

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 577**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2009 PCT/US2009/067264**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.06.2010 WO10068647**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2009 E 09832462 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2355843**

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

30 Prioridad:

10.12.2008 US 121220 P

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

27.10.2017

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 y
PONNIAH, SATHIBALAN**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

Observaciones :

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

ES 2 639 577 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna para la prevención de la recurrencia del cáncer de mama

5 LISTADO DE SECUENCIAS

[0001] La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias, que ha sido presentada a través de EFS-Web y se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 7 de diciembre de 2009, tiene como nombre HMJ106PCT.txt, y tiene 11.473 bytes de tamaño.

10

INTERÉS DEL GOBIERNO

[0002] La presente invención se realizó en parte con el apoyo del Gobierno. El Gobierno puede tener ciertos derechos sobre la invención.

15

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0003] La presente solicitud reivindica el beneficio de, y depende de la fecha de presentación de, la solicitud de patente provisional de Estados Unidos número 61/121.220, presentada el 10 de diciembre de 2008, toda la descripción de la cual se incorpora en el presente documento por referencia.

20

ANTECEDENTES

[0004] El cáncer de mama (BCa) es el diagnóstico de cáncer más común en mujeres y la segunda causa principal de muerte por cáncer entre las mujeres (Ries LAG, et al. (Eds) SEER Cancer Statistics Review., 1975-2003, National Cancer Institute, Bethesda, MD). Los principales avances en el tratamiento del cáncer de mama en los últimos 20 años han dado lugar a una mejora significativa en la tasa de supervivencia libre de enfermedad (DFS). Por ejemplo, las terapias que utilizan anticuerpos reactivos contra antígenos relacionados con el tumor han sido utilizadas para bloquear procesos celulares específicos con el fin de retardar el avance de la enfermedad o prevenir la recurrencia de la enfermedad. A pesar de los recientes avances en el tratamiento del cáncer de mama, un número significativo de pacientes en última instancia morirán de enfermedad recurrente.

25

30

[0005] Las vacunas son un modelo atractivo para prevenir, retardar, o prohibir el desarrollo de la enfermedad recurrente debido a su facilidad de administración, y debido a su alta tasa de éxito observada para las enfermedades infecciosas. El concepto básico de la construcción de una vacuna contra el cáncer es sencillo en teoría. El desarrollo de vacunas eficaces contra el cáncer para tumores sólidos en la práctica, sin embargo, ha tenido un éxito limitado. Por ejemplo, un grupo que intentó administrar una vacuna de péptido dirigido contra el melanoma metastásico observó una tasa de respuesta objetiva de sólo el 2,6% (Rosenberg SA et al (2004) Nat Med 10: 909-15).

35

[0006] Hay muchas explicaciones posibles para esta baja tasa de éxito (Campoli M et al. (2005) Cancer Treat. Res. 123: 61-88). Por ejemplo, incluso si un antígeno se asocia específicamente con un tipo particular de células tumorales, las células tumorales pueden expresar solamente niveles bajos de antígeno, o pueden estar situadas en un sitio críptico o en cualquier caso protegidas de la detección inmunológica. Además, los tumores a menudo cambian su perfil antigénico mediante la propagación de antígenos a medida que desarrollan. También contribuye a la baja tasa de éxito el hecho de que las células tumorales pueden expresar niveles muy bajos de proteínas del MHC y otras proteínas coestimuladoras necesarias para generar una respuesta inmune.

40

45

[0007] Los problemas adicionales a los que se enfrentan los intentos de vacunación contra tumores surgen en pacientes con cánceres en etapa avanzada. Tales pacientes tienden a tener tumores primarios y metastásicos más grandes, y las células en el interior del tumor no pueden ser accesibles debido al mal flujo sanguíneo. Esto concuerda con la observación de que las estrategias de vacunación han tendido a tener más éxito para el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas (Radford KJ et al. (2005) Pathology 37: 534-50; y, Mollndrem JJ (2006) Biol Bone Marrow Transplant 12: 13-8). Además, a medida que los tumores se vuelven metastásicos, pueden desarrollar la capacidad de liberar factores inmunosupresores en su microentorno (Campoli, 2005; y, Kortylewski M et al. (2005) Nature Med 11: 1314-1321). Los tumores metastásicos también se han asociado con una disminución en el número de linfocitos de sangre periférica, y la disfunción de células dendríticas (Gillanders WE et al (2006) Breast Diseases: A Year Book and Quarterly 17: 26-8).

50

55

[0008] Mientras que algunos o todos estos factores pueden contribuir a la dificultad en el desarrollo de una vacuna preventiva o terapéutica eficaz, el principal reto subyacente es que la mayoría de los antígenos tumorales son antígenos propios o tener un alto grado de homología con antígenos propios, y por tanto se espera que sean objeto de una tolerancia inmune estricta. De este modo, es evidente que muchas vacunas contra el cáncer basadas en péptidos, con o sin adyuvantes estimulantes del sistema inmune, pueden estar condenados a sólo un éxito limitado en la práctica clínica debido a la baja inmunogenicidad y la falta de especificidad.

60

65

[0009] Las vacunas prototipo contra el cáncer de mama basadas en antígenos individuales han tenido un éxito

moderado en la inducción de una respuesta inmune medible en experimentos con animales y en ensayos clínicos con pacientes con cáncer de mama. La respuesta inmune observada, sin embargo, no se ha traducido en una inmunidad protectora clínicamente significativa contra la recurrencia de la enfermedad puesta en remisión por la terapia estándar (por ejemplo, cirugía, radioterapia, y quimioterapia).

5 **[0010]** HER2/*neu* es un proto-oncogén que se expresa en muchos tumores malignos epiteliales (Slamon DJ et al. (1989) *Science* 244: 707-12). HER2/*neu* es un miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico y codifica un receptor de tirosina quinasa de 185 kd implicado en la regulación del crecimiento y la proliferación celular. (Popescu NC et al (1989) *Genomics* 4: 362-366; Yarden Y et al (2001) *Nat Rev Mol Cell Bio* 2: 127-137). La sobreexpresión y/o amplificación de HER2/*neu* se encuentra en el 25-30% de los cánceres de mama invasivos (BCa) y se asocia con tumores más agresivos y un resultado clínico más malo. (Slamon DJ et al *Science* (1987) 235: 177-182; Slamon DJ et al *Science* (1989) 244: 707-12; Toikkanen S et al *J Clin Oncol* (1992) 10: 1044-1048; Pritchard KI et al (2006) *N. Engl J. Med* 354: 2103-11).

15 **[0011]** La determinación de HER2/*neu* se realiza predominantemente a través de dos pruebas, inmunohistoquímica (IHC) e hibridación fluorescente *in situ* (FISH). IHC detecta la sobreexpresión de la proteína HER2/*neu* y se describe en una escala semicuantitativa de 0 a 3+ (0 = negativa, 1+ = baja expresión, 2+ = intermedia y 3+ = sobreexpresión). FISH, por otro lado, detecta la amplificación (exceso de copias) del gen HER2/*neu* y se expresa como una relación de copias de genes HER2/*neu* con respecto a las copias del gen del cromosoma 17 y se interpreta como "sobreexpresión" si FISH es $\geq 2,0$ copias. (Hicks DG et al *Hum Pathol* (2005) 36: 250-261). La tasa de concurrencia de IHC y FISH es de aproximadamente el 90%. (Jacobs et al *J Clin Oncol* (1999) 17: 1533-1541). FISH se considera el patrón de oro, ya que el análisis retrospectivo revela que es un mejor predictor de la respuesta de trastuzumab (Tz); es más objetivo y reproducible. (Press MF et al *J Clin Oncol* (2002) 14: 3095-3105; Bartlett J et al *J Pathol* (2003) 199: 411-417; Wolff AC et al *J Clin Oncol* (2007) 25: 118-145).

25 **[0012]** La identificación y cuantificación de HER2/*neu* como un proto-oncogén ha llevado a la inmunoterapia humoral o pasiva basada en anticuerpos, incluyendo el uso de trastuzumab (Herceptin® Genentech Inc., South San Francisco, CA). Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado que se une al dominio yuxtamembrana extracelular de la proteína HER2/*neu* (Plosker GL et al. *Drugs* (2006) 66: 449-475). Tz está indicado para pacientes BCa de nódulos positivos que sobreexpresan HER2/*neu* (IHC 3+ o FISH $\geq 2,0$) y metastásicos, (Vogel CL et al *J Clin Oncol* (2002) 20: 719-726; Piccart-Gebhart MJ et al *N Engl J Med* (2005) 353: 1659-1672) y muestra una actividad muy limitada en pacientes con una expresión de HER2/*neu* de baja a intermedia (Herceptin® (Trastuzumab), el prospecto del producto con receta, Genentech Inc., South San Francisco, CA: revisión de septiembre del año 2000).

35 **[0013]** Otra forma de inmunoterapia que se persigue es la vacunación e inmunoterapia activa que dirige una respuesta inmune celular a epítomos en antígenos asociados a tumores, tales como HER2/*neu*. HER2/*neu* es una fuente de varios péptidos inmunogénicos que pueden estimular el sistema inmune para reconocer y matar las células cancerosas que expresan HER2/*neu*. (Fisk B et al *J Exp Med* (1995) 181: 2109-2117). Dos de tales péptidos se denominan E75 y GP2. E75 y GP2 son ambos péptidos de nueve aminoácidos que está limitados a A2-antígeno leucocitario humano (HLA) y estimulan CTL para reconocer y lisar células cancerosas que expresan HER2/*neu* (Fisk B et al *J Exp Med* (1995) 181: 2109-2117; Peoples GE et al *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92: 432-436).

40 **[0014]** E75 se deriva del dominio extracelular de la proteína HER2/*neu* y corresponde a los aminoácidos 369-377 (KIFGSLAFL) (SEQ ID NO: 3) de la secuencia de aminoácidos de HER2/*neu* y se describe como SEQ ID NO: 11 en la patente de los Estados Unidos. No. 6.514.942, patente que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. La secuencia de proteína de longitud completa de HER2/*neu* se expone a continuación y se describe como SEQ ID NO: 2 en la patente de Estados Unidos N° 5.869.445, patente que se incorpora en el presente por referencia en su totalidad:

50

55

60

65

MKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFL
 5 QDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGA
 SPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSR
 ACHPCSPMCKGSRWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPK
 10 HSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNLST
 DVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVAVTSANIQEF
 15 AGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLD
 SVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNTHLCFVHTV
 PWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQ
 20 ECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFC
 VARCPGSKPDLSPYMPIWKFPEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSI
 25 ISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQM
 RILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLENTSPKANKEILDE
 AYVMAGVGSPLYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRRGLGSQDLLNWCMQ
 30 IAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKS PNHVKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKVP
 KWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGI PAREIPDLLEKGERLPQP
 35 PICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNE DLGPASPLDS
 TFYRSLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSSTRSGGDLT
 40 LGLEPSEEEAPRSP LAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAKGLQSLPTHDPSP LQRYSEDPTV
 PLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKT LSPG
 KNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPOGGAAPQPHPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPP
 45 STFKGTPTAENPEYLGLDVPV (SEQ ID NO:1)

[0015] Se han hecho intentos para utilizar E75 como una vacuna contra el cáncer, por ejemplo, como una vacuna de un solo péptido combinado con diferentes inmunoadyuvantes en pacientes con cáncer avanzado que sobreexpresan la proteína HER2/*neu* (Zaks TZ et al. (1998) Cancer Res 58: 4902-8; Knutson KL et al (2002) Clin Cancer Res 8: 1014-8; y, Murray JL et al (2002) Clin Cancer Res 8: 3407-18); cargado en células dendríticas autólogas y reinfundido (Brossart P et al (2000) Blood 96: 3102-8; y, Kono K et al (2002) Clin Cancer Res 8: 3394-3400); o incrustado en péptidos más largos capaces de unirse a moléculas HLA de clase II con el fin de reclutar células T auxiliares CD4 (Disis ML et al (1999) Clin Cancer Res 5: 1289-1297; y, Disis ML et al (2002) J. Clin Oncol 20: 2624-32). Cada estrategia ha estimulado una respuesta inmune mediada por células T citotóxicas específica de E75, pero ninguna ha demostrado una inmunidad terapéutica o protectora clínicamente significativa en mujeres con cáncer de mama en fase avanzada. La incapacidad de los demás para mostrar un beneficio clínico significativo usando preparaciones de vacuna con E75 se deriva, en parte, del hecho de que E75 deriva de un antígeno tumoral "propio". Vacunas contra el cáncer que reconocen "antígenos tumorales propios", como los derivados de HER2/*neu*, presentan desafíos únicos debido a la característica de tolerancia inmunológica de las proteínas propias. Además, los estudios anteriores se han centrado en los pacientes de cáncer con enfermedad avanzada, como la etapa III o IV del cáncer, en lugar de los pacientes que están siguiendo terapias estándar libres de enfermedad. Por lo tanto, ninguno de estos intentos de utilizar E75 como una vacuna contra el cáncer ha demostrado la capacidad de la vacuna para prevenir o retrasar la recurrencia de la enfermedad después de la remisión. Sobre la base de estos estudios de E75, otros han llevado a cabo más recientemente ensayos clínicos para determinar si la inmunidad inducida por E75 transmite un beneficio clínico mediante la prevención de la recurrencia en pacientes con cáncer de mama de alto riesgo Peoples GE et al, J.

Clin Oncol (2005) 23: 7536-45; Peoples GE et al, Clin Cancer Res (3) (2008) 14: 797-803; Holmes et al, Cancer (2008) 113: 1666-1675. Los datos de estos estudios indican que el aumento *in vivo* de respuestas de DTH inducidas por E75 se correlacionan con una recurrencia reducida y un aumento del tiempo de supervivencia para los que presentaron recurrencia.

[0016] GP2, descrita inicialmente por Peoples et al., es un péptido de nueve aminoácidos derivado de la parte transmembrana de la proteína HER2/*neu* correspondiente a los aminoácidos 654-662 de la secuencia de longitud completa (es decir, IISAVVGL: SEQ ID NO: 2) (Peoples GE et al, Proc Natl Acad Sci USA (1995) 92: 432-436, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). El péptido se aisló usando linfocitos asociados a tumores de pacientes con cáncer de mama y de ovario, y más tarde se encontró que era compartido entre varios tumores malignos epiteliales incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de páncreas (Linehan DC et al., J Immunol (1995) 155: 4486-4491; Peiper M et al, Surgery (1997) 122: 235-242; Yoshino I et al, Cancer Res (1994) 54: 3387-3390; Peiper M et al, Eur J Immunol (1997) 27: 1115-1123).

[0017] E75 tiene una alta afinidad de unión para la molécula de HLA-A2 y se considera el péptido inmunodominante de la proteína HER2/*neu*. Como tal, es el péptido derivado de HER2/*neu* más estudiado en estudios de laboratorio y clínicos. Peoples et al., J. Clin. Oncol. (2005) 23: 7536-45. Como péptido inmunodominante, también se espera que E75 induzca una respuesta inmune más potente. GP2, por otro lado, tiene una afinidad de unión a HLA-A2 relativamente mala y se considera un epítipo subdominante. (Fisk B, et al J Exp Med (1995) 181: 2109-2117). Esta es una de las razones de que las estrategias de vacunas que dirigen una respuesta inmune celular a epítopos de HER-2/*neu* se han centrado en E75 en lugar de GP2.

