

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1 Título de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

COMPOSICIONES VACUNALES BIVALENTES Y SU USO PARA LA TERAPIA DE TUMORES

2 Datos del Solicitante / Titular

Nombre: CENTRO DE
INMUNOLOGIA
MOLECULAR

**Dirección
Electrónica:** sic@castellanosyco.co

Dirección: Calle 216 Esq. 15
Atabey, Playa, La
Habana 11600, CUBA

**Domicilio/País de
constitución:** CUBA - CIUDAD DE LA
HABANA - LA HABANA

Identificación:

☐ CEDULA DE
CIUDADANIA

☐ CEDULA DE
EXTRANJERIA

☒ EMPRESA
EXTRANJERA

☐ NIT

☐ PASAPORTE

Número: 890931752-

3 Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social

Tipo

Identificación

1. CENTRO DE INMUNOLOGIA
MOLECULAR

NN

890931752

4 Datos del Inventor

Nombre:	BELINDA SANCHEZ RAMIREZ	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co	
Dirección:	Calle 184 No. BEEI apto 9, entre 1ra y 5ta, Reparto Flores, Playa, Cuba, La Habana 11300, CUBA	Domicilio/País de constitución:	CUBA - CIUDAD DE LA HABANA - LA HABANA	
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT ☒ No Aplica				
Número:		-		
5	Inventor(es)			
Apellidos - Nombres		Domicilio		
1.	SANCHEZ RAMIREZ BELINDA	CUBA		
2.	YGLESIAS RIVERA ARIANNA	CUBA		
3.	GUTIERREZ PEREZ AMELIA	CUBA		
4.	GONZALEZ SUAREZ NARJARA	CUBA		
6	Datos Inventor(es)			
País de Residencia		Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	CUBA	CIUDAD DE LA HABANA	LA HABANA	Calle 184 No. BEEI apto 9, entre 1ra y 5ta, Reparto Flores, Playa, Cuba, La Habana 11300, CUBA

2.	CUBA	CIUDAD DE LA HABANA	LA HABANA	Calle Segunda, No. 3418 entre Central y Guarina, Reparto Martin Perez, San Miguel de Padrón, Cuba, La habana11000, CUBA
3.	CUBA	CIUDAD DE LA HABANA	LA HABANA	Lucena No. 310 apto 208, entre San Rafael y San Miguel, Centro Habana, Cuba, La Habana 10200, CUBA
4.	CUBA	CIUDAD DE LA HABANA	LA HABANA	Calle 74 No. 24010-18 apto 5 entre 240 y 244, La Lisa, Cuba, La Habana 17100, CUBA
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co
Dirección:		CALLE 94A 7A 09	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE Número: 39779654-				
Presentación de Poder				
Año de Radicación				
Número de Radicación				
8	Datos Solicitud: PCT / WO			
Número Solicitud:		PCT/CU2014/000004	Fecha Solicitud:	01/08/2014
Número Publicacion:		WO 2015/014327	Fecha Publicacion:	05/02/2015
9	Declaraciones de prioridad		☒ SI ☐ NO	
1.	(33) País de origen CUBA	Codigo del país CU	(31) No. Solicitud CU-2013-0110	(32) Fecha 02/08/2013

10	Reivindicaciones		
Número reivindicaciones:		8	Pago Reivindicaciones: No
11	Reducción de tasas.		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
12	Documentos Anexos		
☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☐ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen ☐ Certificado Depósito Material Biológico ☐ Uso de Conocimiento tradicional ☐ Listado de secuencias ☐ Artes finales 12 x 12 cm ☒ Poderes, si fuere el caso ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☒ Otros Anexos			

COMPOSICIONES VACUNALES BIVALENTES Y SU USO PARA LA TERAPIA DE TUMORES

CAMPO TECNICO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se relaciona con la biotecnología y la inmunología aplicada a la salud humana. Particularmente se relaciona con una formulación vacunal para el tratamiento de tumores malignos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Los receptores Her1 y Her2 son glicoproteínas transmembranarias con actividad tirosina cinasa que pertenecen a una familia de cuatro receptores conocida como familia ErbB (Normanno N, y otros, (2005) The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. Curr Drug Targets 6, (3): 243-257). Her1 tiene una alta expresión en tumores de pulmón, mama, cabeza y cuello, colon, páncreas, vejiga, ovario y glioblastomas (Brand TM, y otros, 15 (2011) Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. Cancer Biol Ther 11 (9): 777-792), próstata (Zhau HY y otros, (1996) Androgen-repressed phenotype in human prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 93, (26): 15152-15157; Liu XH, y otros, (1993) Androgens regulate proliferation of human prostate cancer cells in culture by increasing transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) and epidermal growth factor (EGF)/TGF-alpha receptor. J Clin Endocrinol Metab 77 (6): 1472-1478; Neal DE, y 20 otros, (1985) Epidermal-growth-factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours. Lancet 1 (8425): 366-368; Gullick WJ, y otros, Expression of epidermal growth factor receptors on human cervical, ovarian, and vulval carcinomas. Cancer Res 46 (1): 285-292; Salomon DS, y otros, (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Crit Rev Oncol Hematol 19 (3): 183-232). La sobreexpresión de Her1 se ha asociado con un mal pronóstico de la enfermedad en tumores de cabeza y cuello y pulmón, con un alto riesgo de recurrencia de la enfermedad (Turkeri LN y otros, (1998), Impact of the expression of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor receptor on the prognosis of 30 superficial bladder cancer. Urology 51 (4): 645-649; Chow NH, y otros, (1997) Significance of urinary epidermal growth factor and its receptor expression in human bladder cancer. Anticancer Res 17 (2B): 1293-1296) y con disminución de la sobrevida en pacientes con cáncer de ovario, colon, vejiga, tiroide y cabeza y cuello (Grandis y otros, (1998) Downmodulation of TGF-alpha protein expression with antisense oligonucleotides inhibits proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells. J Cell Biochemr 69 (1):55-62.

Además, los niveles de expresión de Her1 se correlacionan con la resistencia a las terapias convencionales (Holbro T, y otros, (2003) The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 284 (1): 99-110). Asimismo, en tumores de mama, gástrico, ovario, y próstata se ha encontrado una expresión aberrada de Her2 en comparación con la expresión en tejidos normales (Tai W y otros, (2010) The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *J Control Release* 146 (3): 264-275). Además, la desregulación de este receptor se ha observado en la transformación maligna del tracto respiratorio (Andrade Filho y cols., 2010) y constituye un mecanismo de resistencia tumoral a las terapias anti-Her1 (Brand y otros, (2011) Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther* 11 (9): 777-792). La sobreexpresión de Her2 en tumores de mama se ha correlacionado con una menor sobrevida total y la sobrevida libre de recaída.

Muchos de los tumores antes mencionados co-expresan altos niveles de Her1 y Her2, y esta sobreexpresión se asocia con una disminución de la sobrevida de los pacientes (Wiseman SM, y otros, (2005) Coexpression of the type 1 growth factor receptor family members HER-1, HER-2, and HER-3 has a synergistic negative prognostic effect on breast carcinoma survival. *Cancer*. May 1; 103(9):1770-7.) Los pacientes con tumores mamarios Her2 positivos tienen un alto riesgo de mortalidad asociada a la enfermedad, y en adición, la co-expresión de Her1 y Her2 en estos tumores aumenta notablemente este riesgo, lo que indica que la expresión de Her1 en estos carcinomas tiene un efecto sinérgico sobre la influencia clínica de la expresión de Her2 (Suo Z y otros, (2002) EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J Pathol* 196 (1): 17-25). Se ha demostrado experimentalmente que existe sinergismo en la interacción de estos receptores en la transformación maligna celular (Kokai Y y otros, (1989) Synergistic interaction of p185c-neu and the EGF receptor leads to transformation of rodent fibroblasts. *Cell* 58 (2): 287-292). Otros ejemplos de tumores en los que se ha comprobado la co-expresión de Her1 y Her2 son cáncer de cerebro, ovario, cabeza y cuello, pulmón, esófago y colon (Emanuel SL y otros, (2008) Cellular and in vivo activity of JNJ-28871063, a nonquinazoline pan-ErbB kinase inhibitor that crosses the blood-brain barrier and displays efficacy against intracranial tumors. *Mol Pharmacol* 73 (2): 338-348; Ako E y otros, (2007) The pan-erbB tyrosine kinase inhibitor CI-1033 inhibits human esophageal cancer cells in vitro and in vivo. *Oncol Rep* 17 (4): 887-893; Venkateswarlu S y otros, (2002) Autocrine heregulin generates growth factor independence and blocks apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* 21 (1): 78-86).

Está bien documentado en la literatura el rol fisiológico de la expresión aberrada y co-expresión de los receptores Her1 y Her2 en los tumores. Estos receptores, a través de la formación de dímeros y heterodímeros (Pinkas-Kramarski R y otros, (1996) Diversification of

Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* 15 (10): 2452-2467), regulan procesos indispensables en la biología de los tumores, como la proliferación sostenida, la angiogénesis, la inhibición de la apoptosis, la reprogramación metabólica y la capacidad invasiva y metastásica (Hanahan D y otros (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (5): 646-674).

Ambos receptores Her1 y Her2 tienen una estructura similar que consiste de un dominio extracelular (DEC), un simple dominio transmembrana, y un dominio intracelular con actividad tirosina cinasa. El DEC de Her1 (DEC-Her1) y el DEC de Her2 (DEC-Her2) tienen un peso molecular de 105 y 110 kDa respectivamente, y su conformación en el espacio es independiente del resto de la molécula. Están formados por cuatro subdominios denominados I, II, III y IV. Los subdominios I y III, son las regiones que forman el sitio de unión al ligando y en ellos se encuentran los sitios potenciales de glicosilación. El subdominio II es la región crítica para que ocurra la dimerización entre los receptores, y se le ha denominado “brazo de dimerización” (Garrett TP y otros, (2002) Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 110 (6): 763-773; Ferguson KM y otros, (2003) EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* 11 (2): 507-517).

Se han descrito hasta siete ligandos para Her1, y entre ellos los más importantes para los tumores son el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), que tiene un efecto promotor de la proliferación de células epidérmicas que expresan el receptor, el Factor de Crecimiento Transformante (TGF) y la Anfirregulina (Normanno y otros, (2005) The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Curr Drug Targets* 6 (3): 243-257). El DEC-Her1 se encuentra en un equilibrio dinámico de múltiples conformaciones que incluyen conformaciones “cerradas” y conformaciones donde el subdominio II se encuentra en un estado más flexible. La unión del ligando desplaza el equilibrio hacia una conformación “extendida” o activa, estado conformacional que es competente para la dimerización (Ferguson KM, (2008) Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annu Rev Biophys* 37: 353-373).

Para Her2, sin embargo, no se ha identificado ningún ligando específico. La señalización a través de este receptor se hace independiente de factores de crecimiento, pues posee una conformación activa o “extendida” de forma constitutiva que expone su subdominio de dimerización (Cho HS y otros, (2003) Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421 (6924): 756-760). Por esta razón constituye la pareja de dimerización preferencial para los demás miembros de la familia ErbB, entre ellos Her1 (Franklin MC y otros, (2004) Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* 5 (4): 317-328). La heterodimerización con Her2 le

aporta además a Her1 una disminución del grado de endocitosis y aumenta el reciclaje a la membrana de los receptores que forman el heterodímero (Lenferink AE y otros, (1998) Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J* 17 (12): 3385-3397).

- 5 Como describen Baselga J y otros, (2009) Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* 9 (7): 463-475), la dimerización inducida por los ligandos permite la autofosforilación y la transfosforilación de los residuos de tirosina de la región citoplasmática de los receptores. Los residuos de fosfotirosina que se generan, inician múltiples vías de señalización intracelular. Una de las vías de señalización es la de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), en cuya cascada de activación se encuentran las proteínas cinasas reguladas por señales extracelulares Erk1 y Erk2. Estas inducen la expresión de factores de transcripción que incrementan la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular como por ejemplo la ciclina D1, que promueve la progresión del ciclo celular hacia la fase G1/S. Las combinaciones heterodiméricas constituyen los complejos de señalización más potentes y se caracterizan por su control directo sobre el ciclo celular (Pinkas-Kramarski R y otros, (1996) Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* 15 (10): 2452-2467).

- Estos blancos tumorales se han validado ampliamente en estudios clínicos. Se ha evaluado el efecto clínico de la terapia con inhibidores de la actividad tirosina cinasa (TKI) de estos receptores, como el gefitinib (Ciardiello F y otros, (2000) Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 6 (5): 2053-2063) y el lapatinib (Kondo N y otros, (2010) Antitumor effects of lapatinib (GW572016), a dual inhibitor of EGFR and HER-2, in combination with cisplatin or paclitaxel on head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 23 (4): 957-963). También hay informes de estudios clínicos que usan la terapia pasiva con anticuerpos monoclonales (AcMs) generados contra dichos blancos tales como cetuximab (Jean GW y otros, (2008) Epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies for the treatment of metastatic colorectal cáncer. *Pharmacotherapy* 8(6):742-54) y nimotuzumab (Ramos TC, y otros, (2006) Treatment of high-grade glioma patients with the humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody h-R3: report from a phase I/II trial. *Cancer Biol Ther* 5 (4): 375-379), que son específicos para el dominio extracelular (DEC) de Her1, y trastuzumab que reconoce al DEC de Her2 (Clifford A, (2007) Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice *N Engl J Med*; 357:39-51). A pesar del potente efecto antitumoral de algunas de estas terapias, como por ejemplo el cetuximab, se han descrito mecanismos de resistencia asociados al empleo de las mismas, entre los cuales se encuentra el aumento de los niveles de expresión de otro

receptor de la familia, como puede ser Her2 (Brand TM y otros, (2011) Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther* 11 (9): 777-792). Por otra parte, se ha encontrado que existe una mejor respuesta al AcM anti-Her1 pertuzumab en carcinomas de mama y pulmón que expresan heterodímeros de Her2 con los otros miembros de la familia ErbB (Agus DB y otros, (2005) Phase I clinical study of pertuzumab, a novel HER dimerization inhibitor, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 23 (11): 2534-2543). Esto refuerza la idea de que la inhibición de la heterodimerización constituye una estrategia atractiva para la terapia del cáncer.

Además, la terapia activa con vacunas de cáncer también ha surgido como una nueva alternativa terapéutica cuyo objetivo es activar la respuesta del sistema inmune de los pacientes contra los tumores que expresan los receptores Her1 y Her2. Este tipo de terapia sin embargo ha tenido el reto de estimular a un sistema inmune deprimido por el efecto supresor del tumor, por lo que las formulaciones vacunales deben usar adyuvantes que contribuyan a generar una respuesta efectiva. Tal es el caso del adyuvante de proteoliposomas de muy pequeña talla (VSSP), derivado de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*, capaz de activar células dendríticas (DC) y polarizar la respuesta inmune hacia el patrón de respuesta cooperadora tipo 1 (Th1) descrito en la patente WO 02/45746 presentada el 6 de diciembre de 2001.

