

**[Anti-HER2 vaccines: The HER2 immunotargeting
future?]**

Maha-Zohra Ladjemi, William Jacot, André Pèlerin, Isabelle Navarro-Teulon

► **To cite this version:**

Maha-Zohra Ladjemi, William Jacot, André Pèlerin, Isabelle Navarro-Teulon. [Anti-HER2 vaccines: The HER2 immunotargeting future?]. Pathologie Biologie, Elsevier Masson, 2009, epub ahead of print. 10.1016/j.patbio.2009.04.002 . inserm-00396298

HAL Id: inserm-00396298

<https://www.hal.inserm.fr/inserm-00396298>

Submitted on 17 Jun 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Vaccination anti-HER2: L'avenir du ciblage immunologique de HER2?

Anti-HER2 vaccines: The HER2 immuno-targeting future?

Ladjemi MZ¹, Jacot W², Pèlerin A¹ and Navarro-Teulon I^{1,3}.

¹IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier ; INSERM U896 ; Université Montpellier 1 ; CRLC Val d'Aurelle Paul Lamarque, Montpellier, F-34298, France; ²Département d'Oncologie Médicale, CRLC Val d'Aurelle Paul Lamarque, F-34298, France ; ³Requests for reprints: Isabelle Navarro-Teulon, PhD, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, CRLC Val d'Aurelle – Paul Lamarque, 34298 Montpellier Cedex 5, France. Phone: +33-4-67-61-37-08; Fax: +33-4-67-61-37-87 ; E-mail: isabelle.teulon@valdorel.fnclcc.fr

Résumé

Le cancer du sein reste un problème majeur de Santé Publique. Malgré les récents progrès dans les domaines de la chirurgie et des thérapies adjuvantes, de nombreux cas de récives métastatiques subsistent, en particulier dans les cancers du sein HER2 positifs. Ces cancers sont en effet plus agressifs, à risque accru de récive et restaient jusqu'à un récent passé de pronostic plus sombre que ceux n'exprimant pas HER2. Différentes études ont permis de mettre en évidence chez certaines patientes atteintes de tumeurs surexprimant HER2 une réponse immunitaire humorale et/ou cellulaire dirigée contre cet antigène, réponse associée à une limitation du développement tumoral dans les stades précoces de la maladie. Ces observations, associées à l'efficacité aujourd'hui démontrée d'une immunothérapie anti-HER2 à base de trastuzumab dans ces cancers, ont permis d'envisager différentes stratégies vaccinales dirigées contre HER2. Cependant, il existe chez l'Homme une tolérance immunologique vis-à-vis de cet antigène, constituant une barrière à une vaccination efficace.

En conséquence, le défi actuel pour les vaccins est de trouver les meilleures conditions pour rompre cette tolérance immunologique. Dans cette revue, nous discuterons les diverses stratégies vaccinales anti-HER2 développées actuellement; nous aborderons autant les stratégies ayant atteint les phases cliniques que celles, non moins prometteuses, qui sont encore en développement préclinique. L'antigène utilisé peut être soit à base de cellules tumorales allogéniques ou de cellules autologues, soit spécifique de HER2 pouvant être délivré par des cellules dendritiques ou sous forme d'ADN, de peptides ou de protéines. Des anticorps ou fragments d'anticorps anti-idiotypiques mimant l'antigène HER2 peuvent aussi constituer la base d'un tel vaccin.

Mots clés : HER2, immunothérapie active, cancer

Abstract

Breast cancer is a widely spread women's disease. In spite of progress in the field of surgery and adjuvant therapies, the risk of breast cancer metastatic relapses remains high especially in those overexpressing HER2. Different studies have shown cellular and/or humoral immune responses against HER2 in patients with HER2-overexpressing tumors. This immune response is associated with a lower tumor development at early stages of the disease. These observations, associated with the efficiency today demonstrated by a trastuzumab-based anti-HER2 immunotherapy, allowed to envisage various vaccinal strategies against HER2. These findings have so led to the hypothesis that the generation of an anti-HER2 immune response should protect patients from HER2-overexpressing tumor growth, and induction of a stable and strong immunity by cancer vaccines is expected to lead to establishment of immune memory, thereby preventing tumor recurrence. However, an immunological tolerance against HER2 antigen exists representing a barrier to effective vaccination against this oncoprotein.

As a consequence, the current challenge for vaccines is to find the best conditions to break this immunological tolerance. In this review, we will discuss the different anti-HER2 vaccine strategies currently developed; considering the strategies having reached the clinical phases as well as those still in preclinical development. The used antigen can be composed of tumoral allogenic cells or autologous cells or be specific of HER2. It can be delivered by dendritic cells or in a DNA, peptidic or proteic form. Another area of the research concerns the use of anti-idiotypic antibodies mimicking HER2.

