

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 399**

51 Int. Cl.:

C07K 14/71 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2008 E 08745615 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2162149**

54 Título: **Vacuna para la prevención de la recaída del cáncer de mama**

30 Prioridad:

01.06.2007 US 941524 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2014

73 Titular/es:

**THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR
THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE,
INC. (100.0%)
6720-A Rockledge Drive, Suite 100
Bethesda, MD 20817 , US**

72 Inventor/es:

**PEOPLES, GEORGE E. y
SATHIBALAN, PONNIAH**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 445 399 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).

Vacuna para la prevención de la recaída del cáncer de mama**Descripción****5 REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS**

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente U.S N° 60/941.524 presentada el 1 de junio de 2007.

10 CAMPO

[0002] La presente invención se refiere, en general, al ámbito de las vacunas preventivas y terapéuticas. Específicamente, la presente invención se refiere a vacunas peptídicas para el tratamiento contra el cáncer de mama y la prevención de la recaída del cáncer de mama en pacientes en remisión.

15 ANTECEDENTES

[0003] El cáncer de mama (CM) es el diagnóstico más común de cáncer en mujeres y la segunda causa de muerte por cáncer entre mujeres (Ries LAG, et al. (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975 – 2003, National Cancer Institute, Bethesda, MD). Los principales avances en el tratamiento contra el cáncer de mama en los últimos 20 años han dado lugar a una mejora significativa en el porcentaje de supervivencia libre de enfermedad (SLE). Por ejemplo, las terapias que utilizan anticuerpos reactivos contra antígenos relacionados con el tumor se han utilizado para bloquear los procesos celulares específicos con el fin de frenar el avance de la enfermedad o prevenir la recurrencia de la enfermedad. A pesar de los recientes avances en el tratamiento contra el cáncer de mama, un número significativo de pacientes finalmente morirá por la enfermedad recurrente.

[0004] Las vacunas son un modelo atractivo para dichos tratamientos y prevenciones debido a su fácil administración y a su alto porcentaje de éxito observado en las enfermedades infecciosas. El concepto básico de la creación de una vacuna contra el cáncer es, en teoría, simple. El desarrollo de vacunas efectivas contra el cáncer para tumores sólidos ha tenido en la práctica, sin embargo, un éxito limitado. Por ejemplo, un grupo que intentó administrar una vacuna peptídica dirigida contra un melanoma metastásico observó un porcentaje de respuesta de sólo el 2,6 % (Rosemberg SA et al. (2004) Nat. Med. 10: 909 – 15).

[0005] Hay numerosas explicaciones para este bajo porcentaje de éxito (Campoli M et al. (2005) Cancer Treat. Res. 123: 61 – 88). Por ejemplo, incluso si un antígeno se asocia específicamente a un tipo en particular de célula tumoral, las células tumorales pueden expresar solo niveles bajos del antígeno o pueden localizarse en un sitio críptico o, de otro modo, protegerse de la detección inmunológica. Además, los tumores, a menudo, cambian su perfil antigénico por la liberación de antígenos a medida que se desarrollan. También contribuye al bajo porcentaje de éxito el hecho de que las células tumorales pueden expresar niveles muy bajos de proteínas de MHC y otras proteínas coestimuladoras necesarias para generar una respuesta inmune.

[0006] Otros problemas frente a los intentos de vacunación contra los tumores surgen en pacientes con cáncer en fase avanzada. Dichos pacientes tienden a tener tumores primarios y metastásicos más grandes, y las células en el interior del tumor no pueden ser accesibles debido al deficiente flujo de sangre. Esto concuerda con la observación de que las estrategias de vacunación han tenido más éxito en el tratamiento de neoplasias hematológicas (Radford KJ et al. (2005) Pathology 37: 534 – 50, y Molldrem JJ (2006) Biol. Bone Marrow Transplant. 12: 13 – 8). Además, como los tumores se vuelven metastásicos, estos pueden desarrollar la capacidad de liberar factores inmunosupresores en su microambiente (Campoli, 2005 y Kortylewski M et al. (2005) Nature Med. 11: 1314 – 21). Los tumores metastásicos se han asociado también a una disminución en el número de linfocitos de sangre periférica y a la disfunción de células dendríticas (Gillanders WE et al. (2006) Breast Diseases: A Year Book and Quarterly 17: 26 – 8).

[0007] Mientras que todos o algunos de estos factores pueden contribuir a obstaculizar el desarrollo de una vacuna preventiva o terapéutica, el gran reto es que la mayoría de los antígenos tumorales sean antígenos propios o que tengan un alto grado de homología con antígenos propios y, por lo que se espera estén sujetos a una tolerancia inmune severa. Por lo tanto, es evidente que muchas vacunas contra el cáncer basadas en péptidos, con o sin adyuvantes inmunoestimulantes, pueden estar destinadas a tener un éxito limitado en la práctica clínica debido a la baja inmunogenicidad y la falta de especificidad.

[0008] El prototipo de vacunas contra el cáncer de mama basado en antígenos únicos ha tenido un éxito moderado en la inducción de una respuesta inmune apreciable en experimentos con animales y en ensayos clínicos de pacientes con cáncer de mama. La respuesta inmune observada, no obstante, no se ha traducido a una inmunidad protectora clínicamente significativa contra el resurgimiento de la enfermedad para poner en remisión mediante la cirugía y la quimioterapia estándar. Por lo tanto, se necesitan enfoques de una vacuna innovadora para mejorar los porcentajes de recurrencia y supervivencia entre los pacientes con cáncer de mama.

- 5 **[0009]** Los epítomos de vacuna preferidos son aquellos expresados exclusivamente o expresados en al menos en niveles incrementados por un neoplasma. HER2 / neu es un proto - oncogén que se expresa en numerosas neoplasias epiteliales (Slamon DJ et al. (1989) Science 244: 707 – 12). La amplificación génica y la sobreexposición de la proteína HER2 / neu se encuentra entre el 20 – 25 % del cáncer de mama y su exceso de presencia es un indicador de mal pronóstico (Pritchard KI et al. (2006) N. Engl. J. Med. 354: 2103 – 11). Se ha estudiado ampliamente al HER2 / neu, gracias a esta proteína se han identificado numerosos péptidos inmunogénicos. Uno de estos péptidos se denomina E75 y corresponde a los aminoácidos 369 – 377 de HER2 / neu (SEC ID N° 1) (patente U.S N° 6.514.942).
- 10 **[0010]** Ha habido intentos de utilizar E75 como vacuna contra el cáncer, por ejemplo, una vacuna de péptido único combinada con diferentes inmunoadyuvantes (Zaks TZ et al. (1998) Cancer Res. 8: 3407 – 18), cargada en células dendríticas autólogas y reinfundida (Brossart P et al. (2000) Blood 96: 3102 – 8, y, Kono K et al. (2002) Clin. Cancer Res. 8: 3394 – 3400); o incorporada en péptidos más largos capaces de unirse a las moléculas HLA clase II para reclutar células T CD4 auxiliar (Disis ML et al. (1999) Clin. Cancer Res. 5: 1289 – 97, y, Disis ML et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20: 2624 – 32). Cada enfoque ha estimulado una respuesta inmune mediada por una célula T citotóxica específica de E75, aunque no ha demostrado una inmunidad protectora o terapéutica clínicamente significativa en mujeres con cáncer de mama avanzado.
- 20 **[0011]** HER2 / neu es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico y codifica un receptor de tirosina quinasa de 185 – kd que participa en la regulación del crecimiento celular y la proliferación. (Popescu NC, King CR, Kraus MH. Localization of the human erbB – 2 gene on normal and rearranged chromosome 17 to bands q12 – 21. 32. Genomics 1989, 4: 362 – 366, Yarden Y, Sliwkowski MX. Untagling the ErbB signalling network. Nat Rev Mol Cell Bio 2001, 2: 127 – 137). La sobreexpresión y / o amplificación de HER2 / neu se halla en el 25 – 30 % de los cánceres de mama invasivos (CM) y se asocia a tumores más agresivos y con pobres resultados clínicos. (Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER – 2/neu oncogene. Science 1987, 235: 177 – 182; Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER – 2/neu proto – oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 1989; 244: 707 – 12; Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H. Prognostic significance of HER – 2 oncoprotein expression in breast cancer: A 30 – year follow – up. J Clin Oncol 1992; 10: 1044 – 1048).
- 30 **[0012]** La determinación del estado de HER2 / neu se realiza principalmente a través de dos pruebas, la inmunohistoquímica (IHC) y la hibridación fluorescente *in situ* (FISH). La IHC detecta la sobreexpresión de la proteína HER2 / neu y se anota es una escala semicuantitativa de 0 a 3⁺ (0 = negativo, 1⁺ = baja expresión, 2⁺ = intermedio y 3⁺ = sobreexpresión). FISH en cambio detecta la amplificación (exceso de copias) del gen HER2 / neu, se expresa en un índice de copias génicas de HER2 / neu en las copias génicas del cromosoma 17 y se interpreta como “sobreexpresión” si FISH es $\geq 2,0$ copias. (Hicks DG, Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluoresce in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. Hum Pathol 2005; 36: 250 – 261). El índice de concurrencia de IHC y FISH es del 90 %. (Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, et al. Specificity of Hercep Test in determining HER – 2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration – approved scoring system. J Clin Oncol 1999; 17: 1533 – 1541). FISH es el estándar de oro, como análisis retrospectivo revela que es el mejor indicador de la respuesta de trastuzumab (Tz), es más objetivo y reproducible. (Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, et al. Evaluation of Her – 2/neu Gene Amplification and Overexpression: Comparison of Frequently Used Assay Methods in a Molecularly Characterized Cohort of Breast Cancer Specimens. J Clin Pathol 2002; 14: 3095 – 3105; Bartlett J, Mallon E, Cooke T. The clinical evaluation of HER – 2 status: which test to use? J Pathol 2003; 199: 411 – 417; Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol 2007, 25: 118 – 145).
- 45 **[0013]** La identificación y cuantificación de HER2 / neu como proto – oncogén se ha dirigido hacia la inmunoterapia pasiva humoral o basada en anticuerpos para incluir la utilización de Tz (Herceptin®). Tz es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado que une el dominio de la yuxtamembrana extracelular de la proteína HER2 / neu. (Plosker GL, Keam SJ. Trastuzumab: A review of its use in the Management of HER2 – positive metastático and early – stage breast cancer. Drugs 2006; 66: 449 – 475). Tz se indica para la sobreexpresión de HER2 / neu (IHC 3⁺ o FISH $\geq 2,0$) con nódulo positivo (NP) y pacientes con cáncer de mama metastático, (Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first – line treatment of HER2 – overexpressing metastático breast cancer. J Clin Oncol 2002, 20: 719 – 726; Piccart – Gebhart MJ, Procter M, Leyland – Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2 – positive breast cancer. N Engl J Med 2005, 353 : 1659 – 1672), muestra una actividad muy limitada en pacientes con baja a intermedia expresión de HER2 / neu. (Herceptin (Trastuzumab) prescription product insert. South San Francisco, CA: Genentech Inc; revised September 2000).
- 60 **[0014]** Otra forma de inmunoterapia que se sigue buscando es la vacunación y la inmunoterapia activa dirigida a una respuesta inmune celular de epítomos en antígenos asociados a tumores (TAA) como el HER2 / neu. El HER2 / neu es una fuente de numerosos péptidos inmunogénicos que puede estimular al sistema inmune para reconocer y destruir las células cancerígenas que expresan HER2 / neu. (Fish B, Blevins TL, Wharton JT, et al. Identification of immunodominant peptide of the HER2 / neu proto – oncogene recognized by ovarian tumor – specific CTL lines. J

Exp Med 1995, 181: 2109 – 2117).

[0015] E75 (KIFGSLAFL, HER2 / *neu*, 369 – 377) es una secuencia peptídica en la familia del proto – oncogén HER2 / *neu* utilizado en ensayos clínicos como vacuna contra el cáncer para estimular los linfocitos T citotóxicos (CLT) a destruir las células cancerígenas. (Zaks, T. et al. Immunization with a peptide epitope (369 – 377) from HER – 2/*neu* leads to peptide specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER – 2/*neu*⁺ tumors. Cancer Research. 58 (21): 4902 – 8. 1998; Knutson KL, Schiffman K, Cheever MA, et al: Immunization of cancer patients with HER – 2/*neu*, HLA – A2 peptide, p 369 – 377, results in short – lived peptide – specific immunity. Clin Cancer Res 8: 1014 – 1018, 2002; Murray JL, Gillogly ME, Przepioroka D, et al: Toxicity, immunogenicity, and induction of E75 – specific tumorlytic CTLs by HER – 2 peptide E74 (369 – 377) combined with granulocyte macrophage colony – stimulating factor in HLA – A2⁺ patients with metastatic breast and ovarian cancer. Clin Cancer Res 8: 3407 – 3418, 2002; Avigan D, Vasir B, Gong J, et al. Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cell cancer induces immunological responses. Clin Cancer Res 2004: 10: 4699 – 4708; Disis ML, Gooley TA, Rinn K, et al. Generation of T – cell immunity to the HER2 / *neu* protein after active immunization with HER2 / *neu* peptide – based vaccines. J Clin Oncol 2002, 20:2624 – 32; Disis ML, Grabstein KH, Sleath PR, et al. Generation of immunity to the HER – 2/*neu* oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide – based vaccine. Clin Cancer Res 5: 1289 – 1297, 1999.

[0016] La inmunoterapia pasiva dirigida basada en el proto – oncogén HER2 / *neu* se ha centrado principalmente en la utilización de Tz (Herceptin®). Tz es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado que une el dominio de la yuxtamembrana extracelular de la proteína HER2 / *neu*. Tz está aprobado e indicado por las autoridades competentes para el tratamiento de tumores que sobreexpresan HER2 / *neu* (IHC 3⁺ o FISH ≥2,0) en pacientes con cáncer de mama metastásico y en el entorno adyuvante en pacientes con cáncer de mama con nódulos positivos. Tz ha sido objeto de numerosos estudios clínicos y hoy día se utiliza de forma rutinaria en el tratamiento de pacientes con metástasis y en el tratamiento adyuvante de pacientes con alto riesgo de cáncer de mama con sobreexpresión de HER2 / *neu*. Tz, no obstante, muestra una actividad limitada en pacientes con expresión HER2 / *neu* baja o intermedia. Por lo tanto, basado en los resultados previos obtenidos con Tz, las vacunas peptídicas inmunogénicas dirigidas a HER2 / *neu* podrían no ser eficaces en pacientes con cáncer con niveles bajos e intermedios de la expresión del tumor HER2 / *neu*.

[0017] Por consiguiente, hay una necesidad en la disciplina de explotar el potencial terapéutico e inmunoprotector de E75 para producir vacunas que ofrezcan a pacientes con cáncer de mama una protección fiable de remisión clínica contra la recurrencia de la enfermedad.

RESUMEN

[0018] La invención presenta composiciones para su utilización en procedimientos para inducir y mantener la inmunidad contra la recaída del cáncer de mama en pacientes en remisión clínica. La invención presenta una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente eficaz y un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos SEC ID N° 2 para su utilización en la inducción de una inmunidad terapéutica o protectora contra la recurrencia del cáncer de mama en un sujeto, en el que el sujeto tiene una puntuación inmunohistoquímica (IHC) de 1⁺ o 2⁺ para la expresión de la proteína HER2 / *neu* y una puntuación de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) menor a 2,0 ± 20 % para la expresión génica HER2 / *neu*. La administración puede realizarse por cualquier modo apropiado en la disciplina, como la inoculación o inyección, y más particularmente la inyección intradérmica puede ocurrir con una o más dosis separadas. Tales dosis pueden comprender una concentración igual al péptido y al adyuvante, puede administrarse de manera simultánea y en un sitio de inoculación o en una zona separada una de otra en la superficie de la piel. La composición puede administrarse mensualmente entre 3 y 6 veces o más hasta establecer la inmunidad protectora. En algunos aspectos, los procedimientos pueden comprender además un adyuvante como un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humanos recombinantes (GM – CSF).

[0019] En algunos aspectos, los procedimientos pueden comprender además la administración al sujeto de una vacuna de refuerzo que comprende una cantidad eficaz de una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente eficaz y un péptido con la SEC ID N° 2. En algunos aspectos, la composición de la dosis de refuerzo comprende además un adyuvante como GM – CSF. La administración de la dosis de refuerzo puede realizarse mediante la inoculación o la inyección y puede administrarse cada 6 o 12 meses.

[0020] El paciente puede ser cualquier mamífero, preferiblemente un ser humano. En algunos aspectos, el ser humano es positivo para un antígeno de histocompatibilidad principal de grupo sanguíneo como un antígeno leucocitario humano A2 o un antígeno leucocitario humano A3. En otros aspectos, el ser humano es positivo para la expresión de niveles detectables en HER2 / *neu*. El ser humano es un expresor HER2 / *neu* bajo o intermedio y tiene una puntuación inmunohistoquímica (IHC) de 1⁺ o 2⁺ y / o una puntuación de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) menor a 2,0.

[0021] Las composiciones comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable, una cantidad eficaz de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos SEC ID N° 2, un adyuvante como un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos y un programa de inmunización optimizado. En algunos aspectos más específicos, las

concentraciones y los programas preferidos de la composición de la vacuna incluyen: (1) 1 mg / ml de péptido y 0,25 mg / ml de adyuvante, (2) 0,5 mg / ml de péptido y 0,25 mg / ml de adyuvante, (3) 0,1 mg / ml de péptido y 0,25 mg / ml de adyuvante y (4) 0,5 mg / ml de péptido y 0,125 mg / ml de adyuvante, cada uno con inoculaciones mensuales durante seis meses consecutivos seguidos por inoculaciones de refuerzos anuales durante 3 años o más.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0022] Las figuras anexas, que se incluyen para proporcionar una comprensión adicional de la invención y se incorporan y constituyen como parte de esta especificación, ilustran aspectos de la invención y junto a la descripción explican los principios de la invención. En las figuras:

10

[0023] **La Figura 1** muestra la toxicidad sistémica y local máxima experimentada en pacientes vacunados con E75. La toxicidad local (eritema e induración en el sitio de inyección) es un efecto deseado que muestra una respuesta a la vacuna. Las toxicidades locales de grado 2 más comunes fueron prurito o molestias que requieren medicación. Las toxicidades sistémicas más comunes fueron dolor de huesos, síntomas semejantes a la gripe y fatiga (comúnmente asociada a GM – CSF) y con una duración < a 24 horas. Las dos toxicidades sistémicas de grado 3 fueron angioedema de la lengua (tras la sexta inoculación) y dolor de huesos.

15

[0024] **La Figura 2** muestra la curva de supervivencia de Kaplan - Meier con una media de seguimiento de 20 meses. De 171 pacientes, el porcentaje de recurrencia en el grupo vacunado fue del 5,6 % si se compara al 14,2 % del grupo de observación ($P = 0,04$) con una mediana de seguimiento de 20 meses. El porcentaje de supervivencia sin enfermedad entre los grupos vacunados y los grupos de control fue de 92,5 % y 77 % respectivamente.

20

[0025] **Las Figuras 3A y 3B** muestran una respuesta de CTL inducida de la vacuna E75. (A) CTL de la vacuna inducida específica de E75 para todos los pacientes. Los niveles medios de CTL $CD8^+$ específicas de E75 fueron significativamente superiores a los niveles de prevacunación (0,39 %, rango 0 – 3,28 %) para un nivel máximo (1,8, rango 0,4 – 12,2 %, $P < 0,0001$) y un nivel postvacunación (0,70 %, rango 0,06 – 2,91 %, $P = 0,002$). No hubo diferencias entre los niveles prevacunación y los niveles a largo plazo (6 meses) de células T $CD8^+$. (B) CTL de la vacuna inducida específica de E75 basada en la inmunidad preexistente. Los pacientes con y sin inmunidad preexistente mostraron patrones idénticos en respuesta a la vacunación E75 con una media máxima y niveles de postvacunación similares alcanzados en ambos. Sin embargo, en pacientes sin inmunidad preexistente hubo un incremento significativo en los niveles de dímero desde la prevacunación hasta la postvacunación a los 6 meses (0,13 % [rango 0 – 0,28 %] contra 0,45 % [0 – 2,68 %], $P < 0,0001$).

25

30

[0026] **Las Figuras 4A a 4D** muestran los resultados del ensayo de hipersensibilidad retardada. (A) DTH para todos los pacientes postvacunación. Control $2,1 \pm 0,5$ mm si se compara al péptido $14,0 \pm 1,4$ mm, $P < 0,0001$. (B) DTH pre y postvacunación en pacientes con NN. No hubo diferencias en el control de solución salina contra la prevacunación peptídica. En la postvacunación hubo un incremento significativo en la respuesta DTH al péptido E75 si se compara al control de la postvacunación ($P < 0,001$) y si se compara con el DTH E75 de la prevacunación ($P < 0,001$). (C) DTH de postvacunación mediante ensayo. Los pacientes con NP tuvieron respuestas de DTH significativamente mayores si se compara con los pacientes con NN ($17,3 \pm 2,4$ mm contra $10,9 \pm 1,5$ mm, $P = 0,02$). Esto puede deberse a una diferencia en la media total de la dosis de vacunación en el grupo de NN (2000 μ g contra 4000 μ g, $P < 0,0001$). (D) DTH postvacunación mediante grupos de dosis. Los pacientes que recibieron < 6000 μ g de E75 tuvieron una respuesta DTH significativamente menor si se compara a los pacientes que recibieron un total de 6000 μ g. ($13,3 \pm 1,9$ mm contra $25,1 \pm 4,0$ mm, $P = 0,008$).