Los receptores Her1 y Her2 han sido blancos de diferentes candidatos vacunales, evaluados en estudios clínicos y preclínicos. En el diseño de vacunas basadas en Her2 se han usado vacunas de DCs (Czerniecki BJ y otros, (2007) Targeting HER-2/neu in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion. *Cancer Res* 67 (4): 1842-1852), péptidos de Her2 y el DEC-Her2 (Ladjemi MZ y otros, (2010) Anti-HER2 vaccines: new prospects for breast cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 59 (9): 1295-1312). En estudios clínicos fase II en pacientes con cáncer de mama se evaluó la inmunización activa con el péptido p369-377 (péptido E75) derivado del DEC de Her2 presentado por MHC-I, adyuvado en factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Esta vacuna es capaz de generar CTL *in vivo* específicos por células que sobreexpresan Her2 y se encuentra actualmente en estudios clínicos fase II (Knutson KL y otros, (2002) Immunization of cancer patients with a HER-2/neu, HLA-A2 peptide, p369-377, results in short-lived peptide-specific immunity. *Clin Cancer Res* 8 (5): 1014-1018; Patil R y otros, (2010) Clinical and immunologic responses of HLA-A3+ breast cancer patients vaccinated with the HER2/neu-derived peptide vaccine, E75, in a phase I/II clinical trial. *J Am Coll Surg* 210 (2): 140-147). Además, se ha diseñado una vacuna terapéutica basada el DEC de Her2 adyuvada en GM-CSF que es capaz de retardar el crecimiento de carcinomas que expresan Her2, así como prolongar la supervivencia de animales inmunizados (Helguera y otros, (2006) Vaccination with novel combinations of

anti-HER2/neu cytokines fusion proteins and soluble protein antigen elicits a protective immune response against HER2/neu expressing tumors. *Vaccine* 16;24(3):304-16).

En la solicitud de patente EP-A-661061 y en la patente US-A-6149921, se describen composiciones vacunales para estimular o incrementar la respuesta de anticuerpos frente a los gangliósidos consistentes en un inmunógeno y un adyuvante inmunológico. Los inmunógenos descritos son VSSP (proteoliposomas de muy pequeño tamaño) constituidos por la asociación de los gangliósidos GM3 N-acetilado (N-AcGM3) y N-Glicolilado (N-GcGM3), con el complejo proteico de la membrana externa (OMP o CPME) de la bacteria *Neisseria meningitidis*. Dichos inmunógenos, N-AcGM3/VSSP y N-GcGM3/VSSP, son de tamaño muy pequeño, prácticamente invisibles al microscopio electrónico, solubles en agua y de gran flotabilidad.

En la solicitud de patente WO-A-02145746 se describen composiciones vacunales que contienen: (A) uno o más antígenos poco inmunogénicos; (B) VSSP con gangliósidos incorporados, principalmente N-AcGM3/VSSP y N-GcGM3/VSSP; y (C) eventualmente uno o más adyuvantes. Particularmente se describe una vacuna cuyo principio activo es el DEC-Her1 y usa como adyuvantes VSSP y Montanide ISA51 VG. Estudios preclínicos con esta vacuna demostraron su efecto antitumoral *in vitro* e *in vivo* (Ramirez BS, y otros, (2006) Active antimetastatic immunotherapy in Lewis lung carcinoma with self EGFR extracellular domain protein in VSSP adjuvant. *Int J Cancer* 119 (9): 2190-2199; Ramirez BS, y otros (2008) Anti-EGFR activation, anti-proliferative and pro-apoptotic effects of polyclonal antibodies induced by EGFR-based cancer vaccine. *Vaccine* 26 (38): 4918-4926).

A pesar de los resultados obtenidos con las terapias monovalentes, estas no han sido suficientemente eficaces debido a que no se logra eliminar totalmente la masa tumoral y cuando esta disminuye, al cabo del tiempo ocurre una regresión del tumor a partir de la aparición de variantes resistentes. Esto sugiere que las perturbaciones puntuales no son capaces de abrogar sistemas tan complejos como los tumores. La explicación pudiera ser que como se conoce hoy las variantes resistentes generadas por las monoterapias dirigidas a miembros de la familia ErbB, aumentan los niveles de expresión de otros miembros de dicha familia (Brand TM, y otros, (2011) Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther* 11 (9): 777-792) permitiéndole a los tumores escapar del ataque del sistema inmune. De manera que una perturbación múltiple en la biología de los tumores a través de la inactivación de más de un receptor ErbB pudiera redundar en un aumento de la eficacia.

La solicitud de patente WO-A-02145746 también reclama una composición que comprende los receptores de factores de crecimiento son el HER-1, HER-2, R-PDGF o cualquiera de sus variantes que contenga el dominio extracelular con y sin región transmembrana. Sin embargo, dicha solicitud ni ningún otro documento de la técnica enseña cómo combinar dos

receptores, particularmente los DEC's de los receptores Her1 y Her2 para producir una Vacuna Bivalente que se eficaz en inducir la producción de anticuerpos en el individuo vacunado.

Los autores de la presente invención han descubierto que al mezclar en la misma proporción los DEC's de los receptores Her1 y Her2 y VSSP-GM3 se obtiene una composición vacunal que es capaz de inducir la producción de títulos de anticuerpos que inhiben inhibición de la fosforilación de Her1 y Her2 y que dichos anticuerpos tienen un efecto antiproliferativo sobre células tumorales. Los inventores también encontraron que la proporción en que se combinan los DEC's de los receptores Her1 y Her2 es decisiva para la obtención de la respuesta inmune deseada, es decir, que no es cualquier combinación de los DEC's de los receptores Her1 y Her2 la que desencadena dicha respuesta inmune.

Son objeto de la presente invención nuevas composiciones vacunales con la misma proporción de los DEC's de los receptores Her1 y Her2 y VSSP-GM3 para la administración por vía subcutánea.

Es también objeto de la presente invención un método para el tratamiento de un paciente que sufre de una enfermedad provocada por un tumor que expresa los receptores de los factores de crecimiento Her1 y Her2 que comprende la administración por vía subcutánea de una composición vacunal de los DEC's de los receptores Her1 y Her2 y VSSP-GM3, en donde los DEC's de los receptores Her1 y Her2 se encuentran en igual proporción.

También forman parte del objeto de la presente invención las composiciones vacunales con igual proporción de los DEC's de los receptores Her1 y Her2 y VSSP-GM3 y un adyuvante adicional que puede ser oleoso o no oleoso.

Adicionalmente es objeto de la presente invención el uso en la inducción de respuesta inmune para un método de tratamiento de tumores malignos que expresen los receptores Her1 y Her2.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION:

La presente invención se refiere a una composición vacunal que comprende los dominios extracelulares (DEC's) de los receptores Her1 y Her2 o fragmentos de estos para inducir una respuesta inmune contra tumores malignos que expresen los receptores Her1 y Her2. Esta composición vacunal adicionalmente comprende proteoliposomas de muy pequeña talla derivado de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* y el gangliósido GM3 (VSSP-GM3). En una modalidad particular la composición de la presente invención comprende adicionalmente un adyuvante farmacéuticamente adecuado. Estos adyuvantes farmacéuticamente adecuados pueden ser sin limitarse a un adyuvante oleoso, tal como por ejemplo aceite mineral altamente purificado y un agente tensioactivo o no oleoso, tal como Alúmina.

Sorprendentemente los inventores de la presente encontraron que la proporción en que se combinan los DEC's de los receptores es importante para inducir una respuesta inmune contra tumores malignos que expresen los receptores Her1 y Her2. La composición vacunal bivalente descrita en la presente comprende los DEC's de los receptores Her1 y Her2 en igual proporción. La mezcla de ambos principios activos, es decir los DEC's de los receptores Her1 y Her2 mezclados en otras proporciones no provoca el efecto deseado sobre el sistema inmune. En una modalidad la composición de la presente invención comprende los DEC's de los receptores Her1 y Her2 en un rango de concentración de aproximadamente 100 a aproximadamente 800 ug/dosis. Más particularmente la composición de la presente invención comprende 800 ug/dosis de cada uno de los DEC's de los receptores Her1 y Her2 o fragmentos de estos y adicionalmente comprende 1.2 mg/dosis de VSSP-GM3, puede ser en solución acuosa para la administración subcutánea. En otra modalidad estas dosis de 800 ug/dosis de cada uno de los DEC's de los receptores Her1 y Her2 o fragmentos de estos y 1.2 mg/dosis de VSSP-GM3 se pueden mezclar con un adyuvante que puede ser Montanide ISA 51 o Alúmina.

En una modalidad, la presente invención se refiere a una composición vacunal que comprende los DEC's de los receptores Her1 y Her2 o fragmentos de estos para el uso en la inducción de respuesta inmune para un método de tratamiento de tumores malignos que expresen los receptores Her1 y Her2. El método de tratamiento de la presente invención comprende la administración subcutánea de al menos una dosis de los DEC's de los receptores Her1 y Her2 o fragmentos de estos en un intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 800 ug/dosis y adicionalmente de aproximadamente 200 ug/dosis a aproximadamente 1.2 mg/dosis de VSSP-GM3. La administración puede ser por inyección subcutánea con una frecuencia quincenal a completar 5 dosis y posteriormente una dosis de mantenimiento durante 1 año. En una modalidad particular la presente invención comprende la composición vacunal con el adyuvante Montanide ISA 51, para la administración intramuscular.

Los DEC's de los receptores Her1 y Her2 o fragmentos de estos se pueden obtener por síntesis de proteínas o por técnicas de ingeniería de genes.

En la presente invención se usan indistintamente los términos formulación vacunal bivalente o composición vacunal bivalente y en todos los casos se refiere a la composición vacunal que comprende los dominios extracelulares (DEC's) de los receptores Her1 y Her2 o fragmentos de estos para inducir una respuesta inmune contra tumores malignos que expresen los receptores Her1 y Her2 y que adicionalmente comprende VSSP-GM3.

Los tumores malignos que se pueden tratar comprenden los tumores que expresan al menos uno de los receptores de la familia Her, particularmente Her1 y/o Her2. Preferentemente los tumores que expresan ambos receptores y con mayor preferencia

aquellos tumores que sobreexpresan ambos receptores. En una modalidad preferida comprende tumores de origen epidérmico y más particularmente tumores de cabeza y cuello, mama, pulmón, colon, páncreas, próstata, vejiga, ovario y glioma.

Las abreviaturas AcMs y AcPs se refiere a anticuerpos monoclonales y policlonales respectivamente.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS:

La Figura 1 muestra la cinética de Acs IgG en ratones BALB/c (n=5) inmunizados por vía subcutánea cuatro veces cada 14 días, y una vez 30 días después de la última inmunización, con 100 µg del DEC-Her1 y 100 µg del DEC-Her2 en 200µg de VSSP. Se realizaron extracciones de sangre los días 7, 21, 35, 56, 87 y 102 para medir por ELISA los títulos de Acs IgG presentes en los sueros inmunes. Se muestra la cinética de Acs IgG en términos de la media del logaritmo del recíproco del título más 1 para cada día de extracción, cuando se recubrió con el DEC-Her1 (a) y el DEC-Her2 (b). Se muestra la respuesta de Acs de ratones individuales (n=5) específicos por el DEC-Her1 (c) y el DEC-Her2 (d) graficando el logaritmo del recíproco del título de Acs más 1, para el día 87 del protocolo de inmunización. Letras diferentes indican significación estadística según la prueba de Anova dos vías (factor grupo de tratamiento), prueba de Bonferroni ($p < 0.05$).

La Figura 2 muestra el reconocimiento de las líneas tumorales MDAMB468 y MCF7/Her2 por los sueros inmunes inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2 y las Vacunas Monovalentes de Her1 y Her2, por citometría de flujo. Las líneas tumorales humanas que se indican se incubaron con los sueros inmunes (n=5) o con una mezcla de sueros pre-inmunes diluidos 1:200, correspondientes al día 35 del protocolo de inmunización; así como con los controles de expresión de los receptores: los AcMs nimotuzumab y trastuzumab a 10µg/ml. Luego, las células se marcaron con AcPs de carnero anti IgG de ratón, conjugados a isotiocianato de fluoresceína. Las células marcadas se visualizaron por citometría de flujo. El porcentaje de células reconocidas por los sueros y los AcMs se obtuvo usando el programa Flow Jo versión 5.7.2. Letras diferentes indican significación estadística según la prueba de Anova dos vías (factor grupo de tratamiento), prueba de Bonferroni ($p < 0.05$).

La Figura 3 muestra el reconocimiento de la línea tumoral H292 por los sueros inmunes inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2 y las Vacunas Monovalentes de Her1 y Her2, por citometría de flujo. Las células tumorales humanas se incubaron con los sueros inmunes (n=5) o con una mezcla de sueros pre-inmunes diluidos 1:300, correspondientes al día 35 del protocolo de inmunización; así como con los controles de expresión de los receptores: los AcMs nimotuzumab y trastuzumab a 10µg/ml. Luego, las células se marcaron con AcPs de carnero anti IgG de ratón, conjugados a isotiocianato de fluoresceína. Las células marcadas se visualizaron por citometría de flujo. El porcentaje de células reconocidas por

los sueros y los AcMs se obtuvo usando el programa Flow Jo versión 5.7.2. Letras diferentes indican significación estadística según la prueba de Anova dos vías (factor grupo de tratamiento), prueba de Bonferroni ($p < 0.05$).

La Figura 4 muestra la inhibición de la fosforilación de Her1 y Her2 por los sueros inmunes inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2. Las células H292 se incubaron con una mezcla de cinco sueros inmunes inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2 y las Vacunas Monovalentes de Her1 y Her2. Los niveles de fosforilación de Her1 y Her2 después de la estimulación con EGF y con los diferentes tratamientos se determinaron mediante Western blot. Como control negativo se usaron células no tratadas y como control negativo de especificidad el tratamiento con una mezcla de sueros pre-inmunes (PI). Se usó el TKI AG1478 como control positivo de inhibición. Las fotografías muestran los niveles de P-Her1 (a) y P-Her2 (b) con los distintos tratamientos. Los gráficos de barra muestran el análisis densitométrico de las fotografías de un experimento representativo de dos realizados.

La Figura 5 muestra el efecto antiproliferativo de los Acs inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2 sobre la línea tumoral H292. Las células H292 se incubaron durante 48 horas con una mezcla de cinco sueros inmunes, diluidos 1:20, correspondientes al día 87 del protocolo de inmunización. La mezcla de sueros PI se usó como control negativo del experimento. La viabilidad celular se determinó por el método colorimétrico del MTT, determinando la diferencia de absorbancia a 540 y 620 nm. El porcentaje de máxima viabilidad se le adjudicó a la diferencia de absorbancia correspondiente a la incubación con el suero PI. Las barras representan la media de los triplicados de tres experimentos, para cada tratamiento. Letras diferentes indican significación estadística según la prueba de T3 Dunnet, para a vs b, $p < 0.01$ y para a vs c, $p < 0.001$.