Key words: HER2, active immunotherapy, cancer

Introduction

Le récepteur HER2 est un Antigène Associé aux Tumeurs normalement présent au cours du développement embryonnaire mais surexprimé uniquement par les cellules cancéreuses chez l'adulte. Il est surexprimé dans 20% des cancers du sein invasifs, 54 à 100% des cancers colorectaux, 25% des cancers de l'ovaire, 17 à 82% des cancers du pancréas et 34% des cancers de la prostate [1-3]. Cette surexpression est corrélée à une plus grande agressivité tumorale, à un risque accru de récurrence et à un pronostic sombre [4]. La surexpression de HER2 au niveau de la membrane des cellules tumorales en a fait une cible de choix pour l'immunothérapie anti-cancéreuse [5].

Au cours des dernières années, des anticorps monoclonaux (AcM) ainsi que des inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant HER2 ont été développés. Des résultats récents avec les AcM ont permis de valider l'utilisation de l'immunothérapie passive dans le traitement des cancers, notamment avec le trastuzumab (Herceptin[®], Roche, Basel, Suisse). Il s'agit d'un AcM humanisé dirigé contre la portion extra-cellulaire d'HER2 dont l'utilisation a été approuvée par la FDA en 1998, en association avec la chimiothérapie dans les cancers du sein métastatiques surexprimant HER2 [6]. Cependant, une limite majeure de l'immunothérapie basée sur le trastuzumab reste le développement de résistances au traitement, généralement dans l'année suivant son initiation en situation métastatique [7,8]. D'autre part, le risque de toxicité cardiaque, notamment chez des patientes préalablement traitées par une chimiothérapie à base d'anthracyclines, peut limiter ou contre-indiquer l'utilisation du trastuzumab [9,10].

Dès 1994, différentes études ont permis de mettre en évidence chez certains patients atteints de tumeurs surexprimant HER2, une réponse

immunitaire anti-HER2 [5,11,12]. Cette immunité serait associée à une limitation du développement tumoral et des métastases dans les stades précoces de la maladie [13]. Associées à l'efficacité aujourd'hui démontrée d'une immunothérapie passive anti-HER2 à base de trastuzumab, ces observations ont conduit au développement de différentes stratégies vaccinales anti-HER2.

L'utilisation d'un vaccin capable d'induire une réponse anti-HER2 ou de stimuler une réponse préexistante chez les patients présente plusieurs avantages théoriques par rapport à une immunothérapie passive de type trastuzumab : (i) moins d'injections itératives, (ii) une utilisation potentiellement plus large chez des patients exprimant différents taux de HER2 (+1 à +3 par immunohistochimie, IHC) et (iii) la mise en place d'une réponse mémoire susceptible d'éviter l'apparition de récurrences.

Cependant, l'antigène (Ag) HER2 est une protéine oncofoetale ; il existe donc chez l'Homme une tolérance immunologique naturelle vis-à-vis de cet Ag constituant une barrière à une vaccination efficace. En conséquence, le défi actuel pour les vaccins est la définition des meilleures conditions en vue de rompre cette tolérance immunologique sans pour autant induire des réactions auto-immunes qui seraient toxiques pour les tissus sains, [14] et notamment les cellules myocardiques.

Les Ag utilisés dans le cadre de la vaccination anti-HER2 peuvent être soit non spécifiques, à base de cellules tumorales allogéniques ou de cellules autologues, soit spécifiques de HER2 pouvant être délivrés soit via des cellules présentatrices d'Ag (CPA) et notamment les cellules dendritiques (CD), soit sous forme d'ADN, de peptides ou de protéines. Des anticorps (Ac) ou fragments d'Ac anti-idiotypiques mimant l'Ag HER2 peuvent aussi constituer la base d'un tel

vaccin. Ces Ag vaccinaux sont généralement injectés en association avec des adjuvants de vaccination ou des cytokines immunostimulantes.

Dans cette revue, nous discuterons les diverses stratégies vaccinales anti-HER2 aujourd'hui développées en abordant les stratégies ayant d'ores et déjà atteint les phases cliniques comme celles, non moins prometteuses, encore au stade plus précoce de développement préclinique.

1. Vaccins à base de cellules tumorales

Ce type de vaccins offre l'avantage théorique d'apporter au système immunitaire du patient un mélange complet d'Ag tumoraux en vue de mettre en place une réponse immunitaire efficace. Cependant, l'induction d'une réponse immune Ag-spécifique dépend également de la présence de signaux non spécifiques de co-stimulation apportés par les CPAs pour activer les cellules T. Or, la plupart des tumeurs solides n'expriment pas ces facteurs de co-stimulation et sont donc incapables d'apporter tous les signaux nécessaires à l'activation des cellules T. Ainsi, pour conférer un potentiel immunostimulant aux cellules tumorales utilisées en tant que vaccins, des gènes codants des facteurs de co-stimulation tels que le CD80 ou des cytokines ont été introduits dans ces vaccins.