[0018] Los estudios previos de GP2 han utilizado células dendríticas autólogas pulsadas con GP2 (y otros péptidos) *ex vivo* y se han reinyectado por vía subcutánea (Brossart P et al Blood (2000) 96: 3102-3108) o intravenosa (Dees EC et al. Cancer Immunol Immunother (2004) 53:777-785) en los pacientes HER2/*neu*⁺ con cáncer de mama o cáncer de ovario metastásicos para inducir una respuesta de CTL. Brossart et al. detectaron una respuesta de CTL específica de péptido (GP2 y E75) *in vivo*, y observaron que ambos péptidos mostraron una respuesta inmune similar a pesar de las diferencias conocidas en las afinidades de unión a HLA-A2. Dees et al. evaluaron las células dendríticas pulsadas con GP2 en pacientes con cáncer de mama metastásico y fueron capaces de documentar la enfermedad clínicamente estable en dos pacientes. Es importante destacar, sin embargo, que ninguno de los estudios utilizó la GP2 como una vacuna de péptidos. Más bien, en ambos estudios, los pacientes fueron inyectados con células dendríticas que habían sido pulsadas con GP2. Por otra parte, al igual que con los estudios de E75, los estudios de GP2 se limitaron a los pacientes con cáncer avanzado. Por tanto, ni Brossart ni Dees demostraron la capacidad de las células dendríticas pulsadas con GP2 para prevenir o retrasar la recurrencia de la enfermedad tras la remisión. Al igual que con E75, las vacunas contra el cáncer dirigidas a antígenos tumorales propios, como HER2/*neu* de la que se deriva GP2, presentan desafíos únicos debido a la característica de tolerancia inmunológica de proteínas propias.

[0019] Peoples et al. han evaluado previamente el uso de GP2 para un ensayo de vacuna contra el cáncer de mama basado en péptidos mediante la realización de ensayos de citotoxicidad *in vitro* con células dendríticas pulsadas con GP2 y células T CD8 obtenidas de pacientes con cáncer de mama. (Mittendorf EA et al Cancer (2006) 106: 2309-2317). Si bien los resultados de estos experimentos *in vitro* confirmaron la presencia de linfocitos T citotóxicos precursores específicos de GP2 en mujeres con cáncer de mama HER2/*neu*⁺, se concluyó que debido a la variabilidad de la respuesta a un péptido determinado y la heterogeneidad de la expresión del antígeno *in vivo*, la vacunación con múltiples péptidos diferentes, incluyendo el péptido inmunodominante E75, será necesaria para proporcionar una respuesta inmunitaria adecuada. (Mittendorf EA et al Cancer (2006) 106: 2309-2317).

[0020] Como se señaló anteriormente, el trastuzumab está indicado para pacientes con cáncer de mama metastásico, de nódulos positivos (NP), que sobreexpresan HER2/*neu* (IHC 3⁺ o FISH $\geq 2,0$), y muestra una actividad muy limitada en pacientes con una expresión de HER2/*neu* de baja a intermedia. Del mismo modo, en los estudios discutidos anteriormente, se seleccionaron los pacientes que recibieron vacunas basadas en E75 y GP2, en parte, en base a la presencia de tumores que sobreexpresaban HER2/*neu*. En consecuencia, no se esperaba que una vacuna de péptido GP2 fuera eficaz en pacientes con cáncer con niveles bajos e intermedios de expresión de tumor HER2/*neu*.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA

[0021] La presente invención se refiere a las realizaciones como se caracterizan en las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a una composición que comprende un portador farmacéuticamente eficaz, un péptido GP2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, y en la que, aparte del péptido GP2, la composición no contiene ningún otro péptido derivado de HER2/*neu*, tal como un péptido E75 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, para utilizar en un procedimiento para prevenir la recurrencia del cáncer de mama en un sujeto, en la que el sujeto es humano y está en remisión después del tratamiento con una evolución estándar de la terapia; y en la que las células cancerosas del sujeto tienen una sobreexpresión de HER2/*neu*, y en la que la sobreexpresión de HER2/*neu* es una calificación de inmunohistoquímica, "IHC", de 3⁺ o una calificación de hibridación fluorescente *in situ*, "FISH", de 2,0 o mayor para la expresión del gen HER2/*neu*. En una realización, la evolución estándar de la terapia es el tratamiento con trastuzumab, cuyo tratamiento puede continuar simultáneamente con los procedimientos descritos en el presente documento. Los

procedimientos comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende un portador farmacéuticamente eficaz y un péptido GP2. El péptido GP2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Además, aparte del péptido GP2, la composición no contiene ningún otro péptido derivado de HER2/*neu*, incluyendo, por ejemplo, el péptido inmunodominante E75. La administración puede realizarse por cualquier medio adecuado en la técnica, tal como inoculación o inyección, y, más particularmente, inyección intradérmica, que pueden tener lugar con una o más dosis separadas. Tales dosis pueden comprender una concentración igual del péptido y un inmunoadyuvante, se pueden administrar sustancialmente al mismo tiempo, y se pueden administrar en un sitio de inoculación o espaciados uno del otro en la superficie de la piel. La composición se puede administrar de aproximadamente tres a seis veces o más sobre una base mensual hasta que se establezca una inmunidad protectora. En algunos aspectos, la composición comprende además un adyuvante, tal como factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y preferiblemente GM-CSF humano recombinante.

[0022] En algunos aspectos, la composición se administra al sujeto conjuntamente con una dosis de vacuna de refuerzo, que comprende una cantidad eficaz de una composición que comprende un portador farmacéuticamente eficaz y un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos, la composición de la dosis de refuerzo comprende además un adyuvante, tal como GM-CSF y, preferiblemente, GM-CSF humano recombinante. La administración de una dosis de refuerzo se puede llevar a cabo mediante cualquier medio adecuado en la técnica, tal como la inoculación o inyección y, más particularmente, la inyección intradérmica, que pueden tener lugar con una o más dosis separadas. Tales dosis pueden comprender una concentración igual del péptido y un inmunoadyuvante, se puede administrar sustancialmente al mismo tiempo, y se pueden administrar en un sitio de la inoculación o espaciados uno de otro en la superficie de la piel. Normalmente, la dosis de refuerzo se administra después de completar un programa de inmunización primaria y, preferiblemente, cada seis o 12 meses después de la inmunización primaria, según sea necesario.

[0023] El sujeto es un humano. En ciertos aspectos, el ser humano es positivo para el antígeno mayor de histocompatibilidad de tipo sanguíneo como antígeno leucocitario humano A2 o antígeno leucocitario humano A3. Según la presente invención, las células cancerosas del ser humano son positivas para la expresión de niveles detectables de HER2/*neu*. En algunos aspectos que no forman parte de la invención, las células cancerosas muestran una expresión de HER2/*neu* de baja a intermedia. Por ejemplo, las células cancerosas del ser humano tienen una calificación de inmunohistoquímica (IHC) de 1+ o 2+ y/o una calificación de hibridación fluorescente in situ (FISH) de menos de 2,0). En otros aspectos según la presente invención, las células cancerosas del ser humano tienen una calificación de IHC de 3+. Según la presente invención, las células cancerosas del ser humano muestran una sobreexpresión de HER2/*neu*. Las células cancerosas del ser humano tienen una calificación de inmunohistoquímica (IHC) de 3+ y/o una calificación de hibridación fluorescente in situ (FISH) mayor o igual a 2,0). En otras realizaciones, el ser humano no tiene inmunidad preexistente a GP2 (SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4).

[0024] En otra realización, la presente invención proporciona composiciones para utilizar en los procedimientos descritos en esta solicitud. En un aspecto, las composiciones comprenden un portador farmacéuticamente aceptable, una cantidad eficaz de un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y un adyuvante, tal como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos. Las composiciones se administran preferiblemente en un programa de inmunización optimizado. En una realización, la composición de vacuna comprende 0,1-1 mg/ml de péptido y 0,125-0,5 mg/ml de adyuvante. En algunos aspectos específicos, las concentraciones y programaciones de la composición de vacuna preferidos 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, (4) 1 mg/ml de péptido y 0,125 mg/ml de adyuvante, y (5) 0,5 mg/ml de péptido y 0,125 mg/ml de adyuvante, cada uno con inoculaciones mensuales durante al menos 6 meses consecutivos, seguido por inoculaciones de refuerzo periódicas (preferiblemente semianuales o anuales) durante 1 año, 2 años, o 3 o más años.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0025] Los dibujos adjuntos, que se incluyen para proporcionar una comprensión adicional de la invención y se incorporan en y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran aspectos de la invención y junto con la descripción sirven para explicar los principios de la invención. En los dibujos:

La **figura 1** muestra las reacciones locales promedio vs. dosis GM-CSF por grupos de dosis. Los pacientes fueron vacunados con péptido y GM-CSF en cuatro grupos de dosis. **A.** Grupo de dosis de 100 mcg de péptido/250 mcg de GM-CSF. **B.** Grupo de dosis de 500 mcg de péptido/250 mcg de GM-CSF. **C.** Grupo de dosis de 1000 mcg de péptido/250 mcg de GM-CSF. **D.** Grupo de dosis de 500 mcg de péptido/125 mcg de GM-CSF. Las reacciones locales fueron medidas en milímetros (líneas continuas). Una reacción local ≥ 100 mm de endurecimiento necesitaba una reducción de la dosis del 50% en la dosis de GM-CSF (líneas de trazos). No hubo reducciones de la dosis de péptidos.

La **figura 2** muestra la toxicidad y las respuestas inmunológicas de todos los pacientes incluidos en el ensayo de fase I con GP2. **A.** Toxicidad, ningún paciente experimenta toxicidades locales o sistémicas de grado 3-5. **B.** Respuesta inmune *ex vivo*, % células T CD8⁺ específicas pre-máx aumentó estadísticamente ($p = 0,001$). **C.** Respuesta inmune *in vivo*, DTH a GP2 pre-post aumentó estadísticamente ($p = 0,0002$). El control de solución salina normal (NS) también se muestra para la comparación.

La **figura 3** muestra la inmunidad y respuestas inmunológicas de los pacientes inscritos en ensayo de fase I con GP2 que comparan ninguna inmunidad preexistente (pre-dímero $< 0,03$) vs. inmunidad preexistente (pre-dímero $> 0,03$). **A.**

Toxicidad, las toxicidades se incrementaron ligeramente en los pacientes sin inmunidad preexistentes, aunque no significativamente. **B.** Respuesta inmune *ex vivo*, los pacientes sin inmunidad preexistente mostraron aumentos estadísticamente significativos en el % de células T CD8⁺ específicas pre-máx, pre-post, y pre-a largo plazo ($p = 0,003$, $p = 0,03$, y $p = 0,01$, respectivamente) en respuesta a la vacunación. **C.** Respuesta inmune *in vivo*, ambas respuestas de DTH pre-post aumentaron estadísticamente (Ninguno $p = 0,03$ y Pre-E $p = 0,0004$). No se observó diferencia estadística entre las respuestas DTH post ($p = 0,3$).

La **figura 4** muestra la toxicidad y respuestas inmunológicas de los pacientes inscritos en el ensayo de fase I con GP2 que compararon las dosis de GM-CSF 125 mcg vs. 250 mcg. **A.** Toxicidad, las toxicidades se incrementaron ligeramente en los pacientes con 250 mcg de GM-CSF, aunque no significativamente. **B.** Respuesta inmune *ex vivo*, el % de células T CD8⁺ específicas pre-máx con 125 mcg de GM-CSF no aumentó estadísticamente ($p = 0,17$), pero el % de células T CD8⁺ específicas pre-máx con 250 mcg de GM-CSF aumentó estadísticamente ($p = 0,005$). **C.** Respuesta inmune *in vivo*, DTH pre-post con 125 mcg y 250 mcg de GM-CSF aumentó estadísticamente (respectivamente, $p = 0,009$ y $p = 0,008$). No hubo significación estadística entre post DTH con 125 mcg de GM-CSF y DTH post con 250 mcg de GM-CSF ($p = 0,1$).

La **figura 5** muestra la respuesta inmune *ex vivo* y la difusión de epítipo en respuesta a GP2. Se midieron los linfocitos T CD8⁺ específicos de E75 promedio en respuesta a la vacunación con la vacuna de péptido GP2. Se compararon la pre-vacunación de dímero de E75 vs. máx ($0,8 \pm 0,2\%$ vs. $2,0 \pm 0,2\%$, $p = 0,0001$), pre vs. post ($0,8 \pm 0,2\%$ vs. $1,2 \pm 0,2\%$, $p = 0,1$), y pre vs. a largo plazo ($0,8 \pm 0,2\%$ vs. $1,0 \pm 0,2\%$; $p = 0,6$). No se observaron diferencias estadísticas entre los valores de GP2 y E75, pero se observó una tendencia hacia la respuesta máxima de dímero E75 más grande ($2,0 \pm 0,2\%$ vs. $1,4 \pm 0,2\%$; $p = 0,07$).

La **figura 6** muestra la respuesta inmune *in vivo* de pacientes inscritos en el ensayo de fase II con GP2. La mediana de la reacción DTH a GP2 aumentó significativamente desde el nivel de pre-vacunación al nivel de post-vacunación en el grupo de péptido GP2 (PG) ($1,0 \pm 0,8$ cm a $18,0 \pm 3,1$ cm; $p < 0,0001$) y en menor medida en el grupo de adyuvante de control (AG) ($0,0 \pm 1,0$ cm a $0,5 \pm 3,3$ cm; $p < 0,01$). DTH post-vacunación fue significativamente mayor en el PG en comparación con el AG ($18,0 \pm 3,1$ cm vs $0,5 \pm 3,3$ cm, $p = 0,002$).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0026] Varios términos relacionados con los procedimientos y otros aspectos de la presente invención se utilizan en toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones. A tales términos se les da su significado ordinario en la técnica a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos específicamente deben interpretarse de un modo consistente con la definición proporcionada en este documento.

[0027] El término "prevenir" o "prevención" se refiere a cualquier éxito o indicio de éxito en el impedimento o retraso de la recurrencia/recaída del cáncer de mama en pacientes en remisión clínica, medido mediante cualquier parámetro objetivo o subjetivo, incluyendo los resultados de un examen radiológico o físico.

[0028] "Cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a una cantidad de un compuesto, material o composición, tal como se describe en el presente documento, eficaz para lograr un resultado biológico particular, tal como, pero no limitado a, resultados biológicos dados a conocer, descritos o ejemplificados en la presente memoria. Tales resultados pueden incluir, pero no se limitan a, la prevención de cáncer de mama, y más particularmente, la prevención del cáncer de mama recurrente, por ejemplo, la prevención de la recaída en un sujeto, tal como se determina por cualquier medio adecuado en la técnica. La cantidad terapéutica óptima se refiere a la dosis, la programación y el uso de dosis de refuerzo para lograr el mejor resultado terapéutico.