La Figura 6 muestra los títulos de Acs específicos por el DEC-Her1 y el DEC-Her2 inducidos por formulaciones de la Vacuna Bivalente Her1+Her2 que contienen cantidades equivalentes o no equivalentes de cada receptor, Ratones BALB/c ($n=5$) se inmunizaron por vía subcutánea cuatro veces cada 14 días con: Grupo 1, 100 μg del DEC-Her1 y 100 μg del DEC-Her2; Grupo 2, 100 μg del DEC-Her1 y 200 μg del DEC-Her2; Grupo 3, 100 μg del DEC-Her1 y 300 μg del DEC-Her2; Grupo 4, 200 μg del DEC-Her1 y 100 μg del DEC-Her2; Grupo 5, 300 μg del DEC-Her1 y 100 μg del DEC-Her2. Todas las formulaciones contenían 200 μg de VSSP. Se realizó la determinación de títulos de anticuerpos en el suero específicos por DEC-Her1 y específicos por el DEC-Her2 mediante la técnica de ELISA, a partir de una extracción de sangre realizada el día 56. Se muestra la cinética de Acs IgG en términos de la media del logaritmo del recíproco del título más 1 para cada día de extracción, cuando se recubrió con el DEC-Her1 (a) y el DEC-Her2 (b). Se muestra la respuesta de Acs IgG de ratones individuales ($n=5$) graficando el inverso del título de

anticuerpos. No se apreciaron diferencias estadísticas según la prueba de Anova dos vías (factor grupo de tratamiento), prueba de Bonferroni ($p < 0.05$).

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no para limitarla.

5 EJEMPLOS:

Ejemplo 1: Títulos de anticuerpos específicos contra el DEC-Her1 y DEC-Her2 inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2

Ratones de la línea Balb/c se inmunizaron por vía subcutánea con una formulación vacunal bivalente que contenía 100 µg de DEC-Her1 y 100 µg de DEC-Her2. Un segundo grupo de ratones de la misma línea se inmunizó con una formulación vacunal monovalente que contenía 100 µg de DEC-Her1, y un tercer grupo se inmunizó con una formulación vacunal monovalente que contenía 100 µg de DEC-Her2. Las tres formulaciones vacunales mencionadas contenían como adyuvante 200µg de VSSP. Las inmunizaciones se realizaron los días 0, 14, 28, 42 y 72, y se extrajo sangre para procesar el suero los días -2, 21, 56, 87 y 102. Mediante la técnica de ELISA se determinaron los títulos de anticuerpos específicos contra los DEC de Her1 y Her2 en el suero.

Los ratones inmunizados con la Vacuna Bivalente Her1+Her2 desarrollaron anticuerpos de isotipo IgG específicos por el DEC-Her1 y por el DEC-Her2. Los títulos de anticuerpos inducidos contra cada uno de estos receptores no difirieron de los inducidos por las respectivas vacunas monovalentes. En el caso de la respuesta de anticuerpos contra el DEC-Her1, los títulos inducidos tanto por la Vacuna Bivalente Her1+Her2 como por la monovalente alcanzaron valores de 1/10.000. La respuesta contra el DEC-Her2 inducida tanto por la Vacuna Bivalente como por la Monovalente alcanzó valores de títulos de anticuerpos de 1/200.000 (Figura 1).

Este resultado demuestra que el hecho de que los dos receptores estén mezclados en una única formulación vacunal no afecta la inmunogenicidad de cada uno de ellos de manera individual, lo cual valida el potencial uso de dicha formulación vacunal.

Ejemplo 2: Reconocimiento de líneas tumorales Her1⁺/Her2⁻, Her1⁻/Her2⁺ por sueros inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2

Sueros provenientes de ratones inmunizados con la Vacuna Bivalente Her1+Her2 y de las Vacunas Monovalentes de Her1 y Her2, diluidos 1/200 se incubaron con 10^5 células de las líneas tumorales: MDA-MB468 (ATCC, HTB-132), derivada de adenocarcinoma de mama y MCF7/Her2, generada a partir de la transfección de la línea MCF7 (ATCC, HTB-22) con Her2 de talla completa. Como controles negativos de especificidad se emplearon los sueros pre-inmunes y como controles positivos se usaron el anticuerpo monoclonal hR3, específico por Her1 y el anticuerpo monoclonal Herceptin, específico por Her2.

Los sueros generados por la Vacuna Bivalente reconocieron el mismo porcentaje de células MDA-MB468 que los sueros generados por la Vacuna Monovalente de Her1. Asimismo, los sueros generados por la Vacuna Bivalente reconocieron el mismo porcentaje de células MCF7/Her2 que los sueros generados por la Vacuna Monovalente de Her2, según la prueba T3 de Dunnet ($p>0.05$) (Figura 2). Además, la intensidad del reconocimiento de estos receptores fue también muy similar (Tabla 1)

Esto demuestra que los anticuerpos inducidos por la formulación bivalente que contiene los receptores Her1 y Her2 truncados no afecta el reconocimiento de los receptores Her1 y Her2 de talla completa en la membrana de las células tumorales. Además, demuestra que no se afecta la calidad de este reconocimiento cuando los anticuerpos contra Her1 y Her2 son generados a partir de una formulación basada en ambos receptores, pues dicho reconocimiento fue igual al de los sueros provenientes de las vacunas monovalentes en cuanto al número de células reconocidas y la intensidad del reconocimiento.

Tratamientos	MDAMB 468	MCF7/Her2
	ImF	ImF
Vac Her1+Her2	440,05	140,99
Vac Her1	370,23	4,31
Vac Her2	4,02	104,05

Tabla1: Intensidad media de fluorescencia (ImF) promedio de las células MDAMB468 y MCF7/Her2 reconocidas por los sueros inmunes generados por los tratamientos.

Ejemplo 3: Reconocimiento de línea tumoral Her1⁺/Her2⁺ por sueros inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2

Sueros provenientes de ratones inmunizados con la Vacuna Bivalente Her1+Her2 y de las vacunas monovalentes de Her1 y Her2, diluidos 1/300 se incubaron con células de la línea tumoral H292 (ATCC, CRL-1848), derivada de carcinoma epidermoide de pulmón. Como controles negativos de especificidad se emplearon los sueros pre-inmunes y como controles positivos se usaron el anticuerpo monoclonal hR3, específico por Her1 y el anticuerpo monoclonal Herceptin, específico por Her2.

El porcentaje de células de la línea H292 reconocidas, fue estadísticamente superior por parte de los sueros generados por la vacuna bivalente, con respecto al reconocimiento de los sueros generados por las vacunas monovalentes de Her1 y Her2, según la prueba de T3 de Dunnet ($p<0.05$)(Figura 3).

Esto demuestra que los anticuerpos policlonales inducidos por la formulación bivalente tienen un mayor umbral de reconocimiento de las células tumorales por su capacidad de

reconocer a ambos receptores, Her1 y Her2, simultáneamente en la membrana de las células. Esto sugiere su mayor potencialidad, con respecto a las vacunas monovalentes, en cuanto al efecto biológico sobre estas células tumorales que esté determinado por el número de receptores reconocidos. Tal es el caso de la inhibición de la activación de los receptores de la familia Her, involucrada en la proliferación de los tumores.

Ejemplo 4: Inhibición de la activación de los receptores Her1 y Her2 por la Vacuna Bivalente Her1+Her2

Sueros provenientes de ratones inmunizados con la Vacuna Bivalente Her1+Her2 y de las vacunas monovalentes de Her1 y Her2, diluidos 1/100 se incubaron con células de la línea tumoral H292. Las células se estimularon con 100 ng/mL de EGF durante 10 minutos y posteriormente se lisaron. El efecto de los sueros inmunes sobre la inhibición de la fosforilación del REGF se determinó mediante un ensayo de western blot, mediante el uso de anticuerpos específicos para la detección del REGF fosforilado y el REGF total. En este ensayo se usó como control positivo de inhibición de la fosforilación el inhibidor tirosina cinasa AG1478 a 10 μ M, y como control negativo de especificidad se usó el suero preinmune.

Los sueros generados por la Vacuna Bivalente inhibieron la activación de los receptores Her1 y Her2, medida en términos de fosforilación, en mayor medida que los sueros de las vacunas monovalentes de Her1 y Her2. Los filmes provenientes de la técnica de western blot se sometieron a análisis densitométrico. Los datos del análisis densitométrico arrojaron que la disminución de la fosforilación de Her1 inducida por los sueros inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2 con respecto al suero preinmune fue de 11.2 veces. Cuando este mismo análisis se realizó para los sueros inducidos por la Vacuna Monovalente de Her1, la disminución de la fosforilación de Her1 fue de 1.7 veces. Para los sueros del grupo correspondiente a la Vacuna Monovalente de Her2 esta disminución fue de 2.2 veces. En el caso de Her2, la disminución de la fosforilación de Her2 inducida por los sueros provenientes de los ratones inmunizados con la Vacuna Bivalente Her1+Her2 con respecto al suero preinmune fue de 8,7 veces. Cuando este mismo análisis se realizó para los sueros inducidos por la Vacuna Monovalente de Her1, la disminución de la fosforilación de Her2 fue de 1,7 veces y para los sueros del grupo correspondiente a la Vacuna Monovalente de Her2 esta disminución fue de 3,5 veces (Figura 4).

Esto demuestra la superioridad de la Vacuna Bivalente con respecto a las monovalentes. La Vacuna Bivalente podría no solo inhibir directamente la fosforilación de los receptores Her1 o Her2 que forman homodímeros (Her1/Her1 y Her2/Her2) a través de anticuerpos bloqueadores de la unión del ligando y contra el brazo de dimerización, sino que pudiera

además ser más eficiente en disminuir la activación de los receptores que se encuentran formando parte de un heterodímero Her1/Her2.

Ejemplo 5: Efecto antiproliferativo de los sueros inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2 sobre una línea tumoral Her1⁺/Her2⁺

Las células H292 se incubaron durante 48 hrs con sueros inducidos en ratones por la Vacuna Bivalente Her1+Her2 y por las vacunas monovalentes de Her1 y Her2, diluidos 1:20. Transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante de cultivo y se adicionó el reactivo MTT a 1mg/mL. Después de 4hrs de incubación, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 µL de dimetilsulfóxido para disolver los cristales de formazán, midiéndose la absorbancia a 540nm y 620nm con un lector de ELISA. Las células viables se evaluaron en términos de la diferencia de absorbancia entre 540nm y 620nm. Se tomó como porcentaje de máxima viabilidad el valor de la absorbancia resultante del suero preinmune.

Las células tumorales tratadas con los sueros inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2 tuvieron una menor viabilidad que las células tumorales incubadas con el suero inducido por las vacunas monovalentes, según la prueba estadística de T3 Dunnet ($p < 0.05$) (Figura 5).

Esto demuestra que la Vacuna Bivalente induce mayor efecto antitumoral, en términos de efecto antiproliferativo, que sus respectivas monovalentes sobre células que expresan los receptores Her1 y Her2. Esto sugiere su potencial como agente terapéutico efectivo sobre tumores epiteliales que expresen ambos receptores.

Ejemplo 6: Dosis no equivalentes del DEC-Her1 y el DEC-Her2 disminuyen la capacidad de los anticuerpos generados de reconocer la línea tumoral H125 / Her1⁺/Her2⁺

Ratones de la línea Balb/c se inmunizaron por vía subcutánea con una formulación vacunal bivalente que contenía combinaciones de los DEC-Her1 y DEC-Her2 no equivalentes. El grupo 1 se inmunizó con 100 µg de DEC-Her1 y 100 µg de DEC-Her2; el grupo 2 con 100 µg de DEC-Her1 y 200 µg de DEC-Her2; el grupo 3 con 100 µg de DEC-Her1 y 300 µg de DEC-Her2; el grupo 4 con 200 µg de DEC-Her1 y 100 µg de DEC-Her2; el grupo 5 con 300 µg de DEC-Her1 y 100 µg de DEC-Her2. Todas las formulaciones vacunales mencionadas contenían como adyuvante 200µg de VSSP. Las inmunizaciones se realizaron los días 0, 14 y 28 por vía subcutáneas y se extrajo sangre para procesar el suero el día 42. Mediante la técnica de ELISA se determinaron los títulos de anticuerpos específicos contra los DEC de Her1 y Her2 en el suero y se evaluó por FACS la capacidad de dichos sueros de reconocer la línea tumoral H125, que expresa los receptores Her1 y Her2 (Figura 6).

El porcentaje de células tumorales reconocidas por los sueros inmunes fue del 100% para todos los grupos evaluados, lo cual se explica por los títulos de anticuerpos inducidos contra

Her1 y Her2 por todas las variantes de formulación evaluadas. Sin embargo, la calidad del reconocimiento, medido en términos de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) fue superior para el grupo 1, en el que se combinaron dosis equivalentes de ambos receptores (Tabla 2).

5

IMF: Intensidad media de fluorescencia

Grupos	G1	G2	G3	G4	G5 ₁₀
DEC-Her1 (µg)	100	100	100	200	300
DEC-Her2 (µg)	100	200	300	100	100
Células reconocidas (%)	100	100	100	100	100 ₁₅
IMF	90,86	71,3	45,7	60,6	53,63

Tabla 2: Reconocimiento de la línea tumoral H125 por los sueros inmunes inducidos por formulaciones vacunales bivalentes Her1+Her2 que contienen dosis equivalentes y no equivalentes de cada receptor.

20

25

30

COMPOSICIONES VACUNALES BIVALENTES Y SU USO PARA LA TERAPIA DE TUMORES

REIVINDICACIONES:

- 5 1- Una composición vacunal que comprende los dominios extracelulares (DECs) de los receptores Her1 y Her2 o fragmentos de estos en la misma proporción y proteoliposomas de muy pequeña talla derivado de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* y el gangliósido GM3 (VSSP-GM3) para inducir una respuesta inmune contra tumores malignos que expresen los receptores Her1 y
10 Her2.
- 2- La composición vacunal de la reivindicación 1 en donde los DECs de los receptores Her1 y Her2 se encuentran en un rango de concentración de aproximadamente 100 a aproximadamente 800 ug/dosis.
- 3- La composición vacunal de la reivindicación 1 caracterizada porque adicionalmente
15 comprende un adyuvante farmacéuticamente adecuado.
- 4- La composición vacunal de la reivindicación 3 caracterizada porque el adyuvante farmacéuticamente adecuado es Montanide ISA 51.
- 5- La composición vacunal de la reivindicación 3 caracterizada porque el adyuvante farmacéuticamente adecuado es Alúmina.
- 20 6- La composición vacunal de la reivindicación 1 para el uso en la inducción de respuesta inmune en un método de tratamiento de tumores malignos que expresen los receptores Her1 y Her2.
- 7- La composición vacunal de la reivindicación 1 para el uso en la inducción de respuesta inmune en un método de tratamiento de tumores malignos que expresen
25 los receptores Her1 y Her2 donde el producto se administra de manera subcutánea.
- 8- La composición vacunal de la reivindicación 1 para el uso en la inducción de respuesta inmune en un tratamiento por vía subcutánea con una frecuencia quincenal por al menos un total de 5 dosis y una dosis de mantenimiento mensual durante al menos un año.
30

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
5 de febrero de 2015 (05.02.2015)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2015/014327 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 39/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2014/000004

(22) Fecha de presentación internacional:
1 de agosto de 2014 (01.08.2014)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
CU-2013-0110
2 de agosto de 2013 (02.08.2013) CU

(71) Solicitante: CENTRO DE INMUNOLOGÍA
MOLECULAR [CU/CU]; Calle 216 esq. 15, Atabey,
Playa, Cuba, P.O. Box 16040, La Habana 11600 (CU).