Des cellules MDA-MB-231, cellules tumorales allogéniques de cancer du sein HLA-A2 et HER2 positives, génétiquement modifiées pour exprimer la molécule de co-stimulation CD80 (B7.1) ont été utilisées, en association avec du bacille de Calmette et Guérin (BCG) ou du Granulocyte Macrophage-Stimulating Growth Factor (GM-CSF), pour vacciner 30 patientes atteintes de cancers du sein de stade IV [15,16]. Une réponse immune cellulaire a été observée chez 9 patientes mais aucune réponse humorale n'a pu être détectée. Une stabilisation

prolongée de la maladie a été observée chez 4 patientes mais aucune régression tumorale objective n'a été observée [15,16].

2. Vaccins à base de cellules autologues

Une étude clinique de phase I a récemment évalué, chez 18 patientes atteintes de cancer du sein métastatique surexprimant HER2, la toxicité et la réponse immunitaire induites par une immunothérapie cellulaire active autologue, Lapuleucel-T (APC8024). Ce vaccin a été préparé à partir de cellules mononucléées du sang périphérique (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) contenant des CPAs activées *in vitro* par une protéine de fusion recombinante, la protéine BA7072 formée des domaines intra et extra-cellulaires (DIC et DEC respectivement) de HER2 fusionnés au GM-CSF [17]. Le vaccin a été bien toléré et une réponse cellulaire significative anti-HER2 a été mise en évidence. Une patiente a présenté une réponse partielle durant 6 mois et une stabilisation de la maladie pendant 1 an a été mise en évidence chez 3 autres patientes [17]. Bien que ces résultats soient encourageants, d'autres essais devront être conduits pour confirmer le bénéfice clinique de ce vaccin.

Plus récemment, une étude a évalué chez une patiente atteinte d'un cancer du sein métastatique HER2 surexprimé une autre stratégie de vaccination à base de cellules autologues ; le transfert adoptif de lymphocytes T cytotoxiques (*Cytotoxic T Lymphocytes*, CTLs). La patiente a reçu des CTLs autologues spécifiques de HER2 [18]. Après leur injection, les CTLs se sont rapidement accumulés au niveau de la moelle osseuse et ont migré vers le foie. Les cellules tumorales disséminées au niveau de la moelle osseuse ont disparu à la fin du protocole de transfert adoptif [18], évoquant une possible activité clinique de cette stratégie vaccinale.

3. Vaccins à base de cellules dendritiques

Cette stratégie vaccinale offre l'avantage théorique de favoriser la présentation de l'Ag vaccinant aux autres types cellulaires du système immunitaire.

Dans le cadre d'études précliniques, la vaccination avec des cellules dendritiques (CDs) transfectées avec des adénovirus codant la protéine HER2 a induit un retard d'apparition de tumeurs mammaires spontanées surexprimant HER2/neu chez des souris BALB/c transgéniques [19].

Chen *et coll.*, avaient déjà montré que l'administration de CDs transfectées avec des adénovirus codant la protéine HER2 et l'IL-12 pouvait induire un effet anti-tumoral dans un modèle de souris FVB greffées avec des cellules tumorales syngéniques exprimant HER2 et que les lymphocytes T (LT) CD4+ et CD8+ étaient nécessaires à la mise en place de cette protection [20]. Des résultats similaires ont été obtenus avec des CDs transfectées avec des adénovirus codant la protéine HER2 et le TNF α [21].

Dans le cadre d'un essai clinique, 6 patientes atteintes de cancer du sein ou de l'ovaire ont été vaccinées par voie sous-cutanée avec des CDs chargées avec deux peptides dérivés de HER2, p369 (acides aminés (aa) 369-377) et p654 (aa654-662) [22]. Après 3 immunisations, il a été détecté chez 2 patientes des LT circulants spécifiques du peptide p369 capables de lyser *in vitro* des cellules tumorales exprimant HER2 [22]. L'une de ces 2 patientes a montré, pendant 8 mois, une stabilisation de sa maladie alors qu'elle était en progression avant la vaccination [22].

Plus récemment, 13 patientes atteintes de carcinomes canauxiers *in situ* surexprimant HER2 ont été traitées avant chirurgie une fois par semaine pendant 4 semaines avec des DCs chargées avec 6 peptides dérivés de HER2 HLA-I et II

restreints, 3 peptides dérivés du DEC et 3 autres du DIC de HER2 [23]. Les patientes immunisées ont développé une immunité spécifique des peptides vaccinant et ont montré des taux élevés de LT CD4+ sécrétant de l'IFN γ (85%) ainsi que de LT CD8+ (80%). Sept de ces patientes ont montré une diminution significative du taux de HER2 au niveau des biopsies chirurgicales souvent corrélée à une réduction mesurable de la taille des tumeurs [23].