[0029] "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas propiedades y/o sustancias que son aceptables para el paciente desde un punto de vista farmacológico/toxicológico y para el químico farmacéutico fabricante desde un punto de vista físico/químico con respecto a la composición, formulación, estabilidad, la aceptación del paciente y biodisponibilidad. "Portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un medio que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del principio o principios activos y no es tóxico para el huésped al que se administra.

[0030] "Inmunidad protectora" o "respuesta inmune protectora", significa que el sujeto produce una respuesta inmune activa a un componente inmunogénico de un antígeno, tal como los antígenos de cáncer de mama descritos y ejemplificados en el presente documento, de manera que tras la posterior exposición al antígeno, el sistema inmune del sujeto es capaz de reconocer y destruir las células que expresan el antígeno, lo que disminuye la incidencia de la morbilidad y la mortalidad de la recurrencia del cáncer en el sujeto. La inmunidad protectora en el contexto de la presente invención es preferiblemente, pero no exclusivamente, conferida por los linfocitos T.

[0031] "Inmunidad preexistente" se define como un nivel de dímero específico de péptido de al menos el 0,3%. El nivel de dímero específico de péptido se puede medir usando ensayos convencionales, tales como el ensayo de dímero de inmunoglobulina HLA-A2 descrito en esta solicitud.

[0032] El término "aproximadamente", tal como se usa en el presente documento, cuando se refiere a un valor medible, tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, se entiende que abarca 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 llevar a cabo los procedimientos descritos.

5 **[0033]** "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 tanto a cadenas cortas, comúnmente denominadas péptidos, oligopéptidos u oligómeros, como a cadenas más largas, generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los polipéptidos incluyen secuencias de aminoácidos modificadas ya sea por procesos naturales, tales como procesamiento postraduccional, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Tales modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa bibliografía de investigación. Las modificaciones pueden tener lugar en cualquier parte en un polipéptido, incluyendo el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo terminales. Se entenderá que el mismo tipo de modificación puede estar presente en los mismos o diferentes grados en varios sitios en 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, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos postraducionales naturales o pueden fabricarse mediante procedimientos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, 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 enlace disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclajes GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas, tales como arginilación y ubiquitinación.

25 **[0034]** "Refuerzo" se refiere a una dosis de un inmunógeno administrado a un paciente para mejorar, prolongar o mantener la inmunidad protectora y para superar la regulación por descenso de las respuestas de células T mediadas por las células T reguladoras.

30 **[0035]** "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 el estándar actual de terapias de cuidado. Por "remisión" o "remisión clínica", que se utilizan como sinónimos, se quiere decir que los signos clínicos, los signos radiológicos, y síntomas de cáncer de mama se han reducido significativamente o han desaparecido por completo basándose en el diagnóstico clínico, aunque todavía pueden existir células cancerosas en el cuerpo. Por lo tanto, se contempla que la remisión abarca la remisión parcial y completa. La presencia de células cancerosas residuales se puede enumerar mediante ensayos, tales como CTC (células tumorales circulantes) y puede ser predictivo de recurrencia.

40 **[0036]** "Recaída" o "recurrencia" o "resurgimiento" se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren al diagnóstico radiográfico de retorno, o los signos y los síntomas de retorno de cáncer de mama después de un período de mejoría o remisión.

45 **[0037]** El cáncer de mama es un importante problema de salud para las mujeres en todo el mundo. Las vacunas contra el cáncer de mama que se han intentado hasta la fecha han sido limitadas en su eficacia, en particular con respecto a la prevención de la recaída en pacientes que están en remisión después de una evolución estándar de terapia. Como se ha discutido en esta solicitud, se ha determinado que la administración de un péptido del oncogén HER2/*neu*, GP2 (SEQ ID NO: 2), puede inducir una respuesta inmune potente *in vivo* que se sabe que se correlaciona con una tasa reducida de recurrencia de cáncer de mama en pacientes libres de enfermedad.

50 **[0038]** El péptido GP2 está asociado con MHC HLA-A2, y por lo tanto puede inducir inmunidad protectora en los pacientes que tienen el haplotipo HLA-A2. El haplotipo HLA-A2 se ha implicado como un factor de pronóstico negativo en cáncer de ovario (Gamzatova et al, Gynecol Oncol (2006) 103: 145-50) y cáncer de próstata (Hueman et al, Clin Cancer Res (2005) 11: 7470-79; de Petris et al, Med Oncol (2004) 21: 49-52) y este hallazgo probablemente se extiende al cáncer de mama también. Por lo tanto, los pacientes HLA-A2⁺ parecen representar un riesgo mayor de desarrollar la recurrencia del cáncer después de la remisión. Sin embargo, se demostró que de forma inesperada una composición de vacuna que comprende GP2 + GM-CSF inducía de manera efectiva una potente respuesta inmune *in vivo* en pacientes HLA-A2⁺ que se sabe que se correlaciona con un menor riesgo de recurrencia del cáncer de mama y una supervivencia libre de enfermedad más larga en comparación con los pacientes de control HLA-A2⁻. Además, se encontró sorprendentemente que los pacientes tratados con GP2 (el epítipo subdominante) y GM-CSF mostraron respuestas de DTH más robustas en comparación con composiciones de vacuna que comprendían E75 (el epítipo inmunodominante) y GM-CSF. Notablemente, estos resultados no fueron obtenidos mediante la combinación de GP2 con otro epítipo, tal como E75, para generar una vacuna multiepítipo, sino que, en cambio, se obtuvieron con una vacuna con un único epítipo (es decir, GP2). Además, basándose en los datos preliminares, parece que GP2 también puede inducir inmunidad protectora en pacientes que tienen el haplotipo HLA-A3.

65 **[0039]** Debido a que GP2 deriva de la proteína HER2/*neu*, se esperaría que los pacientes que sobreexpresan HER2/*neu* exhibirían una mejor respuesta a una vacuna basada en GP2 que aquellos con una expresión de HER2/*neu* de baja a intermedia. Por ejemplo, otra terapia basada en HER2/*neu*, trastuzumab (Herceptin® Genentech Inc., South

San Francisco, CA), solamente está indicada para pacientes con cáncer de mama metastásico, de nódulos positivos (NP), que sobreexpresan HER2/*neu* (IHC 3+ o FISH $\geq 2,0$) y muestra una actividad muy limitada en pacientes con una expresión de HER2/*neu* de baja a intermedia. Sin embargo, se observó inesperadamente que los pacientes que tienen niveles de expresión de HER2/*neu* de bajos a intermedios experimentaron potentes respuestas inmunes a GP2, similares en magnitud a las respuestas inducidas por GP2 en pacientes que sobreexpresan HER2/*neu*.

[0040] Por consiguiente, una realización de la presente invención presenta composiciones de vacuna para inducir inmunidad protectora contra la recaída o la recurrencia del cáncer de mama. Otra realización proporciona procedimientos para inducir y para el mantenimiento de la inmunidad protectora contra el cáncer de mama, y más particularmente, contra el cáncer de mama recurrente. En algunos aspectos, los procedimientos comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende un portador farmacéuticamente eficaz, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y, opcionalmente, un inmunoadyuvante, tal como GM-CSF. Las variantes de la SEQ ID NO: 2, incluyendo las que tienen cadenas laterales modificadas de aminoácidos, tal como se describen por la Patente de los Estados Unidos de No. de publicación 20050169934, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad, son adecuadas para usar en las composiciones de vacuna y procedimientos de esta solicitud.

[0041] Además, se ha identificado un polimorfismo de origen natural en el codón 655 (sustitución de isoleucina a valina) produciendo un péptido GP2 polimórfico que tiene la secuencia IVSAVVGIL (SEQ ID NO: 4) (Papewalis et al, Nucleic Acid Res (1991) 19: 5452). Este péptido GP2 polimórfico también es adecuado para usar en las composiciones de vacunas y procedimientos de esta solicitud. Del mismo modo, varios grupos han investigado sustituciones de aminoácidos individuales, dobles y triples introducidas en diversos sitios en el péptido GP2, incluyendo los residuos de anclaje (posiciones 2 y 9), y se encontró que ciertas sustituciones de aminoácidos conducen a una mayor unión de GP2 a HLA-A2 (Tanaka et al, Int J Cancer (2001) 94: 540-44; Kuhns et al, J Biol Chem (1999) 274: 36422-427; Sharma et al, J Biol Chem (2001) 276: 21443-449, cada una de estas referencias se incorpora por referencia en su totalidad). Por lo tanto, un experto en la técnica entendería que ciertas sustituciones, en particular en los residuos de anclaje, podrían hacerse en GP2 sin afectar negativamente a su capacidad para inducir una respuesta inmune protectora. En una realización, el péptido GP2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 a excepción de una sustitución en un residuo que aumenta la afinidad del péptido GP2 a molécula HLA-A2. Preferiblemente, la sustitución se produce en uno o ambos de los residuos de anclaje de GP2 (posiciones 2 y 9). Más preferiblemente, la sustitución comprende una sustitución de isoleucina a leucina en la posición 2 y/o una sustitución de leucina a valina en la posición nueve. En otra realización, el péptido GP2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 a excepción de una sustitución en un residuo que no afecta a la afinidad del péptido GP2 a la molécula HLA-A2 en comparación con la afinidad de un péptido GP2 de tipo salvaje que comprende la SEQ ID NO: 2 a la molécula HLA-A2. Los ensayos para probar la afinidad de unión entre GP2 y HLA-A2 son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el ensayo de ensamblaje de superficie celular T2 que se describe en Sharma et al, J Biol Chem (2001) 276: 21443-449.

[0042] En un aspecto, el péptido GP2 tiene no más de 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 residuos de aminoácidos. En una realización, el péptido GP2 no tiene más de 9 residuos de aminoácidos. Preferiblemente, el péptido GP2 con no más de 9 aminoácidos es la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, o una versión mutante de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 con una sustitución en la posición 2 y/o 9.

[0043] El sujeto puede ser cualquier animal, y preferiblemente es un mamífero, tal como un humano, ratón, rata, hámster, cobaya, conejo, gato, perro, mono, vaca, caballo, cerdo, y similares. Los seres humanos son los más preferidos. En aspectos muy preferidos, los seres humanos son positivos para el haplotipo HLA-A2. En otros aspectos preferidos, los seres humanos son positivos para la expresión de HER2/*neu* humano, incluyendo preferentemente seres humanos con tumores que expresan HER2/*neu* de forma baja y/o intermedia, así como los seres humanos que son sobreexpresores de HER2/*neu*.

[0044] Además, nuestro grupo ha demostrado previamente una posible sinergia entre trastuzumab y CTL estimulados por péptido GP2 *ex vivo*. El pretratamiento de las células cancerosas de mama con trastuzumab seguido por incubación con CTL inducidos por péptido GP2 dio lugar a una citotoxicidad mejorada en tres líneas celulares tumorales en comparación con el tratamiento con trastuzumab o CTL específicos de GP2 solos (Mittendorf EA et al., Annals of Surgical Oncology (2006) 13 (8): 1085-98). En vista de los resultados de los experimentos con GP2 descritos en esta solicitud, estos hallazgos indican que la vacunación concurrente de GP2 durante la terapia con trastuzumab puede ser una inmunoterapia de combinación eficaz.

[0045] Las composiciones de vacuna se pueden formular como preparaciones liofilizadas o líquidas de acuerdo con cualquier medio adecuado en la técnica. Los ejemplos no limitativos de preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones, jarabes, suspensiones espesas y emulsiones. Los portadores líquidos adecuados incluyen cualquier disolvente orgánico o inorgánico adecuado, por ejemplo, agua, alcohol, solución salina, solución salina tamponada, solución salina fisiológica, solución de dextrosa, soluciones de propilenglicol en agua, y similares, preferiblemente en forma estéril.

[0046] Las composiciones de vacuna se pueden formular en formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente

aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de los polipéptidos activos) y que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos, tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas a partir de grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, y similares.

[0047] Las composiciones de vacuna se formulan preferentemente para la inoculación o inyección en el sujeto. Para la inyección, las composiciones de vacuna de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, tales como agua o alcohol, o en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hanks, solución de Ringer, o tampón de solución salina fisiológica. La solución puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, agentes conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Las formulaciones de inyección también se pueden preparar como preparaciones en forma sólida que están destinadas a ser convertidas, poco antes del uso, en preparaciones en forma líquida adecuadas para la inyección, por ejemplo, por constitución con un vehículo adecuado, tal como agua estéril, solución salina, o alcohol, antes de utilizarse.

[0048] Las composiciones de vacuna también se pueden formular en vehículos de liberación sostenida o preparaciones de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante inoculación o implantación (por ejemplo subcutánea o intramuscular) o por inyección. Por lo tanto, por ejemplo, las composiciones de vacuna se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de suministro adecuados para su uso como portadores.

[0049] Las composiciones de vacuna pueden comprender agentes que mejoran la eficacia protectora de la vacuna, tales como adyuvantes. Los adyuvantes incluyen cualquier compuesto o compuestos que actúan para aumentar una respuesta inmune protectora al antígeno péptido GP2, reduciendo así la cantidad de antígeno necesaria en la vacuna, y/o la frecuencia de administración necesaria para generar una respuesta inmune protectora. Los adyuvantes pueden incluir por ejemplo, emulsionantes, dipéptidos de muramilo, avridina, adyuvantes acuosos, tales como hidróxido de aluminio, adyuvantes basados en quitosano, y cualquiera de las diversas saponinas, aceites y otras sustancias conocidas en la técnica, tales como Amphigen, LPS, extractos de pared de célula bacteriana, ADN bacteriano, secuencias CpG, oligonucleótidos sintéticos y combinaciones de los mismos (Schijns et al (2000) Curr Opin Immunol 12: 456), extracto de pared celular de *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*) (MCWE) (Patente de Estados Unidos No. 4.744.984), ADN de *M. phlei* (M-DNA), y complejo de pared celular (MCC) M-DNA-*M. phlei*. Los compuestos que pueden servir como emulsionantes incluyen agentes emulsionantes naturales y sintéticos, así como tensioactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos. Entre los compuestos sintéticos, los agentes emulsionantes aniónicos incluyen, por ejemplo, las sales de potasio, sodio y amonio de ácido láurico y oleico, las sales de calcio, magnesio y aluminio de ácidos grasos, y sulfonatos orgánicos, tales como laurilsulfato de sodio. Los agentes catiónicos sintéticos incluyen, por ejemplo, bromuro de cetiltrimetilamonio mientras que los agentes no iónicos sintéticos se ejemplifican mediante glicerilésteres (por ejemplo, monoestearato de glicerilo), ésteres y éteres de polioxietilenglicol, y los ésteres de ácidos grasos de sorbitán (por ejemplo, monopalmitato de sorbitán) y sus derivados de polioxietileno (por ejemplo, monopalmitato de sorbitán polioxietileno). Los agentes emulsionantes naturales incluyen acacia, gelatina, lecitina y colesterol.