(72) Inventores: SÁNCHEZ RAMÍREZ, Belinda; Calle 184
No. BEE1 apto 9, entre 1ra y 5ta, Reparto Flores, Playa,
Cuba, La Habana 11300 (CU). YGLESÍAS RIVERA,
Arianna; Calle Segunda, No. 3418 entre Central y
Guarina, Reparto Martín Pérez, San Miguel del Padrón,
Cuba, La Habana 11000 (CU). GUTIÉRREZ PÉREZ,
Amelia; Lucena No. 310 apto 208, entre San Rafael y San
Miguel, Centro Habana, Cuba, La Habana 10200 (CU).
GONZÁLEZ SUÁREZ, Narjara; Calle 74 No. 24010/18
apto 5 entre 240 y 244, La Lisa, Cuba, La Habana 17100
(CU).

(74) Mandatario: LÓPEZ MATILLA, Lien; Calle 216 esq.
15, Atabey, Playa, Cuba, P.O. Box 16040, La Habana
11600 (CU).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN,
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE,
KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO,
RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV,
SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ,
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: DIVALENT VACCINE COMPOSITIONS AND THE USE THEREOF FOR TREATING TUMOURS

(54) Título : COMPOSICIONES VACUNALES BIVALENTES Y SU USO PARA LA TERAPIA DE TUMORES

(57) Abstract: A description is given of vaccine compositions that combine, in equal proportions, the extracellular domains of Her1 and Her2 growth factor receptors or fragments thereof and, in addition, proteoliposomes of very small size deriving from outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* and GM3 ganglioside (GM3/VSSP), which are intended for subcutaneous administration. The compositions described allow antibodies to be induced for treating malignant tumours and offer advantages owing to the fact that they successfully eliminate the entire mass of the tumour and prevent return of the tumour from the appearance of resistant variants.

(57) Resumen: Se describen composiciones vacunales que combinan en igual proporción los dominios extracelulares de los receptores de factores de crecimiento Her1 y Her2 o fragmentos de estos y adicionalmente proteoliposomas de muy pequeña talla derivado de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* y el gangliósido GM3 (VSSP-GM3), que están destinadas a la administración subcutánea. Las composiciones descritas permiten inducir anticuerpos para el tratamiento de tumores malignos y presentan ventajas debido a que logran eliminar totalmente la masa tumoral y evitan la regresión del tumor a partir de la aparición de variantes resistentes.



WO 2015/014327 A1

COMPOSICIONES VACUNALES BIVALENTES Y SU USO PARA LA TERAPIA DE TUMORES

CAMPO TECNICO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se relaciona con la biotecnología y la inmunología aplicada a la salud humana. Particularmente se relaciona con una formulación vacunal para el tratamiento de tumores malignos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Los receptores Her1 y Her2 son glicoproteínas transmembranarias con actividad tirosina cinasa que pertenecen a una familia de cuatro receptores conocida como familia ErbB (Normanno N, y otros, (2005) The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. Curr Drug Targets 6. (3): 243-257). Her1 tiene una alta expresión en tumores de pulmón, mama, cabeza y cuello, colon, páncreas, vejiga, ovario y glioblastomas (Brand TM, y otros, 15 (2011) Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. Cancer Biol Ther 11 (9): 777-792), próstata (Zhau HY y otros, (1996) Androgen-repressed phenotype in human prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 93, (26): 15152-15157; Liu XH, y otros, (1993) Androgens regulate proliferation of human prostate cancer cells in culture by increasing transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) and epidermal growth factor (EGF)/TGF-alpha receptor. J Clin Endocrinol Metab 77 (6): 1472-1478; Neal DE, y 20 otros, (1985) Epidermal-growth-factor receptors in human bladder cancer: comparison of invasive and superficial tumours. Lancet 1 (8425): 366-368; Gullick WJ, y otros, Expression of epidermal growth factor receptors on human cervical, ovarian, and vulval carcinomas. Cancer Res 46 (1): 285-292; Salomon DS, y otros, (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Crit Rev Oncol Hematol 19 (3): 183-232). La sobreexpresión de Her1 se ha asociado con un mal pronóstico de la enfermedad en tumores de cabeza y cuello y pulmón, con un alto riesgo de recurrencia de la enfermedad (Turkeri LN y otros, (1998), Impact of the expression of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor receptor on the prognosis of 30 superficial bladder cancer. Urology 51 (4): 645-649; Chow NH, y otros, (1997) Significance of urinary epidermal growth factor and its receptor expression in human bladder cancer. Anticancer Res 17 (2B): 1293-1296) y con disminución de la sobrevida en pacientes con cáncer de ovario, colon, vejiga, tiroide y cabeza y cuello (Grandis y otros, (1998) Downmodulation of TGF-alpha protein expression with antisense oligonucleotides inhibits proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells. J Cell Biochemr 69 (1):55-62. 35

Además, los niveles de expresión de Her1 se correlacionan con la resistencia a las terapias convencionales (Holbro T, y otros, (2003) The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 284 (1): 99-110). Asimismo, en tumores de mama, gástrico, ovario, y próstata se ha encontrado una expresión aberrada de Her2 en comparación con la expresión en tejidos normales (Tai W y otros, (2010) The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *J Control Release* 146 (3): 264-275). Además, la desregulación de este receptor se ha observado en la transformación maligna del tracto respiratorio (Andrade Filho y cols., 2010) y constituye un mecanismo de resistencia tumoral a las terapias anti-Her1 (Brand y otros, (2011) Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther* 11 (9): 777-792). La sobreexpresión de Her2 en tumores de mama se ha correlacionado con una menor sobrevida total y la sobrevida libre de recaída.

Muchos de los tumores antes mencionados co-expresan altos niveles de Her1 y Her2, y esta sobreexpresión se asocia con una disminución de la sobrevida de los pacientes (Wiseman SM, y otros, (2005) Coexpression of the type 1 growth factor receptor family members HER-1, HER-2, and HER-3 has a synergistic negative prognostic effect on breast carcinoma survival. *Cancer*. May 1;103(9):1770-7.) Los pacientes con tumores mamarios Her2 positivos tienen un alto riesgo de mortalidad asociada a la enfermedad, y en adición, la co-expresión de Her1 y Her2 en estos tumores aumenta notablemente este riesgo, lo que indica que la expresión de Her1 en estos carcinomas tiene un efecto sinérgico sobre la influencia clínica de la expresión de Her2 (Suo Z y otros, (2002) EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J Pathol* 196 (1): 17-25). Se ha demostrado experimentalmente que existe sinergismo en la interacción de estos receptores en la transformación maligna celular (Kokai Y y otros, (1989) Synergistic interaction of p185c-neu and the EGF receptor leads to transformation of rodent fibroblasts. *Cell* 58 (2): 287-292). Otros ejemplos de tumores en los que se ha comprobado la co-expresión de Her1 y Her2 son cáncer de cerebro, ovario, cabeza y cuello, pulmón, esófago y colon (Emanuel SL y otros, (2008) Cellular and in vivo activity of JNJ-28871063, a nonquinazoline pan-ErbB kinase inhibitor that crosses the blood-brain barrier and displays efficacy against intracranial tumors. *Mol Pharmacol* 73 (2): 338-348; Ako E y otros, (2007) The pan-erbB tyrosine kinase inhibitor CI-1033 inhibits human esophageal cancer cells in vitro and in vivo. *Oncol Rep* 17 (4): 887-893; Venkateswarlu S y otros, (2002) Autocrine heregulin generates growth factor independence and blocks apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* 21 (1): 78-86).

Está bien documentado en la literatura el rol fisiológico de la expresión aberrada y co-expresión de los receptores Her1 y Her2 en los tumores. Estos receptores, a través de la formación de dímeros y heterodímeros (Pinkas-Kramarski R y otros, (1996) Diversification of

Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* 15 (10): 2452-2467), regulan procesos indispensables en la biología de los tumores, como la proliferación sostenida, la angiogénesis, la inhibición de la apoptosis, la reprogramación metabólica y la capacidad invasiva y metastásica (Hanahan D y otros (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (5): 646-674).

Ambos receptores Her1 y Her2 tienen una estructura similar que consiste de un dominio extracelular (DEC), un simple dominio transmembrana, y un dominio intracelular con actividad tirosina cinasa. El DEC de Her1 (DEC-Her1) y el DEC de Her2 (DEC-Her2) tienen un peso molecular de 105 y 110 kDa respectivamente, y su conformación en el espacio es independiente del resto de la molécula. Están formados por cuatro subdominios denominados I, II, III y IV. Los subdominios I y III, son las regiones que forman el sitio de unión al ligando y en ellos se encuentran los sitios potenciales de glicosilación. El subdominio II es la región crítica para que ocurra la dimerización entre los receptores, y se le ha denominado "brazo de dimerización" (Garrett TP y otros, (2002) Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 110 (6): 763-773; Ferguson KM y otros, (2003) EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* 11 (2): 507-517).

Se han descrito hasta siete ligandos para Her1, y entre ellos los más importantes para los tumores son el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), que tiene un efecto promotor de la proliferación de células epidérmicas que expresan el receptor, el Factor de Crecimiento Transformante (TGF) y la Anfirregulina (Normanno y otros, (2005) The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Curr Drug Targets* 6 (3): 243-257). El DEC-Her1 se encuentra en un equilibrio dinámico de múltiples conformaciones que incluyen conformaciones "cerradas" y conformaciones donde el subdominio II se encuentra en un estado más flexible. La unión del ligando desplaza el equilibrio hacia una conformación "extendida" o activa, estado conformacional que es competente para la dimerización (Ferguson KM, (2008) Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annu Rev Biophys* 37 353-373).

Para Her2, sin embargo, no se ha identificado ningún ligando específico. La señalización a través de este receptor se hace independiente de factores de crecimiento, pues posee una conformación activa o "extendida" de forma constitutiva que expone su subdominio de dimerización (Cho HS y otros, (2003) Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421 (6924): 756-760). Por esta razón constituye la pareja de dimerización preferencial para los demás miembros de la familia ErbB, entre ellos Her1 (Franklin MC y otros, (2004) Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* 5 (4): 317-328). La heterodimerización con Her2 le

aporta además a Her1 una disminución del grado de endocitosis y aumenta el reciclaje a la membrana de los receptores que forman el heterodímero (Lenferink AE y otros, (1998) Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J* 17 (12): 3385-3397).

- 5 Como describen Baselga J y otros, (2009) Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* 9 (7): 463-475), la dimerización inducida por los ligandos permite la autofosforilación y la transfosforilación de los residuos de tirosina de la región citoplasmática de los receptores. Los residuos de fosfotirosina que se generan, inician múltiples vías de señalización intracelular. Una de las vías de señalización es la de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), en cuya cascada de activación se encuentran las proteínas cinasas reguladas por señales extracelulares Erk1 y Erk2. Estas inducen la expresión de factores de transcripción que incrementan la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular como por ejemplo la ciclina D1, que promueve la progresión del ciclo celular hacia la fase G1/S. Las combinaciones heterodiméricas constituyen los complejos de señalización más potentes y se caracterizan por su control directo sobre el ciclo celular (Pinkas-Kramarski R y otros, (1996) Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* 15 (10): 2452-2467).

Estos blancos tumorales se han validado ampliamente en estudios clínicos. Se ha evaluado el efecto clínico de la terapia con inhibidores de la actividad tirosina cinasa (TKI) de estos receptores, como el gefitinib (Ciardiello F y otros, (2000) Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 6 (5): 2053-2063) y el lapatinib (Kondo N y otros, (2010) Antitumor effects of lapatinib (GW572016), a dual inhibitor of EGFR and HER-2, in combination with cisplatin or paclitaxel on head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 23 (4): 957-963). También hay informes de estudios clínicos que usan la terapia pasiva con anticuerpos monoclonales (AcMs) generados contra dichos blancos tales como cetuximab (Jean GW y otros, (2008) Epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Pharmacotherapy* 8(6):742-54) y nimotuzumab (Ramos TC, y otros, (2006) Treatment of high-grade glioma patients with the humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody h-R3: report from a phase I/II trial. *Cancer Biol Ther* 5 (4): 375-379), que son específicos para el dominio extracelular (DEC) de Her1, y trastuzumab que reconoce al DEC de Her2 (Clifford A, (2007) Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice *N Engl J Med*; 357:39-51). A pesar del potente efecto antitumoral de algunas de estas terapias, como por ejemplo el cetuximab, se han descrito mecanismos de resistencia asociados al empleo de las mismas, entre los cuales se encuentra el aumento de los niveles de expresión de otro

receptor de la familia, como puede ser Her2 (Brand TM y otros, (2011) Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther* 11 (9): 777-792). Por otra parte, se ha encontrado que existe una mejor respuesta al AcM anti-Her1 pertuzumab en carcinomas de mama y pulmón que expresan heterodímeros de Her2 con los otros miembros de la familia ErbB (Agus DB y otros, (2005) Phase I clinical study of pertuzumab, a novel HER dimerization inhibitor, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 23 (11): 2534-2543). Esto refuerza la idea de que la inhibición de la heterodimerización constituye una estrategia atractiva para la terapia del cáncer.

Además, la terapia activa con vacunas de cáncer también ha surgido como una nueva alternativa terapéutica cuyo objetivo es activar la respuesta del sistema inmune de los pacientes contra los tumores que expresan los receptores Her1 y Her2. Este tipo de terapia sin embargo ha tenido el reto de estimular a un sistema inmune deprimido por el efecto supresor del tumor, por lo que las formulaciones vacunales deben usar adyuvantes que contribuyan a generar una respuesta efectiva. Tal es el caso del adyuvante de proteoliposomas de muy pequeña talla (VSSP), derivado de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*, capaz de activar células dendríticas (DC) y polarizar la respuesta inmune hacia el patrón de respuesta cooperadora tipo 1 (Th1) descrito en la patente WO 02/45746 presentada el 6 de diciembre de 2001.