35

40

45

[0027] **La Figura 5** muestra los niveles de las células T $CD8^+$ en pacientes con dosis de refuerzo. Los pacientes que recibieron una dosis de refuerzo a los 6 meses tras las series de vacunaciones primarias tuvieron niveles significativamente más elevados de células T $CD8^+$ que los pacientes > 6 meses de la serie de vacunación primaria. Entre los pacientes > 6 meses, se demostró una disminución poco significativa del 0,7 % al 0,44 % a partir de sus propios niveles a los 6 meses de la postvacunación primaria.

50

[0028] **La Figura 6** muestra una toxicidad sistémica y local graduada. La mayoría de los pacientes presentaron una toxicidad local de grado 1 mientras que sólo 2 pacientes presentaron una toxicidad local de grado 2. Más de la mitad de los pacientes no tuvieron toxicidad sistémica y no hubo toxicidades sistémicas de grado 2 o 3. Once pacientes presentaron toxicidad sistémica de grado 1 (número de casos): fatiga (4), dolor de cabeza (4), mialgias (3), escalofríos (2), fiebre (2), diarrea (1), malestar (1), dolor de huesos (1) y artralgias (1).

55

[0029] **La Figura 7** muestra la respuesta de refuerzo en pacientes que carecen de SRI mostrando una tendencia hacia un número creciente de células T $CD8^+$ específicas del antígeno.

60

[0030] **La Figura 8** muestra los pacientes que presentan un incremento de células secretoras de IFN – y detectadas por la inmunoabsorbencia ligada a enzimas. En general, el 91 % de los pacientes mostró un incremento de las células T específicas de antígeno (funcional) medido por ELISPOT con un 50 % que muestra un claro aumento (incremento de células secretoras de IFN – y en ≥ 50 % de los ensayos).

65

- 5 [0031] **La Figura 9** muestra las reacciones locales en pacientes con dosis de refuerzo. Los pacientes que recibieron la dosis de refuerzo temporal cercana a finalizar su serie de vacunaciones primarias (≤ 9 meses; línea clara) tuvieron una LR significativamente mayor a la de los pacientes > 9 meses de la serie de vacunaciones primarias. Los dos grupos tuvieron un LR similar al final de las series primarias (lado izquierdo). Estos datos sugieren un efecto aditivo de la dosis de refuerzo en pacientes que recibieron la dosis de refuerzo antes y un efecto de mantenimiento en pacientes que recibieron la dosis de refuerzo posteriormente.
- 10 [0032] **La Figura 10** muestra el incremento de LR en el transcurso de las series primarias e ilustra que los dos grupos fueron iguales en la serie inicial y que la única diferencia es el tiempo de la serie primaria. El número vax 6 es diferente al LR anterior mostrado en la **Figura 7** ya que algunos pacientes solo recibieron 4 inoculaciones. Los dos grupos fueron estadísticamente idénticos en todos los puntos excepto en la vacuna 3 cuando el grupo ≤ 9 meses fue mayor (97 contra 80, $p = 0,04$).
- 15 [0033] **Las Figuras 11A a la Figura 11D** mostraron respuestas inmunológicas (media \pm SE) y clínicas (porcentajes de recurrencia absoluta y mortalidad) de pacientes implicados en el ensayo de fase II de E75 por LE contra OE HER2 / neu.
- 20 [0034] **A.** En las respuestas inmunes *in vitro* – todas las células T CD8⁺ específicas *in vitro* pre – max % aumentaron estadísticamente (LE $p < 0,001$, OE $p < 0,001$) y los pacientes LE aumentaron la respuesta max si se compara con los pacientes OE ($p = 0,04$).
- [0035] **B.** En las respuestas inmunes *in vivo* – todas las DTHs *in vivo* pre – post aumentaron estadísticamente (LE $p < 0,001$, OE $p < 0,02$).
- 25 [0036] **C.** Porcentajes de recurrencia – los porcentajes de recurrencia disminuyeron en pacientes LE y OE vacunados, aunque este hecho no fue estadísticamente significativo.
- [0037] **D.** Tasas de mortalidad – los pacientes LE vacunados mostraron una tendencia a la baja en las tasas de mortalidad ($p = 0,08$).
- 30 [0038] **Las Figuras 12A a las Figuras 12D** mostraron respuestas inmunológicas (media \pm SE) y clínicas (tasas de recurrencia absoluta y mortalidad) de pacientes implicados en el ensayo de fase II de E75 por el nivel de expresión de IHC HER2 / neu (0, 1⁺, 2⁺, 3⁺).
- 35 [0039] **A.** En las respuestas inmunes – todas las células T CD8⁺ específicas *in vitro* pre – max % aumentaron estadísticamente, mientras que HER2 / neu 1⁺ pre – a largo plazo se volvió significativo. ($p = 0,08$).
- [0040] **B.** En las respuestas inmunes *in vivo* – todas las DTHs *in vivo* pre – post aumentaron estadísticamente (0 $p < 0,03$, 1+ $p = 0,02$, 2 + $p = 0,02$, 3 + $p = 0,05$).
- 40 [0041] **C.** Porcentajes de recurrencia – los porcentajes de recurrencia disminuyeron en todos los niveles IHC vacunados, aunque este hecho no fue estadísticamente significativo.
- [0042] **D.** Tasas de mortalidad – la tasa de mortalidad disminuyó en todos los niveles IHC vacunados y fue estadísticamente significativo en los pacientes vacunados HER2 / neu IHC 1⁺ ($p = 0,04$).
- 45 [0043] **Las Figuras 13A y 13B** muestran el Ensayo de dímero y DHG por OGD contra SDG. (A) Se observó una diferencia significativa en el ODG contra SDG en el promedio de los niveles de las células T CD8⁺ específicas de E75 (0,91 + 0,13 % contra 0,54 + 0,11 %, $p = 0,03$). No se observó una diferencia significativa entre el promedio máximo de los niveles de las células T CD8⁺ específicas de E75. La dosis óptima mostró una tendencia al alza en el promedio del porcentaje mensual post - vacunación de las células T CD8⁺ específicas de E75 (0,87 + 0,10 % contra 0,67 + 0,05 %, $p = 0,07$). No se observó una diferencia significativa en el promedio a largo plazo de los niveles de las células T CD8⁺ específicas de E75 entre los grupos a los 6 meses. (B) La respuesta DTH del medio ortogonal (mm) entre el ODG contra SGD no mostró diferencia alguna en el inóculo de control (3,0 + 1,1 mm contra 2,0 + 0,5 mm). La respuesta DTH del péptido fue significativamente elevada en el ODG contra el SDG (21,5 + 2,5 mm contra 11,3 + 1,3 mm, $p = 0,00021$).
- 50 [0044] **La Figura 14** muestra la comparación de los porcentajes de recurrencia clínica entre el SDG y el ODG. Si se compara con el SDG, el ODG demostró una tendencia hacia los porcentajes de recurrencia menores ($p = 0,27$), aunque con una mediana de seguimiento más corta. No obstante, el ODG estaba compuesto por pacientes más jóvenes con una enfermedad significativamente más agresiva.
- 60

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 65 [0045] Varios términos relacionados con los procedimientos y otros aspectos de la presente invención se utilizan en la especificación y en las reivindicaciones. Tales términos poseen un significado ordinario en la disciplina a

menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos específicamente deben interpretarse de manera consistente con la definición proporcionada en la presente invención.

[0046] El término "prevenir" se refiere a cualquier éxito o indicio de éxito en la prevención en la recurrencia / recaída en el cáncer de mama en pacientes en remisión clínica, medida por cualquier parámetro objetivo o subjetivo, incluyendo los resultados de un examen radiológico o físico.

[0047] "Cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se utiliza en la presente invención de forma intercambiable, y se refiere a una cantidad de un compuesto, material o composición como se describe en el presente documento, eficaz para conseguir un resultado biológico particular, tal como, pero no limitado a, los resultados biológicos revelados, descritos o ejemplificados en el documento. Dichos resultados pueden incluir, pero no se limitan a, la prevención del cáncer de mama, y más particularmente a la prevención de la recurrencia del cáncer de mama, por ejemplo, la prevención de la recaída en un sujeto, tal y como se determina en cualquier medio apropiado en la disciplina. La cantidad terapéutica óptima se refiere a la dosis, al programa y al uso de las dosis de refuerzo para conseguir el mejor resultado terapéutico.

[0048] "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas propiedades y / o sustancias aceptables para el paciente desde un punto de vista farmacológico / toxicológico y para el fabricantequímico - farmacéutico desde un punto de vista físico / químico respecto a la composición, formulación, estabilidad, aceptación del paciente y biodisponibilidad. "Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un medio que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo (s) y no es tóxico para el huésped al que se le administra.

[0049] "Inmunidad protectora" o "respuesta inmune protectora", significa que el sujeto incrementa una respuesta inmune activa en un componente inmunogénico de un antígeno como los antígenos de cáncer de mama descritos y ejemplificados en el presente documento, de tal manera que, tras la posterior exposición al antígeno, el sistema inmune del sujeto es capaz de dirigirse y destruir las células que expresan el antígeno, disminuyendo de este modo la incidencia de la morbilidad y la mortalidad de recurrencia de cáncer en el sujeto. La inmunidad protectora en el contexto de la presente invención está preferiblemente, pero no exclusivamente, conferida por los linfocitos T.

[0050] El término "aproximadamente" utilizado en la presente invención hace referencia a un valor medible como una cantidad, una duración temporal, y similares, cuando abarca las variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, incluso más preferiblemente $\pm 1\%$, y aún más preferiblemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos descritos.

[0051] "Péptido" se refiere a cualquier péptido que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos. Polipéptido se refiere a cadenas cortas, comúnmente denominadas péptidos, oligopéptidos u oligómeros, y a cadenas más largas, generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos además de los 20 aminoácidos esenciales. Los polipéptidos incluyen secuencias de aminoácidos modificadas ya sea por procesos naturales, como el procesamiento posttraduccional o por técnicas de modificación química ya conocidas en la disciplina. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en voluminosas bibliografías de investigación. Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier parte de un polipéptido, incluyendo el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación pueda estar presente en los mismos o diferentes grados en varios sitios de un polipéptido dado. También, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden ser ramificados como resultado de ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, cíclicos ramificados y ramificados pueden ser resultado de los procesos posttraduccionales naturales o pueden obtenerse por métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces de disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formulación, gamma - carboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesado proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación y ubiquitinación.

[0052] "Refuerzo" se refiere a una dosis de un inmunógeno administrado a un paciente para que mejore, prolongue o mantenga la inmunidad protectora y para que supere la disminución de las respuestas de las células T mediadas por las células T reguladoras.

[0053] "Libre de cáncer de mama" o "libre de enfermedad" o NED (sin evidencia de enfermedad) significa que el paciente está en remisión clínica inducida por el tratamiento con los actuales tratamientos de referencia. Por "remisión" o "remisión clínica" utilizados como sinónimos, se refieren a los signos clínicos, los signos radiológicos y los síntomas del cáncer de mama que han disminuido significativamente o han desaparecido por completo basados en el diagnóstico clínico, aunque todavía pueden existir células cancerígenas en el cuerpo. Por lo tanto, se contempla que la remisión abarque la remisión parcial y completa. La presencia de células cancerígenas residuales puede enumerarse mediante ensayos como CTC (células tumorales circulantes) y puede ser predictiva de

recurrencia.

[0054] “Recaída” o “recurrencia” o “reaparición” se utilizan de manera intercambiable en el presente documento, y se refiere al diagnóstico radiográfico de la reaparición o signos y síntomas del cáncer de mama tras un periodo de mejoría o remisión.

[0055] El cáncer de mama es el principal problema de salud para las mujeres. Las vacunas contra el cáncer de mama que se han realizado hasta la fecha han mostrado una eficacia limitada, en particular, respecto a la prevención de recaídas en los pacientes libres de enfermedad. Según la presente invención, se ha determinado que la recurrencia del cáncer de mama en pacientes libres de enfermedad puede prevenirse por la administración al paciente de un péptido del oncogén HER2 / neu, E75 (SEC ID N° 2) en ciertas condiciones. Se ha determinado también de manera inesperada que el péptido E75 se asocia al MHC HLA – A2 y – A3, y por lo tanto puede inducir inmunidad protectora en pacientes con haplotipo HLA – A2 y – A3.

[0056] Por lo tanto, la presente invención presenta composiciones de vacuna para inducir inmunidad protectora contra la recaída del cáncer de mama. La invención también presenta estas composiciones para su utilización en procedimientos para inducir y mantener la inmunidad protectora contra el cáncer de mama, y más particularmente contra el cáncer de mama recurrente. En algunos aspectos, los procedimientos comprenden la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos SEC ID N° 2.

[0057] El sujeto puede ser cualquier animal, y preferiblemente un mamífero como un ser humano, ratón, rata, hámster, cobaya, conejo, gato, perro, mono, vaca, caballo, cerdo y similares. Se prefiere seres humanos. En aspectos altamente preferentes, los seres humanos son positivos para los haplotipos HLA – A2 o HLA – A3. En otros aspectos preferentes, los seres humanos son positivos para la expresión del HER2 / neu humano. Los seres humanos tienen tumores que expresan HER2 / neu bajos y / o intermedios.

[0058] Según cualquier medio adecuado en la disciplina, las composiciones de vacuna pueden formularse como preparaciones líquidas o liofilizadas. Ejemplos no limitantes de preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones, jarabes y emulsiones. Los vehículos líquidos adecuados incluyen cualquier disolvente orgánico o inorgánico, por ejemplo, agua, alcohol, solución salina, solución salina tamponada, solución salina fisiológica, solución de dextrosa, soluciones de glicol propileno en agua y similares, preferiblemente con forma estéril.

[0059] Las composiciones de vacuna pueden formularse en cualquier forma neutral o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de los polipéptidos activos) formados con ácidos inorgánicos como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas a partir de los grupos carboxilo pueden también derivarse de las bases inorgánicas como por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio calcio o hidróxidos férricos, y bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, 2 – etilamino etanol, histidina, procaína y similares.

[0060] Las composiciones de vacuna se formulan preferiblemente para inocularse o inyectarse en un sujeto. Para la inyección, las composiciones de vacuna de la invención pueden formularse en soluciones acuosas como agua o alcohol, o en tampones fisiológicamente compatibles como solución salina de Hanks, solución salina de Ringer o solución salina tamponada fisiológica. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, agentes conservantes, agentes estabilizantes y / o agentes dispersantes. Antes de su utilización, las formulaciones inyectables pueden prepararse también como preparaciones con forma sólida destinadas a convertirse en preparaciones con forma líquida adecuadas para inyectarse, por ejemplo, por constitución con un vehículo adecuado como agua esterilizada, solución salina o alcohol.

[0061] Las composiciones de vacuna pueden también formularse en vehículos de liberación sostenida o preparaciones de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por inoculación o implantación (por ejemplo por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección. Así, por ejemplo, las composiciones de vacuna pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o derivados moderadamente solubles, por ejemplo, una sal moderadamente soluble. Liposomas y emulsiones son ya conocidos ejemplos de vehículos de entrega adecuados para su utilización como portadores.

[0062] Las composiciones de vacuna pueden comprender agentes que mejoran la eficacia protectora de la vacuna como los adyuvantes. Los adyuvantes incluyen cualquier compuesto o compuestos que actúan para incrementar la respuesta inmune protectora del antígeno péptido E75, reduciendo así la cantidad de antígeno necesaria en la vacuna, y/o la frecuencia de administración requerida para generar una respuesta inmune protectora. Los adyuvantes pueden incluir por ejemplo, emulsionantes, dipéptidos de muramilo, avidina, adyuvantes acuosos como el hidróxido de aluminio, adyuvantes de quitosano y cualquiera de las numerosas saponinas, aceites y otras sustancias conocidas en la disciplina como Amphigen, LPS, extractos de paredes celulares bacterianas, ADN bacteriano, secuencias CpG, oligonucleótidos sintéticos y combinaciones de los mismos (Schijns et al. (2000) Curr.

Opin. Immunol. 12: 456), *Mycobacterialphlei* (*M. phlei*), extracto de pared celular (MCWE) (patente U.S N° 4.744.984), ADN de *M. phlei* (ADN – M), y complejo de pared celular de ADN – *M. phlei* (MCC). Los compuestos que pueden servir como emulsionantes incluyen agentes emulsionantes sintéticos y naturales, así como compuestos aniónicos, catiónicos y no iónicos. Entre los compuestos sintéticos, los agentes emulsionantes aniónicos incluyen, por ejemplo, sales de potasio, sodio y amonio del ácido láurico y oléico, sales de calcio, magnesio y aluminio de los ácidos grasos y sulfonatos orgánicos como laurilsulfato de sodio. Los agentes catiónicos sintéticos incluyen, por ejemplo, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, mientras que los agentes no iónicos sintéticos se ejemplifican por gliceril - ésteres (por ejemplo, monoestereato de glicerilo), ésteres y éteres de glicol de polioxietileno, y ésteres de ácidos grasos de sorbitán (por ejemplo, monopalmitato de sorbitán) y sus derivados de polioxietileno (por ejemplo, monopalmitato de sorbitán polioxietilinado). Agentes emulsionantes naturales incluyen acacia, gelatina, lecitina y colesterol.

[0063] Otros adyuvantes adecuados pueden formarse con un componente de aceite como un único aceite, una mezcla de aceites, una emulsión de aceite en agua o emulsión de agua en aceite. El aceite puede ser un aceite mineral, un aceite vegetal o un aceite animal. Los aceites minerales son hidrocarburos líquidos obtenidos de la vaselina mediante una técnica de destilación, y es también conocida en la disciplina como parafina líquida, vaselina líquida o aceite mineral blanco. Aceites animales adecuados incluyen, por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceite de halibut, aceite de menhaden, aceite de hígado anaranjado y aceite de hígado de tiburón, todos disponibles comercialmente. Aceites vegetales adecuados, incluyen, por ejemplo, aceite de canola, aceite de almendras, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de soja y similares. El adyuvante completo de Freund (FCA) y el adyuvante incompleto de Freund (FIA) son dos adyuvantes comunes utilizados normalmente en preparaciones de vacunas y también adecuados para su utilización en la presente invención. Tanto FCA como FIA son emulsionantes en agua de aceite mineral, sin embargo, FCA contiene también una *Mycobacterium sp* destruida.

[0064] La citoquinas inmunomoduladoras pueden también utilizarse en las composiciones de vacuna para mejorar la eficacia de la vacuna, por ejemplo, como un adyuvante. Ejemplos no limitantes de dichas citoquinas incluyen interferón alfa (IFN – α), interleucina – 2 (IL – 2), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM – CSF) o combinaciones de los mismos. El GM – CSF es altamente preferible.

[0065] Las composiciones de vacuna comprenden antígenos de péptidos E75 y comprenden además adyuvantes que pueden prepararse utilizando técnicas ya conocidas por los expertos en la disciplina que incluyen, pero no limitan, la mezcla, la utilización de ultrasonidos y la microfluidización. El adyuvante puede comprender entre un 10 % y un 50 % (v / v) de la composición de la vacuna, más preferiblemente del 20 % al 40 % (v / v) y más preferiblemente del 20 % al 30 % (v / v), o cualquier número que oscile entre estas cifras. Es altamente preferible un 25 % (v / v).

[0066] La administración de las composiciones de vacuna pueden ser bien por infusión bien por inyección (por ejemplo, por vía intravenosa, vía intramuscular, vía intracutánea, vía subcutánea, vía intratecal, vía intraduodenal, vía intraperitoneal y similares). Las composiciones de vacunas también pueden administrarse por vía intranasal, vía vaginal, vía rectal, vía oral o vía transdérmica. Adicionalmente, las composiciones de vacuna pueden administrarse por sistemas de administración “sin aguja”. Preferiblemente, las composiciones se administran por inyección intradérmica. La administración puede estar bajo la dirección de un médico o un médico asistente.

[0067] Las inyecciones pueden dividirse en múltiples inyecciones, con dichas inoculaciones divididas administradas sustancialmente al mismo tiempo. Cuando se administra la inoculación dividida, la dosis de inmunógeno es preferible, pero no necesariamente, proporcionada por igual en cada inyección separada. Si un adyuvante está presente en la composición de vacuna, la dosis del adyuvante es preferible, pero no necesariamente, proporcionada por igual en cada inyección separada. Las inyecciones separadas para la inoculación dividida se administran sustancialmente próximas una de otra en el cuerpo del paciente. En algunos aspectos preferentes, las inyecciones se administran al menos 1 cm de separación entre ambas en el cuerpo. En algunos aspectos altamente preferentes, las inyecciones se administran con, al menos, 2,5 cm de separación entre ambas en el cuerpo. En algunos aspectos altamente preferentes, las inyecciones se administran con, al menos, 5 cm de separación entre ambas en el cuerpo. En algunos aspectos preferentes, las inyecciones se administran con, al menos, 10 cm de separación entre ambas en el cuerpo. En algunos aspectos preferentes, las inyecciones se administran con, al menos, 10 cm de separación entre ambas en el cuerpo, por ejemplo, al menos 12,5, 15, 17,5, 20 o más cm de separación entre ambas en el cuerpo. Las inyecciones primarias de inmunización y las inyecciones de refuerzo pueden administrarse como una inoculación dividida tal como se describe y se ejemplifica en el presente documento.