[0050] Otros adyuvantes adecuados se pueden formar con un componente de aceite, tal como un solo aceite, una mezcla de aceites, una emulsión de agua-en-aceite, o una emulsión de aceite-en-agua. El aceite puede ser un aceite mineral, un aceite vegetal, o un aceite animal. Los aceites minerales son hidrocarburos líquidos obtenidos a partir de vaselina mediante una técnica de destilación, y también se les conoce en la técnica como parafina líquida, vaselina líquida, o aceite mineral blanco. Los aceites animales adecuados incluyen, por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceite de halibut, aceite de sábal, aceite de pez reloj anaranjado y aceite de hígado de tiburón, todos disponibles comercialmente. Los 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 que se utilizan comúnmente en preparaciones de vacunas, y también son adecuados para usar en la presente invención. Tanto FCA y FIA son emulsiones de agua en aceite mineral; sin embargo, el FCA también contiene una *Mycobacterium sp.* muerta.

[0051] Las citoquinas inmunomoduladoras también pueden ser utilizadas en las composiciones de vacunas para aumentar la eficacia de la vacuna, por ejemplo, como un adyuvante. Los ejemplos no limitantes de tales citoquinas incluyen interferón alfa (IFN- α), la interleuquina-2 (IL-2), y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), o combinaciones de los mismos. El GM-CSF es altamente preferido.

[0052] Las composiciones de vacuna que comprenden los antígenos de péptido GP2 y que comprenden además adyuvantes se pueden preparar usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, mezcla, sonicación y microfluidificación. El adyuvante puede comprender de aproximadamente 10% a aproximadamente 50% (v/v) de la composición de vacuna, más preferiblemente de aproximadamente 20% a

aproximadamente 40% (v/v), y más preferiblemente de aproximadamente 20% a aproximadamente 30% (v/v), o cualquier número entero dentro de estos intervalos. Aproximadamente el 25% (v/v) es muy preferente.

5 **[0053]** La administración de las composiciones de vacuna puede ser por infusión o inyección (por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intracutánea, subcutánea, intratecal, intraduodenal, intraperitoneal, y similares). Las composiciones de vacunas también se pueden administrar por vía intranasal, vaginal, rectal, oral, o transdérmica. Adicionalmente, las composiciones de vacuna se pueden administrar mediante sistemas de administración "sin aguja". Preferiblemente, las composiciones se administran mediante inyección intradérmica. La administración puede ser bajo la dirección de un médico o un médico asistente.

10 **[0054]** Las inyecciones se pueden dividir en múltiples inyecciones, con tales inoculaciones divididas administradas preferiblemente sustancialmente al mismo tiempo. Cuando se administran como una inoculación dividida, la dosis del inmunógeno se proporciona, preferiblemente, pero no necesariamente, por igual en cada inyección separada. Si un adyuvante está presente en la composición de vacuna, la dosis del adyuvante se proporciona, preferiblemente, pero no necesariamente, por igual en cada inyección separada. Las inyecciones separadas para la inoculación dividida se administran preferiblemente sustancialmente proximales entre sí en el cuerpo del paciente. En algunos aspectos preferidos, las inyecciones se administran al menos aproximadamente a 1 cm de distancia entre sí en el cuerpo. En algunos aspectos preferidos, las inyecciones se administran al menos aproximadamente a 2,5 cm de distancia entre sí en el cuerpo. En aspectos muy preferidos, las inyecciones se administran al menos aproximadamente a 5 cm de distancia entre sí en el cuerpo. En algunos aspectos, las inyecciones se administran al menos aproximadamente a 10 cm de distancia entre sí en el cuerpo. En algunos aspectos, las inyecciones se administran a más de 10 cm de distancia entre sí en el cuerpo, por ejemplo, al menos aproximadamente a 12,5, 15, 17,5, 20, o más cm de distancia entre sí en el cuerpo. Las inyecciones de inmunización primaria y las inyecciones de refuerzo se pueden administrar como una inoculación dividida, tal como se describe y ejemplifica en este documento.

25 **[0055]** Se pueden emplear varios sistemas de administración farmacéuticos alternativos. Los ejemplos no limitantes de tales sistemas incluyen liposomas y emulsiones. También pueden emplearse ciertos disolventes orgánicos, tales como dimetilsulfóxido. Además, las composiciones de vacuna pueden administrarse usando un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros sólidos que contienen el agente terapéutico. Los diversos materiales de liberación sostenida disponibles son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar las composiciones de vacuna en un intervalo de varios días a varias semanas a varios meses.

35 **[0056]** Para evitar la recurrencia del cáncer de mama en un paciente que está en remisión de cáncer de mama, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de vacuna al sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz proporcionará un aumento clínicamente significativo en el número de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) específicos de GP2 en el paciente, así como un aumento clínicamente significativo en la respuesta de linfocitos T citotóxicos al antígeno, tal como se mide por cualquier medio adecuado en la técnica. Además, debido a la difusión de epítipo, una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de vacuna con GP2 proporcionará un aumento en el número de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) específicos de E75 en el paciente, tal como se mide mediante cualquier medio adecuado en la técnica. En el paciente en su conjunto, 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 en el paciente.

45 **[0057]** 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 general de salud del paciente, el tipo de formulación, el modo o manera o administración, o la presencia o ausencia de factores de riesgo que aumentan significativamente la probabilidad de que el cáncer de mama reaparecerá en el paciente. Tales factores de riesgo incluyen, pero no están limitados a, el tipo de cirugía, el estado de los nódulos linfáticos y el número positivo, el tamaño del tumor, el grado histológico del tumor, la presencia/ausencia de receptores de hormonas (receptores de estrógeno y progesterona), la expresión de HER2/*neu*, la invasión linfovascular, y la predisposición genética (BRCA 1 y 2). En algunos aspectos preferidos, la cantidad eficaz depende de si el paciente es positivo en nódulos linfáticos o negativo en nódulos linfáticos, y si el paciente es positivo en nódulos linfáticos, el número y el alcance de los nódulos positivos. En todos los casos, la cantidad eficaz apropiada puede ser determinada rutinariamente por los expertos en la técnica usando técnicas rutinarias de optimización y el juicio experto e informado del practicante y otros factores evidentes para los expertos en la técnica. Preferiblemente, una dosis terapéuticamente eficaz de las composiciones de vacuna descrita en el presente documento proporcionará el beneficio preventivo terapéutico sin causar toxicidad sustancial al sujeto.

60 **[0058]** La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones de vacuna pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción LD50/ED50. Se prefieren composiciones de vacuna que exhiben índices terapéuticos elevados. Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden utilizarse para formular un intervalo de dosificación para su uso en pacientes. La dosificación de tales composiciones de vacuna se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La

dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada.

5 **[0059]** La información de toxicidad se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en un sujeto específico, tal como un ser humano. El médico puede terminar, interrumpir o ajustar la administración debido a la toxicidad, o a disfunciones de órganos, y puede ajustar el tratamiento según sea necesario si la respuesta clínica no es adecuada, para mejorar la respuesta. La magnitud de una dosis administrada en la prevención de cáncer de mama recurrente variará con la gravedad de la condición del paciente, el riesgo relativo de recurrencia, o la vía de administración, entre otros factores. La gravedad de la condición del paciente puede, por ejemplo, evaluarse, en parte, mediante procedimientos estándar de evaluación de pronóstico.

15 **[0060]** Las composiciones de vacuna pueden administrarse a un paciente en cualquier programación apropiada para inducir y/o mantener una inmunidad protectora contra la recaída del cáncer de mama, y más específicamente para inducir y/o mantener una respuesta de linfocitos T citotóxicos a GP2 y/o E75 (debido a la difusión de epítipo). Por ejemplo, a los pacientes se pueden administrar una composición de vacuna como una inmunización primaria, tal como se describe y ejemplifica en este documento, seguido por la administración de una dosis de refuerzo para reforzar y/o mantener la inmunidad protectora.

20 **[0061]** En algunos aspectos, a los pacientes se pueden administrar las composiciones de vacuna 1, 2 o más veces al mes. Una vez por mes durante seis meses consecutivos es preferente para establecer la respuesta inmune protectora, sobretodo con respecto al programa de inmunización primaria. En algunos aspectos, los refuerzos se pueden administrar a intervalos regulares, tales como cada 6 meses o más después de la finalización del programa de inmunización primaria. La administración de la dosis de refuerzo es preferentemente cada 6 meses. Los refuerzos también se pueden administrar según sea necesario.

25 **[0062]** El programa de administración de vacunas, incluyendo la inmunización primaria y administración de refuerzo, puede continuar tanto tiempo como sea necesario para el paciente, por ejemplo, en el transcurso de varios años, a durante la vida del paciente. En algunos aspectos, la programación de vacunas incluye una administración más frecuente en el principio del régimen de vacunas, e incluye una administración menos frecuente (por ejemplo, refuerzos) con el tiempo para mantener la inmunidad protectora.

30 **[0063]** La vacuna se puede administrar en dosis más bajas al inicio del régimen de vacuna, con dosis más altas administradas con el tiempo. Las vacunas también se pueden administrar en dosis más altas al comienzo del régimen de vacunas, con dosis más bajas administradas con el tiempo. La frecuencia de la administración de vacunas primarias y de refuerzo y la dosis de GP2 administrada se pueden adaptar y/o ajustar para satisfacer las necesidades particulares de los pacientes individuales, según lo determinado por el médico de acuerdo con cualquier medio adecuado en la técnica.

35 **[0064]** En algunos aspectos, las composiciones de vacuna, incluyendo composiciones para la administración como un refuerzo, comprenden de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg de péptido GP2. En algunos aspectos preferidos, las composiciones comprenden aproximadamente 0,1 mg de GP2. En algunos aspectos preferidos, las composiciones comprenden aproximadamente 1 mg de GP2. En algunos aspectos más preferidos, las composiciones comprenden aproximadamente 0,5 mg de GP2.

40 **[0065]** En algunos aspectos preferidos, las composiciones de vacuna que comprenden GP2, incluyendo composiciones para la administración como refuerzo, comprenden, además, GM-CSF. Tales composiciones comprenden preferiblemente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 0,5 mg de GM-CSF. En algunos aspectos preferidos, las composiciones comprenden aproximadamente 0,125 mg de GM-CSF. En algunos aspectos preferidos, las composiciones comprenden aproximadamente 0,25 mg de GM-CSF.

45 **[0066]** En algunos aspectos particularmente preferidos, las composiciones de vacuna comprenden aproximadamente de 0,5 mg a 1 mg de péptido GP2 y de 0,125 a 0,250 mg de GM-CSF en un volumen total de 1 ml, y se administran mensualmente como una inoculación dividida de 0,5 ml cada una, administradas por medio de inyecciones a unos 5 cm de distancia en el cuerpo del paciente, y administradas simultáneamente o mezcladas. El programa de administración es preferiblemente cada mes durante seis meses. Después de un período de aproximadamente 48 horas, el sitio de inyección se puede evaluar para la reacción local del eritema y el endurecimiento. Si las reacciones en ambos sitios son confluyentes y el área de endurecimiento total mide > 100 mm (o el paciente experimenta cualquier > grado 2 de toxicidad sistémica), entonces la dosis de GM-CSF se puede reducir, por ejemplo, a la mitad, aunque se entiende que la dosis de péptido sigue siendo la misma. Si el paciente presenta una reacción robusta en las dosis posteriores, entonces se puede producir una reducción adicional de GM-CSF, por ejemplo, reduciendo a la mitad. Si el paciente no presenta una reacción robusta, entonces el paciente puede continuar con la dosis más alta de GM-CSF. En algunos aspectos, el programa de administración y la dosificación de la dosis de refuerzo se determina de manera similar, con dosis de refuerzo que comienzan con la administración de composiciones de vacuna que comprenden 1 mg de GP2 y 0,25 mg de GM-CSF, administrados aproximadamente cada seis meses después de la conclusión del programa de vacuna de inmunización primaria .

[0067] Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir la invención con mayor detalle. Pretenden ilustrar, no limitar, la presente invención.

EJEMPLO 1: Ensayo en Fase I de GP2 + GM-CSF

Características de los pacientes y Protocolo clínico:

[0068] Esta es el primer ensayo en fase clínica I del péptido GP2 derivado de HER2/*neu* con el inmunoadyuvante GM-CSF en pacientes con cáncer de mama libres de la enfermedad. El ensayo fue aprobado por el Institutional Review Board y llevado a cabo en el Walter Reed Army Medical Center en virtud de una solicitud de nuevo fármaco en investigación (BB-IND # 11730). Todos los pacientes habían confirmado histológicamente cáncer de mama con nódulos negativos que expresaban todos los niveles de HER2/*neu* por inmunohistoquímica estándar (IHC 1-3 +). Los pacientes habían completado un evolución estándar de cirugía, quimioterapia y radioterapia (según se requiera) antes de la inscripción, y los pacientes en la quimioterapia hormonal continuaron con su régimen específico. Después de cribar por los criterios de elegibilidad y asesoramiento y consentimiento adecuado, los pacientes HLA-A2+ elegibles fueron incluidos en el estudio. Antes de la vacunación, a los pacientes se les analizó la piel con un panel de antígenos de recuerdo (prueba de Mantoux). Los pacientes fueron considerados inmunocompetentes si reaccionaban (> 5 mm) a ≥ 2 antígenos.

[0069] Se incluyeron y se vacunaron 18 pacientes con cáncer de mama libres de enfermedad con nódulos negativos con todos los niveles de expresión de HER2/*neu* (IHC 1-3+). Ninguno de los pacientes se retiró de este estudio o se perdieron durante el seguimiento. Los datos demográficos del paciente, factores de pronóstico y perfiles de tratamiento se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos demográficos del paciente, factores de pronóstico y perfiles de tratamiento para el estudio en fase I

	Pacientes GP2 (n = 18)
Mediana de edad, años	47
Intervalo, años	32-68
Raza	
blanca (%)	14 (77,8)
negra (%)	2 (11,1)
otras (%)	2 (11,1)
Tamaño del tumor	
T2-T4, (%)	7 (38,9)
Grado histológico	
Grado III (%)	7 (38,9)
IHC 3+ o FISH+ de HER2/ <i>neu</i> (%)	6 (33,3)
Receptor de hormona negativo (%)	8 (44,4)
Sin quimioterapia (%)	6 (33,3)
Sin XRT (%)	6 (33,3)
Terapia hormonal (%)	9 (50,0)

Vacunación y protocolo clínico

[0070] *Vacunas.* El péptido GP2 (HER2/*neu*, 654-662) fue producido comercialmente de acuerdo con las directrices federales para las buenas prácticas de fabricación (GMP) por NeoMPS Inc. (San Diego, CA). La pureza del péptido (> 95%) se verificó por cromatografía líquida de alto rendimiento y espectrometría de masas, y el contenido de aminoácidos se determinó por análisis de aminoácidos. Las pruebas de esterilidad, endotoxinas (prueba de lisado de amebocitos de limulus), y de seguridad en general se llevaron a cabo por el fabricante. El péptido liofilizado se reconstituyó en solución salina estéril a las concentraciones siguientes: 100 mcg/0,5 ml, 500 mcg/0,5 ml, y 1 mg/0,5 ml. El péptido GP2 se mezcló con GM-CSF (Berlex, Seattle, WA) a 250 mcg/0,5 ml, y la inoculación de 1,0 ml se dividió y se administró por vía intradérmica en dos sitios con 5 cm de separación en la misma extremidad.