Los receptores Her1 y Her2 han sido blancos de diferentes candidatos vacunales, evaluados en estudios clínicos y preclínicos. En el diseño de vacunas basadas en Her2 se han usado vacunas de DCs (Czerniecki BJ y otros, (2007) Targeting HER-2/neu in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion. *Cancer Res* 67 (4): 1842-1852), péptidos de Her2 y el DEC-Her2 (Ladjemi MZ y otros, (2010) Anti-HER2 vaccines: new prospects for breast cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 59 (9): 1295-1312). En estudios clínicos fase II en pacientes con cáncer de mama se evaluó la inmunización activa con el péptido p369-377 (péptido E75) derivado del DEC de Her2 presentado por MHC-I, adyuvado en factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Esta vacuna es capaz de generar CTL *in vivo* específicos por células que sobreexpresan Her2 y se encuentra actualmente en estudios clínicos fase II (Knutson KL y otros, (2002) Immunization of cancer patients with a HER-2/neu, HLA-A2 peptide, p369-377, results in short-lived peptide-specific immunity. *Clin Cancer Res* 8 (5): 1014-1018; Patil R y otros, (2010) Clinical and immunologic responses of HLA-A3+ breast cancer patients vaccinated with the HER2/neu-derived peptide vaccine, E75, in a phase I/II clinical trial. *J Am Coll Surg* 210 (2): 140-147). Además, se ha diseñado una vacuna terapéutica basada el DEC de Her2 adyuvada en GM-CSF que es capaz de retardar el crecimiento de carcinomas que expresan Her2, así como prolongar la supervivencia de animales inmunizados (Helguera y otros, (2006) Vaccination with novel combinations of

anti-HER2/neu cytokines fusion proteins and soluble protein antigen elicits a protective immune response against HER2/neu expressing tumors. *Vaccine* 16;24(3):304-16).

En la solicitud de patente EP-A-661061 y en la patente US-A-6149921, se describen composiciones vacunales para estimular o incrementar la respuesta de anticuerpos frente a los gangliósidos consistentes en un inmunógeno y un adyuvante inmunológico. Los inmunógenos descritos son VSSP (proteoliposomas de muy pequeño tamaño) constituidos por la asociación de los gangliósidos GM3 (N-acetilado), y N-GlicolilGM3 (N-AcGM3) y (N-GcGM3), con el complejo proteico de la membrana externa (OMP o CPME) de la bacteria *Neisseria meningitidis*. Dichos inmunógenos, N-AcGM3/VSSP y N-GcGM3/VSSP, son de tamaño muy pequeño, prácticamente invisibles al microscopio electrónico, solubles en agua y de gran flotabilidad.

En la solicitud de patente WO-A-02145746 se describen composiciones vacunales que contienen: (A) uno o más antígenos poco inmunogénicos; (B) VSSP con gangliósidos incorporados, principalmente N-AcGM3/VSSP y N-GcGM3/VSSP; y (C) eventualmente uno o más adyuvantes. Particularmente se describe una vacuna cuyo principio activo es el DEC-Her1 y usa como adyuvantes VSSP y Montanide ISA51 VG. Estudios preclínicos con esta vacuna demostraron su efecto antitumoral *in vitro* e *in vivo* (Ramirez BS, y otros, (2006) Active antimetastatic immunotherapy in Lewis lung carcinoma with self EGFR extracellular domain protein in VSSP adjuvant. *Int J Cancer* 119 (9): 2190-2199; Ramirez BS, y otros (2008) Anti-EGFR activation, anti-proliferative and pro-apoptotic effects of polyclonal antibodies induced by EGFR-based cancer vaccine. *Vaccine* 26 (38): 4918-4926). A pesar de los resultados obtenidos con las terapias monovalentes, estas no han sido suficientemente eficaces debido a que no se logra eliminar totalmente la masa tumoral y cuando esta disminuye, al cabo del tiempo ocurre una regresión del tumor a partir de la aparición de variantes resistentes. Esto sugiere que las perturbaciones puntuales no son capaces de abrogar sistemas tan complejos como los tumores. La explicación pudiera ser que como se conoce hoy las variantes resistentes generadas por las monoterapias dirigidas a miembros de la familia ErbB, aumentan los niveles de expresión de otros miembros de dicha familia (Brand TM, y otros, (2011) Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther* 11 (9): 777-792) permitiéndole a los tumores escapar del ataque del sistema inmune. De manera que una perturbación múltiple en la biología de los tumores a través de la inactivación de más de un receptor ErbB pudiera redundar en un aumento de la eficacia.

La solicitud de patente WO-A-02145746 también reclama una composición que comprende los receptores de factores de crecimiento son el HER-1, HER-2, R-PDGF o cualquiera de sus variantes que contenga el dominio extracelular con y sin región transmembrana. Sin embargo, dicha solicitud ni ningún otro documento de la técnica enseña cómo combinar dos

receptores, particularmente los DEC's de los receptores Her1 y Her2 para producir una Vacuna Bivalente que se eficaz en inducir la producción de anticuerpos en el individuo vacunado.

Los autores de la presente invención han descubierto que al mezclar en la misma proporción los DEC's de los receptores Her1 y Her2 y VSSP-GM3 se obtiene una composición vacunal que es capaz de inducir la producción de títulos de anticuerpos que inhiben inhibición de la fosforilación de Her1 y Her2 y que dichos anticuerpos tienen un efecto antiproliferativo sobre células tumorales. Los inventores también encontraron que la proporción en que se combinan los DEC's de los receptores Her1 y Her2 es decisiva para la obtención de la respuesta inmune deseada, es decir, que no es cualquier combinación de combinan los DEC's de los receptores Her1 y Her2 la que desencadena dicha respuesta inmune.

Son objeto de la presente invención nuevas composiciones vacunales con la misma proporción de los DEC's de los receptores Her1 y Her2 y VSSP-GM3 para la administración por vía subcutánea.

Es también objeto de la presente invención un método para el tratamiento de un paciente que sufre de una enfermedad provocada por un tumor que expresa los receptores de los factores de crecimiento Her1 y Her2 que comprende la administración por vía subcutánea de una composición vacunal de los DEC's de los receptores Her1 y Her2 y VSSP-GM3, en donde los DEC's de los receptores Her1 y Her2 se encuentran en igual proporción.

También forman parte del objeto de la presente invención las composiciones vacunales con igual proporción de los DEC's de los receptores Her1 y Her2 y VSSP-GM3 y un adyuvante adicional que puede ser oleoso o no oleoso.

Adicionalmente es objeto de la presente invención el uso en la inducción de respuesta inmune para un método de tratamiento de tumores malignos que expresen los receptores Her1 y Her2.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION:

La presente invención se refiere a una composición vacunal que comprende los dominios extracelulares (DEC's) de los receptores Her1 y Her2 o fragmentos de estos para inducir una respuesta inmune contra tumores malignos que expresen los receptores Her1 y Her2. Esta composición vacunal adicionalmente comprende proteoliposomas de muy pequeña talla derivado de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* y el gangliósido GM3 (VSSP-GM3). En una modalidad particular la composición de la presente invención comprende adicionalmente un adyuvante farmacéuticamente adecuado. Estos adyuvantes farmacéuticamente adecuados pueden ser sin limitarse a un adyuvante oleoso, tal como por ejemplo aceite mineral altamente purificado (Drakeol 6VR) y un agente tensioactivo definido

como un éster de azúcar manitol y ácido oleico (monooleato de manida), Montanide ISA 51, o no oleoso, tal como Alúmina.

Sorprendentemente los inventores de la presente encontraron que la proporción en que se combinan los DEC's de los receptores es importante para inducir una respuesta inmune

5 contra tumores malignos que expresen los receptores Her1 y Her2. La composición vacunal bivalente descrita en la presente comprende los DEC's de los receptores Her1 y Her2 en igual proporción. La mezcla de ambos principios activos, es decir los DEC's de los receptores Her1 y Her2 mezclados en otras proporciones no provoca el efecto deseado sobre el sistema inmune. En una modalidad la composición de la presente invención

10 comprende los DEC's de los receptores Her1 y Her2 en un rango de concentración de aproximadamente 100 a aproximadamente 800 ug/dosis. Más particularmente la composición de la presente invención comprende 800 ug/dosis de cada uno de los DEC's de los receptores Her1 y Her2 o fragmentos de estos y adicionalmente comprende 1.2 mg/dosis de VSSP-GM3, puede ser en solución acuosa para la administración subcutánea.

15 En otra modalidad estas dosis de 800 ug/dosis de cada uno de los DEC's de los receptores Her1 y Her2 o fragmentos de estos y 1.2 mg/dosis de VSSP-GM3 se pueden mezclar con un adyuvante que puede ser Montanide ISA 51 o Alúmina.

En una modalidad, la presente invención se refiere a una composición vacunal que comprende los DEC's de los receptores Her1 y Her2 o fragmentos de estos para el uso en la

20 inducción de respuesta inmune para un método de tratamiento de tumores malignos que expresen los receptores Her1 y Her2. El método de tratamiento de la presente invención comprende la administración subcutánea de al menos una dosis de los DEC's de los receptores Her1 y Her2 o fragmentos de estos en un intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 800 ug/dosis y adicionalmente de aproximadamente 200 ug/dosis a

25 aproximadamente 1.2 mg/dosis de VSSP-GM3. La administración puede ser por inyección subcutánea con una frecuencia quincenal a completar 5 dosis y posteriormente una dosis de mantenimiento durante 1 año. En una modalidad particular la presente invención comprende la composición vacunal con el adyuvante Montanide ISA 51, para la administración intramuscular.

30 Los DEC's de los receptores Her1 y Her2 o fragmentos de estos se pueden obtener por síntesis de proteínas o por técnicas de ingeniería de genes.

En la presente invención se usan indistintamente los términos formulación vacunal bivalente o composición vacunal bivalente y en todos los casos se refiere a la composición vacunal que comprende los dominios extracelulares (DEC's) de los receptores Her1 y Her2 o

35 fragmentos de estos para inducir una respuesta inmune contra tumores malignos que expresen los receptores Her1 y Her2 y que adicionalmente comprende VSSP-GM3.

Los tumores malignos que se pueden tratar comprenden los tumores que expresan al menos uno de los receptores de la familia Her, particularmente Her1 y/o Her2. Preferentemente los tumores que expresan ambos receptores y con mayor preferencia aquellos tumores que sobreexpresan ambos receptores. En una modalidad preferida
5 comprende tumores de origen epidérmico y más particularmente tumores de cabeza y cuello, mama, pulmón, colon, páncreas, próstata, vejiga, ovario y glioma.

Las abreviaturas AcMs y AcPs se refiere a anticuerpos monoclonales y policlonales respectivamente.

10 BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS:

La Figura 1 muestra la cinética de Acs IgG en ratones BALB/c (n=5) inmunizados por vía subcutánea cuatro veces cada 14 días, y una vez 30 días después de la última inmunización, con 100 µg del DEC-Her1 y 100 µg del DEC-Her2 en 200µg de VSSP. Se realizaron extracciones de sangre los días 7, 21, 35, 56, 87 y 102 para medir por ELISA los
15 títulos de Acs IgG presentes en los sueros inmunes. Se muestra la cinética de Acs IgG en términos de la media del logaritmo del recíproco del título más 1 para cada día de extracción, cuando se recubrió con el DEC-Her1 (a) y el DEC-Her2 (b). Se muestra la respuesta de Acs de ratones individuales (n=5) específicos por el DEC-Her1 (c) y el DEC-Her2 (d) graficando el logaritmo del recíproco del título de Acs más 1, para el día 87 del
20 protocolo de inmunización. Letras diferentes indican significación estadística según la prueba de Anova dos vías (factor grupo de tratamiento), prueba de Bonferroni ($p < 0.05$).

La Figura 2 muestra el reconocimiento de las líneas tumorales MDAMB468 y MCF7/Her2 por los sueros inmunes inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2 y las Vacunas Monovalentes de Her1 y Her2, por citometría de flujo. Las líneas tumorales humanas que se
25 indican se incubaron con los sueros inmunes (n=5) o con una mezcla de sueros pre-inmunes diluidos 1:200, correspondientes al día 35 del protocolo de inmunización; así como con los controles de expresión de los receptores: los AcMs nimotuzumab y trastuzumab a 10µg/ml. Luego, las células se marcaron con AcPs de carnero anti IgG de ratón, conjugados a isotiocianato de fluoresceína. Las células marcadas se visualizaron por citometría de flujo.
30 El porcentaje de células reconocidas por los sueros y los AcMs se obtuvo usando el programa Flow Jo versión 5.7.2. Letras diferentes indican significación estadística según la prueba de Anova dos vías (factor grupo de tratamiento), prueba de Bonferroni ($p < 0.05$).

La Figura 3 muestra el reconocimiento de la línea tumoral H292 por los sueros inmunes inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2 y las Vacunas Monovalentes de Her1 y Her2, por citometría de flujo. Las células tumorales humanas se incubaron con los sueros inmunes
35 (n=5) o con una mezcla de sueros pre-inmunes diluidos 1:300, correspondientes al día 35 del protocolo de inmunización; así como con los controles de expresión de los receptores:

los AcMs nimotuzumab y trastuzumab a 10µg/ml. Luego, las células se marcaron con AcPs de carnero anti IgG de ratón, conjugados a isotiocianato de fluoresceína. Las células marcadas se visualizaron por citometría de flujo. El porcentaje de células reconocidas por los sueros y los AcMs se obtuvo usando el programa Flow Jo versión 5.7.2. Letras diferentes indican significación estadística según la prueba de Anova dos vías (factor grupo de tratamiento), prueba de Bonferroni ($p < 0.05$).

La Figura 4 muestra la inhibición de la fosforilación de Her1 y Her2 por los sueros inmunes inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2. Las células H292 se incubaron con una mezcla de cinco sueros inmunes inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2 y las Vacunas Monovalentes de Her1 y Her2. Los niveles de fosforilación de Her1 y Her2 después de la estimulación con EGF y con los diferentes tratamientos se determinaron mediante Western blot. Como control negativo se usaron células no tratadas y como control negativo de especificidad el tratamiento con una mezcla de sueros pre-inmunes (PI). Se usó el TKI AG1478 como control positivo de inhibición. Las fotografías muestran los niveles de P-Her1 (a) y P-Her2 (b) con los distintos tratamientos. Los gráficos de barra muestran el análisis densitométrico de las fotografías de un experimento representativo de dos realizados.

La Figura 5 muestra el efecto antiproliferativo de los Acs inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2 sobre la línea tumoral H292. Las células H292 se incubaron durante 48 horas con una mezcla de cinco sueros inmunes, diluidos 1:20, correspondientes al día 87 del protocolo de inmunización. La mezcla de sueros PI se usó como control negativo del experimento. La viabilidad celular se determinó por el método colorimétrico del MTT, determinando la diferencia de absorbancia a 540 y 620 nm. El porcentaje de máxima viabilidad se le adjudicó a la diferencia de absorbancia correspondiente a la incubación con el suero PI. Las barras representan la media de los triplicados de tres experimentos, para cada tratamiento. Letras diferentes indican significación estadística según la prueba de T3 Dunnet, para a vs b, $p < 0.01$ y para a vs c, $p < 0.001$.

