



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 348 312**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06007834 .2**
96 Fecha de presentación : **13.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1844788**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.10.2007**

54 Título: **Vacuna HER-2/NEU a base de múltiples péptidos.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.12.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.12.2010

73 Titular/es: **Bio Life Science Forschungs- und
Entwicklungsges. mbH
Kohlmarkt 3
1010 Wien, AT**

72 Inventor/es: **Zielinski, Christoph;
Pehamberger, Hubert;
Schreiner, Otto;
Breiteneder, Heimo y
Wiedermann, Ursula**

74 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

ES 2 348 312 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

La presente invención se refiere a una vacuna a base de múltiples péptidos contra enfermedades cancerosas asociadas con el oncogén HER-2/neu.

El antígeno tumoral HER-2/neu, producto génico del protooncogén erbB2/neu, es una proteína de 185 kDa que pertenece a la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico. Comprende un dominio extracelular rico en cisteína (ECD) con diversos sitios de glicosilación, un dominio transmembrana hidrofóbico, y un dominio tirosina quinasa conservado intracelular. HER-2/neu se detecta débilmente en células epiteliales de tejidos normales pero se sobreexpresa en el 20 hasta el 30 % de cánceres primarios de mama, ovario, colon, pulmón y próstata, y se ha asociado con un mal pronóstico y un alto riesgo de recidiva del cáncer. La sobreexpresión parece ser estable y homogénea en tumores primarios, así como sus metástasis. Por lo tanto, HER-2/neu es una diana atractiva de la inmunoterapia del cáncer.

La inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales es un tratamiento contra enfermedades cancerosas que se lleva a cabo de forma rutinaria. Por lo tanto, la inducción de respuestas de anticuerpos antitumorales humorales mediante inmunización con péptidos activos se ha convertido en un concepto de tratamiento favorable. Actualmente, la terapia con Trastuzumab, también conocido como Herceptin®, un anticuerpo monoclonal (mAb) específico de Her-2/neu, es estándar para el tratamiento de cánceres de mama avanzados que sobreexpresan la oncoproteína Her-2/neu. La eficacia terapéutica de este mAb sugiere que dirigir anticuerpos hacia tumores diana tiene una actividad preventiva significativa. Sin embargo, la utilidad de la inmunoterapia pasiva está limitada por la distribución de tejido inadecuada y la necesidad de infusiones múltiples con costes asociados elevados.

Actualmente, existen diversas estrategias de vacuna dirigidas a HER-2/neu. Una estrategia de vacuna de este tipo requiere el desarrollo de un método para superar la tolerancia inmune a la propia proteína HER-2/neu.

El documento EP1236740 se refiere a una vacuna que comprende dos péptidos con una longitud de 13 y 16 aminoácidos y una secuencia, que se encuentran en el dominio extracelular de la proteína HER-2/neu. Los péptidos utilizados permiten una inmunización activa contra enfermedades cancerosas asociadas con el

oncogén HER-2/neu, pero inducen una inhibición menor del crecimiento de tumores que el Trastuzumab.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es dar a conocer una vacuna contra una enfermedad cancerosa que tiene asociada una sobreexpresión de la proteína HER-2/neu, que induce una fuerte inmunidad para establecer una memoria inmune y de este modo evitar los inconvenientes de los tratamientos contra el cáncer convencionales y ofrecer una alternativa convincente a otros métodos de vacunación conocidos. Un objetivo adicional de la presente invención es dar a conocer una vacuna, que se puede administrar al paciente por vía oral y nasal (mucosal) sin perder su fuerte propiedad inmunogénica.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que el objetivo anterior se puede conseguir si la vacuna es una vacuna a base de múltiples péptidos - múltiples epítomos - contra enfermedades cancerosas asociadas con el oncogén HER-2/neu, es decir, la vacuna comprende una combinación específica de péptidos que presentan diferentes secuencias de aminoácidos que se encuentran en el dominio extracelular de la proteína HER-2/neu.

Además, se ha encontrado que, a efectos de mejorar la respuesta inmune, la vacuna debería comprender opcionalmente un adyuvante de estimulación inmune o sistema de liberación, en el caso de que la vacuna se tuviera que administrar por vía oral o nasal sin perder su fuerte propiedad inmunogénica, la vacuna comprende opcionalmente un adyuvante mucosal o un sistema de liberación de antígeno mucosal que se utiliza como transportador mucosal.

Por lo tanto, la presente invención da a conocer una vacuna contra enfermedades cancerosas asociadas con el oncogén HER-2/neu, en la que dicha vacuna comprende una mezcla, como mínimo, de tres péptidos diferentes que tienen una longitud de 9 a 30 aminoácidos y cada secuencia se encuentra en el dominio extracelular de la proteína HER-2/neu, en la que, como mínimo, uno de los tres péptidos tiene la secuencia 378 a 394 del dominio extracelular de la proteína HER-2/neu, como mínimo, otro tiene la secuencia 545 a 560 del dominio extracelular de la proteína HER-2/neu y, como mínimo, el otro péptido tiene la secuencia de 610 a 623 del dominio extracelular de la proteína HER-2/neu, y en la que cada uno de los péptidos está conjugado a un transportador.

La vacuna de la presente invención induce una inmunidad fuerte y establece una memoria inmune contra enfermedades cancerosas asociadas con el oncogén HER-2/neu. De este modo, la vacuna aporta profilaxis contra estas enfermedades cancerosas. Adicionalmente, la vacuna de la presente invención se puede utilizar para tratar una enfermedad cancerosa que ya existe o para acompañar tratamientos contra el cáncer convencionales. La aplicación de la vacuna de la presente invención puede evitar completa o parcialmente los inconvenientes considerables descritos anteriormente de las inmunoterapias contra el cáncer convencionales/pasivas.

En particular, el péptido que tiene la secuencia de 378 a 394 del dominio extracelular de la proteína HER-2/neu es ID SEQ 1: PESFDGDPASNTAPLQP.

El péptido que tiene la secuencia de 545 a 560 del dominio extracelular de la proteína HER-2/neu es ID SEQ 2: RVLQGLPREYVNARHC.

El péptido que tiene la secuencia de 610 a 623 del dominio extracelular de la proteína HER-2/neu es ID SEQ 3: YMPIWKFPDEEGAC.

Los péptidos de la presente invención también se pueden unir a otros péptidos o polipéptidos o a otros grupos químicos, tales como grupos glicosilo, lípidos, fosfatos, grupos acetilo, o similares, tales como, por ejemplo, poliglicol, polietilenglicol, ácido poli-láctico (PLA), ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA), dendrímeros de lisina. Estas sustancias no tienen una influencia negativa sobre la actividad biológica de los péptidos.

Es preferente que el péptido ID SEQ 1 se una adicionalmente a cualquier enlazador conocido en la técnica, pero preferentemente a un enlazador de glicina y/o a un residuo de cisteína C-terminal, más preferentemente al enlazador GGGGGC.

Por lo tanto, la vacuna preferente de la presente invención comprende una mezcla del péptido ID SEQ 1 unido a un enlazador de glicina y/o a un residuo de cisteína C-terminal, en particular al enlazador GGGGGC, y el péptido ID SEQ 2, así como el péptido ID SEQ 3.

Además, es preferente que cada uno de los péptidos de la presente invención esté conjugado a un transportador, en particular para la inmunización sistémica.

Los péptidos utilizados se pueden conjugar mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante ingeniería genética o por medios químicos, los cuales incluyen la unión de un transportador y un grupo funcional por reacción química. Mediante ingeniería genética, la conjugación del transportador, que puede ser una molécula proteica, al péptido se puede realizar insertando una secuencia de ADN o ARN que codifica la secuencia total del conjugado en el sistema de expresión que expresa el conjugado total.

De forma adicional, los péptidos se pueden unir al transportador por medio de otro enlazador. De este modo, el enlazador actúa como espaciador que confiere flexibilidad, o en caso de que se desee, rigidez al péptido conjugado. La naturaleza química del espaciador puede variar, dependiendo de la reactividad de los grupos funcionales del transportador y del péptido, respectivamente, y dependiendo de la necesidad con respecto a flexibilidad o rigidez. Como ejemplo, se pueden mencionar secuencias espaciadoras, tales como los residuos de cisteína en el extremo C-terminal o glicina, tal como (G)_x.