[0071] *Serie de vacunación.* El estudio se diseñó y llevó a cabo como un ensayo de seguridad de escalada de la dosis para determinar la seguridad, la inmunogenicidad y mejor dosis óptima del péptido GP2 en combinación con el adyuvante GM-CSF. La mejor dosis óptima se definió como la dosis mínima de la vacuna y el adyuvante que da la mejor respuesta inmunológica *in vivo* y *ex vivo*.

[0072] Tres pacientes fueron asignados a cada uno de los tres primeros grupos de dosis que recibieron seis inoculaciones mensuales de GP2 y 250 mcg de GM-CSF. Los grupos de dosis se enumeran como péptido GP2 (mcg): GM-CSF (mcg): # de inoculaciones, e incluyen: 100: 250: 6, 500: 250: 6, y 1000: 250: 6. GM-CSF se redujo en un 50% si los pacientes desarrollaron una reacción local que medía > 100 mm o toxicidades sistémicas > grado 2. En el último

grupo de pacientes, GM-CSF se redujo a 125 mcg de modo que estos nueve pacientes recibieron 500: 125: 6.

[0073] Este ensayo de escalado de dosis utilizó una dosis de péptido GP2 creciente (100 mcg, 500 mcg y 1000 mcg) con 250 mcg de GM-CSF y 6 inoculaciones mensuales para los tres primeros grupos de dosis (abreviado: péptido GP2 (mcg): GM-CSF (mcg): # inoculaciones - 100: 250: 6, 500: 250: 6, y 1000: 250: 6). El GM-CSF se redujo en un 50% si los pacientes desarrollaron una reacción local que medía > 100 mm o toxicidades sistémicas > grado 2. Ocho de los primeros 9 pacientes (89%) requirieron reducciones de dosis de GM-CSF debido a reacciones locales robustas. Debido al número de reducciones de la dosis requerida, la dosis inicial de GM-CSF se redujo de 250 mcg a 125mcg por inoculación para el cuarto y último grupo de 9 pacientes (500: 125: 6). Sólo 2 de los 9 pacientes (22%) en el grupo de dosis final requirió una nueva reducción de la dosis de GM-CSF. No se requirieron reducciones de la dosis de péptido para la serie de vacunación. La figura 1 representa las reacciones locales promedio vs. la dosis de GM-CSF promedio para cada grupo de dosis. Las reacciones locales en el grupo de dosis final fluctuaron menos a lo largo de la serie de vacunación utilizando una dosis de partida de GM-CSF de 125mcg por inoculación.

[0074] *Toxicidad.* Los pacientes se observaron una hora después de la vacunación para la hipersensibilidad inmediata y regresaron 48-72 horas después para medir sus puntos de inyección e ser interrogados sobre las toxicidades. Las toxicidades fueron clasificadas mediante NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events, v3.0 (CTCAE). La progresión de un grupo de dosis al siguiente se produjo sólo en la ausencia de toxicidades limitantes de la dosis, lo que se define como la reacción de hipersensibilidad de dos pacientes dentro de un grupo de la dosis que desarrollan una toxicidad \geq grado 3.

[0075] *Aislamiento y cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).* Se extrajo sangre antes de cada vacunación y en un mes (post-vacuna) y seis meses (a largo plazo) tras la finalización de la serie de vacunas. Se extrajeron 50 ml de sangre y se aislaron las PBMC. Las PBMC se lavaron y se resuspendieron en medio de cultivo y se usaron como una fuente de linfocitos.

[0076] *Ensayo de dímero de inmunoglobulina HLA-A2.* La presencia de células T CD8+ específicas de GP2 en PBMC recién aisladas de pacientes se evaluó directamente *ex vivo* mediante el ensayo de dímero al inicio del estudio, antes de cada vacunación sucesiva, y a los 1, 6, y 12 meses después de la finalización de la serie de vacunación (Woll MM et al. J Clin Immunol (2004) 24: 449-461). Brevemente, el dímero de inmunoglobulina (Ig) HLA-A2 (PharMingen, San Diego, CA) se cargó con el péptido GP2, E75, o péptido de control (E37, la proteína de unión a folato (25-33) RIAWARTEL) mediante la incubación de 1 mcg de dímero con un exceso (5 mcg) de péptido y 0,5 mcg de β 2-microglobulina (Sigma, St. Louis, MO) a 37°C durante la noche, después se almacenó a 4°C hasta su uso. Las PBMC se lavaron y se resuspendieron en tampón "PharMingen Stain Buffer" (PharMingen) y se añadieron a 5×10^5 células/100 μ l/tubo en tubos de fondo redondo de poliestireno de 5 ml (Becton Dickinson, Mountain View, CA) y se tiñeron con los dímeros y anticuerpos cargados. En cada paciente se determinó el nivel de células CD8+ específicas de GP2 y específicas E75 en respuesta a cada vacunación sucesiva, y se compararon los niveles promedio después de la inoculación con los niveles antes de la inoculación.

[0077] *Hipersensibilidad de tipo retardado (DTH).* Las reacciones de DTH al péptido GP2 se llevaron a cabo antes de, y después de, la serie de vacunación. Las inyecciones intradérmicas, en la parte posterior o extremidad (lado opuesto de la vacunación), usando 100 mcg de GP2 (sin GM-CSF) en 0,5 ml de solución salina se compararon con un inóculo de control de volumen igual de solución salina. Las reacciones de DTH se midieron en dos dimensiones a las 48-72 horas usando el procedimiento de bolígrafo sensible y presentaron como la media ortogonal. Sokol JE, Measurement of delayed skin test responses. N Engl JMed (1975) 293: 501-501.

[0078] *Análisis estadístico.* Los valores de p para los factores clinicopatológicos se calcularon utilizando Wilcoxon, prueba exacta de Fisher o χ^2 según sea apropiado. Los valores de p para la comparación de los ensayos de DTH y de dímero pre y post-vacunación se calcularon utilizando la prueba t de Student, apareado o no apareado, según sea apropiado. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

[0079] Las composiciones que comprenden GP2 y GM-CSF son seguras y altamente inmunogénicas. Las respuestas inmunes, tanto *ex vivo* como *in vivo*, parecen estar influidas por la presencia o ausencia de inmunidad específica de GP2 al inicio de la serie de inoculación y por la dosis de GM-CSF utilizada. Además, la vacunación de GP2 da lugar eficientemente a una difusión intraantigénica de epítipo.

[0080] La toxicidad se limitó a reacciones leves locales (que se desean y sirven como una medida sustituta de la inmunogenicidad) y las respuestas sistémicas leves, muchas de las cuales son conocidos efectos secundarios de GM-CSF. No hubo toxicidades limitantes de la dosis, y las reducciones de dosis en GM-CSF fueron suficientes para limitar las reacciones locales encontradas con inoculaciones en serie hasta \leq grado 2. En general, la combinación de vacunas se toleró bien.

[0081] Como se discute en más detalle a continuación, se demostró la inmunogenicidad *ex vivo* de la vacuna, pero

era principalmente evidente cuando se realiza el análisis de subgrupos de los pacientes sin inmunidad preexistente. Los pacientes sin inmunidad preexistente, como se define anteriormente como nivel de dímero específico de péptido <0,3%, alcanzaron la mayor inducción de una respuesta de CTL a la vacunación de GP2. Esta respuesta era uniforme sin tener en cuenta la dosis del péptido GP2. Los pacientes con inmunidad preexistente demostraron una menor respuesta de CTL que sugiere un nivel de tolerancia a las vacunas de péptidos o una respuesta inmune endógena previamente optimizada.

[0082] La inmunogenicidad *in vivo* de la vacuna GM-CSF + GP2 se demostró por un incremento en la reacción de DTH en respuesta al péptido GP2 (sin GM-CSF) antes y después de la serie de vacunación. Esta diferencia en la respuesta alcanzó una significación estadística acumulativa y dentro de cada grupo de dosis. Es de destacar que los pacientes sin inmunidad preexistente mostraron una tendencia hacia reacciones de DTH más grandes. Además, los pacientes que recibieron la dosis de 250 mcg de GM-CSF mostraron una tendencia hacia una respuesta de DTH más grande, pero este hallazgo fue confundido por un mayor porcentaje de pacientes con inmunidad preexistente en el grupo de dosis de GM-CSF inferior. Por lo tanto, no está claro si la diferencia observada en los pacientes con 250 mcg de GM-CSF se debe a la dosis de adyuvante o a la falta de tolerancia. En conjunto, estas respuestas de DTH indicarían que la inmunidad *in vivo* se mantiene y aumenta en todos los grupos en respuesta a la vacunación.

[0083] *Grupos de Dosis.* Este ensayo de escalado de dosis utilizó una dosis creciente de péptido GP2 (100 mcg, 500 mcg y 1000 mcg) con 250 mcg de GM-CSF y 6 inoculaciones mensuales para los tres primeros grupos de dosis (abreviado: péptido GP2 (mcg): GM-CSF (mcg): # inoculaciones - 100: 250: 6, 500: 250: 6, y 1000: 250: 6). El GM-CSF se redujo en un 50% si los pacientes desarrollaron una reacción local que medía ≥ 100 mm o toxicidades sistémicas \geq grado 2. Ocho de los primeros 9 pacientes (89%) requirieron reducciones de dosis de GM-CSF debido a reacciones locales robustas. Debido al número de reducciones de la dosis requerida, la dosis inicial de GM-CSF se redujo de 250 mcg a 125mcg por inoculación para el cuarto grupo y el último grupo de 9 pacientes (500: 125: 6). Sólo 2 de los 9 pacientes (22%) en el grupo de dosis final requirió una nueva reducción de la dosis de GM-CSF. No se requirieron reducciones de dosis de péptidos para la serie de vacunación. La figura 1 representa las reacciones locales promedio vs. la dosis de GM-CSF promedio para cada grupo de dosis. Las reacciones locales en el grupo de dosis final fluctuaron menos a lo largo de la serie de vacunación utilizando una dosis de partida de GM-CSF de 125mcg por inoculación.

[0084] *Grupo de dosificación combinada.* No hubo toxicidades de grado 3-5 entre los 18 pacientes que recibieron un total de 108 dosis de GP2 + GM-CSF. Entre todos los pacientes, las toxicidades locales máximas que aparecieron durante toda la serie fueron de grado 1 (38,9%) o de grado 2 (61,1%). Las toxicidades sistémicas máximas durante la serie fueron de grado 0 (5,6%), grado 1 (61,1%), y de grado 2 (33,3%). Las reacciones locales más comunes incluyeron eritema y endurecimiento (100% de los pacientes), prurito (25%) e inflamación (23%). Las reacciones sistémicas más comunes fueron fatiga de grado 1 (40%) y artralgia/mialgia de grado 1 (15%). Las tasas de toxicidad local y sistémica combinada general se observan en la Figura 2a.

[0085] La vacuna GP2 + GM-CSF fue capaz de provocar una respuesta inmune tanto *ex vivo* como *in vivo*. La respuesta inmune *ex vivo* se evaluó a través del ensayo del dímero HLA-A2:Ig para detectar el porcentaje de células T CD8+ circulantes específicas de GP2. Las CTL específicas de GP2 se indican como el porcentaje promedio \pm error estándar de la población total de CD8+ circulante. Los puntos de tiempo analizados incluyeron pre-vacuna (pre = $0,5 \pm 0,1\%$), un mes después de la finalización de todas las inoculaciones (post = $0,6 \pm 0,1\%$), valor máximo durante la serie (max = $1,4 \pm 0,2\%$), y 6 meses después de la finalización de todas las inoculaciones (a largo plazo = $0,9 \pm 0,2\%$). Aunque se produjo un aumento estadísticamente significativo en los pacientes cuando se compararon los niveles de vacuna pre vs. máximo ($p = 0,0003$), no se observó un aumento significativo comparando niveles de dímero de vacuna pre vs. post o a largo plazo ($p = 0,7$ y $p = 0,2$, respectivamente) (Figura 2b).

[0086] La eficacia *in vivo* de la vacuna se analizó a través de las respuestas de DTH a la serie pre y post-vacuna utilizando GP2 (sin GM-CSF), así como un control de volumen de solución salina. Se observó un aumento estadísticamente significativo en las respuestas de DTH a GP2 pre vs. post-vacuna ($2,5 \pm 1,4$ mm vs. $35,1 \pm 7,0$ mm, $p = 0,0002$) (Figura 2c).

[0087] Para elucidar mejor la respuesta inmunológica a la vacuna con GP2, se realizaron dos análisis de subconjuntos diferentes: respuesta basada en la presencia de inmunidad específica de GP2 preexistente y la respuesta basada en la dosis de GM-CSF. Se proporcionan a continuación.

[0088] Inmunidad preexistente vs. inmunidad no preexistente. Tal como se define anteriormente, la inmunidad preexistente es un nivel de dímero específico de péptido > 0,3% (Peoples GE et al, J Clin Oncol (2005) 23: 7.536-7.545). Diez pacientes (56%) tenían niveles de dímero consistentes con la inmunidad preexistente a GP2, y 8 pacientes (44%) no tenían inmunidad preexistente. Hubo una diferencia estadística entre los dos grupos de niveles de dímero de GP2 antes de la vacuna ($0,8 + 0,1\%$ vs. $0,06 + 0,02\%$, $p = 0,0007$).

[0089] Los pacientes sin inmunidad preexistente tuvieron un ligero aumento de reacciones locales con toxicidades locales ligeramente más altas en comparación con el grupo con inmunidad preexistente; aunque, esto no fue estadísticamente significativo (Figura 3a).

[0090] Se observaron las respuestas inmunes *ex vivo* e *in vivo* en ambos grupos, pero fueron más robustas en el grupo de pacientes sin inmunidad preexistente. Los niveles de dímero de GP2 del grupo sin inmunidad preexistente fueron pre vs. max ($0,06 \pm 0,02\%$ vs. $1,4 \pm 0,4\%$; $p = 0,009$), pre vs. post ($0,06 \pm 0,02\%$ vs. $0,5 \pm 0,2\%$; $p = 0,07$), y pre vs. a largo plazo ($0,06 \pm 0,02\%$ vs. $0,9 \pm 0,4\%$; $p = 0,06$). En los 10 pacientes con inmunidad preexistente, la respuesta de CTL a la vacunación fue pre vs. max ($0,8 \pm 0,1\%$ vs. $1,5 \pm 0,2\%$; $p = 0,02$), pre vs. post ($0,8 \pm 0,1\%$ vs. $0,6 \pm 0,2\%$; $p = 0,2$), y pre vs. a largo plazo ($0,8 \pm 0,1$ vs. $0,9 \pm 0,2$; $p = 0,7$) (Figura 3b).