La Figura 6 muestra los títulos de Acs específicos por el DEC-Her1 y el DEC-Her2 inducidos por formulaciones de la Vacuna Bivalente Her1+Her2 que contienen cantidades equivalentes o no equivalentes de cada receptor. Ratones BALB/c ($n=5$) se inmunizaron por vía subcutánea cuatro veces cada 14 días con: Grupo 1, 100 µg del DEC-Her1 y 100 µg del DEC-Her2; Grupo 2, 100 µg del DEC-Her1 y 200 µg del DEC-Her2; Grupo 3, 100 µg del DEC-Her1 y 300 µg del DEC-Her2; Grupo 4, 200 µg del DEC-Her1 y 100 µg del DEC-Her2; Grupo 5, 300 µg del DEC-Her1 y 100 µg del DEC-Her2. Todas las formulaciones contenían 200µg de VSSP. Se realizó la determinación de títulos de anticuerpos en el suero específicos por DEC-Her1 y específicos por el DEC-Her2 mediante la técnica de ELISA, a partir de una extracción de sangre realizada el día 56. Los títulos de Acs IgG presentes en

los sueros inmunes. Se muestra la cinética de Acs IgG en términos de la media del logaritmo del recíproco del título más 1 para cada día de extracción, cuando se recubrió con el DEC-Her1 (a) y el DEC-Her2 (b). Se muestra la respuesta de Acs IgG de ratones individuales (n=5) graficando el inverso del título de anticuerpos. No se apreciaron
5 diferencias estadísticas según la prueba de Anova dos vías (factor grupo de tratamiento), prueba de Bonferroni ($p < 0.05$).

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no para limitarla.

EJEMPLOS:

Ejemplo 1: Títulos de anticuerpos específicos contra el DEC-Her1 y DEC-Her2 inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2

Ratones de la línea Balb/c se inmunizaron por vía subcutánea con una formulación vacunal bivalente que contenía 100 µg de DEC-Her1 y 100 µg de DEC-Her2. Un segundo grupo de ratones de la misma línea se inmunizó con una formulación vacunal monovalente que
15 contenía 100 µg de DEC-Her1, y un tercer grupo se inmunizó con una formulación vacunal monovalente que contenía 100 µg de DEC-Her2. Las tres formulaciones vacunales mencionadas contenían como adyuvante 200µg de VSSP. Las inmunizaciones se realizaron los días 0, 14, 28, 42 y 72, y se extrajo sangre para procesar el suero los días -2, 21, 56, 87 y 102. Mediante la técnica de ELISA se determinaron los títulos de anticuerpos específicos
20 contra los DEC de Her1 y Her2 en el suero.

Los ratones inmunizados con la Vacuna Bivalente Her1+Her2 desarrollaron anticuerpos de isotipo IgG específicos por el DEC-Her1 y por el DEC-Her2. Los títulos de anticuerpos inducidos contra cada uno de estos receptores no difirieron de los inducidos por las respectivas vacunas monovalentes. En el caso de la respuesta de anticuerpos contra el
25 DEC-Her1, los títulos inducidos tanto por la Vacuna Bivalente Her1+Her2 como por la monovalente alcanzaron valores de 1/10.000. La respuesta contra el DEC-Her2 inducida tanto por la Vacuna Bivalente como por la Monovalente alcanzó valores de títulos de anticuerpos de 1/200.000 (Figura 1).

Este resultado demuestra que el hecho de que los dos receptores estén mezclados en una
30 única formulación vacunal no afecta la inmunogenicidad de cada uno de ellos de manera individual, lo cual valida el potencial uso de dicha formulación vacunal.

Ejemplo 2: Reconocimiento de líneas tumorales Her1⁺/Her2⁻, Her1⁻/Her2⁺ por sueros inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2

Sueros provenientes de ratones inmunizados con la Vacuna Bivalente Her1+Her2 y de las Vacunas Monovalentes de Her1 y Her2, diluidos 1/200 se incubaron con 10⁵ células de las líneas tumorales: MDA-MB468 (ATCC, HTB-132), derivada de adenocarcinoma de mama y

MCF7/Her2, generada a partir de la transfección de la línea MCF7 (ATCC, HTB-22) con Her2 de talla completa. Como controles negativos de especificidad se emplearon los sueros pre-inmunes y como controles positivos se usaron el anticuerpo monoclonal hR3, específico por Her1 y el anticuerpo monoclonal Herceptin, específico por Her2.

- 5 Los sueros generados por la Vacuna Bivalente reconocieron el mismo porcentaje de células MDA-MB468 que los sueros generados por la Vacuna Monovalente de Her1. Asimismo, los sueros generados por la Vacuna Bivalente reconocieron el mismo porcentaje de células MCF7/Her2 que los sueros generados por la Vacuna Monovalente de Her2, según la prueba T3 de Dunnet ($p>0.05$) (Figura 2). Además, la intensidad del reconocimiento de estos
10 receptores fue también muy similar (Tabla 1)

Esto demuestra que los anticuerpos inducidos por la formulación bivalente que contiene los receptores Her1 y Her2 truncados no afecta el reconocimiento de los receptores Her1 y Her2 de talla completa en la membrana de las células tumorales. Además, demuestra que no se afecta la calidad de este reconocimiento cuando los anticuerpos contra Her1 y Her2
15 son generados a partir de una formulación basada en ambos receptores, pues dicho este fue igual al de los sueros provenientes de las vacunas monovalentes en cuanto al número de células reconocidas y la intensidad del reconocimiento.

Tratamientos	MDAMB 468	MCF7/Her2
	ImF	ImF
Vac Her1 - Her2	440,05	140,99
Vac Her1	370,23	4,31
Vac Her2	4,02	104,05

20 Tabla1: Intensidad media de fluorescencia. (ImF) promedio de las células MDAMB468 y MCF7/Her2 reconocidas por los sueros inmunes generados por los tratamientos.

Ejemplo 3: Reconocimiento de línea tumoral Her1⁺/Her2⁺ por sueros inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2

25 Sueros provenientes de ratones inmunizados con la Vacuna Bivalente Her1+Her2 y de las vacunas monovalentes de Her1 y Her2, diluidos 1/300 se incubaron con células de la línea tumoral H292 (ATCC, CRL-1848), derivada de carcinoma epidermoide de pulmón. Como controles negativos de especificidad se emplearon los sueros pre-inmunes y como controles positivos se usaron el anticuerpo monoclonal hR3, específico por Her1 y el anticuerpo monoclonal Herceptin, específico por Her2.

30 El porcentaje de células de la línea H292 reconocidas, fue estadísticamente superior por parte de los sueros generados por la vacuna bivalente, con respecto al reconocimiento de

los sueros generados por las vacunas monovalentes de Her1 y Her2, según la prueba de T3 de Dunnet ($p < 0.05$) (Figura 3).

Esto demuestra que los anticuerpos policlonales inducidos por la formulación bivalente tienen un mayor umbral de reconocimiento de las células tumorales por su capacidad de reconocer a ambos receptores, Her1 y Her2, simultáneamente en la membrana de las células. Esto sugiere su mayor potencialidad, con respecto a las vacunas monovalentes, en cuanto al efecto biológico sobre estas células tumorales que esté determinado por el número de receptores reconocidos. Tal es el caso de la inhibición de la activación de los receptores de la familia Her, involucrada en la proliferación de los tumores.

Ejemplo 4: Inhibición de la activación de los receptores Her1 y Her2 por la Vacuna Bivalente Her1+Her2

Sueros provenientes de ratones inmunizados con la Vacuna Bivalente Her1+Her2 y de las vacunas monovalentes de Her1 y Her2, diluidos 1/100 se incubaron con células de la línea tumoral H292. Las células se estimularon con 100 ng/mL de EGF durante 10 minutos y posteriormente se lisaron. El efecto de los sueros inmunes sobre la inhibición de la fosforilación del REGF se determinó mediante un ensayo de western blot, mediante el uso de anticuerpos específicos para la detección del REGF fosforilado y el REGF total. En este ensayo se usó como control positivo de inhibición de la fosforilación el inhibidor tirocina cinasa AG1478 a 10 μ M, y como control negativo de especificidad se usó el suero preinmune.

Los sueros generados por la Vacuna Bivalente inhibieron la activación de los receptores Her1 y Her2, medida en términos de fosforilación, en mayor medida que los sueros de las vacunas monovalentes de Her1 y Her2. Los filmes provenientes de la técnica de western blot se sometieron a análisis densitométrico. Los datos del análisis densitométrico arrojaron que la disminución de la fosforilación de Her1 inducida por los sueros inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2 con respecto al suero preinmune fue de 11.2 veces. Cuando este mismo análisis se realizó para los sueros inducidos por la Vacuna Monovalente de Her1, la disminución de la fosforilación de Her1 fue de 1.7 veces. Para los sueros del grupo correspondiente a la Vacuna Monovalente de Her2 esta disminución fue de 2.2 veces. En el caso de Her2, la disminución de la fosforilación de Her2 inducida por los sueros provenientes de los ratones inmunizados con la Vacuna Bivalente Her1+Her2 con respecto al suero preinmune fue de 8,7 veces. Cuando este mismo análisis se realizó para los sueros inducidos por la Vacuna Monovalente de Her1, la disminución de la fosforilación de Her2 fue de 1,7 veces y para los sueros del grupo correspondiente a la Vacuna Monovalente de Her2 esta disminución fue de 3,5 veces (Figura 4).

Esto demuestra la superioridad de la Vacuna Bivalente con respecto a las monovalentes. La Vacuna Bivalente podría no solo inhibir directamente la fosforilación de los receptores Her1 o Her2 que forman homodímeros (Her1/Her1 y Her2/Her2) a través de anticuerpos bloqueadores de la unión del ligando y contra el brazo de dimerización, sino que pudiera además ser más eficiente en disminuir la activación de los receptores que se encuentran formando parte de un heterodímero Her1/Her2.

Ejemplo 5: Efecto antiproliferativo de los sueros inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2 sobre una línea tumoral Her1⁺/Her2⁺

Las células H292 se incubaron durante 48 hrs con sueros inducidos en ratones por la Vacuna Bivalente Her1+Her2 y por las vacunas monovalentes de Her1 y Her2, diluidos 1:20. Transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante de cultivo y se adicionó el reactivo MTT a 1mg/mL. Después de 4hrs de incubación, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 µL de dimetilsulfóxido para disolver los cristales de formazán, midiéndose la absorbancia a 540nm y 620nm con un lector de ELISA. Las células viables se evaluaron en términos de la diferencia de absorbancia entre 540nm y 620nm. Se tomó como porcentaje de máxima viabilidad el valor de la absorbancia resultante del suero preinmune.

Las células tumorales tratadas con los sueros inducidos por la Vacuna Bivalente Her1+Her2 tuvieron una menor viabilidad que las células tumorales incubadas con el suero inducido por las vacunas monovalentes, según la prueba estadística de T3 Dunnet ($p < 0.05$) (Figura 5).

Esto demuestra que la Vacuna Bivalente induce mayor efecto antitumoral, en términos de efecto antiproliferativo, que sus respectivas monovalentes sobre células que expresan los receptores Her1 y Her2. Esto sugiere su potencial como agente terapéutico efectivo sobre tumores epiteliales que expresen ambos receptores.

Ejemplo 6: Dosis no equivalentes del DEC-Her1 y el DEC-Her2 disminuyen la capacidad de los anticuerpos generados de reconocer la línea tumoral H125 / Her1⁺/Her2⁺

Ratones de la línea Balb/c se inmunizaron por vía subcutánea con una formulación vacunal bivalente que contenía combinaciones de los DEC-Her1 y DEC-Her2 no equivalentes. El grupo 1 se inmunizó con 100 µg de DEC-Her1 y 100 µg de DEC-Her2; el grupo 2 con 100 µg de DEC-Her1 y 200 µg de DEC-Her2; el grupo 3 con 100 µg de DEC-Her1 y 300 µg de DEC-Her2; el grupo 4 con 200 µg de DEC-Her1 y 100 µg de DEC-Her2; el grupo 5 con 300 µg de DEC-Her1 y 100 µg de DEC-Her2. Todas las formulaciones vacunales mencionadas contenían como adyuvante 200µg de VSSP. Las inmunizaciones se realizaron los días 0, 14 y 28 por vía subcutáneas y se extrajo sangre para procesar el suero el día 42. Mediante la técnica de ELISA se determinaron los títulos de anticuerpos específicos contra los DEC de

Her1 y Her2 en el suero y se evaluó por FACS la capacidad de dichos sueros de reconocer la línea tumoral H125, que expresa los receptores Her1 y Her2 (Figura 6).

El porcentaje de células tumorales reconocidas por los sueros inmunes fue del 100% para todos los grupos evaluados, lo cual se explica por los títulos de anticuerpos inducidos contra Her1 y Her2 por todas las variantes de formulación evaluadas. Sin embargo, la calidad del reconocimiento, medido en términos de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) fue superior para el grupo 1, en el que se combinaron dosis equivalentes de ambos receptores (Tabla 2).

Grupos	G1	G2	G3	G4	G5 ₁₀
DEC-Her1 (µg)	100	100	100	200	300
DEC-Her2 (µg)	100	200	300	100	100
Células reconocidas (%)	100	100	100	100	100 ₁₅
IMF	90,86	71,3	45,7	60,6	53,63

Tabla 2: Reconocimiento de la línea tumoral H125 por los sueros inmunes inducidos por formulaciones vacunales bivalentes Her1+Her2 que contienen dosis equivalentes y no equivalentes de cada receptor.

IMF: Intensidad media de fluorescencia

COMPOSICIONES VACUNALES BIVALENTES Y SU USO PARA LA TERAPIA DE TUMORES

REIVINDICACIONES:

- 5 1- Una composición vacunal que comprende los DEC's de los receptores Her1 y Her2 o fragmentos de estos en la misma proporción y proteoliposomas de muy pequeña talla derivado de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* y el gangliósido GM3 (VSSP-GM3) para inducir una respuesta inmune contra tumores malignos que expresen los receptores Her1 y Her2.
- 10 2- La composición vacunal de la reivindicación 1 en donde los DEC's de los receptores Her1 y Her2 se encuentran en un rango de concentración de aproximadamente 100 a aproximadamente 800 ug/dosis.
- 3- La composición vacunal de la reivindicación 1 caracterizada porque adicionalmente comprende un adyuvante farmacéuticamente adecuado.
- 15 4- La composición vacunal de la reivindicación 3 caracterizada porque el adyuvante farmacéuticamente adecuado es Montanide ISA 51.
- 5- La composición vacunal de la reivindicación 3 caracterizada porque el adyuvante farmacéuticamente adecuado es Alúmina.
- 20 6- La composición vacunal de la reivindicación 1 para el uso en la inducción de respuesta inmune en un método de tratamiento de tumores malignos que expresen los receptores Her1 y Her2.
- 7- La composición vacunal de la reivindicación 1 para el uso en la inducción de respuesta inmune en un método de tratamiento de tumores malignos que expresen los receptores Her1 y Her2 donde el producto se administra de manera subcutánea.
- 25 8- La composición vacunal de la reivindicación 1 para el uso en la inducción de respuesta inmune en un tratamiento por vía subcutánea con una frecuencia quincenal por al menos un total de 5 dosis y una dosis de mantenimiento mensual durante al menos un año.