[0068] Pueden emplearse varios sistemas de administración farmacéutica alternativos. Ejemplos no limitantes de dichos sistemas incluyen liposomas y emulsiones. Pueden emplearse también algunos disolventes orgánicos como dimetilsulfóxido. Adicionalmente, las composiciones de vacuna pueden administrarse utilizando un sistema de liberación sostenida como matrices semipermeables de polímeros sólidos que contienen el agente terapéutico. Los diversos materiales de liberación sostenida disponibles son ya conocidos por los expertos en la disciplina. Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar las composiciones de vacuna en un intervalo de varios días a semanas o meses.

[0069] Para prevenir la recurrencia del cáncer de mama en un paciente que se encuentra en remisión del cáncer de mama, se administra al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de vacuna. Una cantidad terapéuticamente eficaz proporcionará un incremento clínicamente significativo en el número de linfocitos T citotóxicos específicos de E75 (CD8⁺) en el paciente, así como un incremento clínicamente significativo en la respuesta de linfocito T citotóxico al antígeno, medido por cualquier medio adecuado en la disciplina. En general, en el paciente, una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de vacuna destruirá la enfermedad microscópica residual y reducirá o eliminará significativamente el riesgo de recurrencia del cáncer de mama.

[0070] La cantidad eficaz de la composición de vacuna puede depender de cualquier número de variables, incluyendo sin limitación, la especie, raza, tamaño, altura, peso, edad, estado de salud del paciente, tipo de formulación, modo o manera o administración, o presencia o ausencia de factores de riesgo que incrementan significativamente la probabilidad de que el cáncer de mama reaparezca. Dichos factores de riesgo incluyen, pero no de manera limitante el tipo de cirugía, el estado de los ganglios linfáticos y el número positivo, el tamaño del tumor, el grado histológico del tumor, la presencia / ausencia de los receptores hormonales (receptores de estrógeno y progesterona), la expresión HER2/neu, la invasión linfovascular y la predisposición genética (BRCA 1 y 2). En algunos aspectos preferentes, la cantidad eficaz depende de si el paciente tiene un ganglio linfático positivo del ganglio linfático negativo y de si el paciente tiene un ganglio linfático positivo, el número y el alcance de los nódulos positivos. En todos los casos, la cantidad eficaz apropiada puede determinarse de forma rutinaria por los expertos en la disciplina utilizando técnicas de optimización rutinaria y por el conocimiento y las cualidades del médico y otros factores evidentes para aquellos expertos en la disciplina. Preferiblemente, una dosis terapéuticamente eficaz de las composiciones de vacuna descritas en el presente documento proporcionarán el beneficio preventivo terapéutico sin provocar toxicidad sustancial al sujeto.

[0071] La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones de vacuna pueden determinarse por métodos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (dosis letal para el 50 % de la población) y la ED50 (dosis terapéutica eficaz en el 50 % de la población). La relación de la dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD50 / ED50. Se prefieren las composiciones de vacuna que exhiben grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden utilizarse para formular un intervalo de dosificación para su utilización en pacientes. La dosificación de dichas composiciones de vacuna se sitúan preferiblemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada.

[0072] La información de toxicidad puede utilizarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en un sujeto específico como un ser humano. El médico tratante puede finalizar, interrumpir o ajustar la administración debido a la toxicidad o a las disfunciones de los órganos, y puede ajustar el tratamiento cuando sea necesario si la respuesta clínica no es adecuada para mejorar la respuesta. La magnitud de una dosis administrada en la prevención del cáncer de mama recurrente variará dependiendo de la gravedad de las condiciones del paciente, el riesgo relativo de la recurrencia o la vía de administración, entre otros factores. La gravedad de las condiciones del paciente pueden, por ejemplo, evaluarse, en parte, por métodos estándar de evaluación de pronóstico.

[0073] Las composiciones de vacuna pueden administrarse a un paciente en cualquier programa adecuado para inducir y / o mantener la inmunidad protectora contra la recaída del cáncer de mama, y más específicamente para inducir y / o mantener la respuesta de los linfocitos T citotóxicos al E75 (SEC ID N° 2). Por ejemplo, puede administrarse a los pacientes una composición de vacuna como una inmunización primaria como se describe y se ejemplifica en el presente documento, seguido por la administración de una dosis de refuerzo para reforzar y / o mantener la inmunidad protectora.

[0074] En algunos aspectos, a los pacientes se les puede administrar composiciones de vacuna durante 1, 2 o más veces al mes. Se prefiere una vez por mes durante seis meses consecutivos para establecer la respuesta inmune protectora, en particular con respecto al programa de inmunización primaria. En algunos aspectos, las dosis de refuerzo pueden administrarse en intervalos regulares cada 6 o más meses tras la finalización del programa de inmunización primaria. La administración de la dosis de refuerzo es preferible cada 6 meses. Las dosis de refuerzo pueden administrarse como una base necesaria.

[0075] El programa de administración de vacunas, incluyendo la inmunización primaria y la administración de dosis de refuerzo, puede continuar tanto como sea necesario para el paciente, por ejemplo, durante varios años o durante la vida del paciente. En algunos aspectos, el programa de vacunación incluye la administración más frecuente en el inicio del régimen de vacunación, e incluye la administración menos frecuente (por ejemplo, dosis de refuerzo) con el tiempo para mantener la inmunidad protectora.

[0076] La vacuna puede administrarse en bajas dosis al inicio del régimen de vacunación, con el tiempo puede administrarse dosis más altas. Las vacunas pueden administrarse también en altas dosis al inicio del régimen de vacunación, con el tiempo pueden administrarse dosis más bajas. La frecuencia de la vacuna primaria y la administración de la dosis de refuerzo y la dosis administrada de E75 pueden adaptarse y / o ajustarse para

satisfacer las necesidades particulares de los pacientes según lo determine el médico con cualquier medio adecuado en la disciplina.

[0077] En algunos aspectos, las composiciones de vacuna, incluyendo las composiciones para administración como una dosis de refuerzo, comprenden entre 0,1 mg y 10 mg de péptido E75. En algunos aspectos preferentes, las composiciones comprenden 0,5 mg de E75. En algunos aspectos preferentes, las composiciones comprenden 2 mg de E75. En algunos aspectos preferentes, las composiciones comprenden 1 mg de E75.

[0078] En algunos aspectos preferentes, las composiciones de vacuna comprenden E75, incluyendo las composiciones para administración como una dosis de refuerzo, además comprenden GM – CSF. Dichas composiciones comprenden preferiblemente 0,125 mg de GM – CSF. En algunos aspectos preferentes, las composiciones comprenden 0,25 mg de GM – CSF.

[0079] En algunos aspectos particularmente preferentes, las composiciones de vacuna comprenden 1 mg de péptido E75 y entre 0,125 mg y 0,250 mg de CG – CSF en un volumen total de 1 ml, administrado mensualmente como una inoculación dividida de 0,5 ml cada una, administrada en inyecciones con 5 cm de separación en el cuerpo del paciente y administrada o mezclada al mismo tiempo. El programa de administración es preferiblemente mensual durante 6 meses. Tras un periodo de 48 horas, el sitio de inyección puede evaluarse por una reacción local del eritema e induración. Si las reacciones en ambos lados son confluentes y el área de las medidas totales de induración > 100 mm (o el paciente experimenta cualquier > toxicidad sistémica de grado 2), puede reducirse la dosis de GM – CFS, por ejemplo, a la mitad, a pesar de que se pretenda que la dosis peptídica siga siendo igual. Si el paciente presenta una reacción fuerte en las dosis posteriores, puede producirse una reducción de GM – CSF, por ejemplo, reduciéndolo a la mitad. Si el paciente no presenta una fuerte reacción, el paciente puede continuar con una alta dosis de GM – CSF. En algunos aspectos, el programa de administración y dosificación de las dosis de refuerzo se determina de forma similar, con el inicio de dosis de refuerzo con la administración de las composiciones de vacuna que comprenden 1 mg de E75 y 0,25 mg de GM – CSF, administradas cada seis meses posteriores a la finalización del programa de vacunación de inmunización primaria.

[0080] Se ofrecen los siguientes aspectos ejemplares específicos para llevar a cabo la presente invención con fines meramente ilustrativos y no se pretende limitar en modo alguno el alcance de la presente invención.

EJEMPLO 1

Selección de pacientes

[0081] Los ensayos de nódulo positivo (NP) y de nódulo negativo (NN) se aprobaron en el Consejo de Revisión Institucional local realizados en el Walter Reed Army Medical Center (WRAMC), en Washington DC y en el Joyce Murthe Breast Care Center, en Windber, PA según la aplicación de un nuevo fármaco de investigación (BB – IND #9187). Todos los pacientes tenían cáncer de mama (CM) histológicamente confirmado, habían completado la terapia estándar de cirugía, quimioterapia y radioterapia (en su caso) antes de la inscripción. Los pacientes tratados con terapia hormonal continuaron con su régimen específico. Tras el asesoramiento y el consentimiento oportunos, los pacientes con CM se inscribieron en el ensayo apropiado (NP o NN) y se determinó el tipo de HLA ya que HLA – A2 que se une en primer lugar a E75 se encuentra en, aproximadamente, el 40 – 50 % de la población general. Los pacientes con HLA – A2+ se vacunaron, y los pacientes con HLA – A2- se mantuvieron en observación por recurrencia clínica. Los pacientes con HLA – A3⁺ se inscribieron en un ensayo paralelo con los pacientes A2 y se trataron en el programa de dosis activa en el momento de la inscripción. Antes de la vacunación, se realizaron en los pacientes pruebas cutáneas con un conjunto de antígenos de recuerdo (paperas, tétano y *Candida*). Los pacientes se consideraron inmunocompetentes si reaccionaban (> 5mm) a > 2 antígenos.

[0082] Se inscribieron en los ensayos de E75 un total de 186 pacientes (NP = 95, NN = 91), que estaban libres de enfermedad tras el tratamiento estándar pero con un alto riesgo de recurrencia. Tras el HLA – A2⁺ y después el HLA – A3⁺, los pacientes (n = 101) se vacunaron (49 NP y 52 NN; 90 HLA – A2⁺ y 11 HLA – A3⁺). Los otros pacientes (n = 85) fueron asignados en observación. Cinco pacientes con la vacuna y cuatro en observación se retiraron del estudio, aunque ninguno debido a la toxicidad. Por lo tanto, 96 pacientes vacunados y 81 en observación estaban disponibles para los análisis. Se presentan en la **Tabla 1** los factores de pronóstico y demográficos para los dos grupos.

Tabla 1. Factores de pronóstico y demográficos para pacientes vacunados y en observación.

		Vacunadas, HLA - A2 ⁺ , A3 ⁺ (n = 96) †	En observación, HLA - A2 ⁻ A3 ⁻ (n = 81) ‡	P
5	Edad media, años	58,9	55,1	
	Rango, años	32 - 80	34 - 87	0,33
	Raza			
	Blanca %	89,6	81,5	
	Otra %	10,4	18,5	0,12
10	Tamaño del tumor			
	T1 %	69,8	60,5	0,20
	T2 - T4 %	30,2	39,5	0,20
	Grado histológico			
	I - II %	64,5	59,5	0,50
15				
	III %	35,5	40,5	0,50
	Nódulo positivo %	46,9	56,8	0,19
	Media + nódulos (sólo NP)	2,0	2,5	
20	Rango	1 - 25	1 - 15	0,17
	IHC 3 + o FISH + HER2 / neu %	25,8	28,4	0,32
	Receptor de Hormona negativa %	31,6	17,3	0,03
	XRT %	71,9	80,2	0,20
25	Quimioprevención %	65,6	78,8	0,05
	Herceptin adyuvante %	5,2	3,7	0,60
30	101 † pacientes se inscribieron en el grupo de vacunación, 2 se cambiaron a observación, 1 se retiró por el adyuvante trastuzumab, 1 debido a una enfermedad extendida no relacionada y 1 paciente por motivos personales.			
	85 ‡ pacientes se inscribieron en el grupo de observación, 2 no pudieron continuar y 4 se retiraron por el ensayo de la vacuna peptídica MHC II. 2 pacientes se unieron al grupo de vacunación.			

[0083] Los dos grupos fueron equivalentes en la mayoría de las categorías de pronóstico estándar. Sin embargo, los pacientes vacunados fueron más receptores de la hormona negativa y, por lo tanto, un número menor de pacientes en el grupo de vacunación estaban en la terapia hormonal adyuvante. Observando los ensayos individuales, más pacientes vacunados en el ensayo de NN en comparación a los controles tuvieron sobreexpresión de tumores HER2 / neu (25,0 % contra 7,1 %, P < 0,05), y menos pacientes recibieron radioterapia adyuvante (64,7 % contra 85,7 %, P < 0,05).

[0084] Durante los ensayos, se determinó que E75 podría utilizarse en pacientes HLA - A3⁺ basándose en los datos de afinidad obtenidos a partir de dos algoritmos de unión comunes de péptido HLA utilizados: BIMAS (SEC ID N° 3) y SYFPEITHI (SEC ID N° 4). Además, la evaluación pre - clínica demostró que CTL de E75 estimulado HLA - A3⁺ podría lisar las células cancerígenas que expresan HER2 / neu HLA - A3⁺ (no se muestra).

[0085] Aunque no hubo diferencia en el estado de los nódulos del subconjunto de HLA - A3 comparado al subconjunto de HLA - A2 (54,5 % contra 45,9 %, P = 0,59), tienden a tener tumores más pequeños (90,9 5 contra 65,7 %, P = 0,08), tuvieron menos probabilidades de tener tumores hormonalmente insensibles (18,2 % contra 29,6 %, P = (0,4) y tuvieron menos tumores que sobreexpresaban HER2 / neu (0 % contra 31, 5 %, P = 0,028).

EJEMPLO 2

Protocolo clínico y de vacunación

[0086] NeoMPS, Inc. (San Diego, CA) produjo el péptido E75 cumpliendo las normas correctas de fabricación y calidad. La pureza del péptido (> 95 %) se verificó mediante cromatografía líquida de alta eficacia y espectrometría de masas, y el contenido aminoácido se determinó mediante análisis de aminoácidos. Las pruebas de esterilidad y seguridad general se llevaron a cabo por el fabricante. El péptido liofilizado se reconstituyó en solución salina estéril a 100 µg, 500 µg o 1000 µg en 0,5 ml. En el momento de su administración, el péptido se descongeló y se mezcló con GM - CSF (Berlex, Seattle, WA) en 0,5 ml y la inoculación de 1,0 ml se dividió y se administró por vía intradérmica en dos sitios distanciados 5 cm. Todas las inoculaciones se dieron en la misma extremidad.

[0087] *Series de vacunas.* El ensayo de NP se diseñó como un ensayo de seguridad de dos fases con dosis incrementadas de péptido en la fase inicial y alteraciones del plan en la segunda fase. Los detalles de las series de vacunas se han publicado anteriormente (Peoples GE et al., (2005) J. Clin. Oncol. 23: 7536 - 45). Resumidamente, se asignó a entre 3 y 6 pacientes (HLA - A2⁺ o HLA - A3⁺) un plan de vacunas para recibir cuatro o seis inyecciones

mensuales de 100 µg, 500 µg o 1000 µg de E75 (100,6; 500,4; 500,6; 1000,4 y 1000,6, respectivamente) (**Tabla 2**). Por último, los grupos se ampliaron para determinar y confirmar la dosis óptima en pacientes con NP, teniendo en cuenta el gran número de pacientes en los segundos grupos de dosis.

5

Tabla 2. Diseños de ensayos de NP y NN

Grupo del paciente	Nº de pacientes HLA – A2* (A3*)	Dosis de péptido (µg)	† Dosis de GM – CSF† (µg)	‡ Meses vacunados ‡
<i>Nódulo - positivo</i>				
100,6	2*	100	250	0, 1, 2, 3, 4, 5
500,4	6	500	250	0, 1, 2, 5
500,6	6	500	250	0, 1, 2, 3, 4, 5
1000,4	9 (2)	1000	250	0, 1, 2, 5
1000,6	16 (4)	1000	250	0, 1, 2, 3, 4, 5
<i>Nódulo – negativo</i>				
500,125,3	10	500	125	0, 1, 5
500,125,4	10	500	125	0, 1, 2, 5
500,250,4	10 (3)	500	250	0, 1, 2, 5
500,250,6	10 (2)	1000	250	0, 1, 2, 3, 4, 5
1000,250,6	6	1000	250	0, 1, 2, 3, 4, 5
Total	85 (11)			
† El péptido se suspendió en 0,5 ml de solución salina estéril y se combinó con GM – CSF y solución salina a un volumen final de 1,0 ml por inoculación.				
‡ Las vacunas se administraron cada 3 – 4 semanas.				
* Un paciente asignado al grupo 100,6 se retiró y no se designó ningún sustituto en ese grupo de dosis.				

45 **[0088]** El ensayo de NN se diseñó para definir la dosis biológica óptima variando la dosis de GM – CSF y alterando el plan de inoculación. Los pacientes con tumores que no expresaron HER2 / neu participaron en este ensayo para determinar la viabilidad de vacunar un presunto huésped antígeno (naive). Se asignaron diez pacientes a cada grupo de dosis para recibir tres, cuatro o seis inyecciones mensuales durante cinco meses (**Tabla 2**).

50 **[0089]** *Cultivos y aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)*. La sangre se extrajo antes de cada vacunación y después de terminar las series de vacunas al primer (postvacuna) y al sexto mes (a largo plazo). Se extrajeron 50 ml de sangre y se aislaron PBMCs. Los PBMCs se lavaron, se resuspendieron en un medio de cultivo y se utilizaron como fuente de linfocitos.

55 **[0090]** *Toxicidad*. Los pacientes se mantuvieron en observación una hora después de la vacunación por hipersensibilidad inmediata y volvieron pasadas 48 a 72 horas para comprobar sus sitios de inyección y preguntarles por la toxicidad. La toxicidad se midió según los criterios de terminología común para los efectos secundarios del NCI, v 3.0 y se representaron en una escala de 0 a 5. La progresión del grupo de una dosis a la siguiente ocurrió solo si no tenía lugar ninguna toxicidad significativa en el grupo de menor dosis. Los resultados de pacientes específicos se representaron basándose en la toxicidad máxima local y sistémica ocurrida durante las series.

65 **[0091]** Las toxicidades local y sistémica fueron leves, y todos los pacientes completaron las series de vacunas. Las toxicidades locales fueron de grado 1 (81 %) y de grado 2 (19 %). La toxicidad sistémica fue mínima: de grado 0 (12 %), de grado 1 (71 %), de grado 2 (14 %) y de grado 3 (2 %) (**Figura 1**) sin que se observaran toxicidades sistémicas de grado 4 o 5. Debido a que se observaron toxicidades compatibles con GM – CSF, se estableció una reducción del 50 % en la dosis de GM – CSF en caso de reacciones significativas locales o sistemáticas (18,7 % de los pacientes).

[0092] Los perfiles de toxicidad fueron los mismos en los pacientes A3 y en sus homólogos A2: toxicidad máxima local de grado 1 (82 %) y de grado 2 (18 %) para ambos grupos. Toxicidad máxima sistémica (A3 vs. A2): de grado 0 (0 % vs. 15 %), de grado 1 (92 % vs. 68 %), de grado 2 (8 % vs. 14 %) y de grado 3 (0 % vs. 2 %; $p=0,4$). Las respuestas locales de los pacientes A3 fueron idénticas a las de los pacientes A2 en sus respectivos grupos de dosis. Por tanto, no hubo diferencia en el perfil de toxicidad entre los pacientes HLA – A3⁺ en comparación a los pacientes HLA – A2⁺, y tuvieron fuertes reacciones reacciones locales. La toxicidad local de grado 2 fue del 20 % en comparación al 18 %, respectivamente, lo que sugiere una inmunogenicidad *in vivo* similar.

[0093] *Recurrencias clínicas.* Se observó en todos los pacientes la recurrencia clínica mediante las pruebas de detección de cáncer dictadas por el oncólogo de cabecera del paciente. Un paciente era considerado recurrente si se comprobaba mediante una biopsia o si estaba siendo tratado por recurrencia por el equipo oncológico primario.

[0094] Por diseño del protocolo, los análisis primarios se iniciaron a los 18 meses, en la mitad del seguimiento. Al término de este análisis, se habían inscrito 71 pacientes, y el porcentaje de recurrencia en el grupo vacunado fue del 5,6 %, comparado al 14,2 % del grupo de observación ($P=0,04$) a un seguimiento medio de 20 meses. Los porcentajes de supervivientes libres de enfermedad en los grupos vacunados y de control fueron de 92,5 % y 77 %, respectivamente (**Figura 2**). Hubo cuatro muertes en el grupo de observación (supervivientes totales [OS] 95,1 %) en comparación a la única muerte del grupo vacunado (OS 99 %, $P=0,1$).

