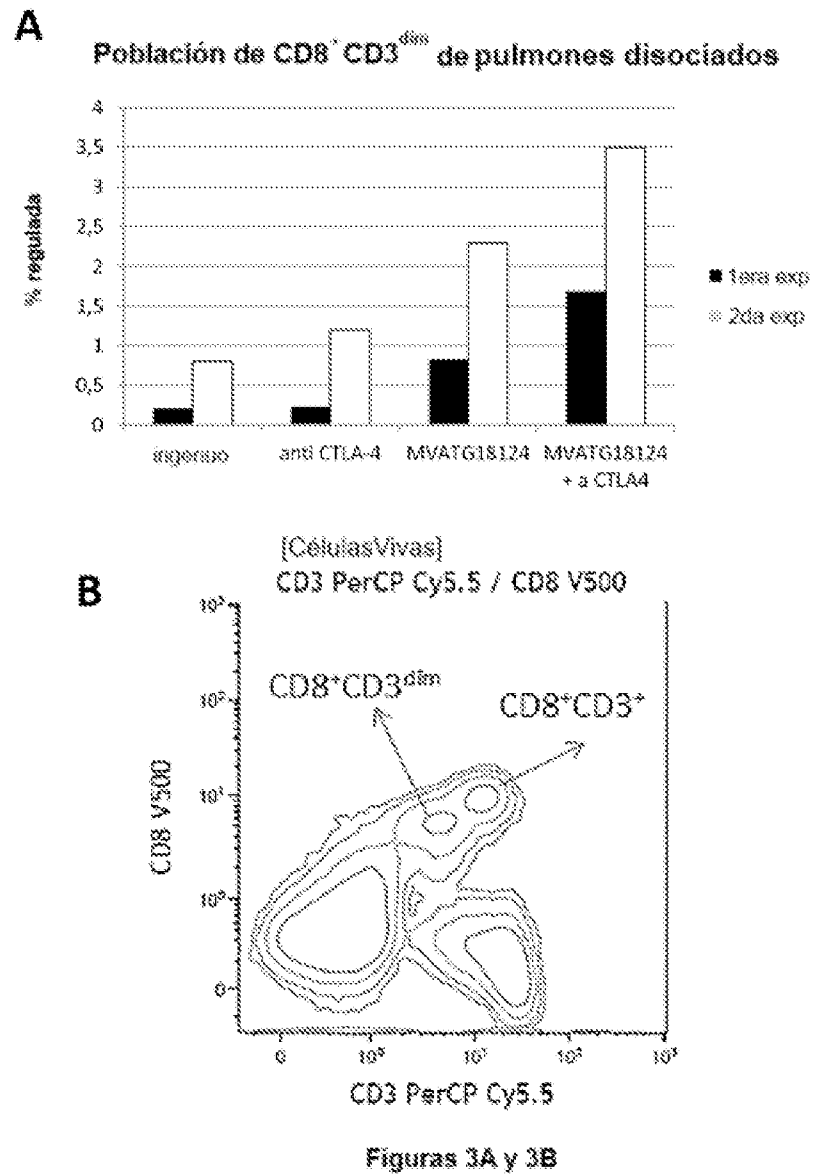
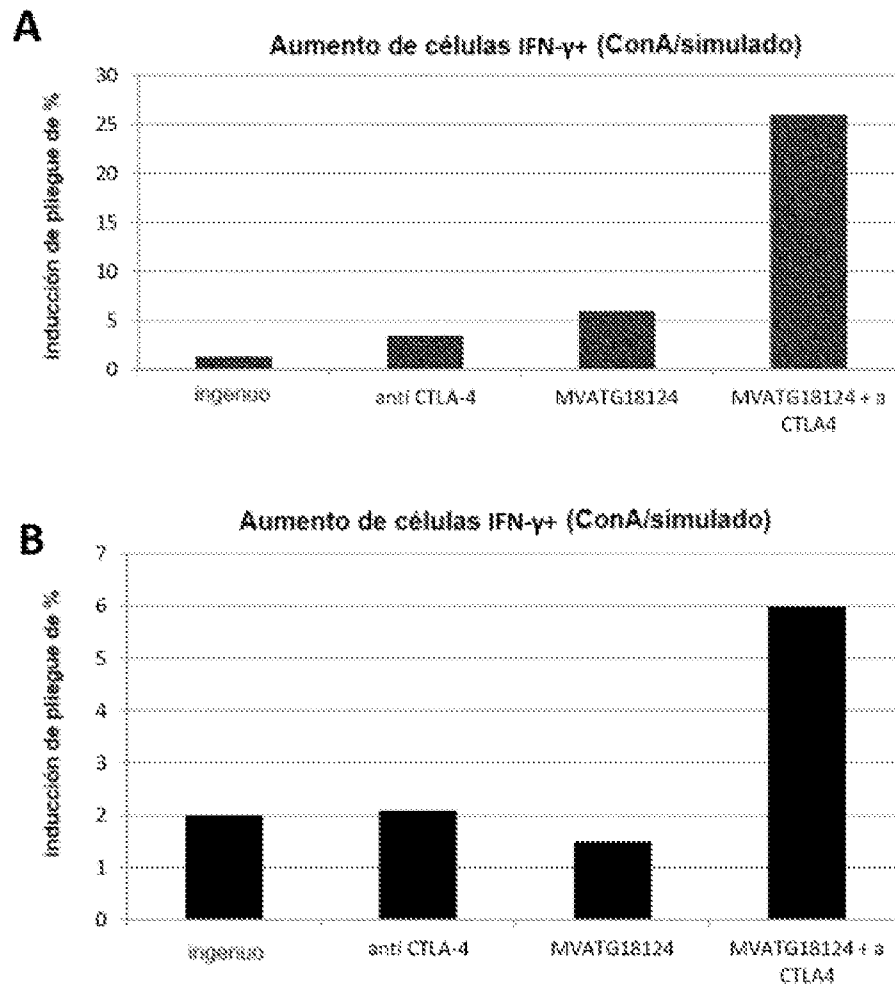