Cada uno de los péptidos de la presente invención se puede conjugar al transportador de forma simple o múltiple, en diferentes combinaciones como monooligómeros, dioligómeros o trioligómeros. Dichas conjugaciones se describen, por ejemplo, en la publicación de Th. H. Turpen, S.J. Reinl, Y. Charoenvit, S.L. Hoffmann, V. Fallarme en *Bio/Technology*, 1995, Vol. 13, páginas 53 a 57, mediante ejemplos de la conjugación de epítomos a transportadores macromoleculares, o de Wagner y otros, 2005 *J. Immunol.* 174:976-982.

Es preferente que el propio transportador tenga un efecto inmune, lo que significa que el propio transportador es inmunogénico.

El transportador se selecciona del grupo que comprende péptidos inmunogénicos, secuencias de proteína de estimulación inmune, tales como islas GPC, hemocianina de lapa (KLH), toxoide tetánico (TT), subunidad B de la toxina del cólera (CTB), bacterias o fantasmas bacterianos, liposomas, quitosomas, virosomas, microsferas, células dendríticas, o similares.

En una realización preferente, cada péptido de la presente invención se conjuga preferentemente con KLH, TT o CTB como transportador mediante una reacción química.

En otra realización preferente, cada péptido de la presente invención se conjuga preferentemente con un virosoma o con bacterias ácido lácticas probióticas (LAB) o fantasmas bacterianos como transportadores.

Los virosomas se basan en liposomas y contienen proteínas virales embebidas en sus membranas. Estas proteínas permiten que las membranas del virosoma se fusionen con células del sistema inmune y, de este modo, liberen su contenido, la vacuna, antígenos específicos, en este caso los péptidos de la presente invención, directamente a sus dianas. Una vez los virosomas han liberado los antígenos, los virosomas se degradan completamente dentro de las células. El origen de los virosomas puede ser un virus de la gripe.

Además, es preferente que la vacuna comprenda un adyuvante. Los adyuvantes son sustancias biológicas que aumentan las respuestas inmunes humorales y/o celulares cuando se suministran con un antígeno de vacuna, en este caso con los péptidos de la presente invención. En la presente invención es preferente que el adyuvante se utilice para una inmunización sistémica.

Los adyuvantes se seleccionan del grupo que comprende, por ejemplo, interleuquinas, toxinas bacterianas, paredes celulares bacterianas o partículas de las mismas, partículas de lípidos, hidróxido de aluminio, derivado del escualeno, monofosforil lípido A, o similares.

Además, es preferente que la vacuna se pueda administrar por vía oral o nasal. Sin embargo, la mayor parte de los antígenos de proteína y/o péptido que incluyen los antígenos de vacuna purificados son muy poco inmunogénicos cuando se administran por vía oral y nasal. De este modo, es fundamental la coadministración de adyuvantes mucosales para inducir respuestas inmunes eficaces.

La ventaja de una vacuna mucosal se basa en una mayor conformidad del paciente con la vacunación y una eficacia potencialmente superior debido a la inducción de respuestas inmunes tanto sistémicas como mucosales, siendo ésta también importante, por ejemplo, para tumores situados en las mucosas.

Los adyuvantes mucosales se podrían seleccionar del grupo que comprende toxina zonula occuldens, toxina termolábil (LT) producida por E.coli enterotoxigénica, toxina colérica de Vibrio

cholerae (CTB) o de origen no bacteriano, por ejemplo, liposomas, o similares.

Un adyuvante mucosal preferente es la subunidad B de la toxina del cólera, bacterias ácido lácticas, fantasmas bacterianos o mutantes de los mismos.

En la presente invención también es preferente que cada uno de los péptidos de la presente invención se conjugue con el adyuvante mucosal, es decir, cada uno de los péptidos de la presente invención se acopla al adyuvante mucosal, por ejemplo, mediante una reacción química y no sólo se mezcla con el adyuvante mucosal. De este modo, el adyuvante mucosal actúa como transportador de los péptidos.

En otra realización preferente de la presente invención se utilizan bacterias ácido lácticas probióticas (LAB) como transportadores mucosales, en particular, como sistemas de liberación de antígeno mucosales. Se sabe que algunas bacterias ácido lácticas (LAB) tienen propiedades promotoras de Th1 y se han utilizado, por lo tanto, para la vacunación contra las enfermedades alérgicas de Th-2 parcial (Repa y otros Vaccine 2002; Daniel y otros 2006, Allergy).

En la presente invención se muestra que IL-12, que promueve respuestas de Th1, aumenta la actividad antitumoral de la vacuna a base de múltiples péptidos. Por lo tanto, es preferente aplicar una bacteria ácido láctica determinada, que induce la inducción de IL-12 y respuestas de Th-1, junto con la vacuna a base de polipéptidos de la presente invención. Es de particular interés utilizar estas bacterias como sistema de expresión para la producción de los péptidos y también utilizarlas como sistema de liberación mucosal. Por lo tanto, se puede crear una vacuna de tumor oral/ mucosal.

En particular, en la presente invención se utilizan preferentemente cepas de *Lactobacillus plantarum* o *Lactococcus lactis* como transportadores mucosales.

La producción de dichos transportadores mucosales y la producción de vacunas que incluyen dichos transportadores se describen, por ejemplo, en Repa y otros, Vaccine, 2003, 22, páginas 87 a 95 o en Daniel y otros, Allergy, 2006.

Además, es preferente que se añada un adyuvante inmunogénico adicional a la vacuna de la presente invención, más

preferentemente interleuquina 12 (IL-12) o un agonista de IL-12 o una sustancia que estimula la producción de IL-12.

Además, la vacuna de la presente invención puede comprender adicionalmente aditivos que se utilizan en general en dicha aplicación como estabilizantes, antidegradantes, etc.

La vacuna de la presente invención se puede producir de diversas formas mediante ingeniería genética o por medios químicos, por ejemplo, un método de síntesis en fase sólida. Dichos métodos se describen, por ejemplo, en el documento US 5.869.445.

Un ejemplo de un método de producción de ingeniería genética es la manipulación de organismos, tales como E. coli o las bacterias ácido lácticas mencionadas anteriormente. Éstas se manipulan de modo que expresen los péptidos como tales o los conjugados totales que comprenden el péptido y el transportador acoplado al mismo.

La vacuna de la presente invención también se puede aplicar de diferentes formas. La vacuna se puede administrar, por ejemplo, por vía intramuscular, subcutánea, oral, intranasal o generalmente mucosal, si la vacuna se encuentra en forma de cápsula o pastilla o dispersada en comida, tal como yogur, si se utilizan las bacterias ácido lácticas como transportadores de vacuna, o un sistema de liberación específica. Si la vacuna contiene variantes de ácidos nucleicos funcionales de los péptidos también se puede administrar mediante un procedimiento ex-vivo, que incluye la eliminación de células de un organismo, la inserción de la vacuna de la presente invención en estas células y la colocación de las células tratadas otra vez en el organismo.

La vacuna de la presente invención con o sin coadministración de IL-12 se puede administrar al paciente según cualquier programa de tratamiento.

Sin embargo, un tratamiento repetido con IL-12 en un solo intervalo de tres semanas no mostró ningún efecto beneficioso o perjudicial, tal como se ha dado a conocer para un tratamiento en un intervalo de una semana (Boggio y otros, J. Exp. Med 1998; 188: 589-96). Por lo tanto, es preferente que se administren al paciente tres péptidos de la presente invención 4 veces en intervalos de 14 a 21 días y además que un día después de la administración de los tres péptidos se prosiga con la coaplicación de IL-12 o un agonista de IL-12 o una formulación que induzca la producción de IL-12 en un tratamiento de cinco días, en los que en los primeros dos días se

administra IL-12 en una concentración inferior a la de los últimos tres días. Es preferente que la primera concentración de IL-12 sea la mitad que la segunda.

La vacuna de la presente invención se puede utilizar para el tratamiento profiláctico o agudo de mamíferos que pueden desarrollar tipos de cáncer asociado al oncogén HER-2/neu o en combinación con otras quimioterapias o para la prevención de la metástasis que prosigue la intervención quirúrgica.

Figura 1: Diseño experimental: se inmunizaron repetidamente ratones MMTV-c-neu (es decir, ratones transgénicos Her-2/neu, que desarrollan de forma espontánea cáncer de mama) con A) los conjugados de péptido HER-2/neu (15 µg cada uno) o solamente TT, B) la coadministración con IL-12 o C) con IL-12 solamente, en intervalos mensuales hasta el sacrificio. En un experimento separado se inmunizaron ratones BALB/c tal como se ha descrito para los ratones MMTV-c-neu y se sacrificaron 10 días después de la cuarta inmunización.