[0095] El seguimiento de ambos ensayos se extendió cinco años, a pesar de la decreciente inmunidad y la falta de una inoculación de refuerzo en el diseño del protocolo. Un análisis actualizado demostró recurrencias adicionales en ambos grupos, incluyendo una recurrencia tardía en el grupo vacunado a los 58 meses. A los 26 meses del seguimiento, había 186 pacientes inscritos, y el porcentaje de recurrencia fue del 8,3 % en el grupo vacunados, comparado al 14,8 % en el grupo de observación ($P=0,15$). Hubo una distribución diferente de recurrencias entre estos pacientes. La recurrencia en hueso supuso/fue el 50 % de las recurrencias en los pacientes de control (6 / 12) y el 0 % de los pacientes vacunados ($P=0,04$).

[0096] Entre los pacientes HLA – A3⁺, el porcentaje de recurrencia fue similar al de los pacientes HLA – A2⁺ (9,1 % vs. 82 %).

[0097] *Análisis estadístico.* Se compararon los porcentajes de recurrencia entre grupos utilizando análisis de supervivencia mediante el método de Kaplan - Meier, y la proporción de sujetos que tuvieron recurrencias se comparó utilizando análisis log rango. Los valores P de los factores clinicopatológicos se calcularon utilizando Wilcoxon, el test exacto de Fisher o χ^2 según procediera. Los valores P para comparar los niveles prevacunación y postvacunación débiles se calcularon utilizando Wilcoxon y para DTH utilizando el t-test de Student.

EJEMPLO 3

HLA – A2: Ensayo de dímero de inmunoglobulina

[0098] La presencia de células CD8⁺ específicas de E75 en PBMC aislado recientemente de pacientes se analizaron directamente utilizando un ensayo de dímero. En resumen, la HLA – A2: dímero de inmunoglobulina (Ig) (PharMingen, San Diego, CA) se cargó con el péptido E75 o de control (E37, proteína de unión a folato (25 – 33) RIAWARTEL (SEC ID N° 5) incubando 1 μg de dímero con un exceso (5 μg) de péptido y 0,5 μg de $\beta 2$ – microglobulina (Sigma, St Louis, MO) a 37 °C durante toda la noche y, a continuación, se conservó a 4 °C hasta su utilización. El PMBC se lavó y se resuspendió en tampón PharMingen Stain (PharMingen) y se añadió a 5×10^5 células / 100 μl / tubo en tubos de base redonda de poliestireno de 5 ml (Becton Dickinson, Mountain View, CA) y se tiñeron con los dímeros y anticuerpos cargados. Se determinó en cada paciente el nivel de células CD8⁺ específicas de E75 en respuesta a cada vacunación sucesiva y todas las medidas tras la inoculación se calcularon para cada paciente y se compararon con sus niveles antes de la inoculación.

[0099] El CTL específico de E75 se analizó en PMBCs fresco *ex vivo* mediante el ensayo de dímero antes de cada vacunación y tras uno (tras la vacunación) y seis meses (a largo plazo). Se ha demostrado anteriormente que el ensayo de dímero está correlacionado con los ensayos funcionales inmunes (citotoxicidad y secreción de citoquina) (Peoples GE et al., (2005) J. Clin. Oncol. 23: 7536 – 45). Se observó un patrón de incremento de CTL CD8⁺ específicas de E75 durante las series de vacunas, alcanzando su punto más alto y estabilizándose posteriormente una vez finalizadas.

[0100] Las respuestas acumulativas de dímeros para todos los pacientes se muestran en la **Figura 3A**. Hubo un incremento estadísticamente significativo en el medio de células CD8⁺ específicas de E75 entre los niveles prevacunación y postvacunación y los niveles máximos. Los niveles a largo plazo no fueron diferentes de los niveles prevacunación. Tan solo el 48,3 % de los pacientes mantuvo inmunidad residual significativa (definida como dímero > 0,5) seis meses después de la vacunación.

[0101] La inmunidad preexistente a E75 (definida como dímero > 0,3) se encontró en el 42,7 % de los pacientes (**Figura 3B**). Se ha encontrado el mismo patrón de respuesta al dímero independientemente de los niveles de

dímero iniciales. Sin embargo, los pacientes que carecían de inmunidad preexistente tuvieron un incremento significativo en sus niveles de dímero a largo plazo.

EJEMPLO 4

5

Hipersensibilidad retardada (DTH)

[0102] En ambos ensayos, se analizó una reacción de DTH con 100 µg de E75 en 0,5 ml de solución salina normal (sin GM – CSF) y 0,5 ml de solución salina como control de volumen un mes después de terminar la serie de vacunas como se describió anteriormente (Peoples GE et al., (2005) J. Clin. Oncol. 23: 7536 – 45). La reacción de DTH se midió en dos dimensiones durante 48 a 72 horas utilizando el “sistema del bolígrafo” sensible y se presentó como el medio ortogonal y se comparó al control. En el ensayo de NN, también se llevó a cabo un DTH antes de la vacunación.

[0103] *Respuesta inmune in vivo.* Para medir la eficacia de la vacuna *in vivo*, se midió DTH postvacuna un mes después completar las series de vacunas con 100 µg de E75 inyectado por vía intradérmica con un control de volumen de solución salina. Entre todos los pacientes vacunados, el 74 % tuvo una DTH postvacuna positiva con un endurecimiento medio de E75 de 14,0 ± 1,4 mm en comparación al control 2,1 ± 0,5 mm (P < 0,0001) (**Figura 4A**).

[0104] Los pacientes con NN tuvieron DTH antes y después de las vacunas (**Figura 4B**). Antes de la vacuna no hubo diferencia en DTH entre E75 y el control. Tras la vacuna, la respuesta DTH a E75 fue estadísticamente mayor que el control, y el DTH de E75 fue significativamente diferente después de la vacuna en comparación a antes de la vacuna (10,9 ± 1,5 mm vs. 2,8 ± 0,8 mm, P < 0,0001).

[0105] Los pacientes con NP tuvieron una respuesta a DTH de E75 mayor tras la vacuna que los pacientes con NN (**Figura 4C**); diferencia debida a que los pacientes con NN recibieron cantidades mucho más pequeñas de E75 en total. Analizando las respuestas a DTH como función de dosis, los pacientes que recibieron 6000 µg de E75 tuvieron una reacción a DTH significativamente mayor que aquellos pacientes que recibieron < 6000 µg de péptido (25,1 ± 4,0 vs. 13,3 ± 1,9 mm, P= 0,008) (**Figura 4D**).

30

EJEMPLO 5

ENSAYO ELISPOT HLA – A3⁺

[0107] Le respuesta de la vacuna para los pacientes HLA – A3⁺ también se analizó con interferón – γ y ELISPOT específico de E75. Mediante ELISPOT, los pacientes A3 mostraron entre 0 y 30 puntos / 10⁶ células al inicio que se incrementó a entre 3 y 448 puntos / 10⁶ células tras la vacunación, p= 0,04. Lo que es más importante, las recurrencias clínicas fueron las mismas en ambos grupos (A3, 9,1 % vs. A2, 8,2 %) y se compararon al 14,8 % del grupo de control.

40

EJEMPLO 6

Vacuna de refuerzo para el cáncer de mama

[0108] *Pacientes.* Los ensayos de NP y NN se aprobaron en el Consejo de Revisión Institucional local realizados en el Walter Reed Army Medical Center (WRAMC), en Washington DC y en el Joyce Murthe Breast Care Center, en Windber, PA. Estos ensayos clínicos son dirigidos según la aplicación de un nuevo fármaco de investigación (BB – IND #9187) aprobado por la Food and Drug Administration. Todos los pacientes tenían cáncer de mama histológicamente confirmado, habían completado la terapia estándar, estaban libres de la enfermedad y eran inmunocompetentes en el momento de inicio de la inscripción. Los pacientes HLA – A2⁺ y HLA – A3⁺ se vacunaron con dosis diferentes de E75 y GM – CSF, variando el plan en un período de seis meses, como se establece en los Ejemplos anteriores. Se ofreció a los pacientes una dosis de refuerzo opcional de E75 (1 mg) + GM – CSF (0,250 mg) si habían transcurrido, al menos, seis meses desde que terminaron las series de vacunación primaria.

[0109] 25 pacientes recibieron una vacuna de refuerzo (**Tabla 3**). Tan solo la mitad (56 %) tuvo NP de cáncer de mama. El tiempo medio antes de la vacuna fue de 12 meses (oscila de 6 a 24 meses). Los pacientes se evaluaron como pacientes con refuerzo anterior (RA) si recibían el refuerzo 6 meses después de las series primarias o pacientes con refuerzo posterior (RP) si lo hacían > 6 meses desde las series primarias.

60

65

Tabla 3. Demografía de pacientes	
	Paciente (n = 25)
Edad, media (años)	56 (oscila de 31 a 76)
≥ T2	28 %
Nódulo positivo	56 %
Grado 3	32 %
ER – PR –	28 %
Sobreexpresión de HER2 / neu	20 %
Tiempo desde la terapia primaria estándar (mes)	33 (9 – 200)
Tiempo desde la primera serie vacunas (mes)	12 (6 - 24)

5
10
15
20

[0110] La inmunidad residual específica de E75 disminuyó con el tiempo como se midió con el dímero HLA – A2: IgG. El nivel medio de células T de CD8⁺ en el grupo EB (n= 6) fue del 1,4 % (oscila del 0,61 % a 3,43 %) en comparación al grupo LB (n = 13) (0,44 %, 0 a 2,67 %, p= 0,02). Para los pacientes LB, su nivel de dímero medio 6 meses después de la serie inicial fue de 0,70 % (0,19 % a 1,55 %). No hubo diferencia estadística respecto a los niveles de los pacientes EB 6 meses después (**Figura 5**).

25

[0111] *Vacuna de refuerzo.* NeoMPS, Inc. (San Diego, CA) produjo el péptido E75 cumpliendo las normas correctas de fabricación y calidad. La pureza del péptido (> 95 %) se verificó mediante cromatografía líquida de alta eficacia y espectrometría de masas, y el contenido aminoácido se determinó mediante análisis de aminoácidos. El péptido se purificó a más del 95 %. Las pruebas de esterilidad y seguridad general se llevaron a cabo por el fabricante. El péptido liofilizado se reconstituyó en solución salina estéril a 100 µg, 500 µg o 1000 µg en 0,5 ml. En el momento de su administración, el péptido se descongeló y se mezcló con GM – CSF (Berlex, Seattle, WA) en 0,5 ml y la inoculación de 1,0 ml se dividió y se administró por vía intradérmica en dos sitios distanciados 5 cm. La vacuna de refuerzo se dio en la misma extremidad que la primera serie.

30
35

[0112] *Toxicidad.* Los pacientes se mantuvieron en observación una hora después de la vacunación por reacciones de hipersensibilidad inmediata. La toxicidad se midió según los criterios de terminología común para los efectos secundarios del NCI, v 3.0 y se representaron en una escala de 0 a 5. Los pacientes que habían sufrido anteriormente toxicidad local o sistemática significativa (de grado 2 o 3) recibieron una dosis reducida de GM – CSF de 0,125 mg.

40

[0113] La dosis de recuerdo fue muy bien tolerada (**Figura 6**) con una toxicidad local primaria de grado 1 (un efecto deseado). Aproximadamente la mitad de los paciente no sufrió dolencias sistémicas. No hubo toxicidades de grado 3 o 4. Tan solo 1 paciente (4 %) tuvo un grado de toxicidad más alto durante el refuerzo que durante la primera serie (inflamación local de grado 2).

45

[0114] *Cultivos y aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).* Se extrajo sangre antes de cada vacuna de refuerzo y a las 3 o 4 semanas posteriores a la administración del refuerzo para aislar células mononucleares de sangre periférica en tubos Vacutainer CPT, y se utilizaron como fuente de linfocitos.

50

[0115] *HLA – A2: Ensayo de dímero de inmunoglobulina.* La presencia de células CD8⁺ específicas de E75 en PBMC aislado recientemente de pacientes se analizó directamente utilizando el ensayo de dímero descrito en el Ejemplo 3. En resumen, la HLA – A2: dímero de inmunoglobulina (Ig) (PharMingen, San Diego, CA) se cargó con el péptido E75 o de control (E37, proteína de unión a folato (25 – 33) RIAWARTEL (SEC ID N° 5)) incubando 1 µg de dímero con un exceso (5 µg) de péptido y 0,5 µg de β2 – microglobulina (Sigma, St Louis, MO) a 37 °C durante toda la noche y, a continuación, se conservó a 4 °C hasta su utilización. El PMBC se lavó y se resuspendió en tampón PharMingen Stain (PharMingen) y se añadió a 5 x 10⁵ células / 100 µl / tubo en tubos de base redonda de poliestireno de 5 ml (Becton Dickinson, Mountain View, CA) y se tiñeron con los dímeros y anticuerpos cargados. Se determinó en cada paciente HLA - A2⁺ el nivel de células CD8⁺ específicas de E75 antes y después de cada vacuna de refuerzo.

55
60

[0116] Los antígenos específicos CD8⁺ de las células T se cuantificaron antes y de 3 a 4 semanas después de la vacuna de refuerzo. La inmunidad residual significativa (IRS, definida como antígeno específico CD8⁺ de células T ≥ 0,5 %) fue significativamente diferente en los dos grupos en un 100 % (6 / 6) en los pacientes EB comparado al 30,8

65

% (4 / 13) de los pacientes LB (p= 0,01). Entre aquellos pacientes que carecían de IRS (n = 8) hubo tendencia a incrementar CD8⁺ específico de E75 + células T (**Figura 7**) de 0,43 % (0 a 0,49 %) a 0,87 % (0 a 2,3 %; p= 0,08).

5 **[0117] Ensayos de puntos por inmunoabsorción unida a enzimas.** Se detectaron las células productoras de IFN - γ utilizando el kit BD ELISPOT de manera inmediata (*ex vivo*) o tras una incubación de 7 días con péptidos. El PBMC fresco se dispuso en las placas de ELISPOT a una concentración de 5×10^5 células (*ex vivo*) o 1×10^5 (7 días) por pocillo un medio con IL - 7 (*ex vivo*) o en un medio con y sin IL - 7 (7 días). Las células se estimularon durante 16 horas (*ex vivo*) o durante 7 días en presencia o ausencia de péptidos (E37, FluM, E75, GP2, HER2 / neu 1 μ g o 5 μ g). Se realizaron incubaciones adicionales en los pocillos de 7 días incluyendo una combinación de E75 + HER2 / neu 1 μ g o 5 μ g. Se llevaron a cabo un total de 16 ensayos en cada muestra de sangre, proporcionando células suficientes. Al final de la incubación, las placas se desarrollaron según las instrucciones del fabricante. Se añadió una detección de anticuerpos biotinilados, y las placas se incubaron toda la noche a 4 °C. Tras la incubación, las placas se lavaron, se añadió solución Avidin - HRP durante 1 hora y se desarrollaron los puntos utilizando solución de sustrato de AEC. Se contaron los puntos utilizando el analizador Immunospot Series 2 y el software ImmunoSpot.

20 **[0118]** Todos los pacientes tuvieron células productoras de IFN - γ contadas antes y después de la vacuna de refuerzo en 16 ensayos, dependiendo de la disponibilidad de PBMC a partir de una muestra de sangre. Veintidós pacientes tuvieron, al menos, un ensayo ELISPOT antes y después del refuerzo (media de 10 ensayos por paciente, oscila entre 1 y 14). Entre estos pacientes, hubo, en total, 225 ensayos antes del refuerzo, de los cuales, el 54,5 % mostró una producción de IFN - γ detectable. Entre los 194 ensayos (antes y después del refuerzo) las muestras del mismo paciente de llevaron a cabo con la misma concentración de péptido, 78 (40,2 %) mostraron un incremento de células productoras de IFN - γ con el refuerzo. En todos, 20 / 22 (91 %) de los pacientes mostraron un incremento de células productoras de IFN - γ en, al menos, un ensayo y 11 (50 %) mostró un incremento de células productoras de IFN - γ en, al menos, el 50 % de los ensayos. Los resultados se muestran en la **Figura 8**.

30 **[0119] Reacciones locales.** Las reacciones locales (RL) se midieron como un análisis funcional *in vivo* de la respuesta. Las RL se midieron entre 48 y 72 después de la vacuna y en dos direcciones, y se presentaron como un medio ortogonal \pm SE utilizando el "sistema del bolígrafo" sensible. Las RL se compararon con las RL previas de los pacientes para calcular la respuesta al refuerzo.

35 **[0120]** Los pacientes que recibieron el refuerzo \leq 9 meses (n= 12) desde su primera serie tuvieron RL significativamente superiores (130 ± 7 mm) que los pacientes < 9 meses (n= 13) desde su primera serie (\leq 9 meses 81 ± 5 mm; > 9 meses 85 ± 8 mm, p= 0,73). Los resultados se muestran en las **Figuras 9 y 10**.

40 **[0121] Análisis estadístico.** Los valores de dímero HLA: IgG que se presentan como medios y valores P se calcularon utilizando el test Wilcoxon. Para comparaciones proporcionales, se utilizó el exacto de Fisher. La comparación de reacciones locales se llevó a cabo con las pruebas - t para muestras apareadas o desapareadas de Student, cuando fue necesario.

EJEMPLO 7

Nivel de expresión de HER2 / neu (E75) de la respuesta a la vacuna de péptido por HER2 / neu

45 **[0122]** Los ensayos clínicos se llevaron a cabo con vacuna de péptido E75 HER2 / neu en pacientes CM con nódulo positivo y nódulo negativo. Estos pacientes tenían todos los niveles de expresión de HER2 / neu. La determinación del estado de HER2 / neu se llevó a cabo, sobre todo, mediante dos pruebas, inmunohistoquímica (IHC) e hibridación por fluorescencia *in situ* (FISH). IHC detectó la sobreexpresión de la proteína HER2 / neu y se presentó en una escala semicuantitativa de 0 a 3+ (0 = negativo, 1 + = expresión baja, 2 + = intermedio y 3 + = sobreexpresión). FISH, por otro lado, detectó la amplificación (exceso de copias) del gen HER2 / neu y se expresó como una relación de HER2 / neu al cromosoma 17 y se interpretó como sobreexpresión si FISH era > 2,0 copias. El porcentaje de concurrencia de IHC y FISH es de, aproximadamente, el 90 %.

Materiales y métodos:

55 **[0123]** Se llevó a cabo un subconjunto de análisis de 163 pacientes con CM inscritos en la fase II de los ensayos de vacuna E75 basados en el nivel de expresión de HER2 / neu. Se analizaron los expresores bajos de los pacientes (LE = IHC 1 + - 2 + y FISH > 0 pero < 2,0) vs. Los sobreexpresores (OE = IHC 3 + y / o FISH > 2,0) y mediante el estado de IHC (0, 1+, 2+, 3+). El análisis se llevó a cabo con los factores clinicopatológicos estándar, respuesta inmunológica a la vacuna (reacciones DTH *in vivo* e *in vitro* del ensayo de dímero HLA - A2 : IgG), y las respuestas clínicas (recurrencia absoluta y porcentaje de mortalidad).

65 **[0124] Características del paciente y Protocolos clínicos.** Los ensayos de NP y de NN se aprobaron en el Consejo de Revisión Institucional local realizados en el Walter Reed Army Medical Center (WRAMC), en Washington DC y en el Joyce Murthe Breast Care Center, en Windber, PA según la aplicación de un nuevo fármaco de investigación (BB

– IND #9187). Todos los pacientes tenían CM histológicamente confirmado y habían completado el ciclo estándar de cirugía, quimioterapia y radioterapia (en su caso) antes de la inscripción. Los pacientes tratados con terapia hormonal continuaron con su régimen específico. Tras el asesoramiento y el consentimiento oportunos, los pacientes con CM se inscribieron en el ensayo apropiado (NP o NN) y se determinó el tipo de HLA ya que HLA – A2 que se une en primer lugar a E75 se encuentra en, aproximadamente, el 40 – 50 % de la población general. Los pacientes con HLA – A2+ se vacunaron, y los pacientes con HLA – A2- se mantuvieron en observación por recurrencia clínica. A continuación se vacunaron los pacientes con HLA – A3⁺. Antes de la vacunación, se realizaron en los pacientes pruebas cutáneas con un conjunto de antígenos de recuerdo (pruebas de Mantoux). Los pacientes se consideraron inmunocompetentes si reaccionaban (> 5mm) a > 2 antígenos.

[0125] *Vacuna:* NeoMPS, Inc. (San Diego, CA) produjo el péptido E75 cumpliendo las normas correctas de fabricación y calidad. La pureza del péptido (> 95 %) se verificó mediante cromatografía líquida de alta eficacia y espectrometría de masas, y el contenido aminoácido se determinó mediante análisis de aminoácidos. Las pruebas de esterilidad y seguridad general se llevaron a cabo por el fabricante. El péptido liofilizado se reconstituyó en solución salina estéril a 100 µg, 500 µg o 1000 µg en 0,5 ml. El péptido se mezcló con GM – CSF (Berlex, Seattle, WA) en 0,5 ml. La inoculación de 1,0 ml se dividió y se administró por vía intradérmica en dos sitios distanciados 5 cm en la misma extremidad.

[0126] *Series de vacunación.* El ensayo de NP se diseñó como un ensayo de seguridad de dos fases con dosis incrementadas de péptido en la fase inicial y alteraciones del plan en la fase posterior. Los detalles de las series de vacunas se han publicado anteriormente. Resumidamente, se asignó a entre 3 y 6 pacientes (HLA – A2⁺ o HLA – A3⁺) un plan de vacunas para recibir cuatro o seis inyecciones mensuales de 100 µg, 500 µg o 1000 µg de E75 (100,6; 500,4; 500,6; 1000,4 y 1000,6, respectivamente). Los grupos se ampliaron para determinar y confirmar la dosis óptima en pacientes con NP, teniendo en cuenta el gran número de pacientes en los segundos grupos de dosis.