Figura 2





Figuras 4A y 4B

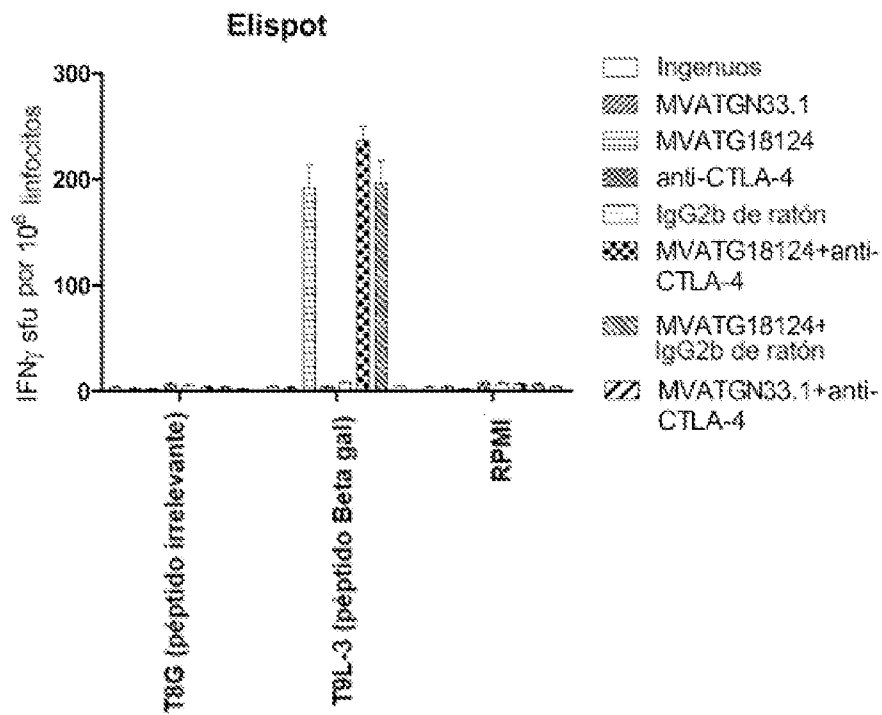


Figura 5