Figura 2: Efectos inmunoprotectores de la vacunación específica de HER-2/neu sobre la formación de tumores y la progresión de tumores en ratones transgénicos MMTV-c-neu.

Panel superior: Se analizó el tiempo de desarrollo de un tumor mediante el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. Se vacunaron ratones (n = 8) con péptidos HER-2/neu conjugados a TT (○), péptidos HER-2/neu conjugados a TT y coaplicación de IL-12 (◆), TT solo (■), IL-12 sola (n=5, ○) según el diseño experimental que se muestra en la figura 1. El grupo de control (•) permaneció sin tratar. Panel inferior: Progresión del tumor expresada en semanas hasta que el volumen cumulativo del tumor alcanzó 1000 mm³/ratón. *p<0,05.

Figura 3: Se incubaron lisados de células SK-BR-3 con sueros de ratones inmunizados con adyuvante y TT como grupo de control (carril C), con un Ab monoclonal murino anti HER-2/neu humana como control positivo (carril mAb), con sueros de ratones inmunizados con péptidos conjugados P1 - P3, P5 e ID SEQ 1 a 3 (carriles 1-7, el carril 4 se refiere a ID SEQ 1, el carril 6 se refiere a ID SEQ 2 y el carril 7 a ID SEQ 3) o una combinación de P1+P2 (carril 1+2), P3+P5 (carril 3+5), e ID SEQ 2 + ID SEQ 3 (carril 6+7). Se detectó la Her-

2/neu precipitada mediante Ab de conejo anti HER-2/neu humana y Ab de cerdo anti conejo conjugado a AP.

Figura 4: Anticuerpos específicos de Her-2/neu medidos por ELISA. Suero de péptidos = sueros de ratones inmunizados con conjugado péptido/tétanos; suero de control = sueros de ratones inmunizados con toxoide tetánico.

Figura 5: Inmunización de los ratones con el conjugado de péptido de ID SEQ 1 y CTB (P4 se refiere a ID SEQ 1) o una mezcla de ID SEQ 1 y CTB (figura 5a); la dilución del suero fue para IgG1 1:10.000, para IgG2a e IgG2b 1:2.000 (figura 5 b); IgA en lavados broncoalveolares (1:1) (figura 5c).

Figura 6: Inhibición de células SK-BR-3 con IgG anti ID SEQ 2 y 3 (denominadas P6 y P7) y anti ID SEQ 1 (denominada P4) y anti TT con una concentración de 150 µg/ml, Trastuzumab (Herceptin) con una concentración de 50 µg/ml.

Figura 7: Inhibición de células SK-BR-3 con IgG anti ID SEQ 1 y 2 y 3 (denominadas P4, P6 y P7) y anti TT con una concentración de 75 µg/ml Trastuzumab (Herceptin) con una concentración de 50 µg/ml.

Figura 8: Ensayo de proliferación de [3H]-timidina que demuestra el efecto de inhibición de una forma dependiente de la dosis de la IgG de conejo sobre el crecimiento de células SK-BR-3. Los datos se expresan en porcentaje de inhibición; los valores cpm de los pocillos sin tratar se consideraron el 100%.

Figura 9: Producción de citoquinas por células esplénicas después de la estimulación in vitro con TT. Se inmunizaron ratones BALB/c (n=5 por grupo) con péptidos conjugados a TT con o sin la coadministración sistémica de IL-12 o con TT solo. Se cultivaron esplenocitos con TT y se calcularon las concentraciones de citoquina en los sobrenadantes mediante ELISA. A: niveles de IFN-γ; B: niveles de IL-4; C: proporción IFN-γ /IL-4. El asterisco indica p<0,05 (Prueba Turkey-Kramer).

Método y ejemplos

Ratones

Los ratones transgénicos FVB/N hembras utilizados para el oncogén *c-neu* de rata activado (MMTV-*c-neu*, 5-9 semanas de vida) y los ratones BALB/c (8 semanas de vida) se compraron a Charles

River (Sulzfeld, Alemania). La sobreexpresión del oncogén c-neu se llevó a cabo mediante un promotor de virus de tumor mamario de ratón (MMTV) y estos ratones transgénicos para el oncogén c-neu de rata activado desarrollan de forma espontánea tumores mamarios a la edad de ~30 semanas de vida. Las glándulas mamarias se inspeccionaron semanalmente para observar la aparición y progresión de los tumores.

Tumores

Los tumores se midieron con un calibre y se calculó el volumen según: $x^2 \times y/2$, en la que x e y representan las dimensiones corta y larga del tumor. El volumen tumoral total por ratón se calculó añadiendo todos los volúmenes de tumores. Las masas de crecimiento progresivo de $>3\text{mm} \times 3\text{mm}$ se consideraron tumores. Los ratones se sacrificaron por motivos éticos en el momento en el que se superó el volumen tumoral total de 2.000 mm^3 . Los tumores se extirparon y se almacenaron a -80°C .

Todos los experimentos fueron autorizados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Medicina de Viena y el Ministerio de Educación, Ciencia y Cultura de Austria.

Antígenos

Se realizó un barrido de la secuencia de proteína del dominio extracelular (ECD) de HER-2/neu humana mediante predicción asistida por ordenador para buscar epítomos inmunogénicos en base a la hidrofiliidad, accesibilidad, flexibilidad, distribución de las cargas o propensiones hacia estructura secundaria. A continuación se sintetizaron siete péptidos, de 14 a 21 aminoácidos de longitud, con un residuo de cisteína C-terminal adicional, química de N-alfa-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) de PiChem (Austria).

Tabla 1: Péptidos ensayados

<i>Péptido</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Aminoácidos</i>
P1	115-132	AVLDNGDPLNNTTPVTGA
P2	149-162	LKGGVLIQRNPQLC
P3	274-295	YNTDTFESMPNPEGRYTFGAS
ID SEQ 1	378-394	PESFDGDPASNTAPLQP
P5	489-504	PHQALLHTANRPEDE
ID SEQ 2	545-560	RVLQGLPREYVNRHC
ID SEQ 3	610-623	YMPIWKFPDEEGAC

Además, para los experimentos se sintetizó el péptido ID SEQ 1 (PESFDGDPASNTAPLQP) con un enlazador de glicina adicional

y un residuo de cisteína C-terminal, en particular con el enlazador GGGGGC.

Conjugación de péptidos

Los péptidos se acoplaron a las proteínas transportadoras toxoide tetánico (TT) o hemocianina de lapa (KLH) o a la subunidad B de la toxina del cólera (tal como la que se incluye en la vacuna del cólera Dukoral®) utilizando el reactivo entrecruzador heterobifuncional m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS) [Pierce, Rockford, IL]. Los transportadores en la vacuna mucosal están acoplados a los péptidos según Wagner S y otros 2005; J. Immunol 174:976-982. Los grupos amino de las proteínas transportadoras se activaron en primer lugar mediante la adición de un exceso molar de 25 veces de MBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el exceso de MBS mediante una columna de desalinización (columna PD-10 de Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK). En una segunda etapa se añadieron los péptidos en una proporción molar de 40:1 péptido respecto a proteína transportadora. Se produjo entrecruzamiento en los residuos de cisteína de los péptidos a las 3 horas a temperatura ambiente. Los péptidos no enlazados se eliminaron mediante diálisis contra PBS.

Vacunación

1. Se inmunizaron ratones Balb/c (n=5/grupo) con tres péptidos de la presente invención. Estos péptidos se inyectaron individualmente (25 µg/ratón) o en una combinación de tres péptidos (30 µg /ratón). Previamente a la inyección los conjugados de péptidos se mezclaron con adyuvante de Gerbu (Gerbu Technik, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se administraron por vía subcutánea en un volumen de 100 µl. El grupo de control recibió los transportadores y adyuvantes utilizados solos. Las inmunizaciones se llevaron a cabo 4 veces en intervalos de 21 días. Siete días después de la última inmunización los animales se sacrificaron. Se tomaron muestras de sangre de los ratones mediante el sangrado de la cola antes de la inmunización y siete días después de la última inmunización.
2. Se inmunizaron ratones BALB/c (n=5/grupo) y ratones MMTV-c-neu transgénicos (n=8/grupo) con la combinación de los tres péptidos de la presente invención acoplados a toxoide tetánico (conjugados TT) utilizando 15 µg de cada conjugado

de péptido. Los grupos de control recibieron TT o IL-12 solos o se dejaron sin inmunizar. Previamente a la inyección, los antígenos se mezclaron con adyuvante de Gerbu (Gerbu Technik, Gaiberg, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se administraron por vía subcutánea en un volumen de 100 μ l. A un ratón recombinante se le administró IL-12 (Strathmann Biotec, Hamburg, Alemania), reconstituida en PBS que contenía el 0,01% albúmina de suero de ratón (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), por vía intraperitoneal en un volumen de 100 μ l. Durante los primeros dos tratamientos de cinco días se dieron un total de 50 ng de inyecciones de IL-12, seguidos de 100 ng de inyecciones de IL-12 en las inmunizaciones posteriores. Las inmunizaciones y los tratamientos con IL-12 se llevaron a cabo de acuerdo con el programa que se muestra en la figura 1. Las muestras de sangre se recogieron mediante el sangrado de la cola previamente a la inmunización y durante el sacrificio. Los ratones BALB/c se sacrificaron diez días después de la cuarta inmunización. Los ratones MMTV-*c-neu* se inmunizaron repetidamente en intervalos de un mes hasta el sacrificio.