[0127] El ensayo de NN se diseñó para definir la dosis biológica óptima variando la dosis de GM – CSF y alterando el plan de inoculación. Se permitieron en este ensayo veintidós paciente con tumores HER2 / neu IHC 0 para determinar la viabilidad de vacunar un presunto huésped antígeno (naive). Se asignaron diez pacientes a cada grupo de dosis con péptido E75 constante de 500 mcg para recibir tres, cuatro o seis inyecciones mensuales variando las dosis de GM – CSF) 125 mcg o 250 mcg).

[0128] *Toxicidad.* Los pacientes se mantuvieron en observación una hora después de la vacunación por hipersensibilidad inmediata y volvieron pasadas 48 a 72 horas para comprobar sus sitios de inyección y preguntarles por la toxicidad. La toxicidad se midió según los criterios de terminología común para los efectos secundarios del NCI, v 3.0 (representados en una escala de 0 a 5). La progresión del grupo de una dosis a la siguiente ocurrió solo si no tenía lugar ninguna toxicidad significativa en el grupo de menor dosis. Los resultados de pacientes específicos se representaron basándose en la toxicidad máxima local y sistémica ocurrida durante las series.

[0129] *Cultivos y aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).* La sangre se extrajo antes de cada vacunación y después de terminar las series de vacunas al primer (tras la vacuna) y al sexto mes (a largo plazo). Se extrajeron 50 ml de sangre y se aislaron PBMCs. Los PBMCs se lavaron, se resuspendieron en un medio de cultivo y se utilizaron como fuente de linfocitos como se ha descrito anteriormente.

[0130] *Ensayo de dímero de inmunoglobulina:* La presencia de células CD8⁺ específicas de E75 en PBMC aislado recientemente de pacientes se analizó directamente utilizando el ensayo de dímero descrito anteriormente. En resumen, la HLA – A2: dímero de inmunoglobulina (Ig) (PharMingen, San Diego, CA) se cargó con el péptido E75 o de control (E37, proteína de unión a folato (25 – 33) RIAWARTEL (SEC ID N° 5)) incubando 1 µg de dímero con un exceso (5 µg) de péptido y 0,5 µg de β2 – microglobulina (Sigma, St Louis, MO) a 37 °C durante toda la noche y, a continuación, se conservó a 4 °C hasta su utilización. El PMBC se lavó y se resuspendió en tampón PharMingen Stain (PharMingen) y se añadió a 5 x 10⁵ células / 100 µl / tubo en tubos de base redonda de poliestireno de 5 ml (Becton Dickinson, Mountain View, CA) y se tiñeron con los dímeros y anticuerpos cargados. Se determinó en cada paciente el nivel de células CD8⁺ específicas de E75 en respuesta a cada vacunación sucesiva y todas las medidas tras la inoculación se calcularon para cada paciente y se compararon con sus niveles antes de la inoculación.

[0131] *Hipersensibilidad retardada (DTH):* En ambos ensayos, se analizó una reacción de DTH con 100 µg de péptido E75 en 0,5 ml de solución salina normal (sin GM – CSF) y en 0,5 ml de solución salina como control de volumen un mes después de terminar la serie de vacunas como se describió anteriormente. La reacción de DTH se midió en dos dimensiones durante 48 a 72 horas utilizando el “sistema del bolígrafo” sensible y se presentó como el medio ortogonal y se comparó al control. En el ensayo de NN, también se llevó a cabo un DTH antes de la vacunación.

[0132] *Recurrencias clínicas.* Se observó en todos los pacientes la recurrencia clínica mediante las pruebas de detección de cáncer dictadas por el oncólogo de cabecera del paciente. Un paciente era considerado recurrente si se comprobaba mediante una biopsia o si estaba siendo tratado por recurrencia por el equipo oncológico primario.

[0133] *Análisis estadístico.* Se compararon los porcentajes de recurrencia entre grupos utilizando análisis de

supervivencia mediante el método Kaplan - Meier, y la proporción de sujetos que tuvieron recurrencias se comparó utilizando análisis de log - rango. Los valores P de los factores clinicopatológicos se calcularon utilizando Wilcoxon, el test exacto de Fisher o χ^2 según procediera. Los valores P para comparar los niveles prevacunación y postvacunación débiles/tenues/bajos se calcularon utilizando Wilcoxon y para DTH utilizando t-test de Student.

5

Resultados:

[0134] Se evaluaron los pacientes LE (control = 44, vacuna = 56) vs OE (control = 22, vacuna = 29) y el estado de IHC de los grupos de control y con la vacuna (0 = 5 vs. 7, 1+, 15 vs. 25, 2+ 24 vs. 26, 3+ 13 vs. 19, respectivamente. Tanto los LE vs OE como todos los estados IHC de los grupos vacunados respondieron inmunológicamente; sin embargo, los pacientes LE, y más específicamente, los pacientes IHC 1+, tuvieron una respuesta inmune aumentada *in vitro* a largo plazo ($p = 0,04$ y $p = 0,08$, respectivamente). Además, los pacientes LE tendían a, al igual que los pacientes IHC 1+ disminuir la mortalidad en comparación a sus grupos de control ($p = 0,08$ y $p = 0,04$, respectivamente).

15

[0135] *Pacientes:* Se inscribieron 186 pacientes en los estudios de la vacuna con E75; 9 se retiraron (4 pacientes de control y 5 pacientes vacunados – ninguno se retiró debido a la toxicidad), dando como resultado 177 que completaron los ensayos. Todos los pacientes de control (C) y los vacunados (V) en el ensayo de NP (C= 46, V= 45, total = 91 pacientes) se habían sometido a pruebas IHC, FISH o a ambas. En el ensayo de NN (C= 35, V = 51, total= 86 pacientes) 12 pacientes tenían tumores HER2 / neu IHC 0 (C= 5, V=7). También en los ensayos de NN, los tumores de 14 pacientes (C=7, V=7) no se sometieron a IHC o FISH – estos 14 pacientes fueron excluidos del subconjunto de análisis; por lo tanto, 163 pacientes estaban disponibles para los análisis.

20

[0136] *Subconjunto de análisis de LE vs. OE:*

25

[0137] *Pacientes por expresión:* el subconjunto de análisis se llevó a cabo comparando LE (IHC 1 + - 2 + o FISH > 0 y < 2,0) vs. OE (IHC 3 + o FISH > 2,0). Sesenta y seis pacientes del grupo de control realizaron IHC o FISH (LE= 44, OE = 22). En total, 85 pacientes del grupo con la vacuna de E75 realizaron IHC o FISH (LE = 56, OE = 29). Un número comparable de pacientes C y V estaban en los grupos LE (67 % vs 66 %, respectivamente) y OE (33 % vs 34 %, respectivamente).

30

[0138] Los factores demográficos, de pronósticos y los perfiles de tratamiento de los pacientes LE y OE se presentan en la **Tabla 4**. En lo que concierne a los pacientes LE, no se encontraron diferencias estadísticas entre los pacientes C y V. Sin embargo, con los pacientes OE, un número de pacientes V receptores negativos de hormonas fue estadísticamente mayor que en el grupo C ($p= 0,02$) (**Tabla 4**).

35

Tabla 4. Factores demográficos, de pronóstico y perfiles de tratamiento de los pacientes inscritos en la Fase II del ensayo con E75 de LE vs. OE.

40

	LE Control (n= 44)	LE Vacuna (n=56)	P	OE Control (n= 22)	OE Vacuna (n=29)	P
Edad media, años	55	56		50	52	
Rango de edad	31 – 82	27 – 77	0,7	32 – 75	37 – 68	0,1
Blancos, %	86,4 %	89,3 %	0,8	72,7 %	86,2 %	0,3
Otros, %	13,6 %	10,7 %	0,8	27,3 %	13,8 %	0,3
Tamaño del tumor						
T2 – T4, %	38,6 %	33,9 %	0,7	31,8 %	34,5 %	0,9
Grado histológico						
Grado III, %	27,2 %	30,4 %	0,8	63,6 %	62,1 %	0,9
Nódulo positivo (NP), %	54,5 %	58,9 %	0,7	90,1 %	55,2 %	0,06
Receptor de hormona -, %	15,9 %	19,6 %	0,8	27,3 %	62,1 %	0,02*

65

Quimioterapia, %	72,7 %	75,0 %	0,8	86,4 %	96,6 %	0,3
XRT, %	84,1 %	75,0 %	0,3	72,7 %	75,9 %	NS
Terapia hormonal, %	81,8 %	76,8 %	0,6	63,6 %	41,4 %	0,2
Herceptin, %	0,2 %	0,2 %	NS	9,1 %	24,1 %	0,3

* Diferencia estadísticamente significativa

[0139] *Respuesta inmunológica por expresión:* La vacuna E75 fue capaz de obtener una respuesta inmune *in vitro* tanto en pacientes LE como OE. Se observó un incremento significativo de células T CD8+ específicas de E75 desde antes de la vacuna hasta el máximo en ambos grupos (LE p < 0,001, OE p < 0,001). Los pacientes LE tuvieron una respuesta inmune máximas estadísticamente mayor que los pacientes OE (p = 0,04) (**Figura 11A**).

[0140] Tanto los pacientes LE como OE fueron capaces de obtener una respuesta inmune *in vivo* tal y como se midió mediante DTH antes y después de la vacuna. Se observó un incremento significativo antes del DTH en ambas categorías (LE p < 0,001, OE p= 0,02) (**Figura 11B**). Aunque el post DTH en LE es mayor que el de OE (15,9 + 1,9 mm vs. 12,8 + 2,0 mm, respectivamente), no fue estadísticamente significativo (p = 0,5). En total, la vacuna E75 parece más activa inmunológicamente en pacientes LE.

[0141] *Respuesta clínica por expresión:* La respuesta clínica, evaluada por recurrencia y mortalidad, se anota en las **Figuras 11C** y **11D**. Todos los pacientes V (LE = 10,7 vs OE = 13,8 %) parecieron tener un porcentaje de recurrencia disminuido cuando se comparan a los pacientes C (LE & OE = 18,2 %), pero este número no es significativo. Lo que es más importante, hubo una tendencia a disminuir la mortalidad en los pacientes V, vista de manera más impresionante en los pacientes LE (C= 6,8 % vs. V= 0,0 %, p = 0,08).

[0142] *Subconjunto de análisis de estado IHC:*

[0143] *Pacientes por estado IHC:* El grupo C tenía especímenes patológicos de 57 pacientes que desarrollaron IHC (0 = 5, 1 + = 15, 2 + = 24, 3 + = 13). El grupo V de E75 tenía patologías de 77 pacientes que desarrollaron IHC (0 = 7, 1 + = 25, 2 + = 26, 3 + = 19). Había un porcentaje comparable de pacientes C y V en cada grupo IHC (0 C = 8,8 % vs. V = 9,1 %; 1 + C = 26,3 % vs. V = 32,5 %, 2 + C = 42,1 % vs. V = 33,8 %, 3 + C = 22,8 % vs. V = 24,7 %).

[0144] Los factores demográficos, de pronóstico y los perfiles de tratamiento por estado IHC se presentan en la **Tabla 5**. Hubo dos diferencias significativas en los factores de pronóstico para los grupos de estado IHC. Los pacientes IHC 1+ tuvieron un porcentaje mayor de tumores T2 – T4 en el grupo C en comparación al grupo V (66,7 % vs. 30,8 %, p= 0,05). Los pacientes IHC 3+ C fueron todos NP y el 42,1 % de los pacientes V fueron NP (p = 0,003).

Tabla 5. Factores demográficos, de pronósticos y perfiles de tratamiento de los pacientes inscritos en el ensayo con E75 Fase II por el nivel de expresión de HER2 / neu.

	0			1+			2+			3+		
	Control (n=5)	Vacuna (n=7)	p	Control (n=15)	Vacuna (n=25)	p	Control (n=24)	Vacuna (n=26)	p	Control (n=13)	Vacuna (n=19)	p
Edad media, años	50	60		54	54		50	57		49	51	
Rango de edad	38-74	31-74	0.4	44-82	42-71	0.4	31-75	27-77	0.2	31-74	37-62	0.2
Blancos, %	100.0%	71.4%	0.5	73.3%	84.0%	0.4	87.5%	92.3%	0.7	61.5%	89.5%	0.1
Otros, %	0.0%	28.6%	NS	26.7%	16.0%	NS	12.5%	7.7%	NS	40.5%	10.5%	NS
Tamaño del tumor T2 - T4, %	40.0%	14.3%	0.5	66.7%	28.0%	0.05*	29.2%	46.2%	0.2	38.5%	36.8%	0.8
Grado histológico Grado III, %	20.0%	14.3%	0.6	33.3%	36.0%	0.7	37.5%	38.5%	0.9	61.5%	57.9%	0.8
Nódulo positivo (NP), %	0.0%	0.0%	NS	80.0%	60.0%	0.3	79.2%	80.8%	0.8	100.0%	42.1%	0.003*
Receptor de hormona -, %	20.0%	14.3%	0.6	13.3%	28.0%	0.4	16.7%	11.5%	0.9	38.5%	63.2%	0.2
Quimioterapia, %	80.0%	42.9%	0.3	80.0%	76.0%	0.9	87.5%	96.2%	0.5	92.3%	94.7%	0.6
XRT, %	100.0%	42.9%	0.08	66.7%	76.0%	0.7	87.5%	96.2%	0.5	69.2%	94.7%	0.1
Terapia hormonal, %	80.0%	85.7%	0.6	80.0%	72.0%	0.9	79.2%	73.1%	0.6	53.8%	73.7%	0.3
Herceptin, %	0.0%	0.0%	NS	0.0%	0.0%	NS	8.3%	7.7%	0.9	7.7%	10.5%	0.7

* Diferencias estadísticamente significativas

[0146] Además, todos los pacientes fueron capaces de obtener una respuesta inmune *in vivo* como se midió por DTH antes y después de la vacuna. El incremento significativo de DTH antes y después se observó en todas las categorías IHC (0 p = 0,03, 1 + p = 0,02, 2 + p = 0,02, 3+ p = 0,05). En total, sin tener en cuenta la expresión de HER2 / neu medida por IHC, la vacuna fue inmunológicamente efectiva pero pareció ser más efectiva en los pacientes IHC 1+ (**Figura 12B**).

[0147] *Respuesta clínica por estado IHC:* La respuesta clínica, evaluada por recurrencia y mortalidad, se anota en la **Figuras 12C y 12D**. En todas las categorías IHC (excepto IHC + en la que no hubo pacientes), el porcentaje de recurrencia disminuyó comparando los pacientes C y V, aunque el número se mostró estadísticamente significativo. Lo que es más importante, hubo una disminución de la mortalidad en los pacientes IHC 1+, mortalidad de C= 20% y de V= 0% (p= 0,04).

[0148] En un ensayo previo a la fase II, la administración de la vacuna E75 tuvo como resultado la disminución de los porcentajes de recurrencia y tuvo una tendencia a disminuir los porcentajes de mortalidad en 20 meses, pero estas diferencias pierden inmunidad significativamente sin el uso de refuerzos. Se mostró que los pacientes que tenían todos los niveles de expresión de HER2 / neu respondieron inmunológicamente a la vacuna, pero los pacientes LE (y específicamente los IHC 1+) tuvieron respuestas inmunológicas más fuertes, y derivaron el beneficio clínico más grande con mortalidad disminuida. También se mostró que los pacientes con antígeno (naive) respondieron inmunológicamente a la vacuna de la misma manera.

[0149] Cuando se utilizan rangos en la presente para propiedades físicas, como el peso molecular, o propiedades químicas, como la formulación química, todas las combinaciones y subcombinaciones de aspectos específicos en la presente intentan incluirse.

[0150] Aunque la presente invención ha sido descrita detalladamente mediante la ilustración y los ejemplos con el objetivo de aclarar y ayudar en la comprensión, resultará evidente para los expertos en la disciplina a tenor de las enseñanzas de esta invención que pueden realizarse ciertos cambios y modificaciones en la misma sin alejarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Listado de Secuencias
SEC ID N° 1 (secuencia aminoácida HER2 / neu)
[0151]

5 MKLRLPASPETHLDMRLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFL-
 QDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGA
 10 SPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSR
 ACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTV CAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPK
 15 HSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDIFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLST
 DVGSCTLVCP LHNQEVT AEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSANIQEF
 20 AGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSL PDL
 SVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNTHLCFVHTV
 25 PWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEG LACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQ
 ECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDP PFC
 30 VARCP SGVKPDL SYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGC PAEQRASPLTSI
 ISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQM
 35 RILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDE
 AYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVREN RGLGSQDLLNWC MQ
 40 IAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDET EYHADGGKVP I
 KWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQP
 45 PICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNE DLGPASPLDS
 TFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLT
 50 LGLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAKGLQSLPTHDP SPLQRYSEDPTV
 PLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSPG
 55 KNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPQGGAAPQPHPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPP
 STFKGTPTAENPEYLGLDVPV

SEC ID N° 2 (péptido E75)

60 **[0152]** KIFGSLAFL

SEC ID N° 3

65 **[0153]** BIMAS

SEC ID N° 4

5 **[0154]** SYFPEITHI

SEC ID N° 5

10 **[0155]** RIAWARTEL

LISTADO SECUENCIAL

[0156]

15 <110> Henry M. Jackson Foundation for the Advancement of Military Medicine, Inc.
Peoples, George E.
Ponniah, Sathibalan

20 <120> VACUNA PARA LA PREVENCIÓN CONTRA LA RECAÍDA DEL CÁNCER DE MAMA

<130> HMJF-0009

25 <150> US 60/941,524

<151> 2007-06-01

<160> 5

30 <170> Versión en Patente 3.3

<210> 1

35 <211> 1225

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Constructo Sintético

<400> 1

45

50

55

60

65

ES 2 445 399 T3

	130		135		140												
5	Lys 145	Asn	Asn	Gln	Leu	Ala 150	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp 155	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg 160	
10	Ala	Cys	His	Pro	Cys 165	Ser	Pro	Met	Cys	Lys 170	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp 175	Gly	
15	Glu	Ser	Ser	Glu 180	Asp	Cys	Gln	Ser	Leu 185	Thr	Arg	Thr	Val	Cys 190	Ala	Gly	
20	Gly	Cys	Ala 195	Arg	Cys	Lys	Gly	Pro 200	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys 205	Cys	His	Glu	
25	Gln	Cys 210	Ala	Ala	Gly	Cys	Thr 215	Gly	Pro	Lys	His	Ser 220	Asp	Cys	Leu	Ala	
30	Cys 225	Leu	His	Phe	Asn	His 230	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu 235	Leu	His	Cys	Pro	Ala 240	
35	Leu	Val	Thr	Tyr	Asn 245	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu 250	Ser	Met	Pro	Asn	Pro	Glu 255	
40	Gly	Arg	Tyr	Thr 260	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys 265	Val	Thr	Ala	Cys 270	Pro	Tyr	Asn	
45	Tyr	Leu	Ser 275	Thr	Asp	Val	Gly	Ser 280	Cys	Thr	Leu	Val	Cys 285	Pro	Leu	His	
50	Asn	Gln	Glu	Val	Thr	Ala	Glu 295	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg 300	Cys	Glu	Lys	Cys	
55	Ser 305	Lys	Pro	Cys	Ala	Arg 310	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu 315	Gly	Met	Glu	His	Leu 320	
60	Arg	Glu	Val	Arg	Ala 325	Val	Thr	Ser	Ala	Asn 330	Ile	Gln	Glu	Phe	Ala 335	Gly	
65	Cys	Lys	Lys	Ile 340	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala 345	Phe	Leu	Pro	Glu 350	Ser	Phe	Asp	
	Gly	Asp	Pro 355	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala 360	Pro	Leu	Gln	Pro	Glu 365	Gln	Leu	Gln	
	Val	Phe 370	Glu	Thr	Leu	Glu	Glu 375	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu 380	Tyr	Ile	Ser	Ala	

ES 2 445 399 T3

Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val
 385 390 395 400
 5
 Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln
 405 410 415
 10
 Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly
 420 425 430
 15
 Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His
 435 440 445
 20
 Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu
 450 455 460
 25
 His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala
 465 470 475 480
 30
 Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr
 485 490 495
 35
 Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu
 500 505 510
 40
 Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg
 515 520 525
 45
 His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val
 530 535 540
 50
 Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr
 545 550 555 560
 55
 Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro
 565 570 575
 60
 Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala
 580 585 590
 65
 Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp
 595 600 605
 Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile
 610 615 620

ES 2 445 399 T3

5 Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val
 625 630 635 640

Phe Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr
 645 650 655

10 Met Arg Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro
 660 665 670

15 Ser Gly Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr
 675 680 685

20 Glu Leu Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val
 690 695 700

25 Tyr Lys Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val
 705 710 715 720

30 Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu
 725 730 735

35 Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val
 740 745 750

40 Ser Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr
 755 760 765

45 Gln Leu Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg
 770 775 780

50 Gly Arg Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala
 785 790 795 800

55 Lys Gly Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu
 805 810 815

60 Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr
 820 825 830

Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His
 835 840 845

65 Ala Asp Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile
 850 855 860

ES 2 445 399 T3

5 Leu Arg Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val
 865 870 875 880
 Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile
 885 890 895
 10 Pro Ala Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro
 900 905 910
 15 Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys
 915 920 925
 20 Trp Met Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser
 930 935 940
 25 Glu Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln
 945 950 955 960
 30 Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg
 965 970 975
 35 Ser Leu Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu
 980 985 990
 Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly
 995 1000 1005
 40 Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
 1010 1015 1020
 45 Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
 1025 1030 1035
 50 Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser
 1040 1045 1050
 Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu
 1055 1060 1065
 55 Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser
 1070 1075 1080
 60 Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val
 1085 1090 1095
 Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro