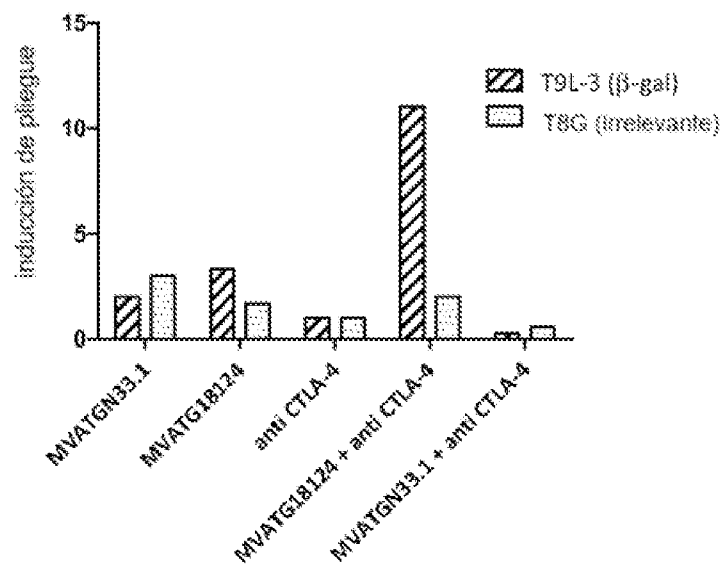
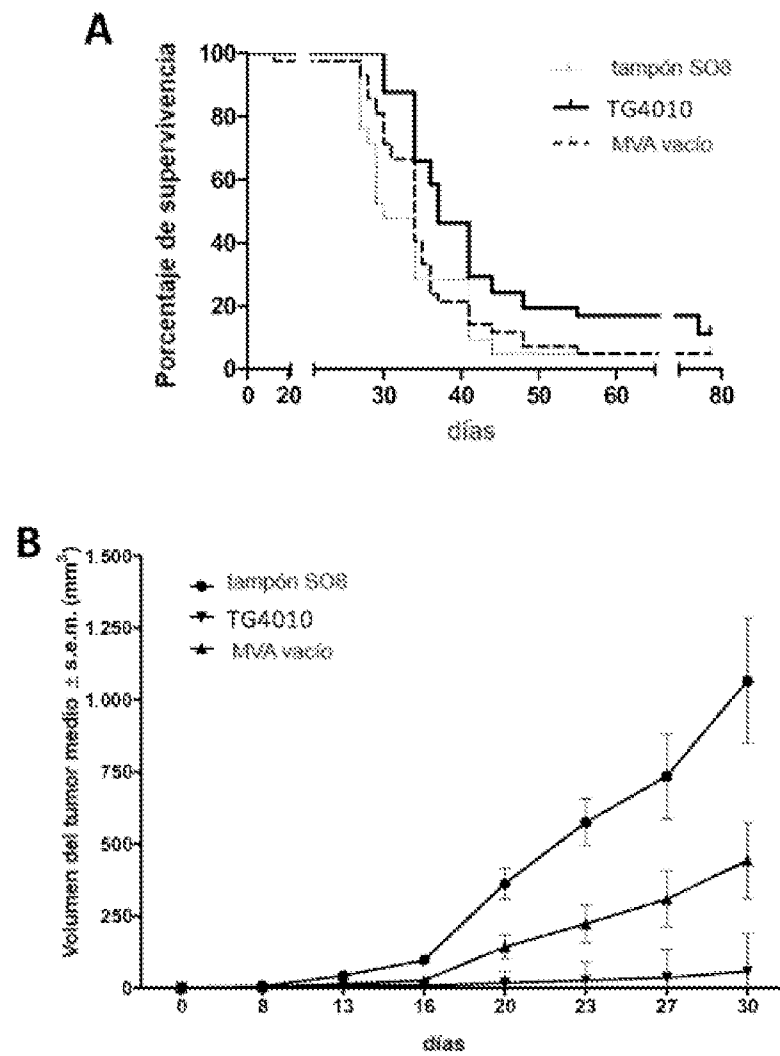
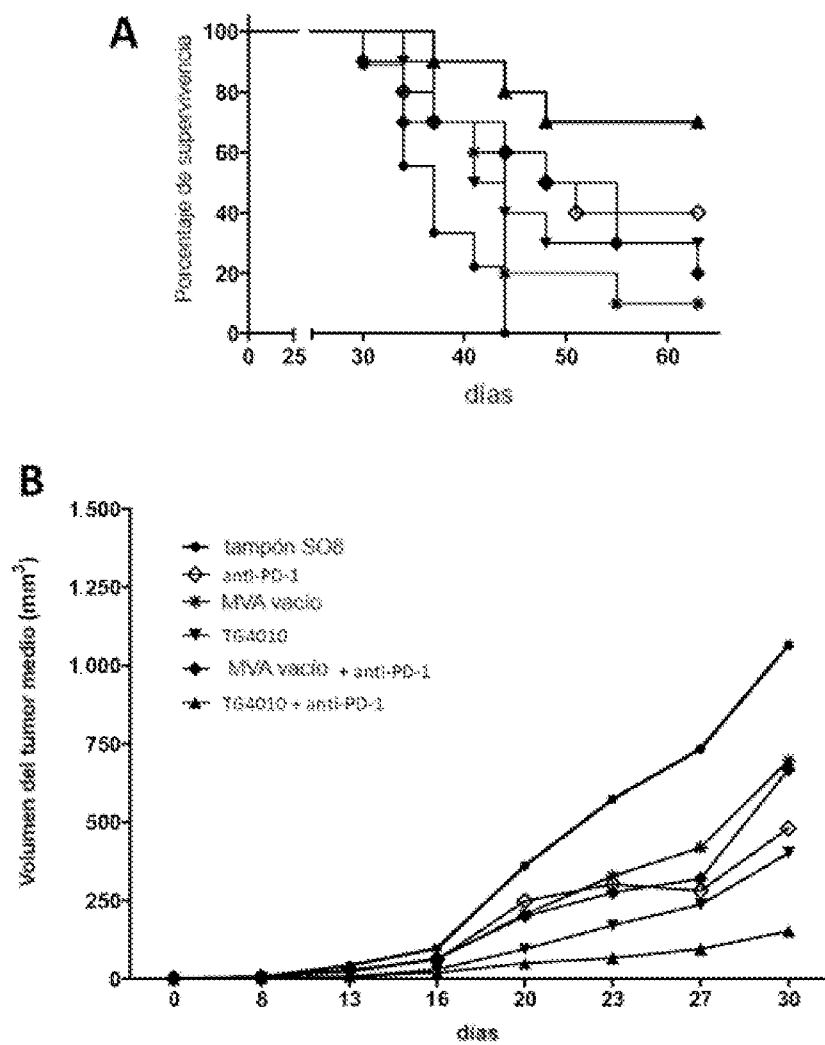