3. Se inmunizaron conejos con la vacuna a base de múltiples péptidos o toxoide tetánico y posteriormente se recogió sangre mediante punción de una vena de la oreja previamente a la inmunización y después de la misma. Se llevaron a cabo inmunizaciones con la mezcla de los péptidos en conejos en los laboratorios de Charles River (Kissleg, Alemania). Según el programa que se llevó a cabo en los ratones las inmunizaciones se realizaron 4 veces en intervalos de 14-21 días. Las muestras de sangre se utilizaron para los ensayos *in vitro*.

Se extirparon los bazo, corazones, hígados, riñones y pulmones de los ratones para su análisis histopatológico.

Vacunación y desarrollo de los tumores

Se investigó la capacidad de la vacuna de la presente invención y el efecto de la coaplicación de IL-12 para retrasar el desarrollo de tumores espontáneo y la progresión de los tumores en ratones transgénicos MMTV-*c-neu* FVB/N que expresaban una forma activada de *c-neu* de rata que daba como resultado un desarrollo de tumores rápido. El programa de la inmunización se empezó con ratones de 6-10 semanas de vida según el diseño experimental que se

muestra en la figura 1 con péptidos Her-2/neu acoplados combinados con el tratamiento sistémico con IL-12 o sin el mismo. Los ratones se inmunizaron mensualmente hasta el sacrificio. Se monitorizaron las glándulas mamarias semanalmente para controlar el número y tamaño de los tumores.

Los primeros tumores se observaron en los ratones no tratados y de control que recibieron IL-12 sola a la edad de 22-26 semanas. A las ocho semanas (30-34 semanas de edad) todos los ratones de estos grupos desarrollaron tumores mientras que se observó un retraso significativo ($p < 0,05$) en la aparición de tumores en los grupos vacunados (figura 2A): en el 37,5% (3/8) de los ratones inmunizados con péptidos y en el 57,1% (4/7) de los ratones inmunizados con el péptido + IL-12 el intervalo sin tumores se prolongó hasta 56 días. Por el contrario, en el grupo que recibió la proteína transportadora TT sola solamente un ratón permaneció sin tumores durante este periodo de tiempo.

La monitorización de los volúmenes de los tumores reveló una progresión de los tumores rápida en controles no inmunizados. Por el contrario, los grupos vacunados con péptidos se caracterizaron por una progresión más lenta de tumores aparecidos en una etapa anterior. Tal como se indica en la figura 2B, los controles no inmunizados alcanzaron un volumen total de tumor de 1.000 mm^3 a las 21,5 semanas después de la primera inmunización. Este periodo se superó para los ratones inmunizados con péptidos hasta 6,5 semanas (27 semanas después de la primera inmunización; $p = 0,08$). En ratones tratados con la vacuna de péptidos coadministrada con IL-12 el periodo de tiempo hasta un volumen de tumor de 1.000 mm^3 se prolongó de forma significativa ($p < 0,05$) hasta 8,5 semanas (29 semanas después de la primera inmunización) en comparación con los ratones de control. No se observó una reducción significativa en la progresión de tumores en el grupo de ratones que recibieron IL-12 o TT solos, alcanzando los volúmenes de tumor de 1.000 mm^3 a las 23 o 25 semanas después de la primera inmunización, respectivamente.

Líneas celulares

Se compraron las líneas celulares de cáncer de mama humanas SK-BR-3 (HTB 30) y HTB 132 a ATCC (Manassas, Virginia, USA). Las líneas celulares de melanoma humanas 518.A2 fueron suministradas gentilmente por B. Jansen (Departamento de Dermatología, Universidad de Viena, Austria). La línea celular

murina de tumor mamario Tg1-1 fue suministrada gentilmente por T.J. Kipps (División de Hematología/Oncología, Universidad de California, Escuela de medicina de San Diego School, CA). Las células se cultivaron en un medio que contenía el 10% de suero bovino fetal (PAA Laboratories, Linz, Austria), 50 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin (GIBCO, Life Technologies LTD, Paisley, Escocia, UK) en una atmósfera humidificada que contenía el 5% de CO₂. Las células SK-BR-3 se mantuvieron en medio McCoy 5A, las células 518.A2 y Tg1-1 en medio DMEM. Las células HTB 132 se mantuvieron en medio Leibovitz L-15 y condiciones exentas de CO₂. Todos los medios se compraron a GIBCO, Life Technologies LTD, Paisley, Escocia, UK.

Preparación de lisados de células

Se utilizó la línea celular humana de cáncer de mama SK-BR-3 como fuente de proteína Her-2/neu. Para la lisis de las células se utilizó solución salina tamponada con Tris (TBS, pH 7,4) que contenía el 1% de Triton X-100 y cóctel inhibidor de la proteasa 1 x EDTA completo libre ("1 x Complete EDTA free protease inhibitor mix") (Roche, Mannheim, Alemania). Se suspendieron aproximadamente 30 x 10⁶ células SK-BR-3 en un ml de tampón de lisis, se agitó intensamente en vórtex y se incubaron sobre hielo durante 15 minutos. Después de la ruptura, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 800 g a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se eliminaron de los restos celulares y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Antes de su utilización los lisados de células se diluyeron 1:3 con TBS 0,1 M pH 7,4 y se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm.

Inmunoprecipitación

Se incubaron alícuotas de lisado de células que contenían 3,5 mg de proteína con 40 µl de suero de ratones almacenado o 1 µg de anticuerpo monoclonal anti-c-erbB-2 (Zymed, San Francisco, CA) y 20 µl de proteína A+G agarosa (Oncogene, Uniondale, NY) y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Los inmunoprecipitados se dejaron sedimentar y se lavaron dos veces en TBS 0,1 M y en el mismo tampón que contenía el 0,5% de Nonidet P40. A continuación, las proteínas inmunoprecipitadas se separaron mediante una SDS-PAGE 6% y se analizaron mediante transferencia Western.

Análisis por transferencia Western

Los precipitados se separaron sobre geles SDS-PAGE 6% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania). Las transferencias Western se llevaron a cabo utilizando Na_2HPO_4 40 mM, NaH_2PO_4 7 mM, 1% de leche en polvo, 0,05% p/v de azida sódica, 0,5% p/v de Tween-20, pH 7,5 para el bloqueo, lavado y diluciones de los anticuerpos. Para la detección del Her-2/neu precipitado se incubaron membranas con anticuerpos de conejo anti-Her-2/neu humano (diluidos 1:100; Zymed, San Francisco, CA, USA). Se detectó la Ig de conejo enlazada mediante anticuerpo de cerdo anti-conejo marcado con fosfatasa alcalina (diluido 1:500; DAKO A/S, Dinamarca). El sustrato fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/nitroazul de tetrazolio se convirtió in situ en un compuesto azul denso mediante la fosfatasa alcalina inmunolocalizada.

Se pudo demostrar que sólo los tres péptidos de la presente invención tienen la capacidad de inducir respuestas inmunes específicas anti-her-2/neu (véase figura 3).