[0091] Al comparar la respuesta inmune *in vivo* de los grupos, ambos grupos tenían aumentos estadísticamente significativos en sus respuestas de DTH pre vs. post (sin inmunidad preexistente = $3,3 \pm 2,1$ mm vs. $43,9 \pm 14,6$ mm; $p = 0,02$; e inmunidad pre-existente = $2,0 \pm 2,0$ mm vs. $28,0 \pm 4,6$ mm; $p = 0,0001$).

[0092] Los pacientes sin inmunidad preexistente tenían mayores respuestas de DTH post en comparación con la respuesta de DTH post del grupo con inmunidad preexistente, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($43,9 \pm 14,6$ mm vs. $28,0 \pm 4,6$ mm, respectivamente; $p = 0,3$) (Figura 3c).

[0093] GM-CSF 250 mcg vs. 125 mcg. También se realizó análisis de los pacientes de acuerdo con las dos dosis de partida de GM-CSF. Ambos efectos tóxicos locales y sistémicos se redujeron en el grupo de dosis final de 125 mcg GM-CSF, aunque no fue estadísticamente significativo (Figura 4a).

[0094] La respuesta de CTL a la vacunación en los grupos de dosis de 250 mcg ($n = 9$) fueron pre vs. max ($0,3 \pm 0,1\%$ vs. $1,1 \pm 0,2\%$; $p = 0,004$), pre vs. post ($0,3 \pm 0,1\%$ vs. $0,5 \pm 0,2\%$; $p = 0,07$), y pre vs. a largo plazo ($0,3 \pm 0,1\%$ vs. $0,4 \pm 0,09\%$; $p = 0,2$). La respuesta de CTL en el grupo de dosis de 125mcg ($n = 9$) fue pre vs. max ($0,8 \pm 0,2\%$ vs. $1,8 \pm 0,3\%$; $p = 0,04$), pre vs. post ($0,8 \pm 0,2\%$ vs. $0,6 \pm 0,2\%$; $p = 0,5$), y pre vs. a largo plazo ($0,8 \pm 0,2\%$ vs. $1,4 \pm 0,3\%$; $p = 0,5$) (Figura 4b). Tanto los grupos de 250 mcg como de 125 mcg de GM-CSF tuvieron aumentos significativos en la respuesta de dímero de pre a máxima, y el grupo de 250 mcg mostró una tendencia hacia la significación. Este análisis puede ser confundido por el hecho de que el 33% (3/9) de los pacientes del grupo de 250 mcg tenía una inmunidad preexistente, mientras que el 77,8% (7/9) de los pacientes del grupo de 125 mcg tenían una inmunidad preexistente.

[0095] Para las respuestas inmunes *in vivo*, todos los pacientes, independientemente de la dosis de GM-CSF, tenían un aumento estadísticamente significativo en la respuesta de DTH comparando mediciones pre vs. post-vacuna (125 mcg = $3,8 \pm 2,5$ mm a $24,4 \pm 5,5$ mm; $p = 0,009$, y 250 mcg = $1,3 \pm 1,3$ mm a $45,7 \pm 12,2$ mm; $p = 0,008$). Los pacientes que recibieron 250 mcg de GM-CSF tuvieron una tendencia hacia las respuestas de DTH post-vacunas más grandes, aunque no estadísticamente significativas ($45,7 \pm 12,2$ mm vs. $24,4 \pm 5,5$ mm; $p = 0,1$) (Figura 4c).

[0096] *Estado de expresión de HER2*. Los datos de la respuesta inmune *in vivo* para pacientes agrupados de acuerdo con el nivel de expresión de HER2 (IHC 1+, IHC 2+, o IHC 3+) se analizaron, como se muestra en la Tabla 2 a continuación. Los tres grupos produjeron reacciones de DTH sustanciales post-vacuna. Sorprendentemente, los pacientes que tenían una expresión de baja a intermedia de *HER2/neu* produjeron respuestas inmunitarias *in vivo* similares en magnitud a las respuestas de DTH post-vacuna observadas en pacientes IHC 3+. La expresión de baja a intermedia que expresa de los pacientes con *HER2/neu* también mostraron una tendencia hacia diferencias más estadísticamente significativas entre las respuestas de DTH pre y post-vacuna en comparación con los pacientes con IHC 3+. Específicamente, los pacientes con IHC 2+ tuvieron un aumento estadísticamente significativo en la respuesta de DTH comparando las mediciones pre vs. post-vacuna ($2,3 \pm 2,3$ mm a $32,5 \pm 6,6$ mm; $p = 0,02$). Los pacientes con IHC 1+ y IHC3+ tenían una tendencia hacia respuestas de DTH post-vacuna más potentes, con los pacientes IHC 1+ más cerca de la significación estadística que los pacientes IHC 3+ (IHC 1+ = $2,1 \pm 2,1$ mm a $33,0 \pm 12,8$ mm; $p = 0,06$, y IHC 3+ = $3,9 \pm 3,9$ mm a $44,0 \pm 17,9$ mm; $p = 0,1$). Cuando los datos de DTH de los pacientes de expresión de baja a intermedia se combinaron ("LE") y se compararon con los datos de DTH de los pacientes con IHC 3+ ("OE"), se observó inesperadamente que los pacientes LE tenían un aumento estadísticamente significativo en la respuesta de DTH comparando las mediciones pre vs. post-vacuna ($2,0 \pm 1,4$ mm a $31,7 \pm 7,1$ mm; $p = 0,002$) en comparación con los pacientes OE ($3,9 \pm 3,9$ mm a $44,0 \pm 17,9$ mm; $p = 0,1$).

Tabla 2. Respuestas de DTH basadas en el nivel de expresión de HER2

	IHC 1+	IHC 2+	IHC 3+	No IHC
Número	7	5	5	1
GP2 pre-DTH				
promedio \pm SE	$2,1 \pm 2,1$	$2,3 \pm 2,3$	$3,9 \pm 3,9$	
mediana (intervalo)	0 (0-14,5)	0 (0-11,5)	0 (0-19,5)	
GP2 post-DTH				
promedio \pm SE	$33,0 \pm 12,8$	$32,5 \pm 6,6$	$44,0 \pm 17,9$	

mediana (intervalo)	23,5 (0-104)	28 (22,5-58,5)	30 (14,5-114,5)	
valor p pre-post (prueba t)	0,06	0,03	0,1	
	LE	OE		
Número	13	5		
GP2 pre-DTH promedio \pm SE	2,0 \pm 1,4	3,9 \pm 3,9		
mediana (intervalo)	0 (0-14,5)	0 (0-19,5)		
GP2 post-DTH promedio \pm SE	31,7 \pm 7,1	44,0 \pm 17,9		
mediana (intervalo)	24,0 (0-104)	30 (14,5-114,5)		
valor p pre-post (prueba t)	0,002	0,1		

[0097] *Difusión de epítipo.* Por último, se realizó la evaluación para la evidencia de difusión de epítipo intraantigénico en respuesta a la vacunación con GP2 + GM-CSF. Se realizó la medición de CTL específicas de GP2 y E75 antes de, durante, y después de la vacunación. Se observó que el porcentaje de CTL específicas de E75 aumentó de manera significativa cuando se compararon niveles pre vs. máximos (0,8 \pm 0,2% vs 2,0 \pm 0,2%; p = 0,0001), y aumentó, pero no significativamente, pre vs. post-vacuna (0,8 \pm 0,2% vs. 1,2 \pm 0,2%; p = 0,1) y pre vs. a largo plazo (0,8 \pm 0,2% vs. 1,0 \pm 0,2%; p = 0,6) en respuesta a la vacunación con péptido GP2 (Figura 5). Cabe indicar que estos niveles de CTL específicas de E75 son similares en magnitud a la vacunación primaria con E75 con la única diferencia de una tendencia hacia respuestas de dímero máximas de E75 más grandes en comparación con GP2 (2,0 \pm 0,2% vs. 1,4 \pm 0,2%; p = 0,07).

[0098] La observación de reacciones de DTH y reacciones locales más robustas junto con mayores respuestas de CTL entre los pacientes empezando con dosis más altas de GM-CSF sugiere que la dosis de inmunoadyuvante juega un papel en la inmunogenicidad, y, posiblemente, en la eficacia de las vacunas de péptidos HER2/*neu*. Como se indicó anteriormente, las dosis más grandes de E75 + GM-CSF llevaron a reacciones de DTH más robustas y a tendencias hacia un menor número de reapariciones con la mejora de la supervivencia en los pacientes que presentaron recurrencia (Peoples GE et al, Clin Cancer Res (2008) 14 (3): 797-803). Otro estudio reciente con E75 ha mostrado que la administración de E75 y GM-CSF en seis inoculaciones mensuales a pacientes con cáncer de mama libre de enfermedad en el grupo de dosis óptima (ODG) de 1000 mcg de E75 y 250 mcg de GM-CSF (1000: 250: 6) da lugar a una respuesta de DTH promedio post-vacunación de 21,5 mm. Holmes et al, Cancer (2008) 113: 1666-1675. Las respuestas de DTH post-vacunación del grupo de dosis subóptima (SDG) fueron significativamente menores que la OBD. Curiosamente, los pacientes en el ODG tenían menos casos de recurrencia de la enfermedad a pesar de tener una enfermedad más agresiva, lo que indica que la respuesta de DTH proporciona un marcador útil para el resultado clínico y, en particular, para medir la predisposición a la recurrencia de la enfermedad, correlacionando una menor DTH con una mayor predisposición a la recurrencia de la enfermedad o de un tiempo de supervivencia libre de enfermedad más corto y viceversa.

[0099] Sorprendentemente, a pesar de que GP2 tiene una afinidad de unión relativamente mala a HLA-A2 y es el epítipo subdominante, los pacientes tratados con GP2 y GM-CSF mostraron respuestas de DTH notablemente mayores en comparación con las inducidas con el epítipo inmunodominante, E75 (más GM-CSF). En este ensayo con GP2, las respuestas de DTH más grandes se observaron en los pacientes sin inmunidad preexistente (43,9 mm), así como en los pacientes que recibieron la dosis de GM-CSF más alta (45,7 mm). Específicamente, la respuesta de DTH promedio después de la vacunación para todos los pacientes con GM-CSF + GP2 fue 35,1 mm, mientras que la respuesta de DTH promedio después de la vacunación para los pacientes GM-CSF + E75 fue de 11,3 mm (SDG) y 21,5 mm (ODG). Los pacientes tratados con GP2 y 250 mcg de GM-CSF tuvieron una DTH promedio después de la vacunación de más de dos veces el tamaño de los pacientes con OBD E75 tratados de manera similar (1000: 250: 6) (45,7 mm vs. 21,5 mm). Sorprendentemente, en comparación con los ensayos anteriores con el péptido inmunodominante E75, la reacción de DTH promedio a GP2 fue aproximadamente dos veces el tamaño de la inducida por E75 con la mitad en promedio de la dosis del péptido. No sólo estos hallazgos ilustran adicionalmente la inmunogenicidad de GP2 y ponen de relieve su importancia clínica, sino que los datos de DTH *in vivo* también sugieren fuertemente que GP2, a pesar de ser el epítipo subdominante, debería ser más eficaz en la reducción de la recurrencia del cáncer de mama que E75.

EJEMPLO 2: Ensayo en Fase II de GP2 + GM-CSF

Procedimientos

[0100] Los pacientes con cáncer de mama libres de enfermedad de alto riesgo que han completado la terapia

adyuvante estándar se inscribieron en múltiples sitios y se dispusieron al azar para recibir seis inoculaciones mensuales de 500 mcg de GP2 con 125 mcg de GM-CSF (grupo de péptido; PG) o 125 mcg de GM-CSF solo (grupo de adyuvante; AG). La toxicidad se evaluó después de cada inoculación. La respuesta inmunológica se controló mediante las mediciones de las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) y un ensayo de dímero de antígeno HLA-A2: inmunoglobulina para detectar los linfocitos T CD8⁺ específicos de GP2. Los pacientes fueron controlados clínicamente, radiológicamente, y patológicamente para la recurrencia.

Resultados

[0101] Hasta el momento, 50 (27 PG, 23 AG) de los 200 pacientes planificados han completado la serie primaria. PG y AG tienen características demográficas/de pronóstico similares (Tabla 3).

Tabla 3. Características demográficas y de pronóstico de pacientes para el estudio de la fase II

Demográficas			
	Péptido	Adyuvante	p =
N =	27	23	
Edad (mediana)	52	51	0,88
Nódulo positivo	51,9%	69,6%	0,32
Grado 3	51,9%	56,5%	1
Tumor >= 2 cm	66,7%	52,2%	0,45
ER/PR neg	40,7%	43,5%	0,92
sobreexpresión HER2	59,3%	47,8%	0,6

[0102] Los perfiles de toxicidad en el PG y AG fueron casi idénticos sin toxicidades locales de grado 4-5 y sin toxicidades sistémicas de grado 3-5 en cualquier brazo. La mediana de la reacción DTH a GP2 aumentó significativamente de nivel antes de la vacunación después de la finalización de la serie primaria (después de la vacunación) en el grupo de PG ($1,0 \pm 0,8$ cm a $18,0 \pm 3,1$ cm; $p < 0,0001$) y en menor medida en el grupo AG ($0,0 \pm 1,0$ cm a $0,5 \pm 3,3$ cm; $p < 0,01$) (Figura 6.). La DTH post-vacunación fue significativamente mayor en el PG en comparación con el AG ($18,0 \pm 3,1$ cm vs $0,5 \pm 3,3$ cm, $p = 0,002$) (Figura 6). Todos los pacientes (27/27) PG mostraron inmunidad significativa (SI) por DTH (reacción de más de 1 cm) después de la vacunación en comparación con 45,5% (10/22) de los pacientes AG. De los 10 pacientes AG con SI post-vacunación, el 50% (5/10) tenía SI antes de la vacunación en comparación con sólo el 16,6% (2/12) sin SI después de la vacunación ($p = 0,38$). El % linfocitos CD8⁺ específicos de GP2 aumentó significativamente de la línea de base a los 6 meses después de la finalización de la serie primaria en el PG ($0,65 \pm 0,15$ a $1,82 \pm 0,23$, $p = 0,002$) y no cambió significativamente en el AG ($1,08 \pm 0,16$ a $1,41 \pm 0,49$, $p = 0,45$).

[0103] Debido a que este es un estudio en curso de múltiples sitios, con pacientes que participaron de forma continua, los datos de recurrencia aún no están completos. Sin embargo, los datos preliminares muestran que los pacientes PG han experimentado una reducción de aproximadamente el 50% en la tasa de recurrencia en comparación con los pacientes AG de control, similar a las tasas de recurrencia observadas a los 24 meses en los pacientes tratados con E75 + GM-CSF (Peoples GE et al., Clin Cancer Res (2008) 14 (3): 797-803). Más específicamente, en una mediana de seguimiento de 17,9 meses, la tasa de recurrencia en el PG es 7,4% (2/27) en comparación con 13% (3/23) en el AG ($p = 0,65$). Más datos de la tasa de recurrencia estarán disponibles a medida que más pacientes se sometan a un seguimiento a los 24 meses y más allá y a medida que más pacientes se inscriban en el estudio.