Figura 6



Figuras 7A y 7B



Figuras 8A y 8B

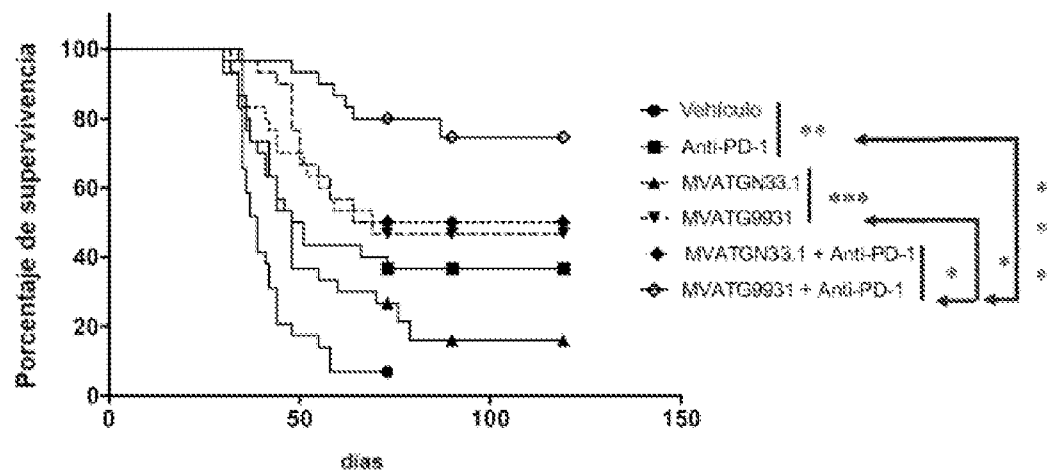


Figura 9