Preparaciones microsomales

Las células se rompieron en un tampón de lisis (fosfato de Na 50 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, sacarosa 250 mM, cóctel inhibidor de proteasa 1 X Completo ("1 X Complete protease inhibitor mix") (Roche, Mannheim, Alemania) utilizando un homogenizador de tejido dounce ("dounce tissue grinder"). Los núcleos sin romper se separaron mediante centrifugación a 1.000 x g. A continuación, los sobrenadantes se centrifugaron a 32.000 g durante 1 hora a 4°C. Los sedimentos se solubilizaron en un tampón que contenía fosfato de Na 100 mM pH 7,4, NaCl 500 mM, EDTA 2 mM y 1% de Triton X-100. Se estimó el contenido en proteína utilizando un ensayo DC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

ELISA

a) Respuestas de Ab específicos de péptido

Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc-Immuno Plate, Nalge Nunc International, Dinamarca) con 5 µg/ml de péptidos conjugados a KLH o 5 µg/ml de KLH en tampón carbonato 100 mM, pH 9,6 durante toda la noche a 4°C. Los sitios de unión no específica se bloquearon durante 4 horas con PBS que contenía el 3% de leche en polvo. Los sueros de ratones inmunizados con conjugados péptido-TT se diluyeron 1:100 en PBS-tw (0,05% v/v

Tween 20) que contenía el 0,5% de leche en polvo, se añadieron a las placas recubiertas con antígeno y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Los sueros de los ratones inmunizados con conjugados péptido-TT e IL-12 como adyuvante adicional se diluyeron 1:200-1:4.000 para la medición de IgG2a específica y 1:8.000-1:100.000 para IgG1 específica.

Las titulaciones de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados i.n. con conjugados péptidoS-CTB se midieron tal como se ha descrito anteriormente. Las IgG1 se detectaron en sueros diluidos 1:10.000 y las IgG2a a una dilución 1:2.000. Se añadió IgG2a o IgG1 de rata anti-ratón (Pharmlingen, San Diego, CA, USA) diluida 1:500 en PBS-tw que contenía el 0,5% de leche en polvo a las placas. Se detectó la Ig de rata unida con anticuerpos conjugados de ratón anti-HRP de rata (Jackson Immunolab, West Grove, Pa, USA), diluidos 1:2.000 en PBS-tw que contenía el 0,5% de leche en polvo. El desarrollo de color se llevó a cabo con sustrato TMB (R&D Systems, MN, USA), la reacción se paró con H₂SO₄ 0,1 M, y se midió la densidad óptica a 450 nm (630 nm como longitud de onda de referencia).

b) Respuestas de Ab específicos de Her-2/neu

Se llevó a cabo el recubrimiento con 5 µg/ml de mAB Trastuzumab y el bloqueo de los sitios de unión no específicos tal como se ha descrito anteriormente. A continuación, se incubaron placas de 96 pocillos con 50 µg/pocillo de una preparación microsomal de células SK-BR-3 o HTB 132 diluidas en PBS que contenía el 0,5% de Triton X-100 durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado y el bloqueo las placas se incubaron durante toda la noche a 4°C con antisueros de ratón diluidos 1:250 en PBS. Se detectó la Ig enlazada con Ig de oveja anti-ratón marcada con HRP diluida 1:500 en PBS (Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra). El desarrollo de color se llevó a cabo tal como se ha descrito. Se presentan los valores de la DO de cada muestra después de restar los valores de control.

La vacuna de la presente invención induce una respuesta de anticuerpo significativa hacia la HER-2/neu humana a diferencia del suero de control (sueros de ratones inmunizados con toxoide tetánico) (figura 4). Después de la inmunización con la vacuna de la presente invención e IL-12 se observó una tendencia hacia niveles aumentados de anticuerpos de estos isotipos.

También la aplicación mucosal de los conjugados péptido/CTB condujo a la inducción de respuestas de anticuerpos específicas. Se indujeron tanto anticuerpos IgG1 como IgG2a. Se pudo demostrar que el sistema de administración mucosal tiene la capacidad de inducir respuestas inmunes del tipo Th1. Los datos muestran que los adyuvantes mucosales, tales como CTB, pueden inducir respuestas inmunes sistémicas de Th1 parcial y también IgA local. Los efectos sólo se consiguen si los péptidos están conjugados a CTB y no sólo mezclados con el adyuvante mucosal (figura 5 a hasta c).

Ensayo de proliferación celular

Se sembraron células tumorales en placas de microtitulación de 96 pocillos (Costar, Coming, NY) a una densidad óptima para el crecimiento lineal: 1×10^4 células/pocillo para células SK-BR-3 y 5×10^3 /pocillo para células 518A2. Se dejaron adherir las células durante toda la noche a 37°C. Se añadió la IgG total aislada de sueros de ratones y conejos inmunizados con conjugados de péptido Her-2/neu simples (figura 6) o mezclados (fig. 7, 8) o TT a una concentración de 150 µg /ml (figura 6) o a concentraciones crecientes (0, 18,75, 37,5, 75 µg /ml) (figuras 7, 8) y Trastuzumab, un mAb IgG1 anti-Her-2/neu humanizado comprado a Roche (Hertfordshire, UK), a una concentración de 50 µg/ml. Las células se incubaron durante 72 horas a 37°C, a continuación se pulsaron durante 16 horas a 37°C con 0,5 µCi de [3H]-timidina/pocillo (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA) y posteriormente se recolectaron. Se midió la [3H]-timidina incorporada en un contador 1205 Betaplate Liquid Scintillation Counter (Wallac Oy, Turku, Finlandia). Se calculó el porcentaje de inhibición de la proliferación comparando los valores cpm de las células tratadas con los de las células no tratadas, que se consideraron el 100%.

La figura 6 muestra que los anticuerpos inducidos después de la inmunización con 2 péptidos (ID SEQ 2 y 3) o solamente con 1 péptido (ID SEQ 1) pueden inducir una reducción del 20% del crecimiento de células tumorales in vitro; en comparación, el Trastuzumab, conduce a un 40% de inhibición del crecimiento tumoral in vitro.

La figura 7 muestra que los anticuerpos obtenidos de la inmunización con una mezcla de los tres péptidos de la presente invención induce una inhibición superior al 60% del crecimiento de

tumores, que es incluso superior a la inducida por el ab monoclonal Trastuzumab. Estos datos muestran que la combinación de los tres péptidos supone una gran ventaja para la efectividad de la vacuna de péptidos y es superior a la inmunización con péptidos simples o combinaciones de sólo dos péptidos.

Además, se pudo demostrar que la proliferación de las células SK-BR-3 que expresaban niveles elevados de HER-2/neu se inhibió de una forma dependiente de dosis mediante los anticuerpos específicos de péptido oscilando entre el 39% y el 66 % a una respuesta de anticuerpo de 18,75 µg/ml a 75 µg/ml, respectivamente (figura 8).

Citometría de flujo

Se recogieron las células Tgl-1 de matraces de cultivo y se lavaron en un tampón de tinción que comprendía HBSS (GIBCO, Life Technologies LTD) y el 5% de FCS termoinactivado. Se incubaron 5×10^6 células con 50 µl de sueros inmunes almacenados diluidos 1:5 en el tampón de tinción o con 10 µg del anticuerpo monoclonal anti-c-erbB-2 (NeoMarkers, Fremont, CA) en el mismo tampón. Después de la incubación las células se lavaron con el tampón de tinción y se tiñeron con anticuerpos anti-ratón bovinos conjugados con FITC (Santa Cruz, CA, USA) diluidos 1:100 en el mismo tampón. Todas las incubaciones se llevaron a cabo sobre hielo durante 45 minutos. Después del lavado final las células se resuspendieron en HBSS/FCS 0,5%. Se midió la fluorescencia mediante un FACScan (Becton Dickinson). Se determinaron la intensidad media de fluorescencia del canal y el porcentaje de células positivas utilizando el software CellQuest™ Pro.

Los análisis de FACS revelaron que los sueros de ratones inmunizados con la vacuna de la presente invención con o sin IL-12 fueron capaces de unirse a las células Tgl-1 que expresaban c-neu, de forma similar a la del Ab de control monoclonal dirigido tanto contra HER-2/neu humana como de rata. Utilizando una reserva de sueros de ratones inmunizados con TT también se observó una tinción débil de las células mientras que no se detectó unión a Tgl-1 con anticuerpo IgG anti-ratón conjugado a FITC (no se muestran los datos).

La especificidad por c-neu de los anticuerpos inducidos se probó adicionalmente por la capacidad de inmunoprecipitar la proteína c-neu de los lisados de tumores. Por el contrario, los sueros de control obtenidos de los ratones vírgenes y de ratones

inmunizados con TT no mostró reactividad con c-neu (no se muestran los datos).