65

ES 2 445 399 T3

	1100		1105		1110									
5	Asp Val 1115	Arg Pro	Gln Pro	Pro Pro 1120	Ser Pro	Arg Glu	Gly Pro	Leu Pro						
10	Ala Ala 1130	Arg Pro	Ala Gly	Ala Thr	Leu Glu	Arg Pro	Lys Thr	Leu						
15	Ser Pro 1145	Gly Lys	Asn Gly	Val Val	Lys Asp	Val Phe	Ala Phe	Gly						
20	Gly Ala 1160	Val Glu	Asn Pro	Glu Tyr	Leu Thr	Pro Gln	Gly Gly	Ala						
25	Ala Pro 1175	Gln Pro	His Pro	Pro Pro 1180	Pro Ala	Phe Ser	Pro Ala	Phe Asp						
30	Asn Leu 1190	Tyr Tyr	Trp Asp	Gln Asp	Pro Pro	Glu Arg	Gly Ala	Pro						
35	Pro Ser 1205	Thr Phe	Lys Gly	Thr Pro	Thr Ala	Glu Asn	Pro Glu	Tyr						
	Leu Gly 1220	Leu Asp	Val Pro	Val										

40 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Constructo Sintético

50 <400> 2

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
 1 5

55 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Constructo Sintético

65 <400> 3

Asx Ile Met Ala Ser
 1 5

ES 2 445 399 T3

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo Sintético
10

<400> 4

Ser Tyr Phe Pro Glu Ile Thr His Ile
1 5
15

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo Sintético
25

<400> 5

Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu
1 5
30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente eficaz y un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos SEC ID N° 2 para su utilización en la inducción de una inmunidad terapéutica o protectora contra la recurrencia del cáncer de mama en un sujeto, en el que el sujeto tiene una puntuación inmunoquímica (IHC) de 1⁺ o 2⁺ para la expresión de la proteína HER2 / *neu* y una puntuación de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) menor a $2,0 \pm 20$ % para la expresión del gen HER2 / *neu*.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que se formula la composición para administrarse mensualmente por inoculación o inyección, preferiblemente por inyección intradérmica hasta que se establezca la inmunidad protectora.
- 15 3. La composición de la reivindicación 2, en la que se formula la composición para administrarse como inyecciones tres o seis veces al mes y, preferiblemente, seis inyecciones mensuales.
- 20 4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición se formula para administrarse con una composición de vacuna de refuerzo, en la que la composición de la vacuna de refuerzo comprende un vehículo farmacéuticamente eficaz y un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2.
- 25 5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición de dosis de refuerzo se formula para administrarse por inoculación o inyección, preferiblemente por inyección intradérmica.
- 30 6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición se formula para administrarse por inoculación o inyección en una o más dosis divididas y / o la composición de refuerzo se formula por inoculación o inyección en una o más dosis separadas.
- 35 7. La composición de la reivindicación 6, en el que las dos dosis de la composición y / o las dos dosis de la composición de refuerzo contienen las mismas concentraciones de péptido.
- 40 8. La composición de las reivindicaciones 6 o 7, en la que los sitios de inoculación o inyección en el cuerpo se localizan a, al menos, 5 cm de distancia unos de otros.
- 45 9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en la que la composición de dosis de refuerzo se formula para administrarse cada 6 y 12 meses, preferiblemente cada seis meses una vez completado el programa de inmunización primaria.
- 50 10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el sujeto es un ser humano.
- 55 11. La composición de la reivindicación 10, en la que el ser humano expresa un antígeno leucocitario humano A2 o un antígeno leucocitario humano A3.
- 60 12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el sujeto se encuentra en remisión clínica completa tras el diagnóstico de cáncer de mama de nódulo positivo o nódulo negativo, o en el que el sujeto se encuentra en remisión parcial de cáncer de mama.
- 65 13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la composición comprende además un adyuvante, preferiblemente en la que el adyuvante sea un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humanos recombinantes.
14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, en la que la composición de vacuna de refuerzo comprende además un adyuvante, preferiblemente en la que el adyuvante sea un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humanos recombinantes.
15. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que la composición induce una respuesta de linfocitos T citotóxicos al péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2.
16. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en la que el ser humano tuvo cáncer de mama de nódulo positivo o en el que el ser humano tuvo un cáncer de mama de nódulo negativo.
17. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la composición comprende:
 - (i) entre 0,1 mg y 10 mg de péptido, preferiblemente 0,1, 0,5 o 1 mg de péptido y,
 - (ii) entre 0,01 y 0,5 de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humanos (GM – CSF) como adyuvante, preferiblemente 0,25 o 0,125 mg de GM – CSF.

5 18. La composición de la reivindicación 1 para su utilización en un sujeto humano que tiene una puntuación inmunohistoquímica (IHC) de 1⁺ o 2⁺ para la expresión de la proteína HER2 / *neu* y una puntuación de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) menor a 2,0 ± 20 % para la expresión del gen HER2 / *neu*, en la que la composición comprende:

- 10 (i) una composición de vacuna que comprende 1 mg de péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 y 0,125 o 0,250 mg de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humanos (GM – CSF) como adyuvante, en la que la composición de vacuna se formula para administrarse como inyecciones trimestrales o semestrales, preferiblemente como inyecciones intradérmicas y,
- 15 (ii) una composición de vacuna de refuerzo que comprende 1 mg de péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 y 0,125 o 0,250 mg de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humanos (GM – CSF) como adyuvante, en el que la composición de vacuna se formula para administrarse como inyecciones, preferiblemente inyección intradérmica cada seis meses una vez completada la inmunización primaria.

20 19. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en la que el sujeto tiene una puntuación inmunohistoquímica (IHC) de 1⁺ para la expresión de la proteína HER2 / *neu*.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