[0104] Todas las patentes, solicitudes de patentes, y referencias publicadas citadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad. Si bien esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a realizaciones preferidas de la misma, se entenderá por los expertos en la técnica que pueden hacerse diversos cambios en la forma y detalles en la misma sin apartarse del alcance de la invención abarcado por las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0105]

<110> THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE, INC.

<120> VACUNA PARA LA PREVENCIÓN DE LA RECURRENCIA DEL CÁNCER DE MAMA

<130> HMJ-106-PCT

<140>

<141>

<150> US 61/121,220

ES 2 639 577 T3

<151> 2008-12-10

<160> 5

5 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1225

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu
 1 5 10 15
 Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu
 20
 Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln
 35
 Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val
 50
 Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp
 65 70 75 80
 Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr
 85 90 95
 Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu
 100 105 110
 Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn
 115 120 125
 Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His
 130 135 140
 Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg
 145 150 155 160
 Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly
 165 170 175
 Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly
 180 185 190
 Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu
 195 200 205
 Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala
 210 215 220

ES 2 639 577 T3

Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 5 Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu
 245 250 255
 10 Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn
 260 265 270
 15 Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His
 275 280 285
 20 Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys
 290 295 300
 25 Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu
 305 310 315 320
 30 Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly
 325 330 335
 35 Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp
 340 345 350
 40 Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln
 355 360 365
 45 Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala
 370 375 380
 50 Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val
 385 390 400
 55 Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln
 405 410 415
 60 Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly
 420 425 430
 65 Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His
 435 440 445
 70 Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu
 450 455 460
 75 His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala
 465 470 475 480
 80 Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr
 485 490 495

ES 2 639 577 T3

Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu
 500 505 510
 5 Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg
 515 520 525
 10 His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val
 530 535 540
 15 Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr
 545 550 555 560
 20 Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro
 565 570 575
 25 Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala
 580 585 590
 30 Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp
 595 600 605
 35 Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile
 610 615 620
 40 Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val
 625 630 635 640
 45 Phe Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr
 645 650 655
 50 Met Arg Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro
 660 665 670
 55 Ser Gly Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr
 675 680 685
 60 Glu Leu Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val
 690 695 700
 65 Tyr Lys Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val
 705 710 715 720
 70 Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu
 725 730 735
 75 Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val
 740 745 750
 80 Ser Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr
 755 760 765

ES 2 639 577 T3

Gln Leu Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg
 770 775 780
 5 Gly Arg Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala
 785 790 795 800
 10 Lys Gly Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu
 805 810 815
 15 Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr
 820 825 830
 20 Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His
 835 840 845
 25 Ala Asp Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile
 850 855 860
 30 Leu Arg Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val
 865 870 875 880
 35 Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile
 885 890 895
 40 Pro Ala Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro
 900 905 910
 45 Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys
 915 920 925
 50 Trp Met Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser
 930 935 940
 55 Glu Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln
 945 950 955 960
 60 Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg
 965 970 975
 65 Ser Leu Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu
 980 985 990
 70 Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly
 995 1000 1005
 75 Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
 1010 1015 1020
 80 Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
 1025 1030 1035

ES 2 639 577 T3

Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser
 1040 1045 1050
 5 Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu
 1055 1060 1065
 10 Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser
 1070 1075 1080
 15 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
 1100 1105 1110
 20 Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro
 1115 1120 1125
 25 Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu
 1130 1135 1140
 30 Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly
 1145 1150 1155
 35 Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala
 1160 1165 1170
 Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
 1175 1180 1185
 40 Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro
 1190 1195 1200
 45 Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
 1205 1210 1215
 50 Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
 1220 1225
 <210> 2
 <211> 9
 55 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 60 Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu
 1 5
 <210> 3
 <211> 9
 65 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5

5 <210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 4
Ile Val Ser Ala Val Val Gly Ile Leu
1 5

15 <210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 5
Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu
1 5

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende un portador farmacéuticamente eficaz, un péptido GP2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, y en la que, aparte del péptido GP2, la composición no contiene ningún otro péptido derivado de HER2/*neu*, tal como un péptido E75 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, para utilizar en prevenir la recurrencia del cáncer de mama en un sujeto, en la que el sujeto es humano y está en remisión después del tratamiento con una evolución estándar de la terapia; y en la que las células cancerosas del sujeto tienen una sobreexpresión de HER2/*neu*, y en la que la sobreexpresión de HER2/*neu* es una calificación de inmunohistoquímica, "IHC", de 3+ o una calificación de hibridación fluorescente in situ, "FISH", de 2,0 o mayor para la expresión del gen HER2/*neu*.
- 10 2. Composición para utilizar, según la reivindicación 1, en la que la composición se administra mediante inyección o inoculación.
- 15 3. Composición para utilizar, según la reivindicación 2, en la que la inyección es una inyección intradérmica o en la que la composición se inyecta en una o más dosis divididas.
- 20 4. Composición para utilizar, según la reivindicación 3, en la que la composición se inyecta en una o más dosis divididas y en la que los sitios de inyección en el sujeto se localizan aproximadamente a 5 cm separados entre sí.
- 25 5. Composición para utilizar, según la reivindicación 1, en la que la composición se administra cada mes durante seis meses.
- 30 6. Composición para utilizar, según la reivindicación 1, en la que la composición se administra al sujeto conjuntamente con un refuerzo que comprende una cantidad eficaz de una composición de refuerzo de la vacuna que comprende un portador farmacéuticamente eficaz y un péptido GP2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- 35 7. Composición para utilizar, según la reivindicación 6, en la que la el refuerzo se administra cada seis o 12 meses después de completar un programa de inmunización primaria.
- 40 8. Composición para utilizar, según la reivindicación 1, en la que el ser humano expresa el antígeno leucocitario humano A2.
- 45 9. Composición para utilizar, según la reivindicación 1, en la que el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos es un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano recombinante.
- 50 10. Composición para utilizar, según la reivindicación 7, en la que la composición de refuerzo de vacuna comprende además un adyuvante.
11. Composición para utilizar, según la reivindicación 10, en la que el adyuvante es el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
12. Composición para utilizar, según la reivindicación 1, en la que la administración de la composición induce una respuesta de linfocitos T citotóxicos al péptido GP2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
13. Composición para utilizar, según la reivindicación 1, en la que el sujeto no tiene una inmunidad preexistente al péptido GP2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
14. Composición para utilizar, según la reivindicación 1, en la que la evolución estándar de terapia comprende el tratamiento con trastuzumab.
15. Composición para utilizar, según la reivindicación 1, en la que la composición se administra al sujeto simultáneamente con trastuzumab.