Medición de la liberación de citoquina in vitro

Se llevó a cabo un experimento separado en ratones BALB para estudiar la producción de citoquina in vitro: se extirparon los bazos en condiciones estériles y se prepararon tal como se conoce en la técnica. Brevemente, los bazos se homogenizaron y los esplenocitos se estimularon con la vacuna de péptidos de la presente invención a una concentración de 25 µg/pocillo o con TT a una concentración de 5 µg/pocillo. Los pocillos de control se cultivaron sólo con medio. Se recogieron los sobrenadantes después de 46 horas y se mantuvieron congelados hasta su análisis. Se midieron los niveles de IFN-γ mediante ELISA (no se muestran). Se midieron los niveles de IL-2 e IL-4 con kits ELISA de ratón comerciales (Endogen, Woburn, MA, USA).

Dado que se midieron cantidades significativas de IFN-γ en los cultivos de células esplénicas de ratones inmunizados con péptidos + IL-12, se pudo demostrar que IL-12 induce la producción de INF-gamma y tiene un papel central en la mejora de la vacuna de múltiples epítomos (figura 9).

Análisis estadístico

Se realizaron comparaciones de intervalos sin tumores para todos los grupos mediante una generalización de la prueba de Gehan Wilcoxon. Se analizaron las diferencias de los grupos en el tiempo hasta un volumen de tumor de 1.000 mm³ mediante pruebas Kruskal-Wallis. Se llevaron a cabo comparaciones post hoc para todas las parejas de grupos aplicando pruebas Tukey-Kramer. Se aplicó el mismo procedimiento para las citoquinas. Un valor de p por debajo de 0,05 se consideró significativo.

En resumen, se pudo demostrar que la vacuna de la presente invención, es decir, la vacuna de múltiples epítomos, es eficaz en la prevención de tumores que sobreexpresan c-neu in vivo y que este efecto se podía incrementar mediante la coadministración de IL-12. La inducción de una fuerte inmunidad mediante la vacuna de la presente invención conduce al establecimiento de una memoria inmunológica, evitando potencialmente la reaparición del tumor. Mediante la extrapolación de los presentes resultados se espera una inmunización activa con una vacuna de múltiples epítomos de este tipo, una eficacia profiláctica pero también una buena eficacia terapéutica contra enfermedades mínimas de tumores de rápido

REIVINDICACIONES

1. Vacuna contra enfermedades cancerosas asociadas con el oncogén HER-2/neu, en la que dicha vacuna comprende una mezcla, como mínimo, de tres péptidos diferentes que tienen una longitud de 9 a 30 aminoácidos y cada secuencia se encuentra en el dominio extracelular de la proteína HER-2/neu, en la que, como mínimo, un péptido tiene la secuencia 378 a 394 del dominio extracelular de la proteína HER-2/neu, como mínimo, otro tiene la secuencia 545 a 560 del dominio extracelular de la proteína HER-2/neu y, como mínimo, otro péptido tiene la secuencia 610 a 623 del dominio extracelular de la proteína HER-2/neu y en la que cada uno de los péptidos está conjugado a un transportador.

2. Vacuna contra enfermedades cancerosas asociadas con el oncogén HER-2/neu, según la reivindicación 1, en la que, como mínimo, un péptido que tiene la secuencia 378 a 394 del dominio extracelular de la proteína HER-2/neu está acoplado a un enlazador de glicina adicional y/o a un residuo de cisteína C-terminal.

3. Vacuna contra enfermedades cancerosas asociadas con el oncogén HER-2/neu, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que cada péptido está conjugado a un transportador de forma simple o múltiple.

4. Vacuna contra enfermedades cancerosas asociadas con el oncogén HER-2/neu, según la reivindicación 3, en la que el transportador es inmunogénico.

5. Vacuna contra enfermedades cancerosas asociadas con el oncogén HER-2/neu, según las reivindicaciones 3 ó 4, en la que el transportador se selecciona del grupo que comprende hemocianina de lapa (KLH), toxoide tetánico (TT), la subunidad B de la toxina del cólera (CT, CTB), toxina termolábil (LT) o mutantes o la subunidad B (LTB) de E. coli, fantasmas bacterianos, liposomas, quitosomas, virosomas o células dendríticas.

6. Vacuna contra enfermedades cancerosas asociadas con el oncogén HER-2/neu, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la vacuna comprende un adyuvante.

7. Vacuna contra enfermedades cancerosas asociadas con el oncogén HER-2/neu, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la vacuna comprende un adyuvante mucosal.

8. Vacuna contra enfermedades cancerosas asociadas con el oncogén HER-2/neu, según la reivindicación 7, en la que el

adyuvante mucosal es la subunidad B de la toxina del cólera (CTB), una bacteria ácido láctica o un mutante de la misma.

9. Vacuna contra enfermedades cancerosas asociadas con el oncogén HER-2/neu, según las reivindicaciones 7 u 8, en la que el adyuvante mucosal se utiliza como transportador.

10. Vacuna contra enfermedades cancerosas asociadas con el oncogén HER-2/neu, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el transportador mucosal es una bacteria ácido láctica probiótica con una capacidad promotora de IL-12/activadora de Th1 para su aplicación oral/mucosal.

11. Vacuna contra enfermedades cancerosas asociadas con el oncogén HER-2/neu, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la vacuna además comprende interleuquina 12 o un agonista de IL-12 o una sustancia que promueve la producción de IL-12.

12. Utilización de la vacuna, según las reivindicaciones 1 a 11, para la preparación de un medicamento para su administración a un mamífero, a efectos de mantener su respuesta biológica en el tratamiento de las enfermedades cancerosas asociadas con el oncogén HER-2/neu, en la que el patrón de administración de la medicación comprende las etapas de:

- a. administración de dicha vacuna 4 veces en intervalos de 14 a 21 días y
- b. administración/coadministración posterior de interleuquina 12 o un agonista de IL-12 o una sustancia que promueve la producción de IL-12 en un tratamiento de cinco días, en la que IL-12 se administra en dos concentraciones diferentes.