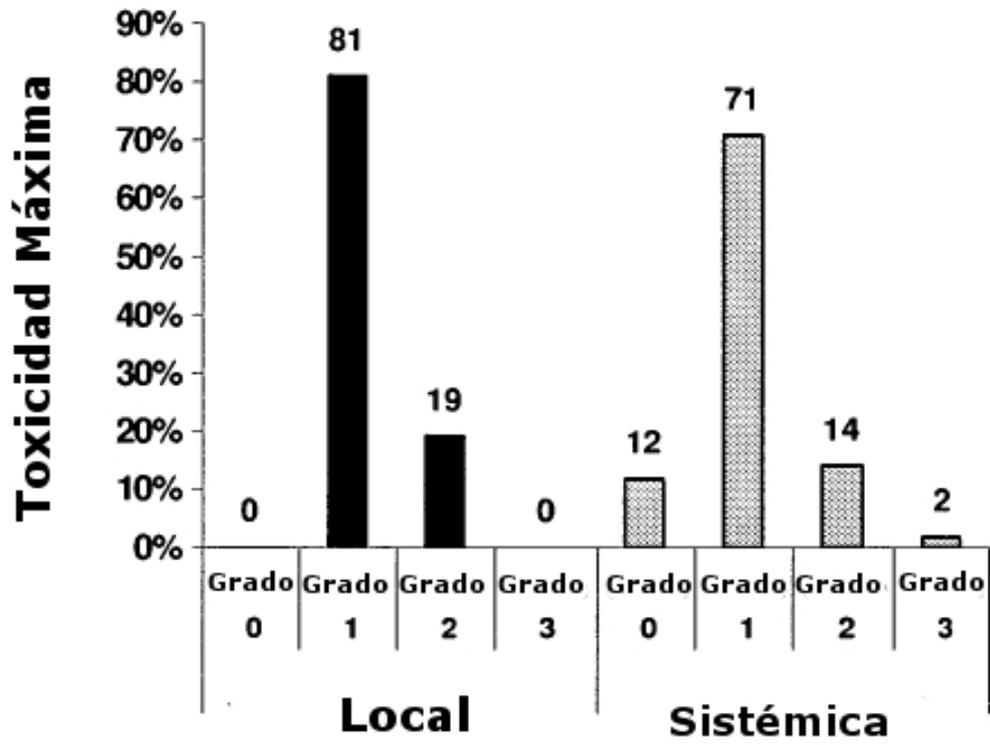


Figura 1

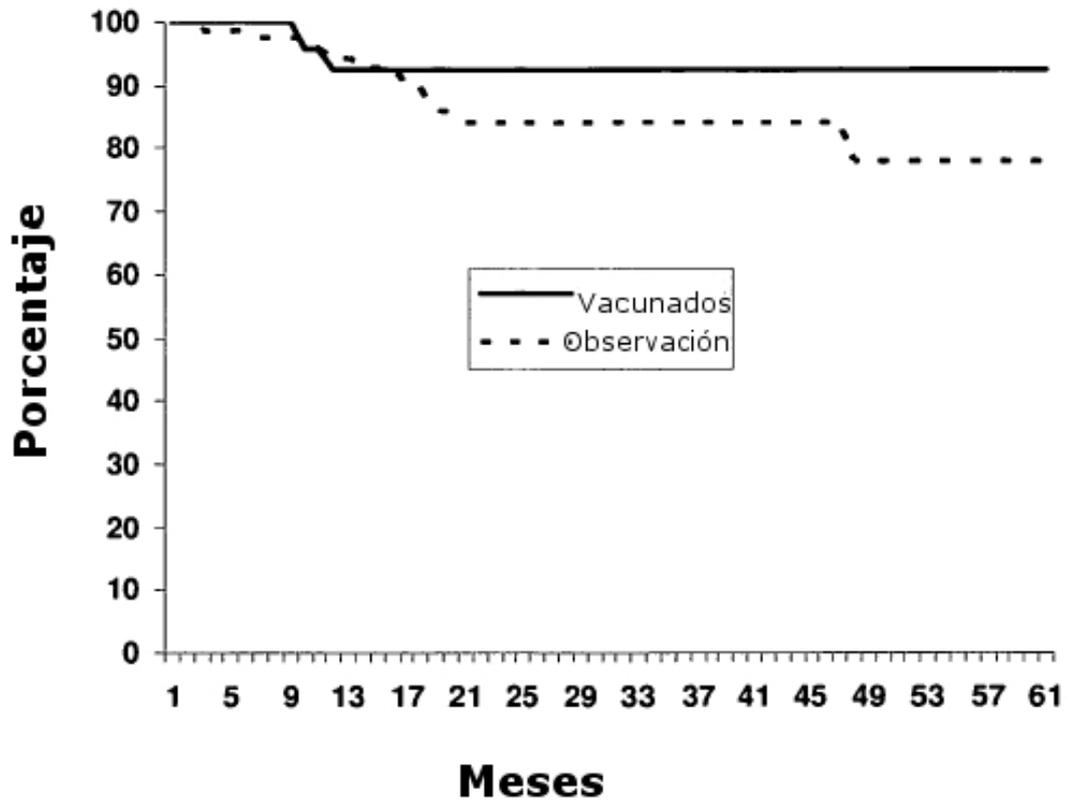


Figura 2

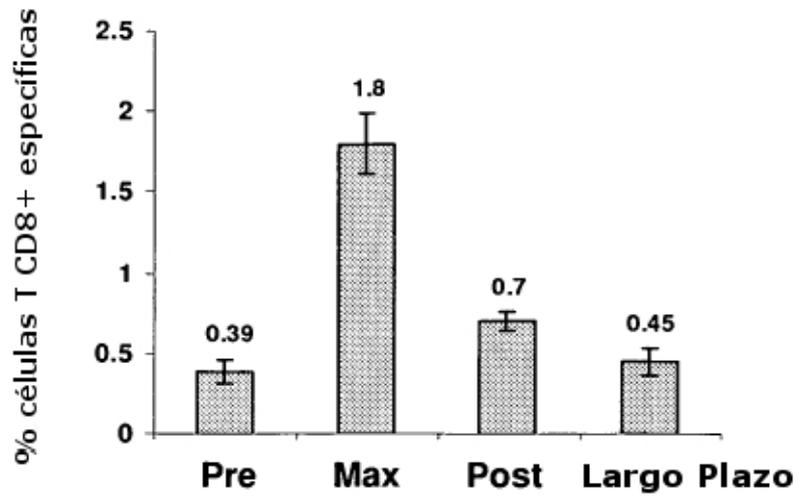


Figura 3A

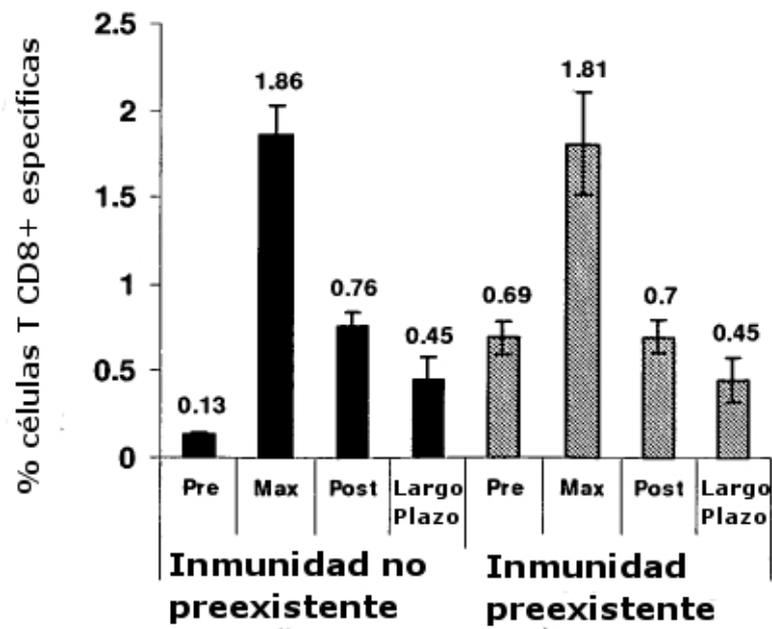


Figura 3B

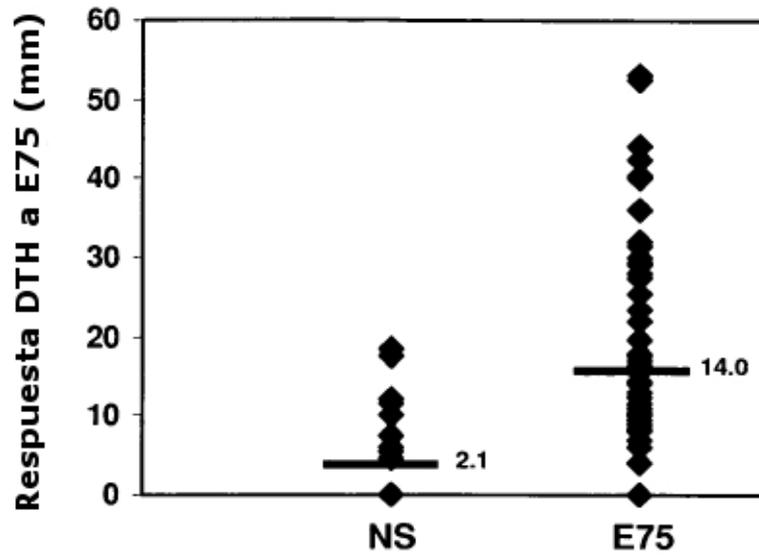


Figura 4A

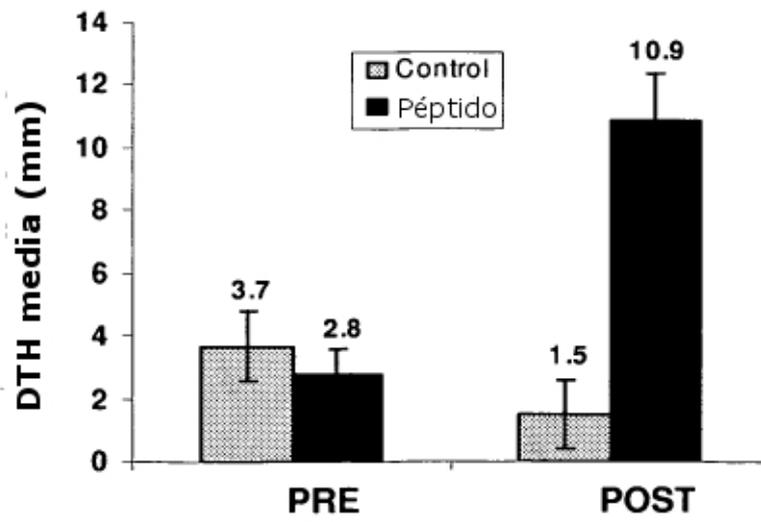


Figura 4B

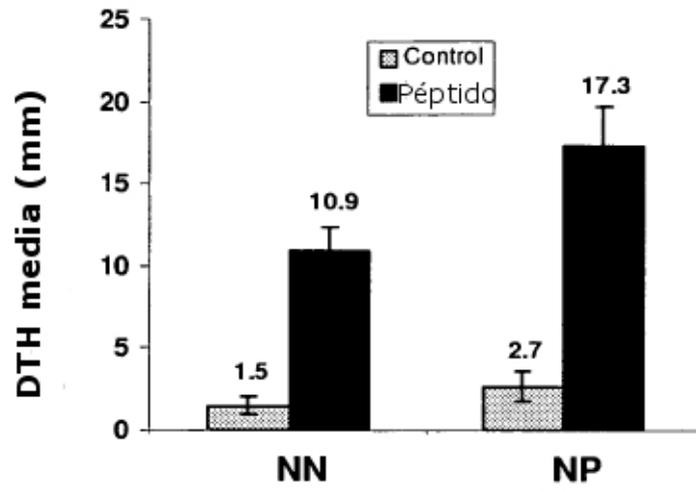


Figura 4C

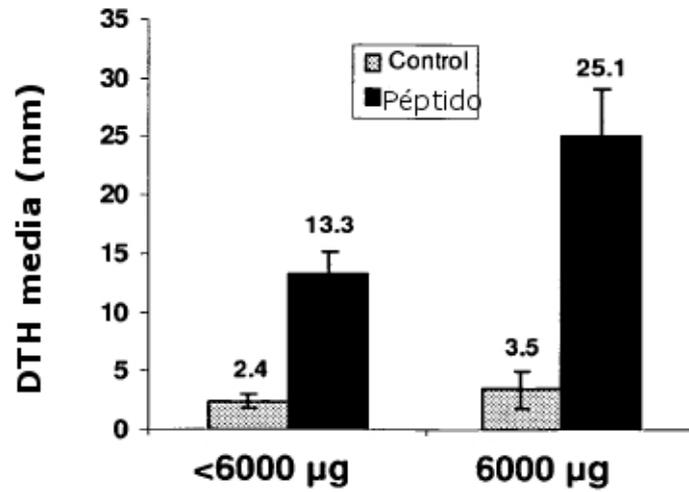


Figura 4D

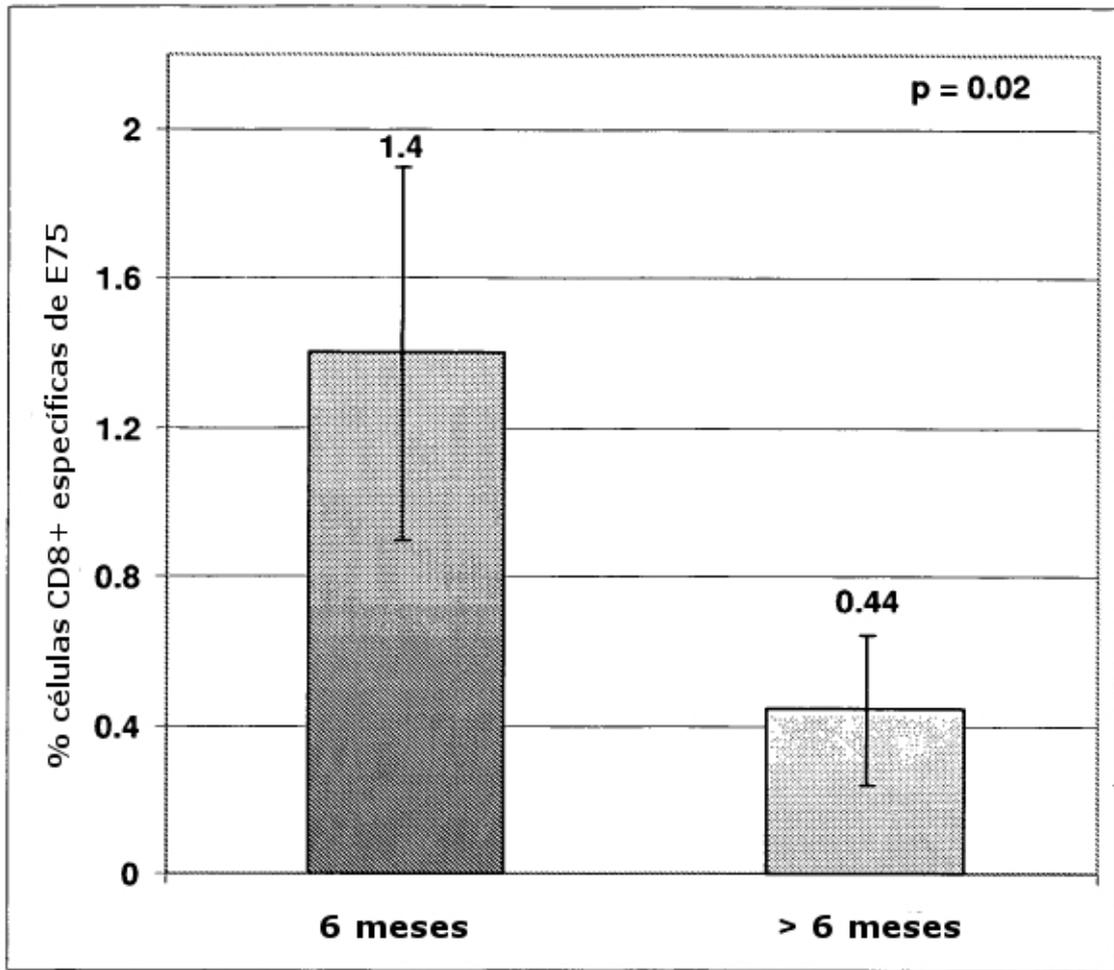


Figura 5

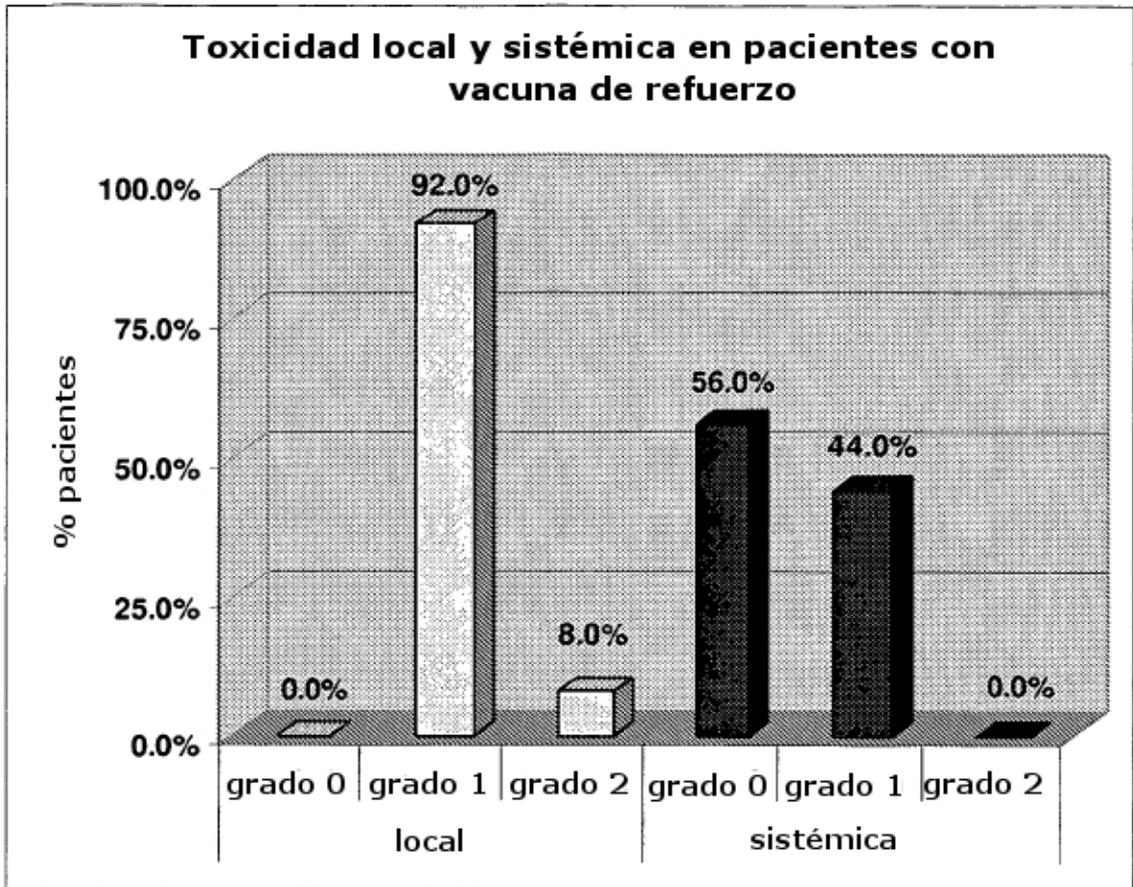


Figura 6

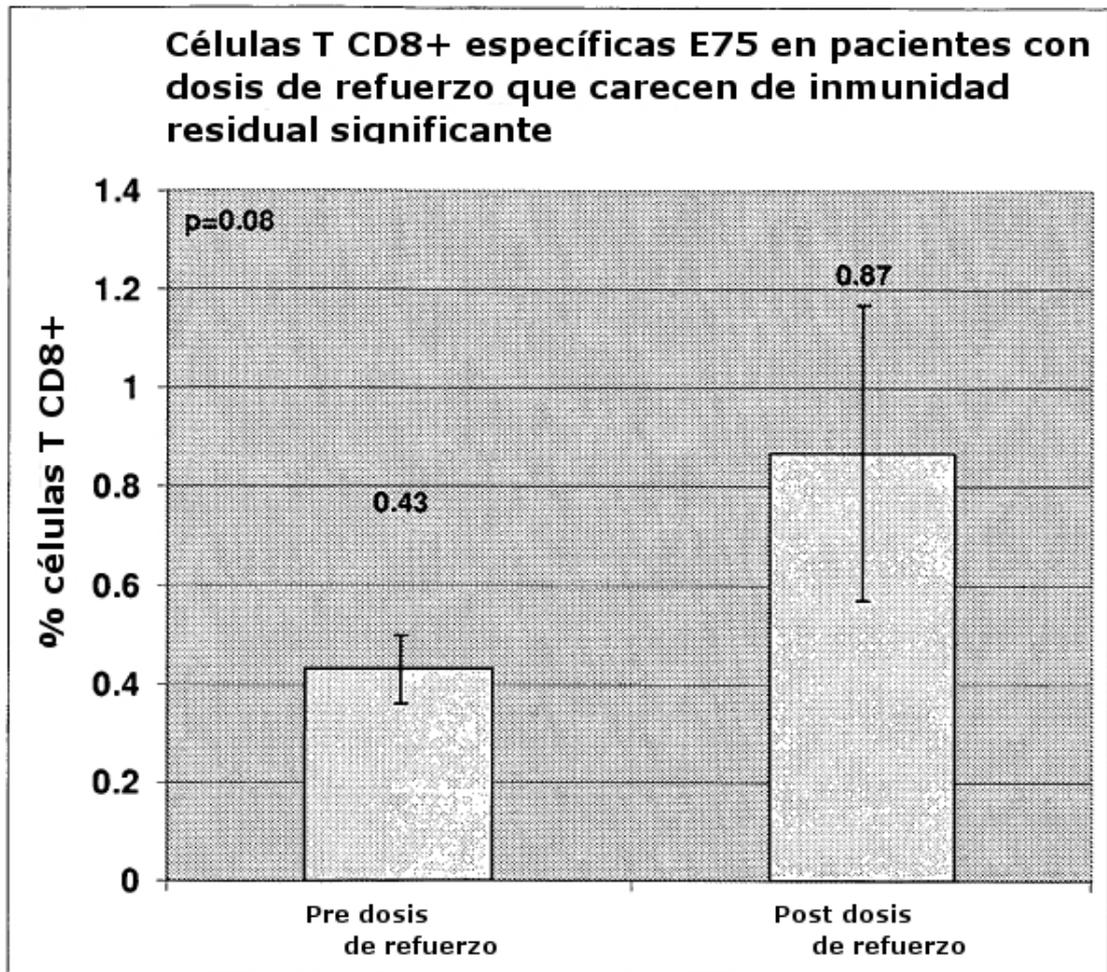


Figura 7

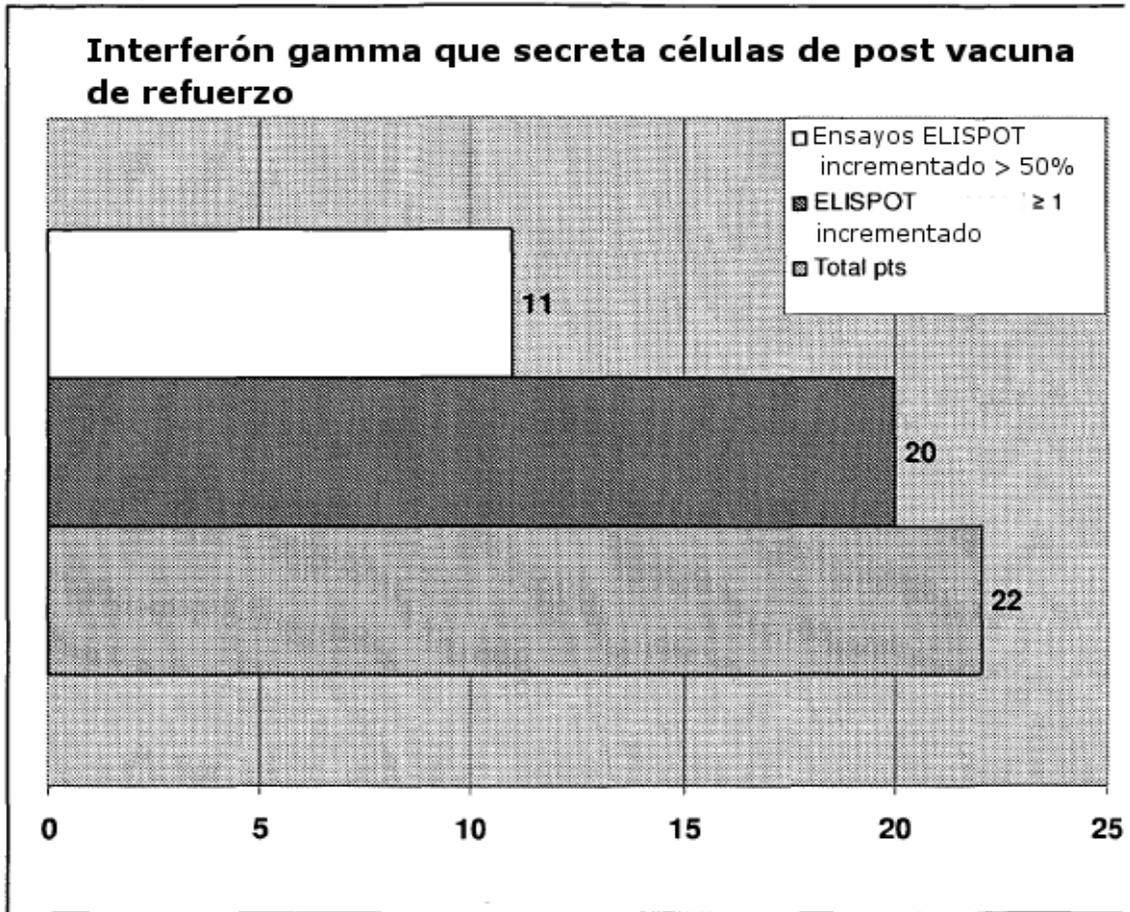


Figura 8

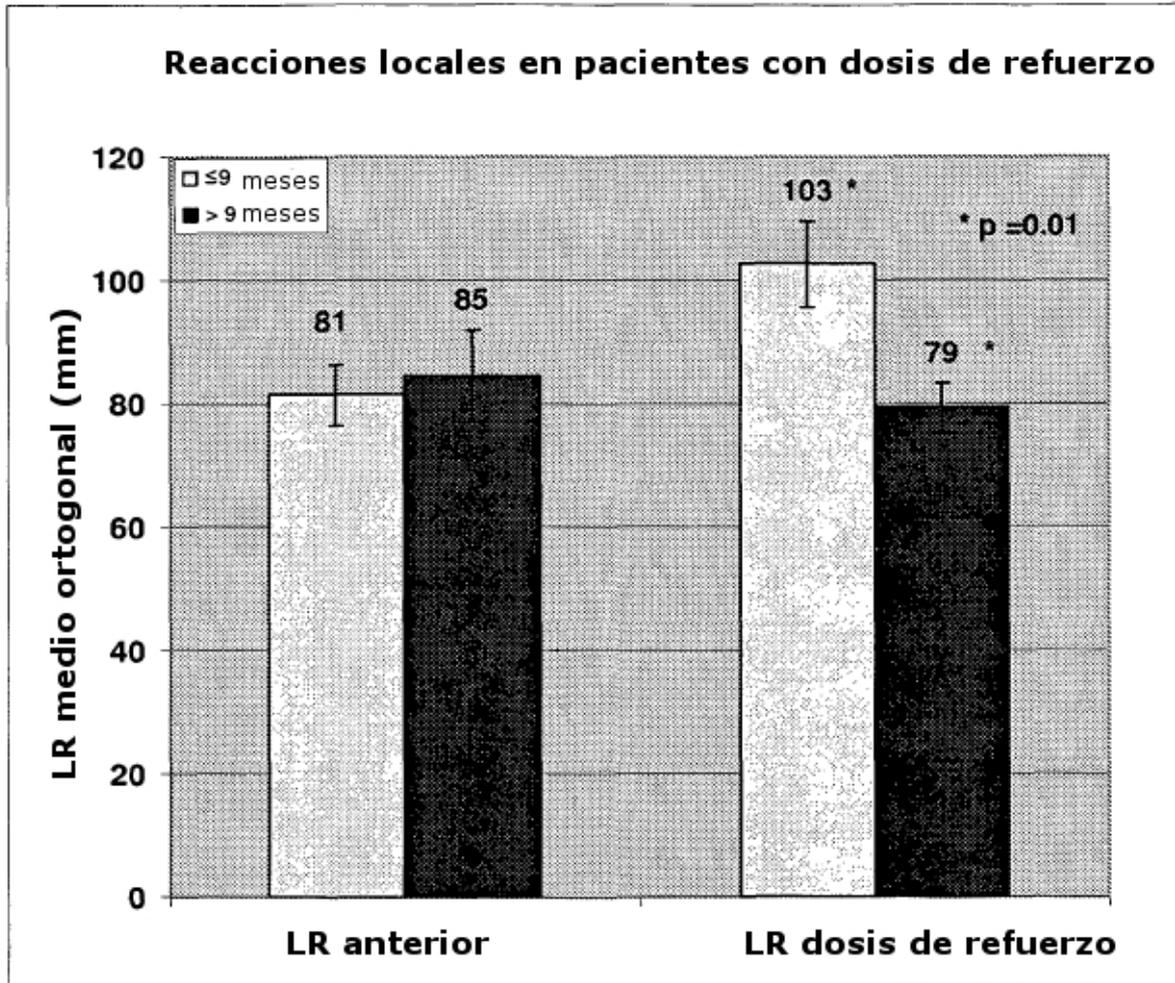