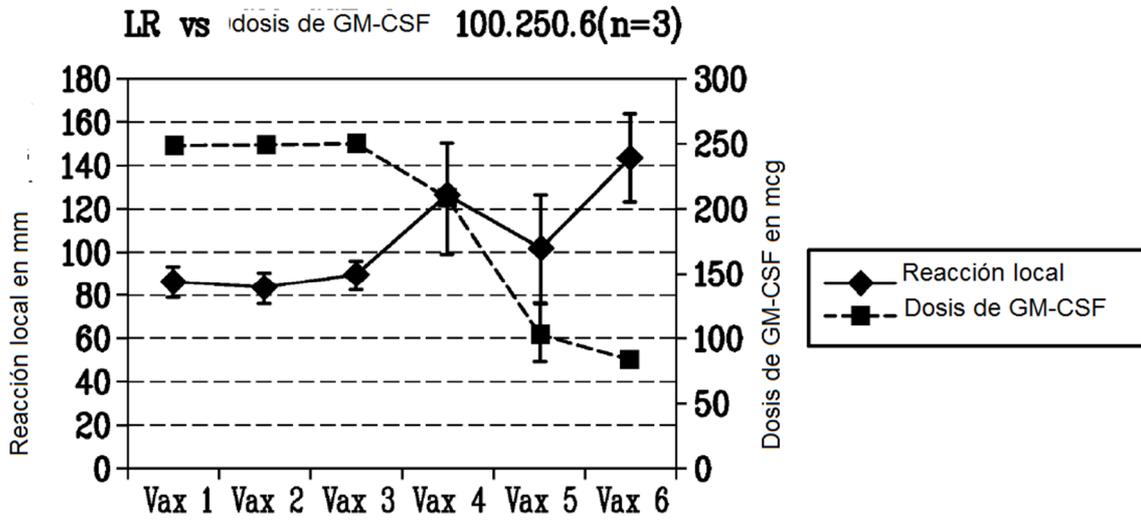


Figura 1A

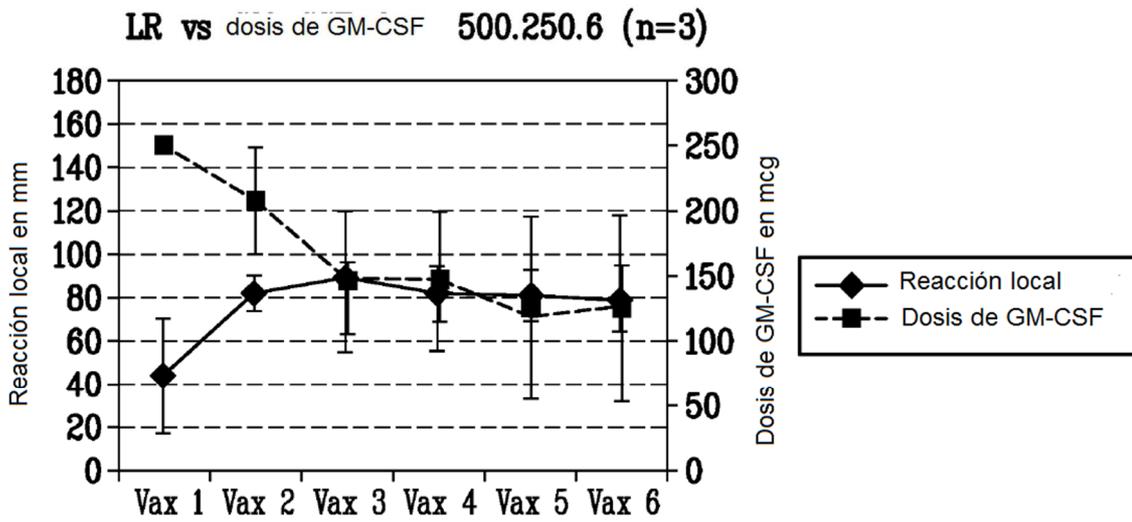


Figura 1B

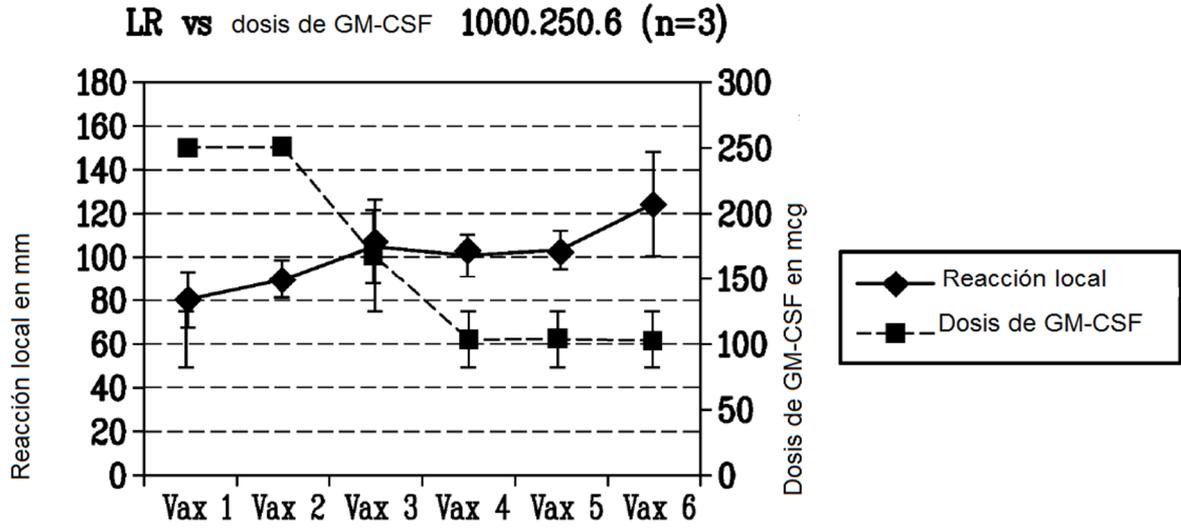


Figura 1C

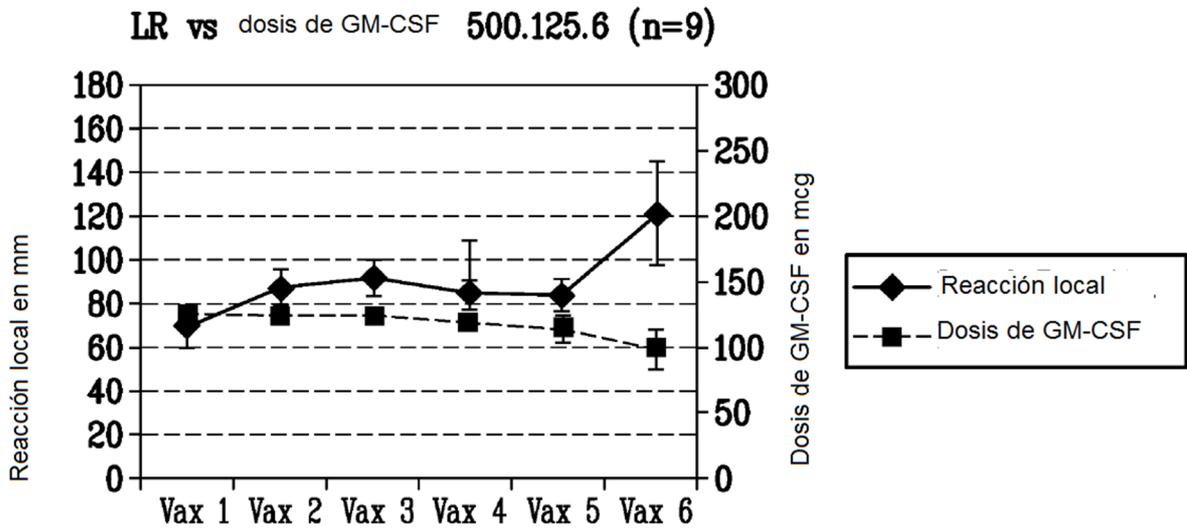


Figura 1D

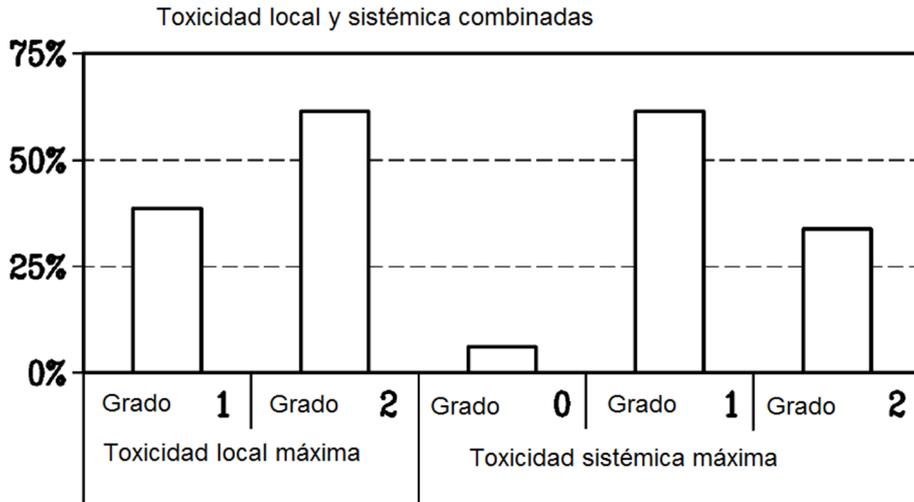


Figura 2A

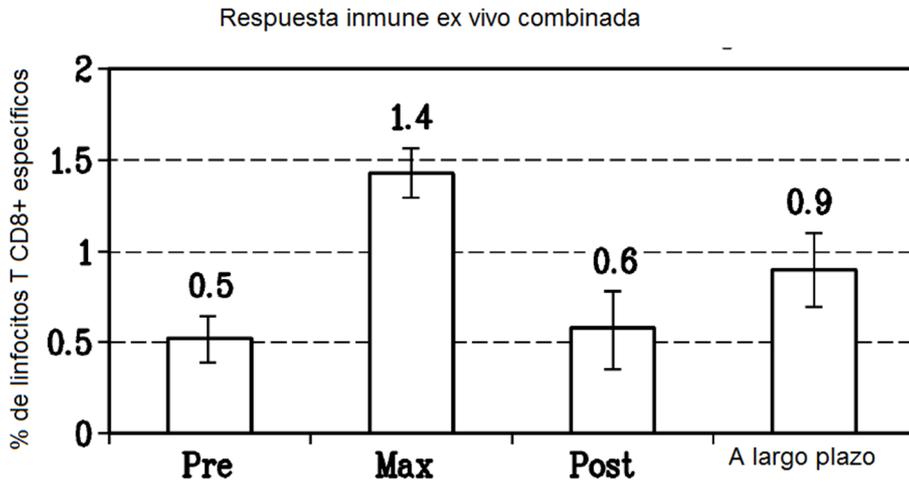


Figura 2B

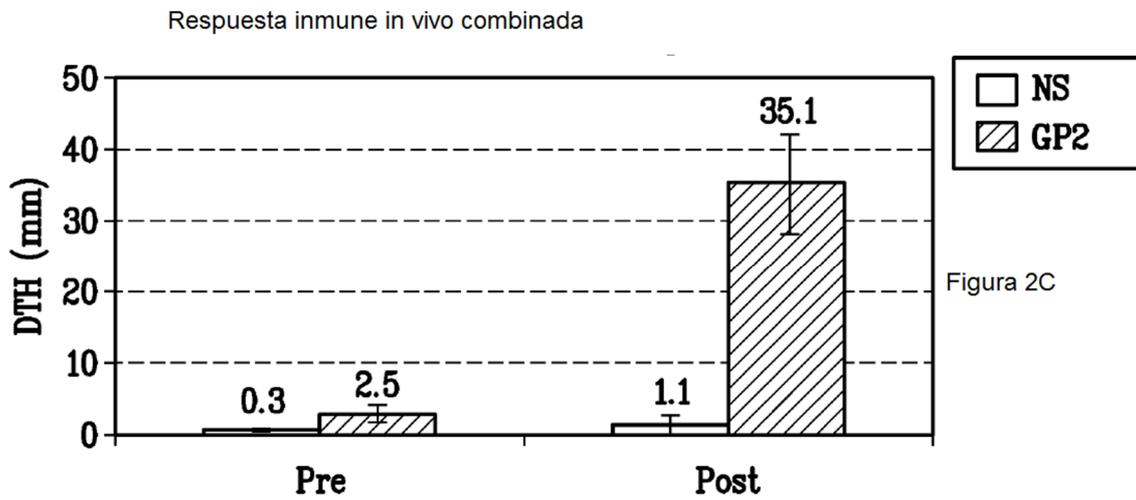


Figura 2C

Toxicidades local y sistémica con inmunidad no preexistente vs. preexistente

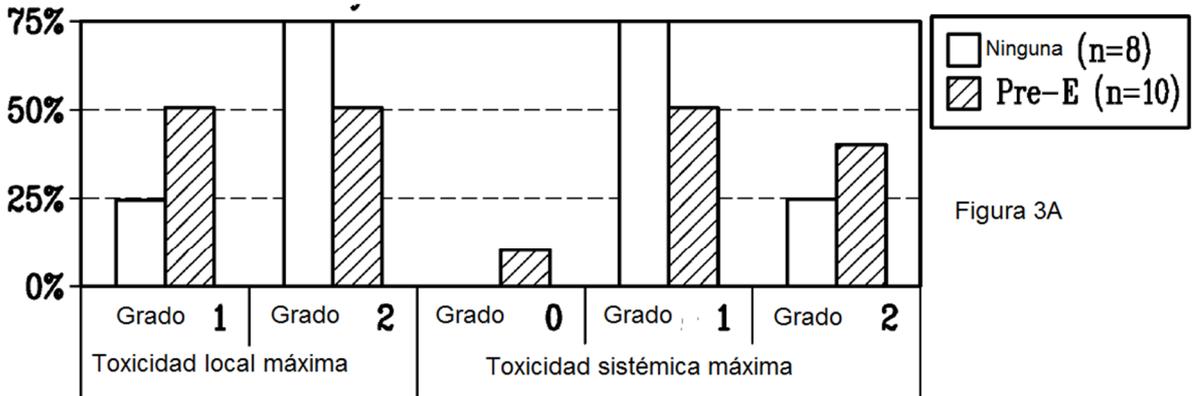


Figura 3A

Respuesta inmune ex vivo con inmunidad no preexistente vs. preexistente

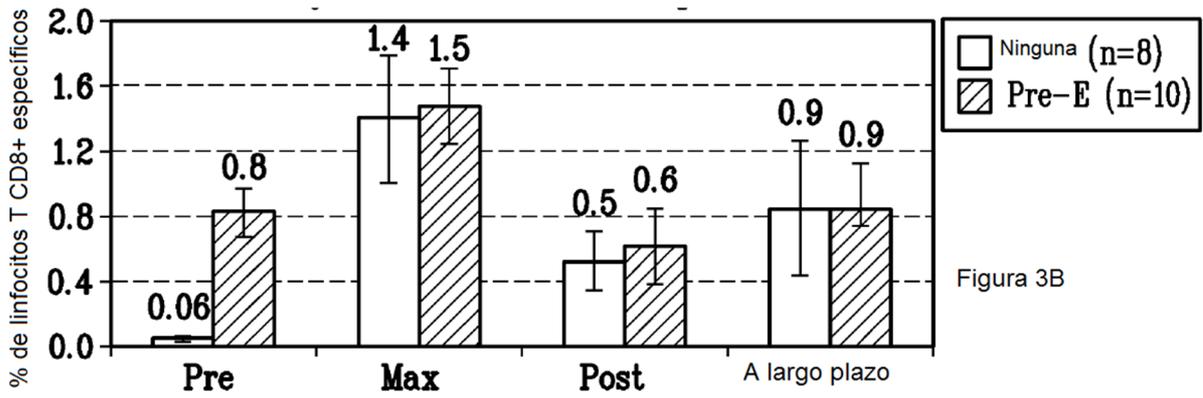


Figura 3B

Respuesta inmune in vivo con inmunidad no preexistente vs. preexistente

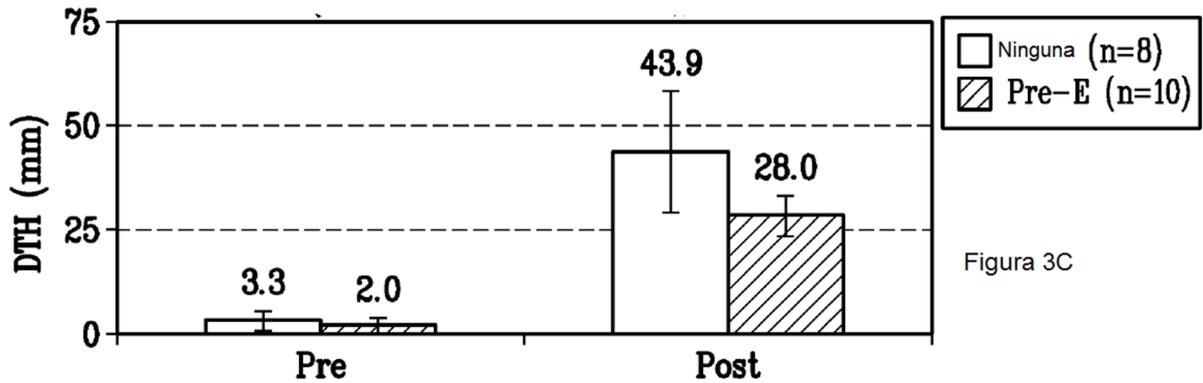


Figura 3C

Toxicidad local y sistémica con 125 mcg vs. 250 mcg de GM-CSF

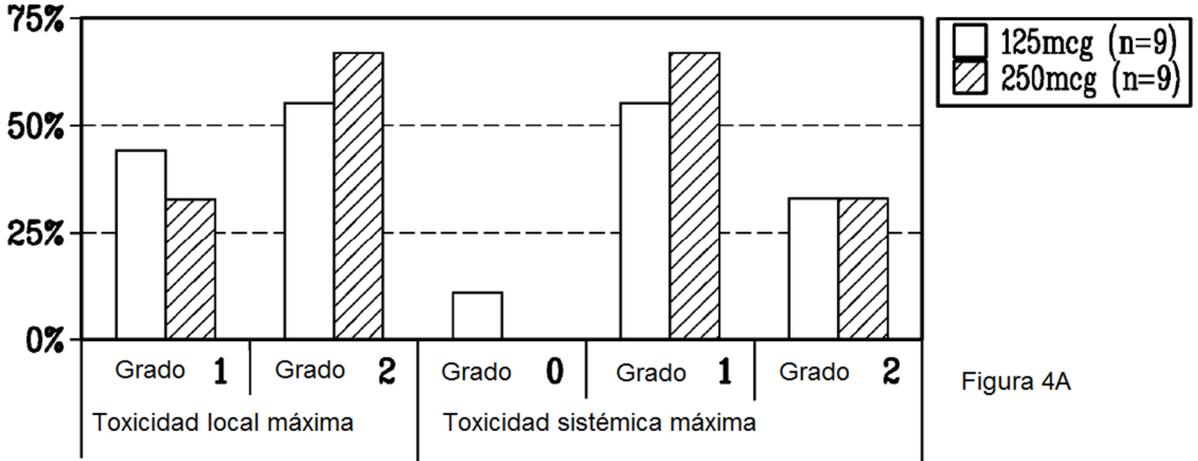


Figura 4A

Respuesta inmune ex vivo con 125 mcg vs. 250 mcg de GM-CSF

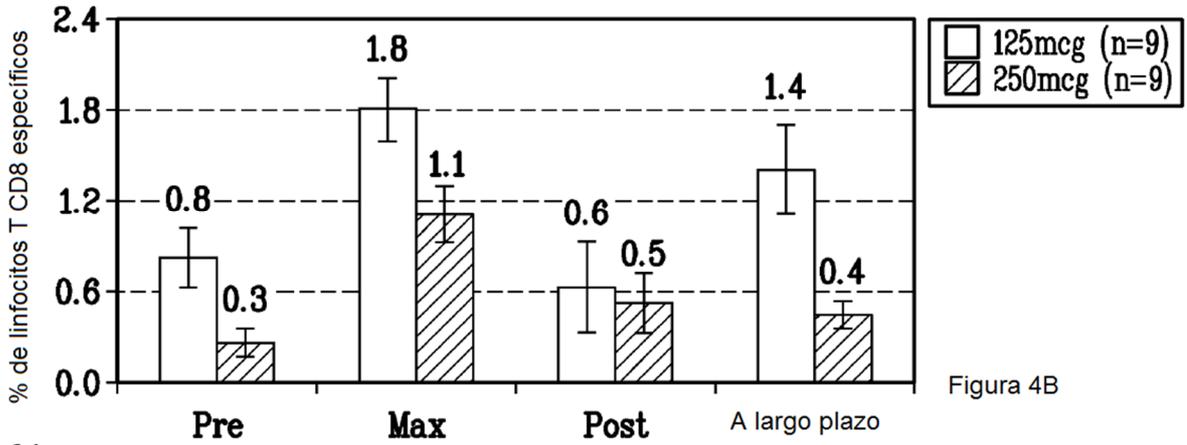


Figura 4B

Respuesta inmune in vivo con 125 mcg vs. 250 mcg de GM-CSF

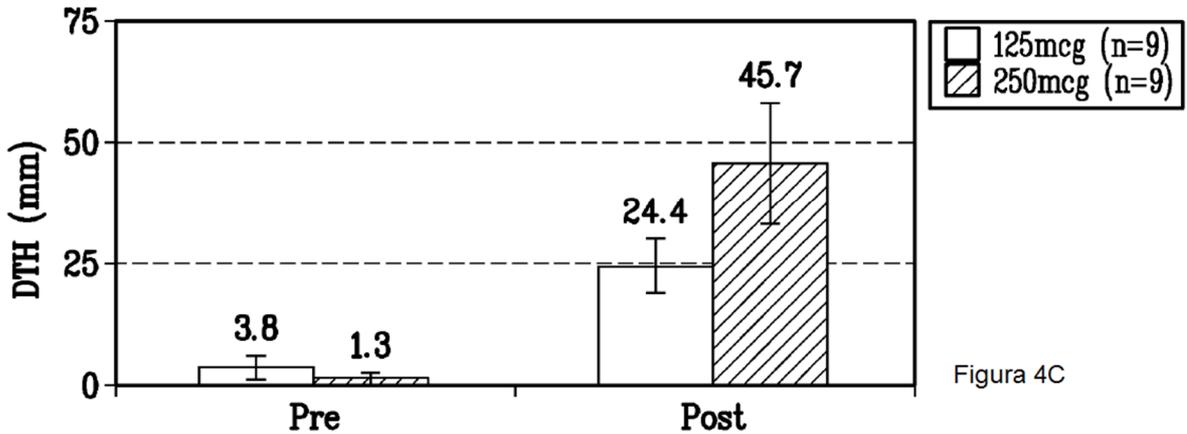


Figura 4C

Respuesta inmune ex vivo con difusión de epitopo