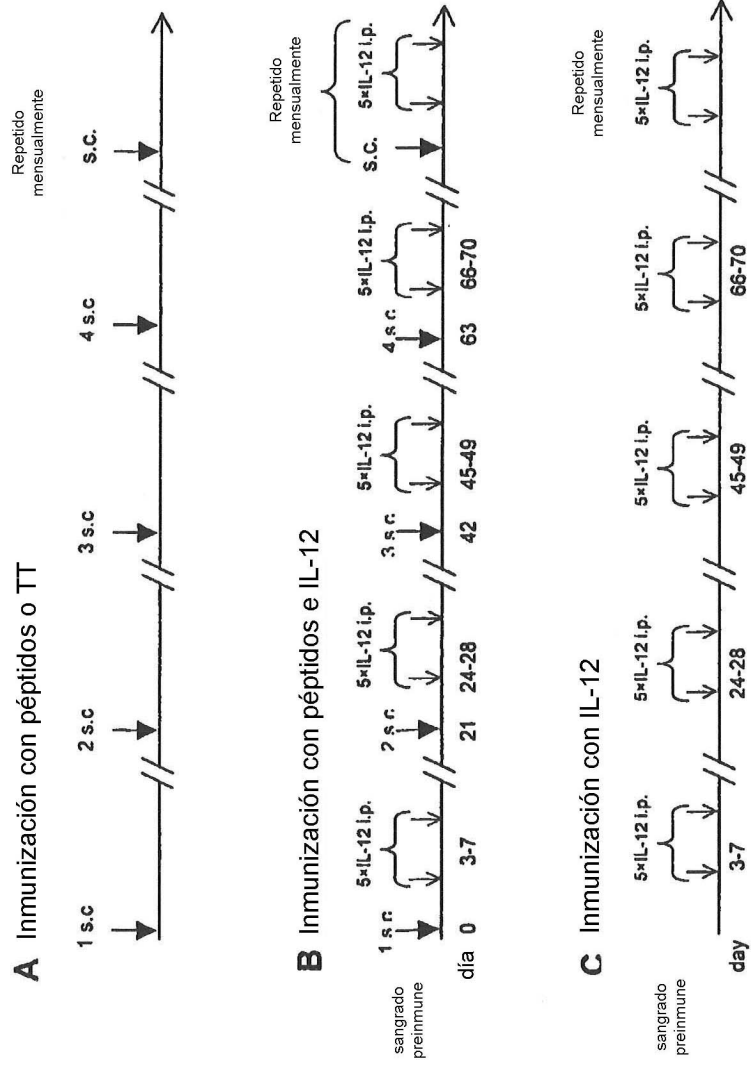


Fig. 1

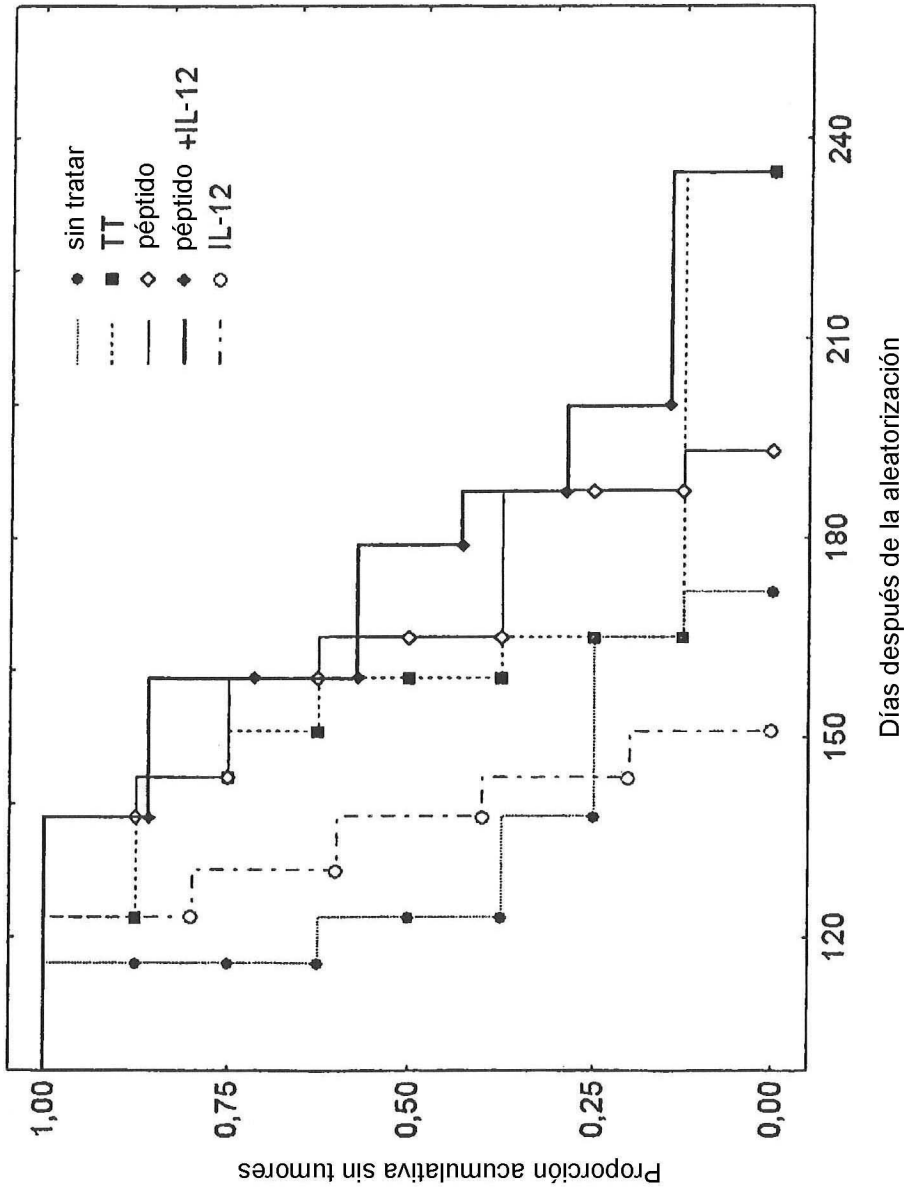


Fig. 2 A

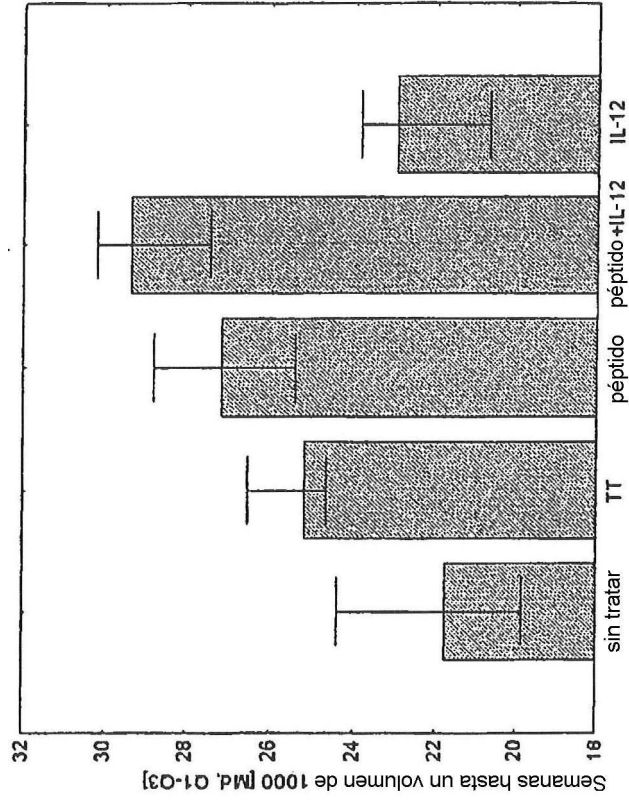


Fig. 2 B

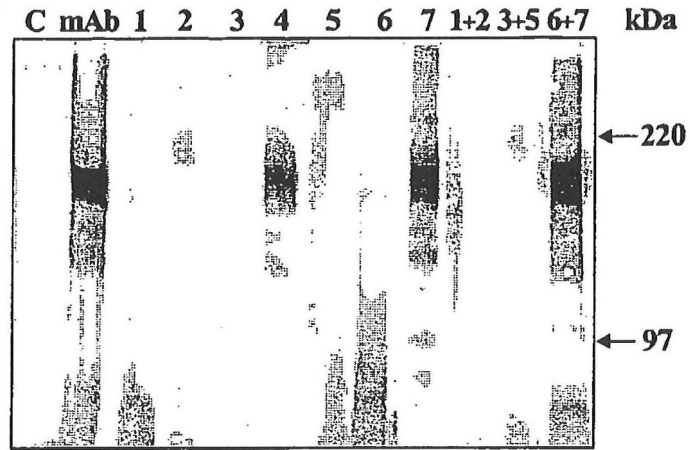


Fig. 3

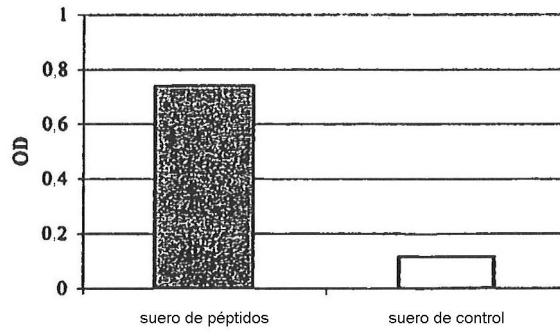
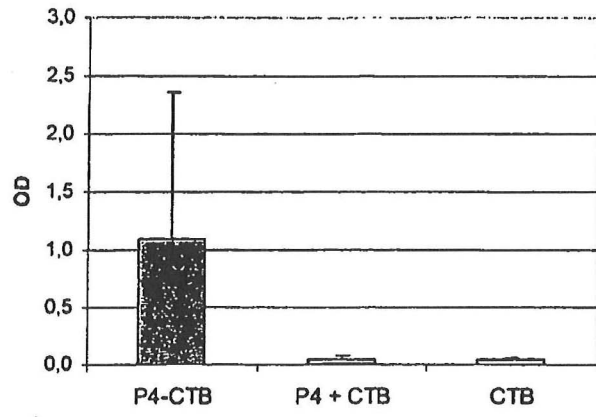
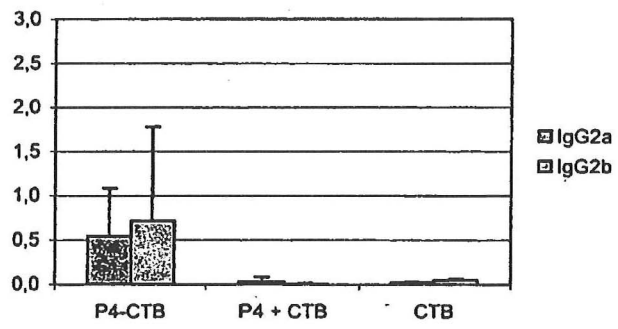