Figura 9

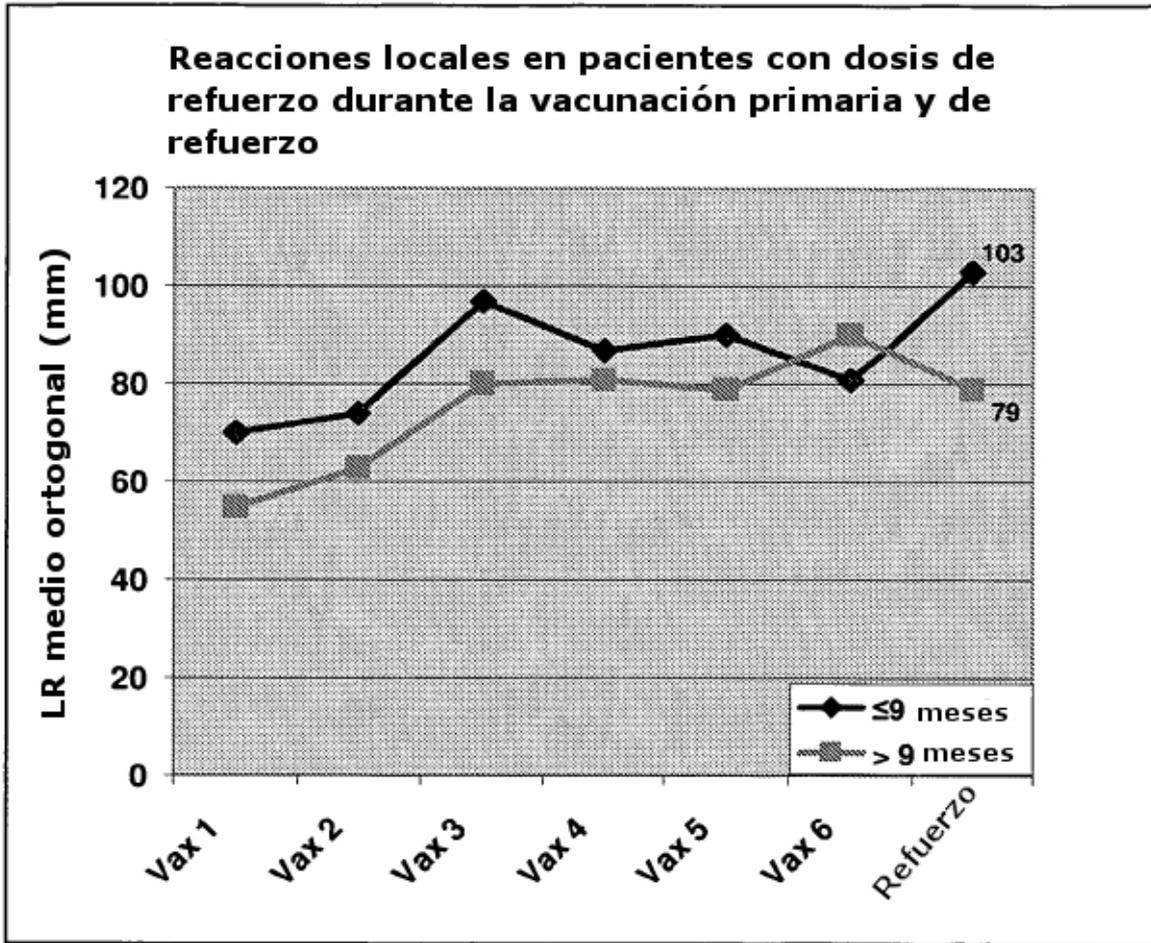


Figura 10

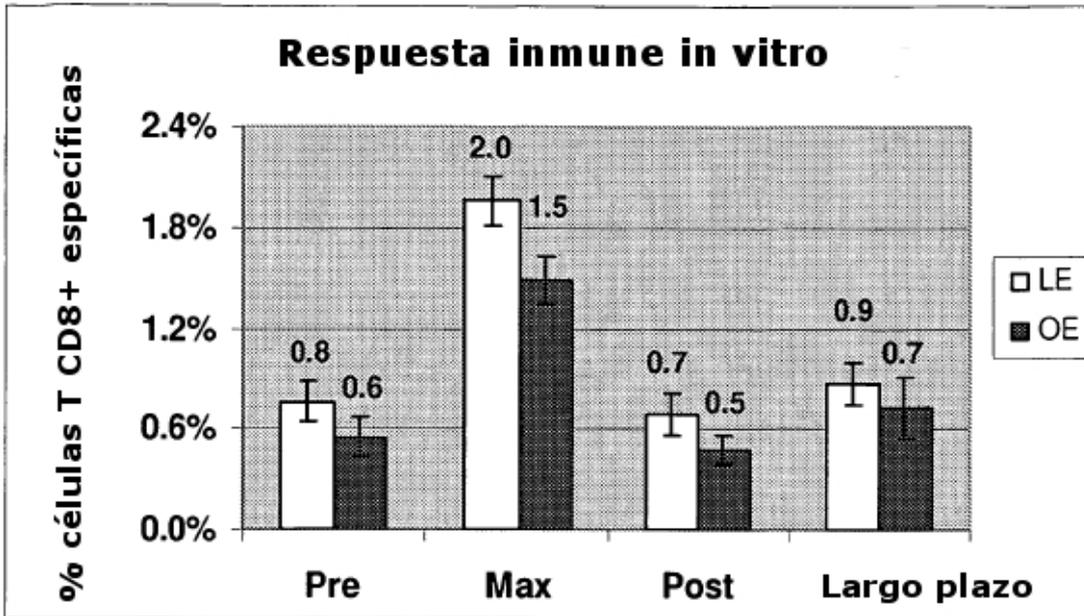


Figura 11A

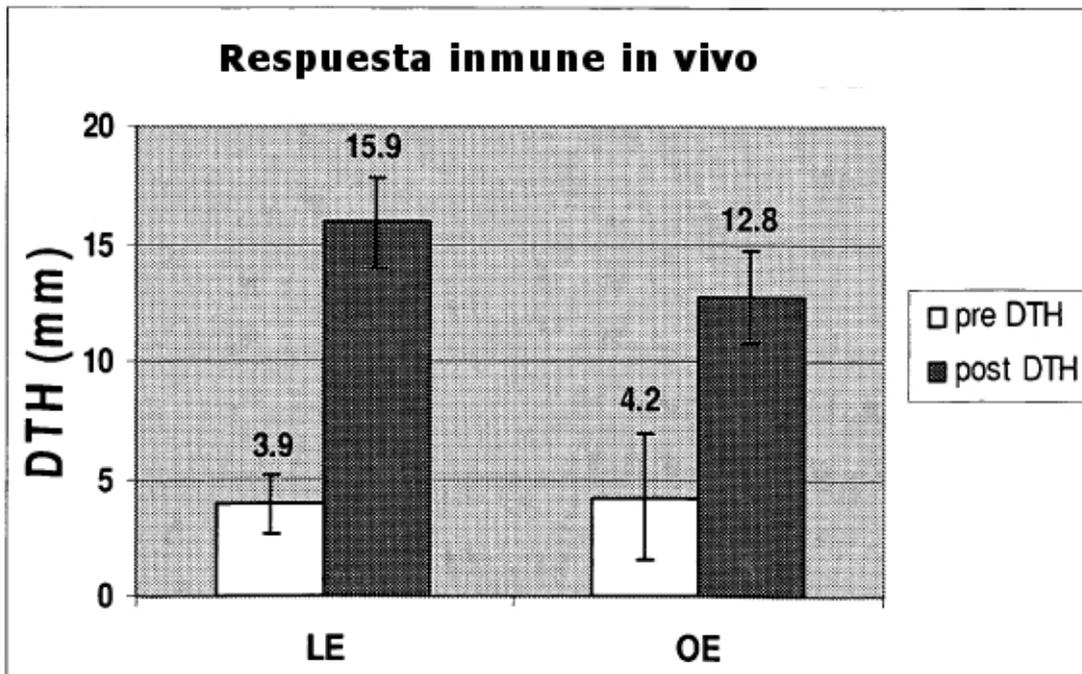


Figura 11B

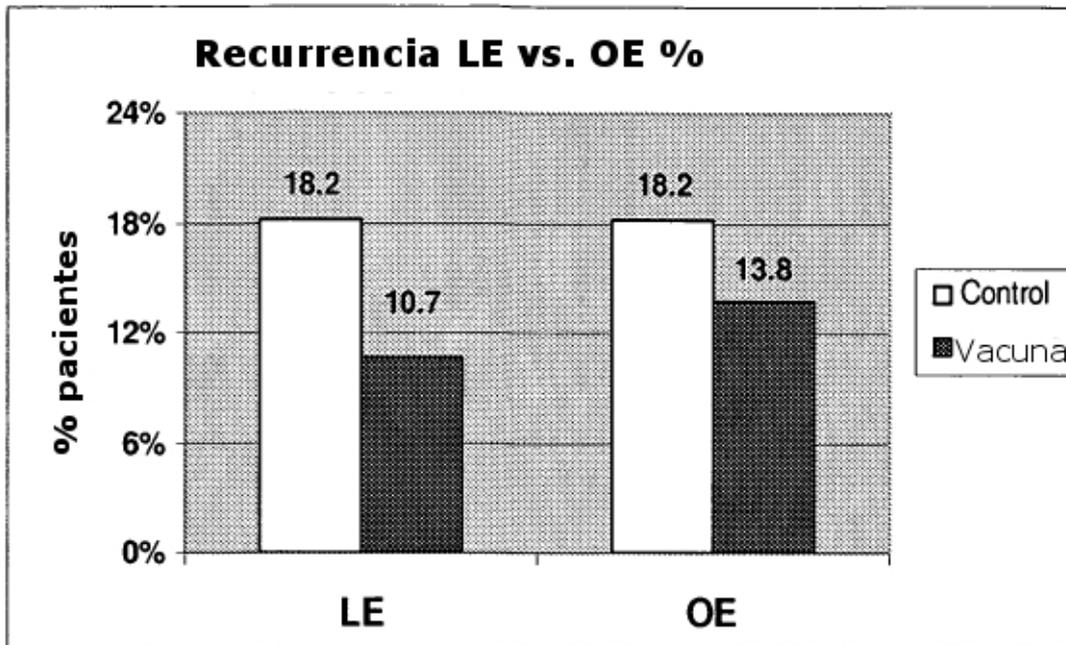


Figura 11C

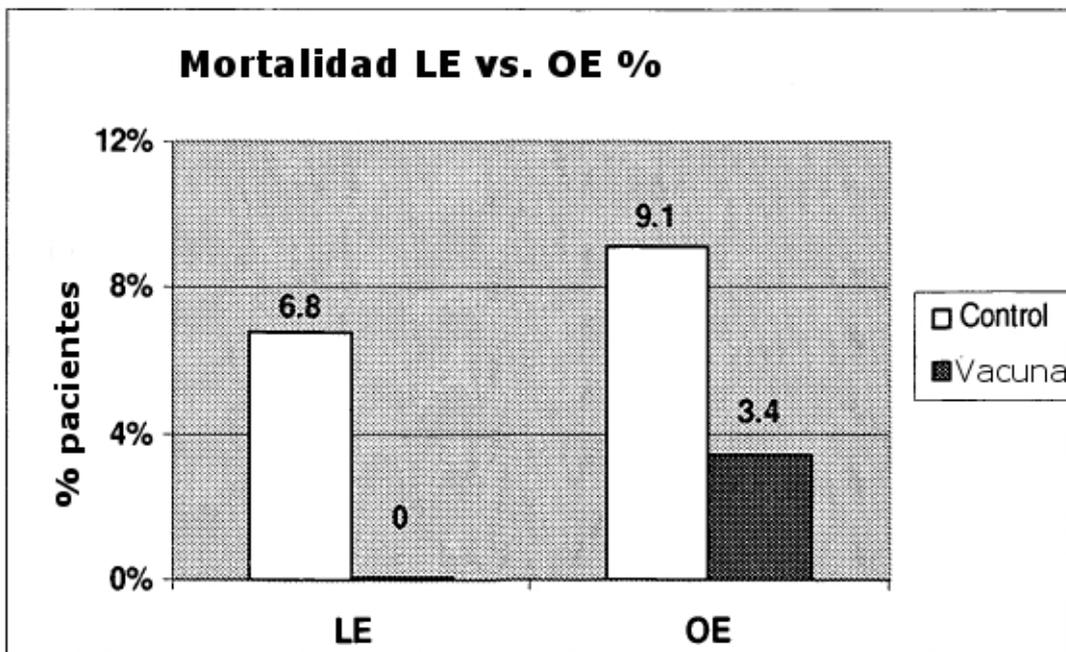


Figura 11D

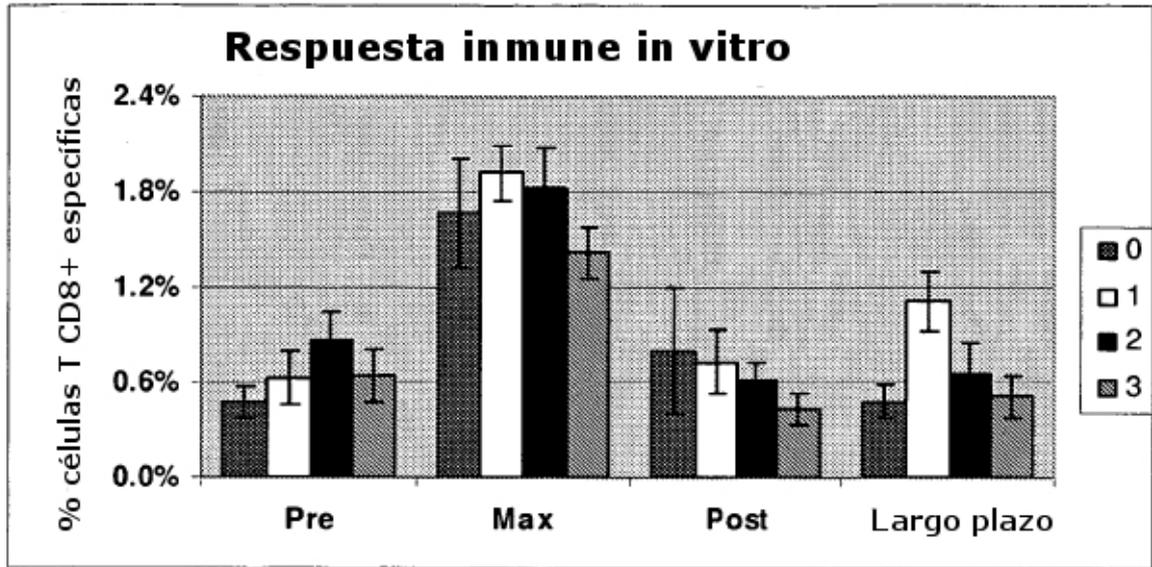


Figura 12A

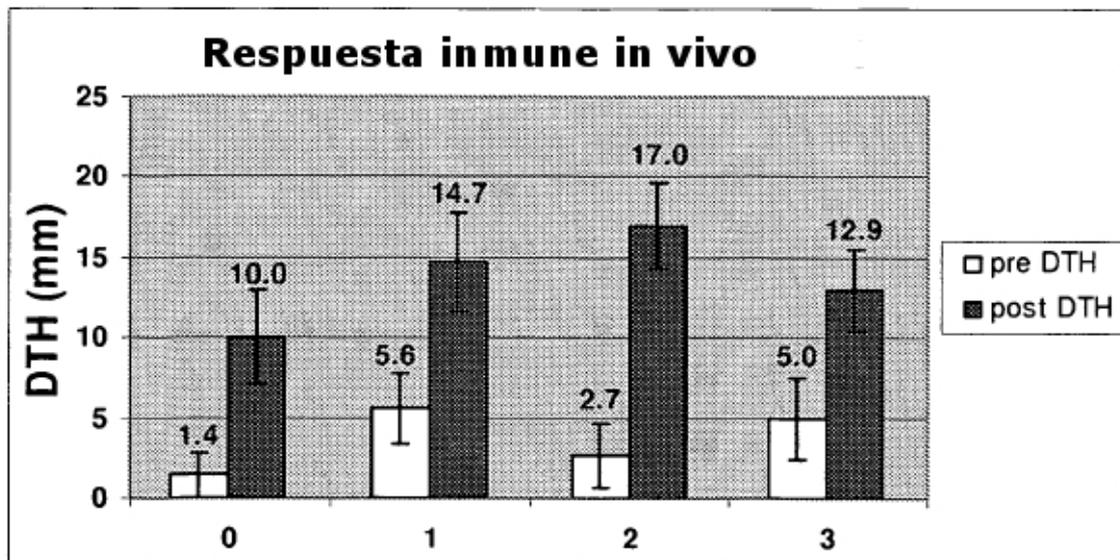


Figura 12B

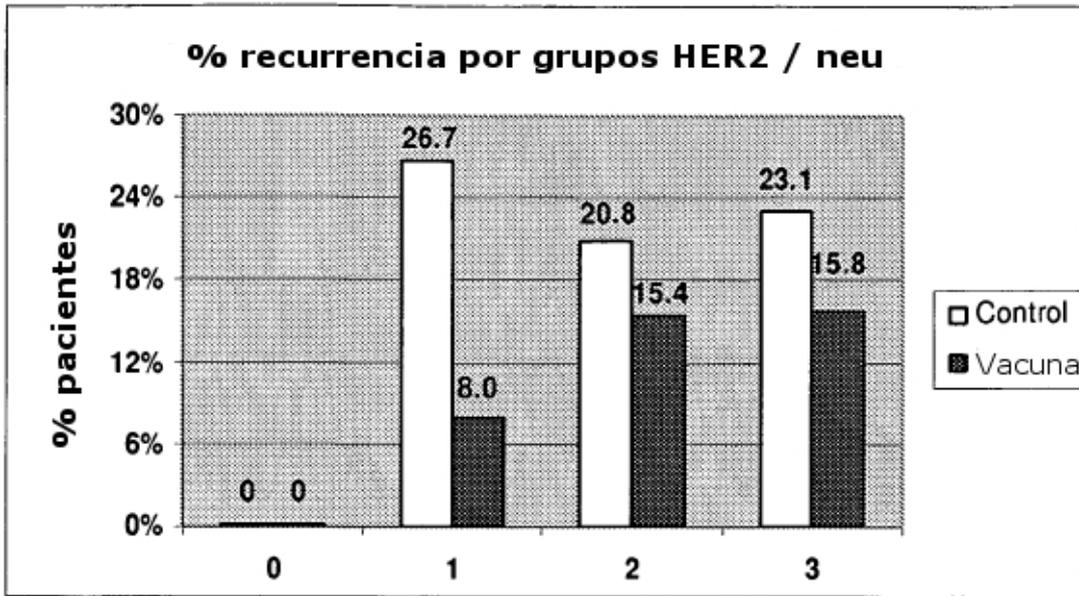


Figura 12C

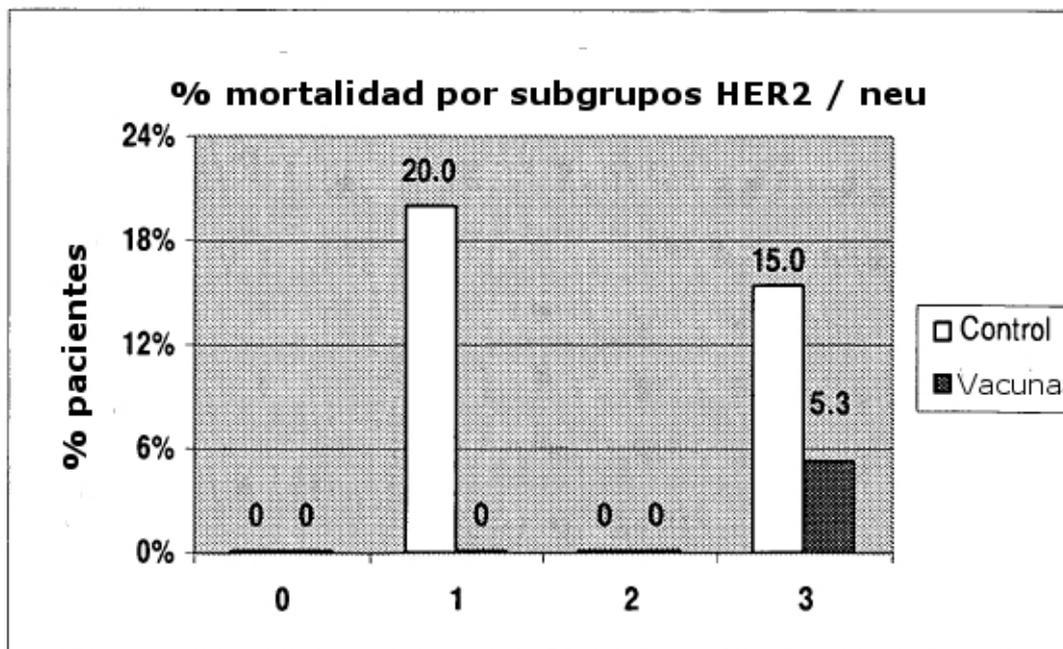


Figura 12D

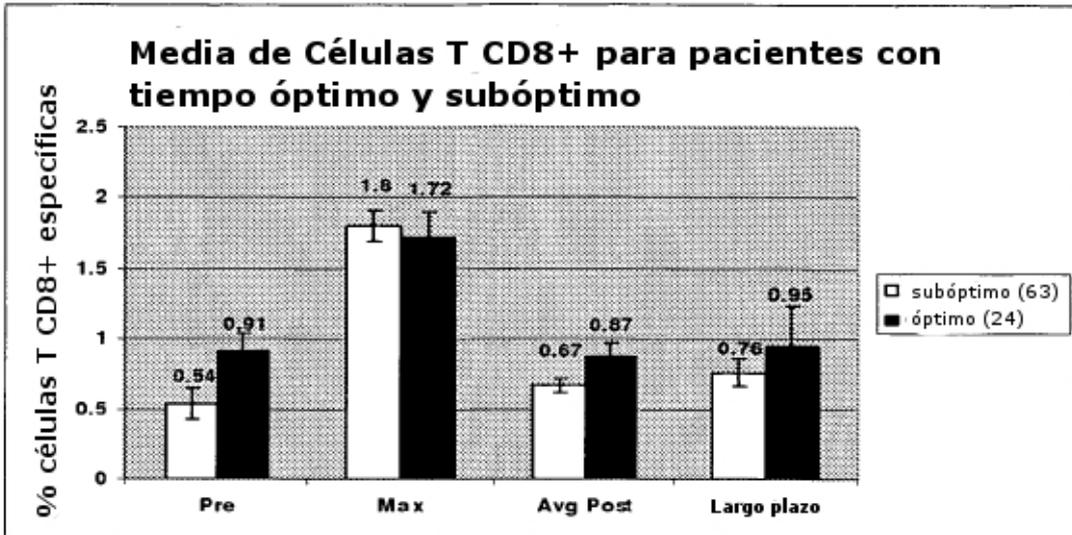


Figura 13A

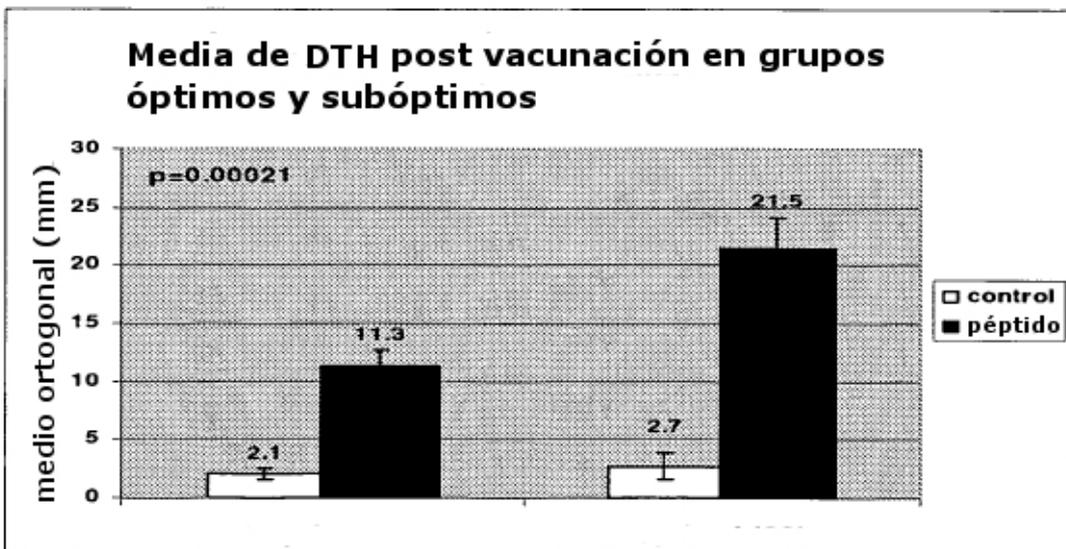


Figura 13B

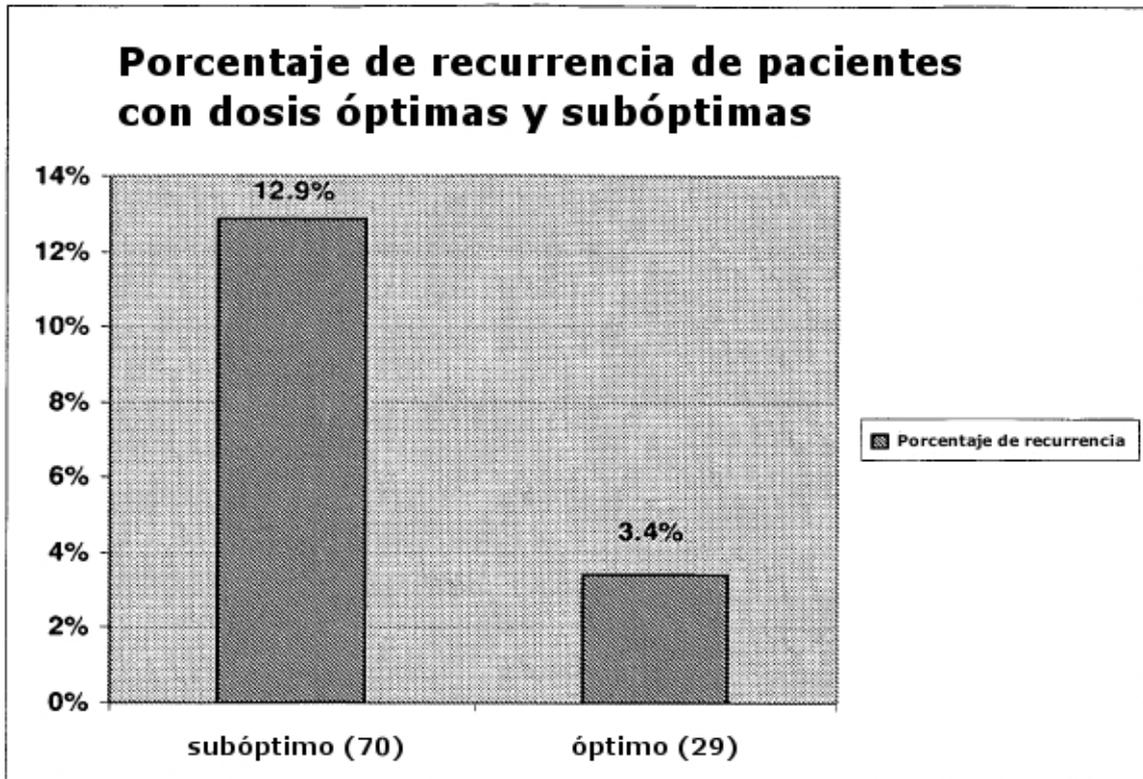


Figura 14