Figura 1

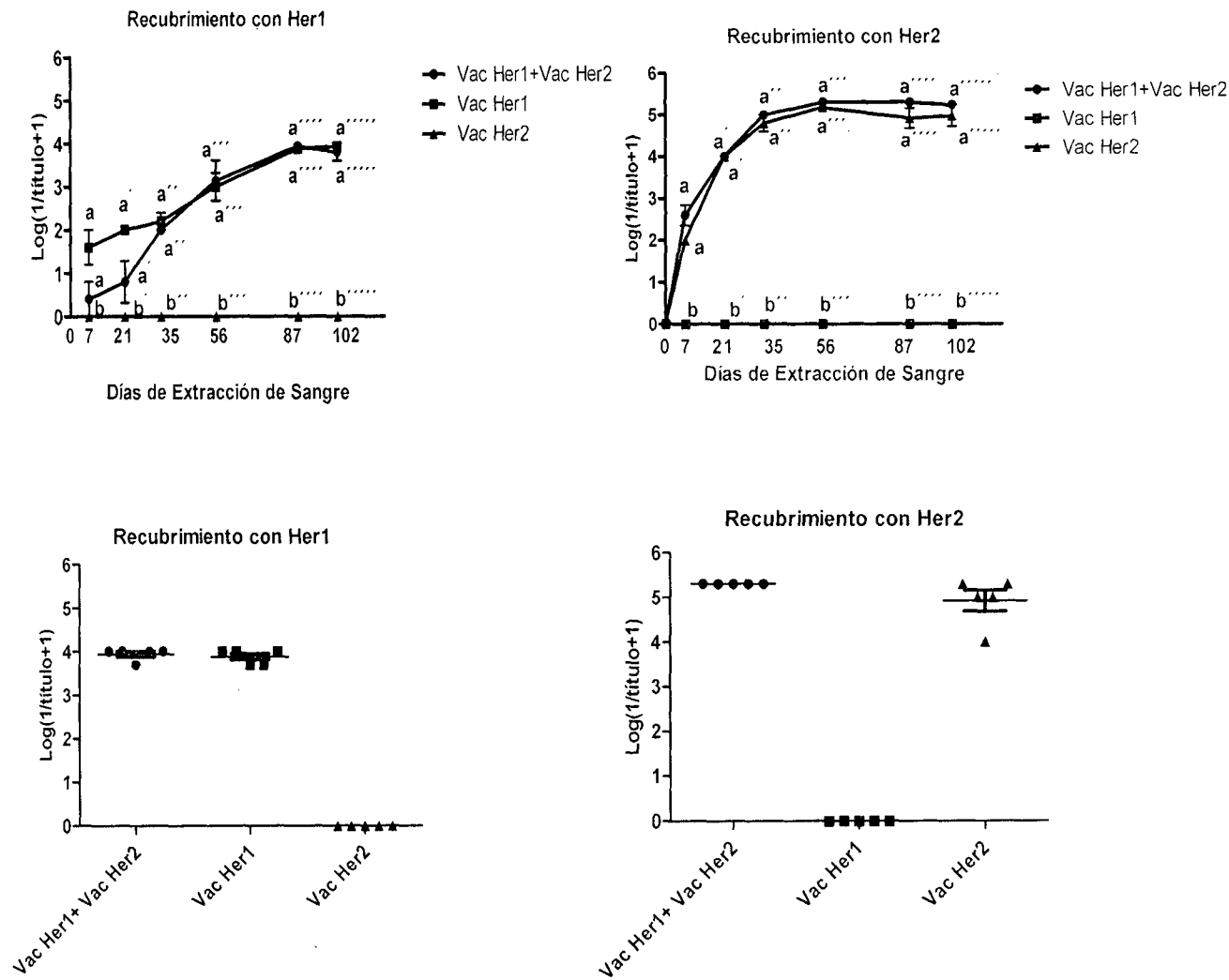


Figura 2

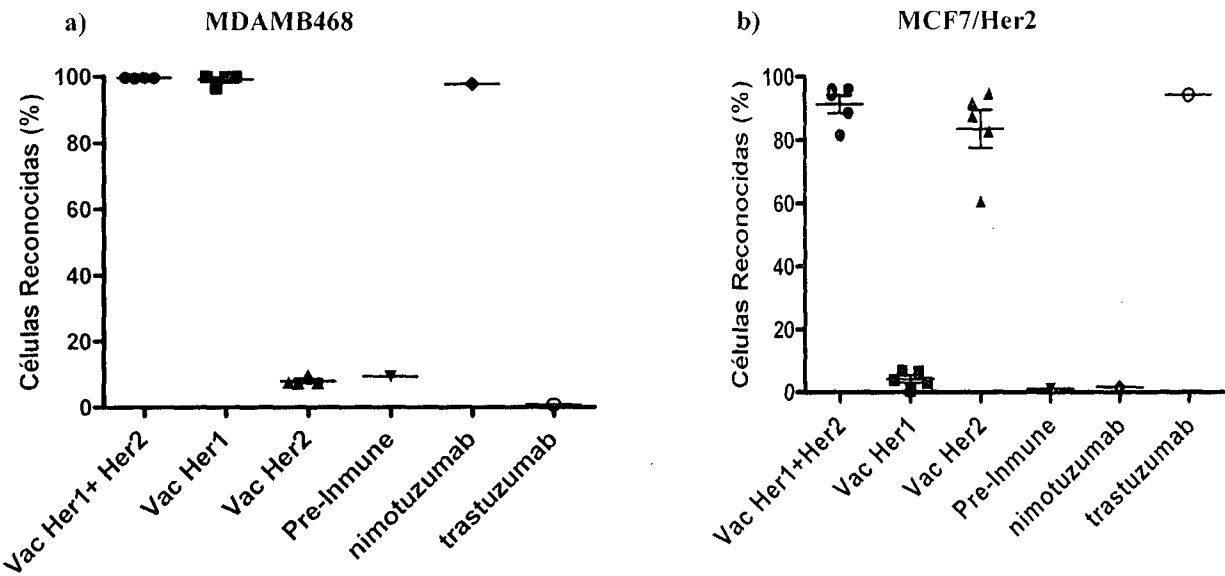


Figura 3

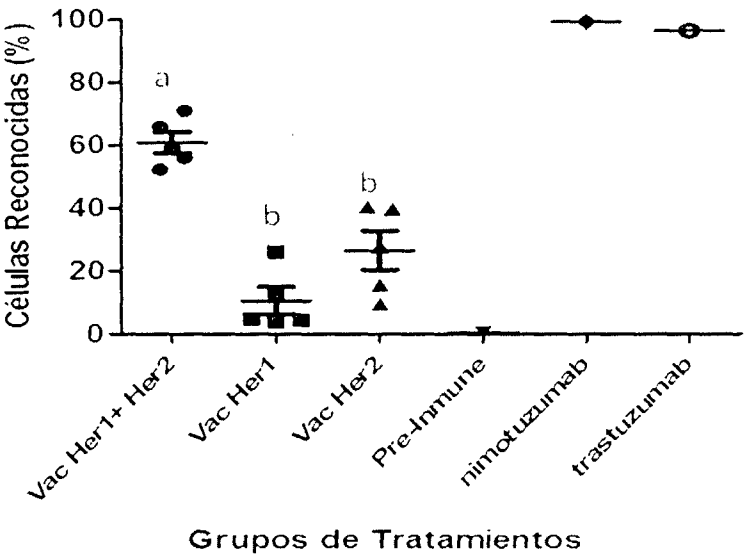


Figura 4

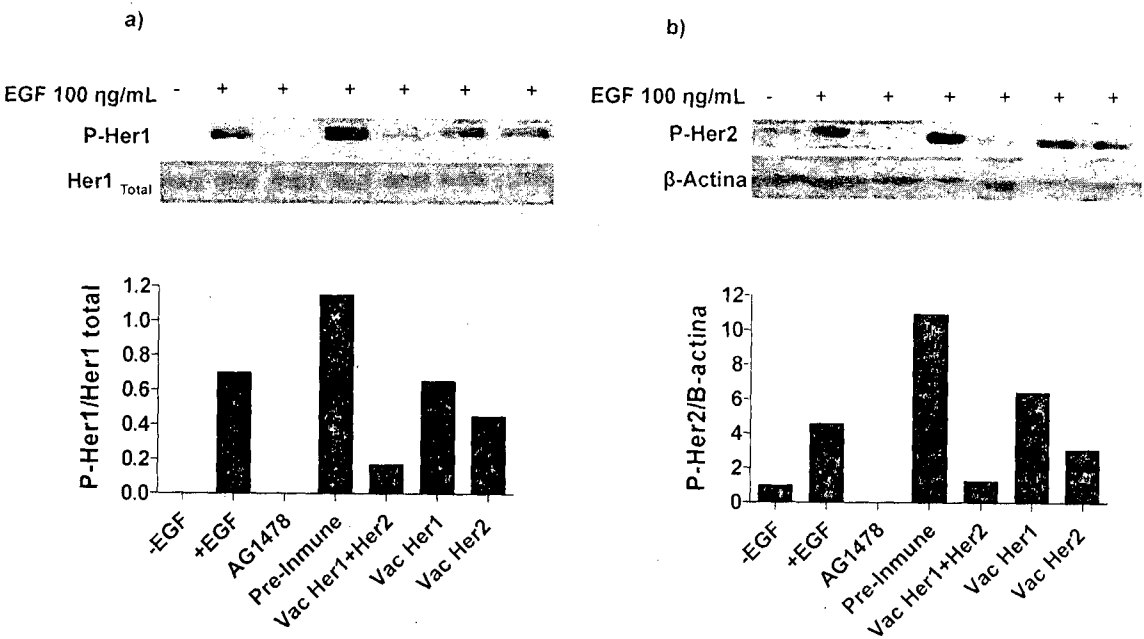


Figura 5

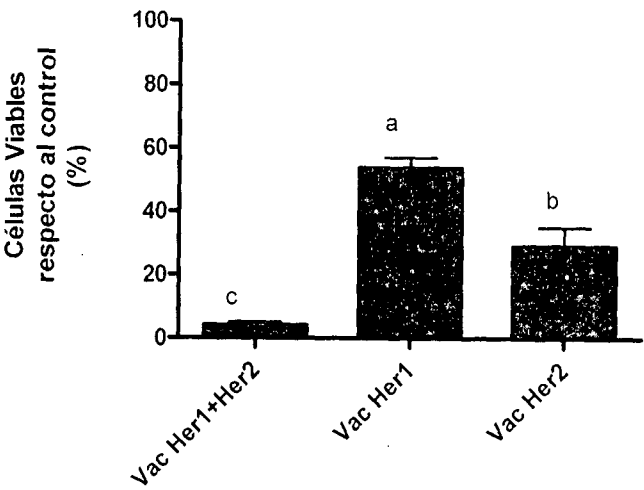
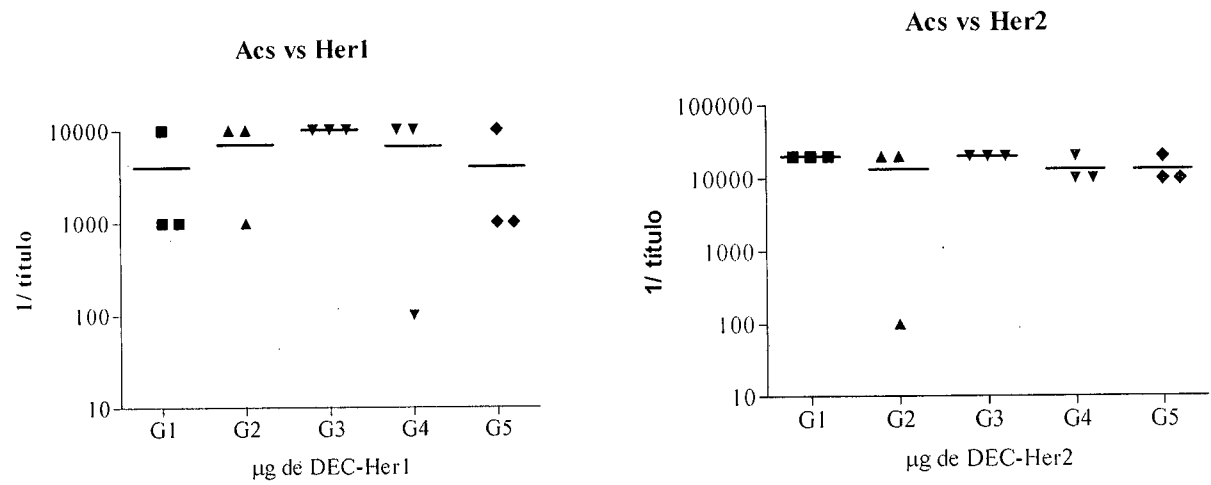


Figura 6



INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2014/000004

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. A61K39/00

ADD.

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	WO 02/45746 A2 (CENTRO INMUNOLOGIA MOLECULAR [CU]; FERNANDEZ MOLINA LUIS ENRIQUE [CU];) 13 de junio de 2002 (2002-06-13) mencionado en la solicitud ejemplo 4 página 8, línea 24 - línea 25 página 14, línea 19 - línea 21 -----	1-8

☐ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

“&” documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional
19 de noviembre de 2014

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
05/12/2014

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

N° de fax

Funcionario autorizado

Mata Vicente, Teresa

N° de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/CU2014/000004

WO 0245746	A2	13-06-2002	AR	031638	A1	24-09-2003
			AT	485833	T	15-11-2010
			AU	2151902	A	18-06-2002
			AU	2002221519	B2	23-11-2006
			BR	0116013	A	06-01-2004
			CA	2431188	A1	13-06-2002
			CN	1484532	A	24-03-2004
			DK	1356822	T3	07-02-2011
			EP	1356822	A2	29-10-2003
			HK	1063726	A1	14-09-2007
			JP	4210519	B2	21-01-2009
			JP	2004523494	A	05-08-2004
			KR	20030061838	A	22-07-2003
			MX	PA03005032	A	10-09-2004
			NZ	526282	A	28-01-2005
			PE	05722002	A1	31-07-2002
			US	2002136735	A1	26-09-2002
			UY	27059	A1	26-04-2002
			WO	0245746	A2	13-06-2002
			ZA	200304411	A	29-07-2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CU2014/000004

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/45746 A2 (CENTRO INMUNOLOGIA MOLECULAR [CU]; FERNANDEZ MOLINA LUIS ENRIQUE [CU];) 13 June 2002 (2002-06-13) cited in the application example 4 page 8, line 24 - line 25 page 14, line 19 - line 21 -----	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 November 2014

Date of mailing of the international search report

05/12/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mata Vicente, Teresa

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/CU2014/000004

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0245746	A2	13-06-2002	
		AR 031638 A1	24-09-2003
		AT 485833 T	15-11-2010
		AU 2151902 A	18-06-2002
		AU 2002221519 B2	23-11-2006
		BR 0116013 A	06-01-2004
		CA 2431188 A1	13-06-2002
		CN 1484532 A	24-03-2004
		DK 1356822 T3	07-02-2011
		EP 1356822 A2	29-10-2003
		HK 1063726 A1	14-09-2007
		JP 4210519 B2	21-01-2009
		JP 2004523494 A	05-08-2004
		KR 20030061838 A	22-07-2003
		MX PA03005032 A	10-09-2004
		NZ 526282 A	28-01-2005
		PE 05722002 A1	31-07-2002
		US 2002136735 A1	26-09-2002
		UY 27059 A1	26-04-2002
		WO 0245746 A2	13-06-2002
		ZA 200304411 A	29-07-2004