Fig. 4

a



b



c

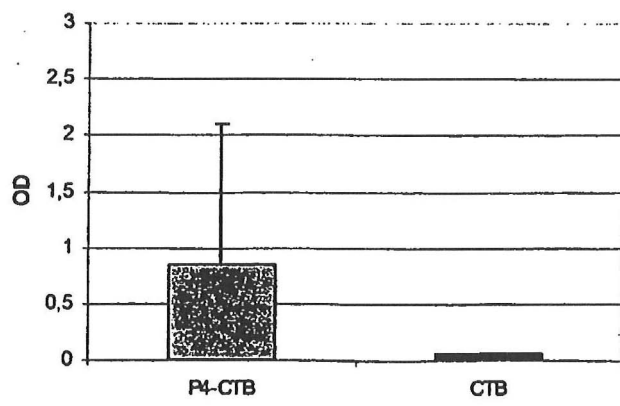


Fig. 5

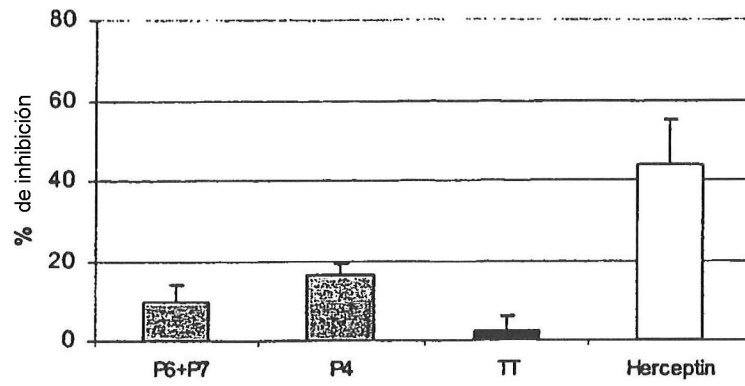


Fig. 6

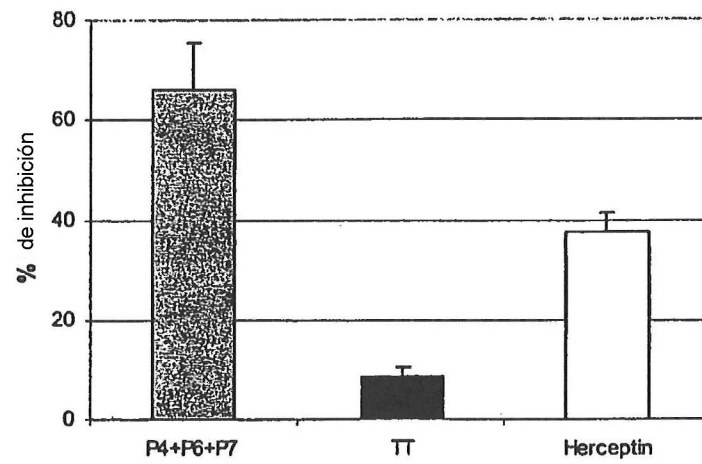


Fig. 7

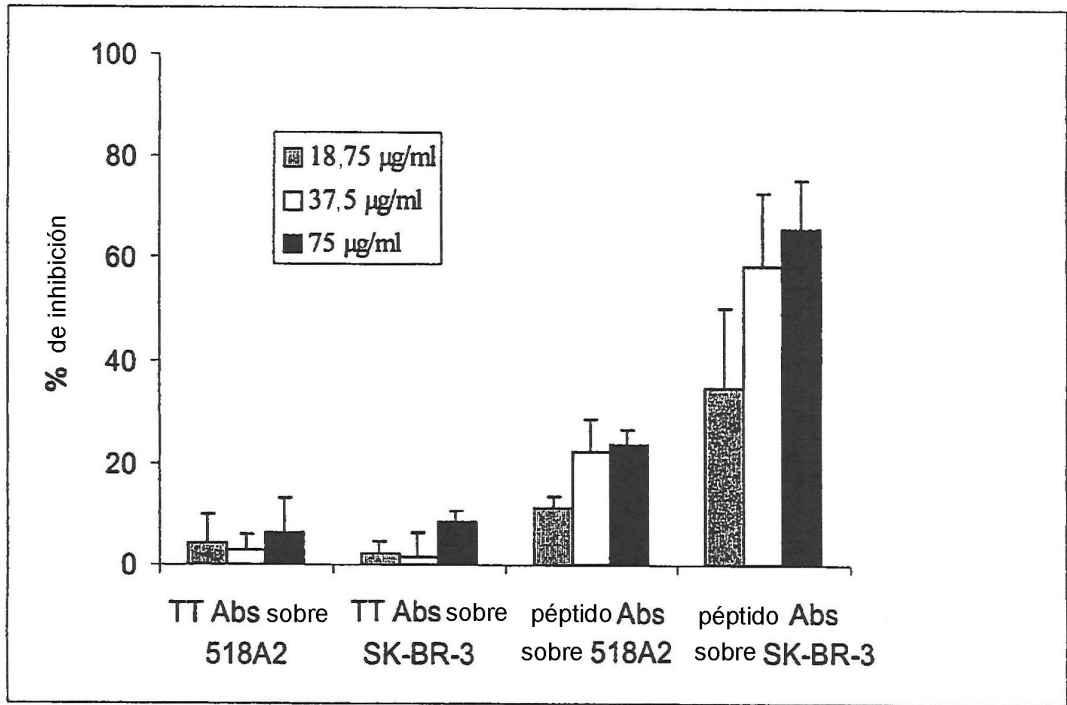


Fig. 8

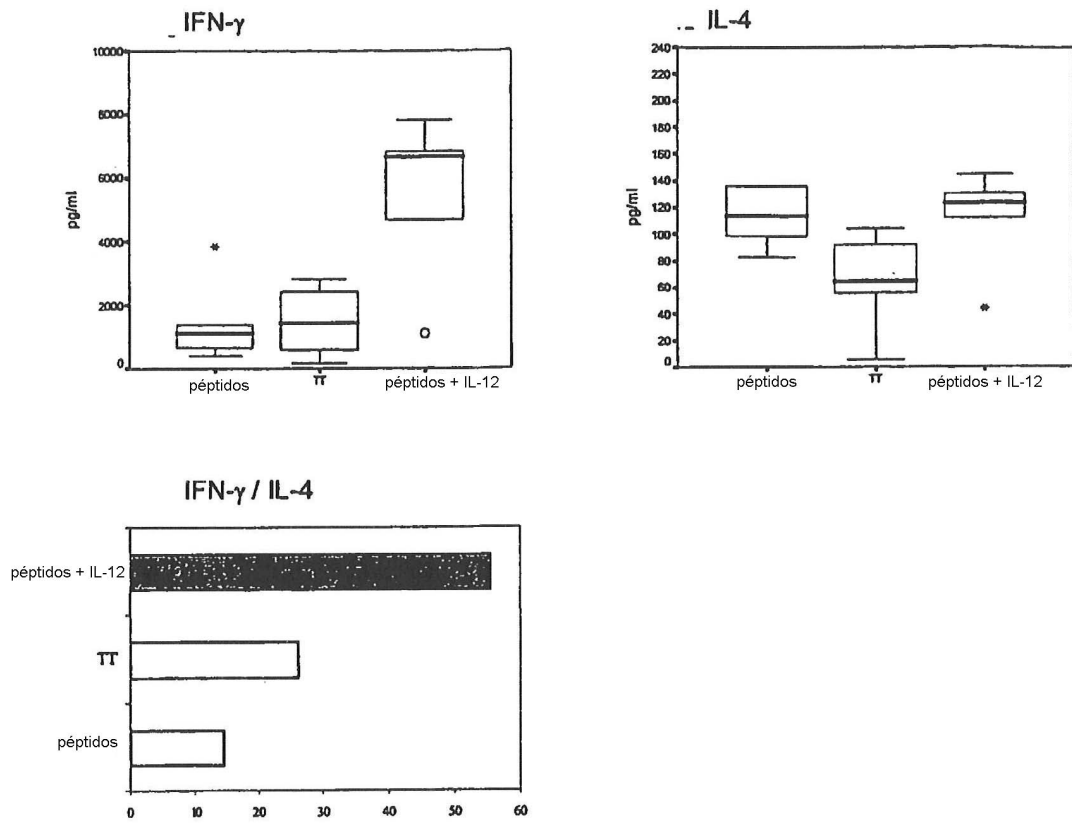


Fig. 9