Figura 1

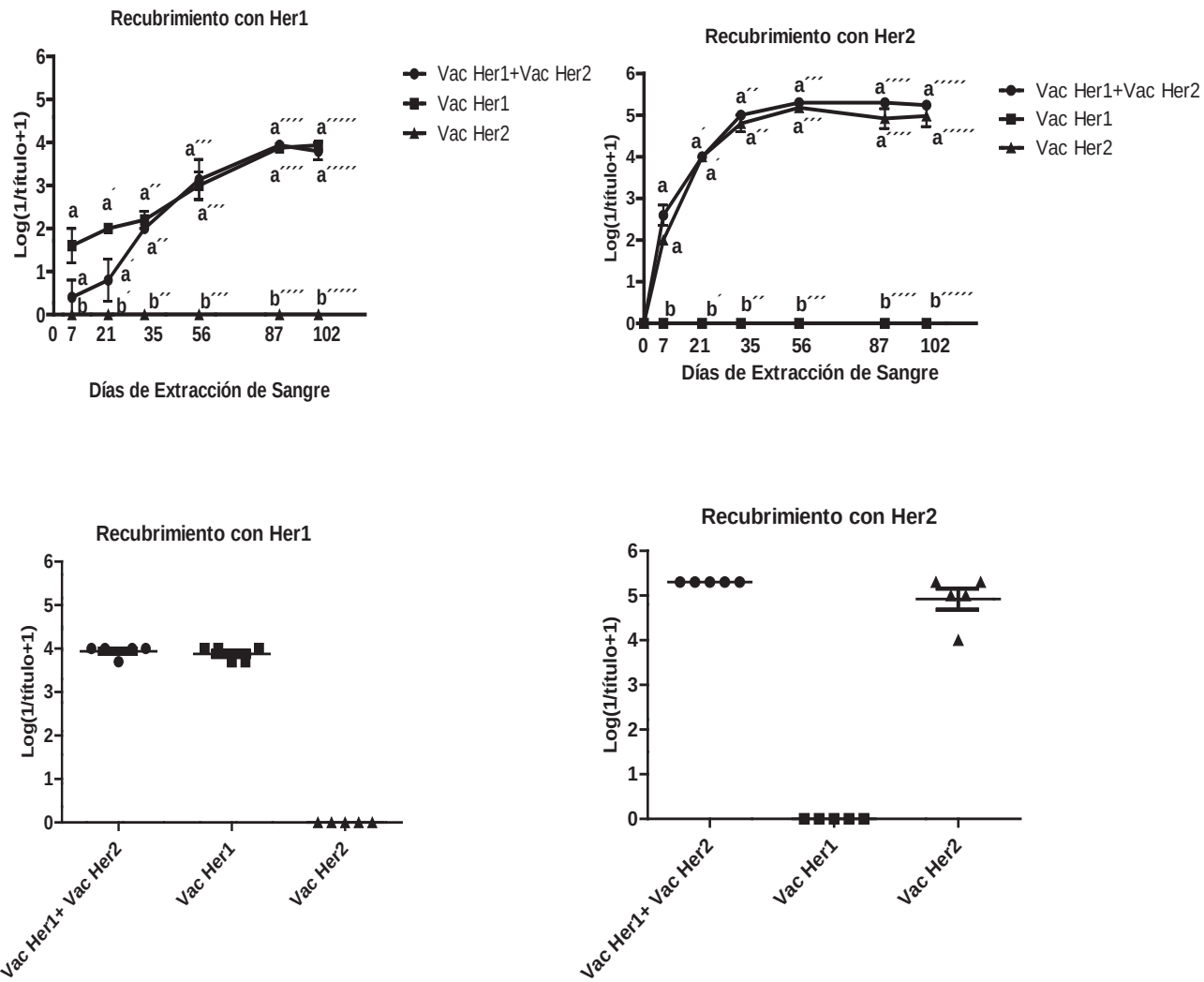


Figura 2

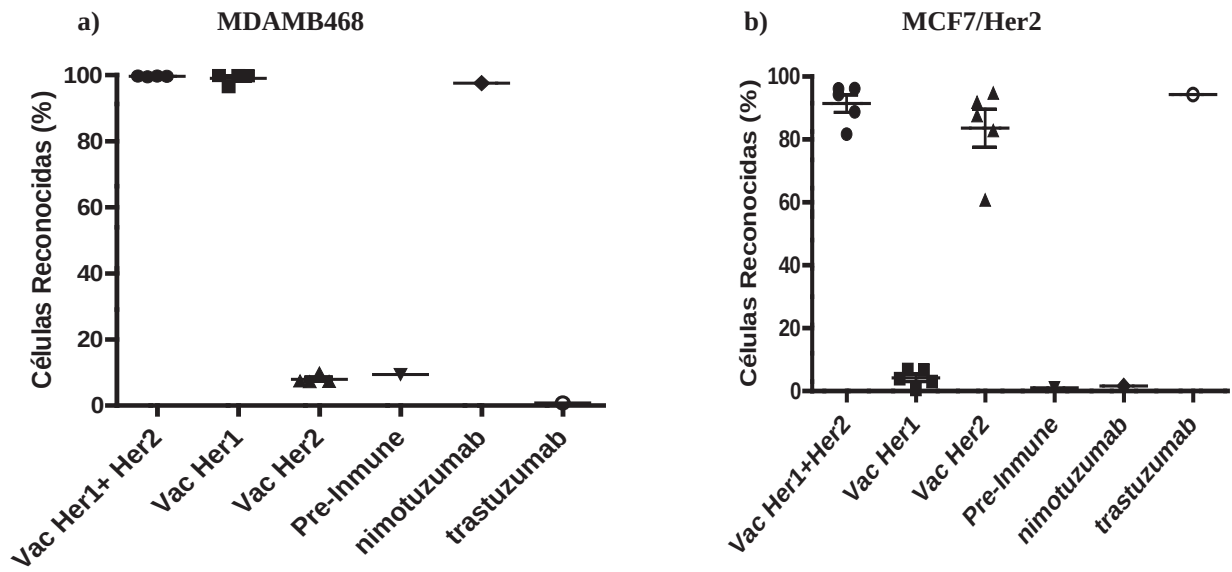


Figura 3

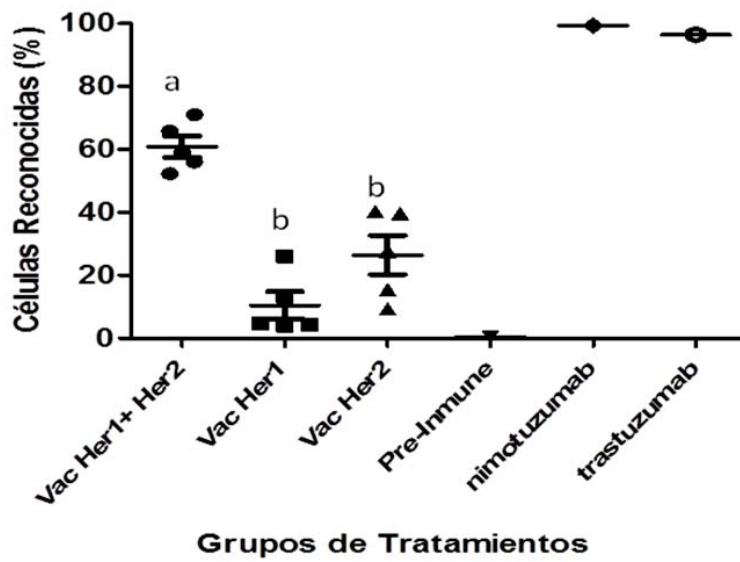


Figura 4

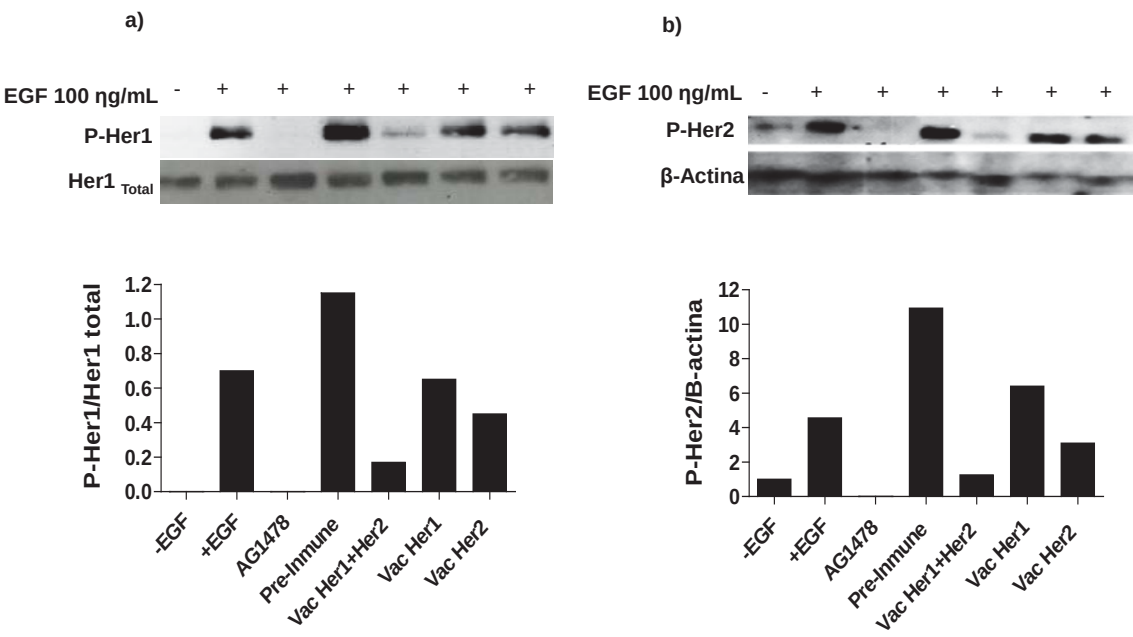


Figura 5

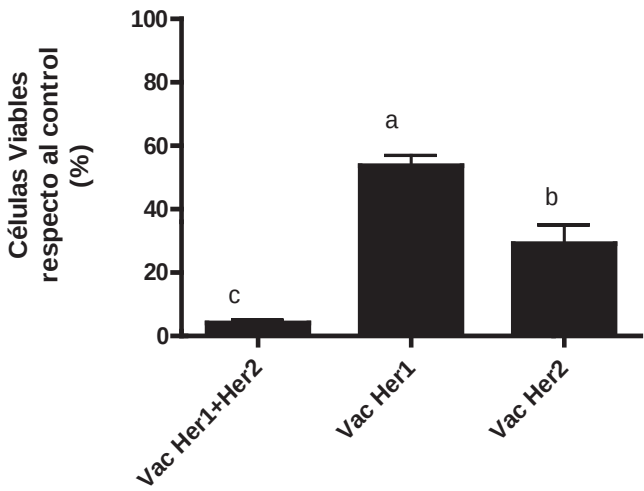
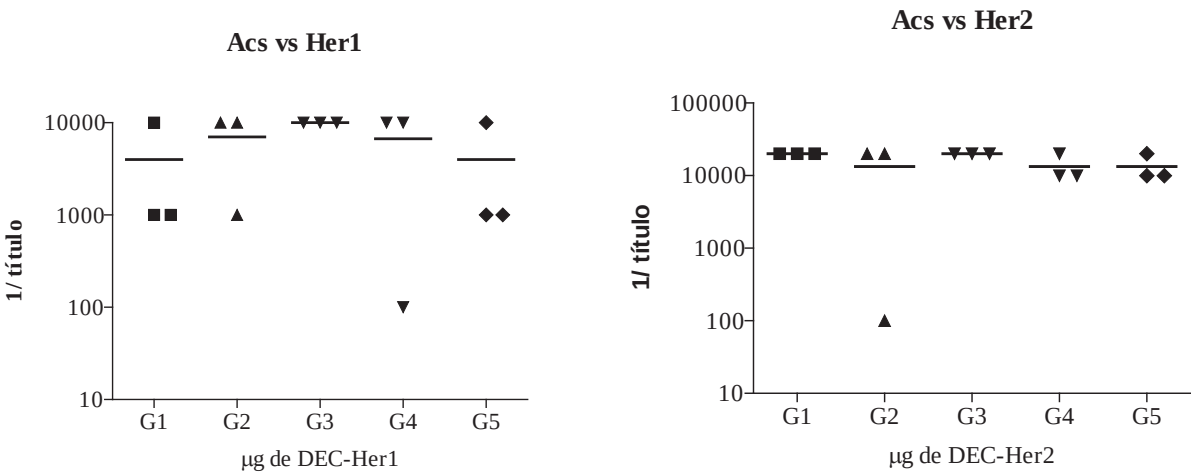


Figura 6



PODER

El (los)

CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

Domiciliados en

Calle 216 Esq 15Atabey, Playa La Habana 11600, Cuba

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para

obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial e intelectual y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso – administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

- a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
- b) Para la obtención de registros sanitarios;
- c) Para la obtención de registros de derechos de autor.
- d) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

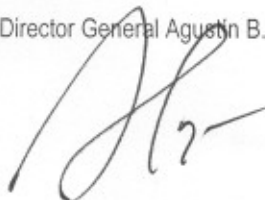
Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato entre los apoderados, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extra-judiciales. .

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy 05 de diciembre de 2012

En la Habana.

Por el Director General Agustín B. Lage Davila.



CASTELLANOS & Co.
INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM

CALLE 94 A No. 7 A – 09 / P.O. BOX 6349
PHONE (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1) 755 01 58
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
info@castellanosyco.co

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned

CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

Of

Calle 216 Esq 15Atabey, Playa La Habana 11600, Cuba

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS A.** attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia,

obtain the protection of my (our) Intellectual Property, for

which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

- a) Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
- b) For the obtainment of Sanitary registrations;
- c) For the obtainment of copyright registrations
- d) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney within the appointed attorneys, compromise, cancel, receive, withdraw, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this

in

by

COMPOSICIONES VACUNALES BIVALENTES Y SU USO PARA LA TERAPIA DE TUMORES

RESUMEN

- 5 Se describen composiciones vacunales que combinan en igual proporción los dominios extracelulares de los receptores de factores de crecimiento Her1 y Her2 o fragmentos de estos y adicionalmente proteoliposomas de muy pequeña talla derivado de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* y el gangliósido GM3 (VSSP-GM3), que están destinadas a la administración subcutánea.
- 10 Las composiciones descritas permiten inducir anticuerpos para el tratamiento de tumores malignos y presentan ventajas debido a que logran eliminar totalmente la masa tumoral y evitan la regresión del tumor a partir de la aparición de variantes resistentes.