En 2008, Sas S. *et coll.*, ont construit un adénovirus recombinant codant la protéine HER2 et un motif RGD, (RGD) AdVneu ; l'addition du motif RGD dans la construction ayant été décrite comme efficace pour augmenter le taux d'expression des protéines à partir de transgènes [24]. Cette équipe a ensuite transfecté des CDs avec le (RGD) AdVneu puis a évalué les réponses CTL et humorale anti-HER2 et l'effet anti-tumoral de CDs transfectées avec les vecteurs AdVneu contenant (DCneu2) ou pas (DCneu1) le motif RGD [25]. Les résultats ont montré que DCneu2 induisait l'expression de huit fois plus de protéine HER2 que DCneu1 et que les réponses CTL et humorale induites dans ce cas étaient plus importantes. L'immunisation de souris FVB avec le vaccin DCneu2 a, de plus, conduit à la protection de 100% des animaux greffés avec une lignée tumorale syngénique surexprimant HER2 [25]. Cette même équipe avait précédemment comparé l'effet d'un vaccin à base d'ADN plasmidique de HER2 à celui d'un vaccin à base de CDs transfectées avec un adénovirus codant HER2 mettant en évidence une meilleure efficacité de ce dernier [26].

Une autre étude préclinique a testé l'efficacité de CDs syngéniques transfectées avec le gène codant la protéine de fusion formée par le DEC de HER2 et le domaine de transduction de la protéine Tat [27]. Les souris immunisées par voie intra-péritonéale (i.p.) avec les CDs ont développé des tumeurs de taille significativement plus petite que les souris non immunisées ou

immunisées avec des CD8 transfectées uniquement avec le domaine de transduction de la protéine Tat. Une immunité cellulaire T CD4+ et CD8+ à l'origine de l'effet anti-tumoral observé a été démontrée [27].

4. Vaccins à base d'ADN

Wei *et coll.*, ont développé plusieurs vaccins à base d'ADN construits pour coder la protéine HER2 humaine dépourvue de son activité tyrosine kinase [28-30]. Leurs 3 principales constructions sont : (1) pE2A codant pour la totalité de la protéine HER2 avec une substitution unique de la Lys753 en Ala753 pour éliminer le résidu Lys liant l'ATP, (2) pE2TM codant le peptide signal et les domaines extracellulaire et transmembranaire mais pas le DIC, (3) psecE2 codant les aa-N-terminaux (aa1-505) du DEC comme protéine sécrétée. Ces trois constructions ont été capables d'induire des réponses immunitaires cellulaire et humorale conduisant à une protection tumorale *in vivo*. L'immunisation de souris avec une 4^{ème} construction, pcytE2 codant pour la protéine HER2 sans le peptide signal, a permis le développement d'une immunité cellulaire CD8+ mais pas humorale [29].

Les premières études pré-cliniques ont utilisé les vaccins ADN seuls injectés par voie intramusculaire (i.m.) [28-30]. Plus tard, la séquence codant pour le GM-CSF a été rajoutée à ces constructions ; ces vaccins ADN ont ensuite été injectés par électroporation permettant une meilleure expression du gène et la génération d'une meilleure réponse immunitaire [31-33]. Ces études ont permis le développement d'une immunité significative anti-HER2 et un rejet des tumeurs chez des souris sauvages greffées avec des lignées tumorales syngéniques ou chez des souris transgéniques pour HER2.

L'étude menée par Rovero *et coll.*, a donné des résultats similaires. Ainsi, la vaccination à base d'ADN codant pour la protéine HER2/neu tronquée, p185

s'est montrée efficace pour inhiber la carcinogénèse dans un modèle de souris transgéniques [34].

L'injection par voie intra-musculaire (i.m.), soit de l'ADN plasmidique soit d'un vecteur adénoviral tous deux codant pour HER2, a entraîné le développement d'une réponse immunitaire cellulaire anti-HER2 chez des souris transgéniques BALB/c développant des tumeurs mammaires spontanées exprimant HER2/neu. Le vecteur adénoviral a cependant été le seul capable d'induire une réponse humorale anti-HER2 et a été plus efficace que le vaccin à base d'ADN plasmidique [35].

De façon très intéressante, une équipe vient de montrer, très récemment et pour la première fois, la régulation génétique de la réponse à un vaccin anti-cancer. En effet, les auteurs ont immunisés 3 souches de souris différentes avec un même vaccin ADN codant HER2 et ont montré que l'amplitude de la réponse immunitaire engendrée et l'efficacité du vaccin dépendait du fond génétique des souris. Ces mêmes auteurs ont montré que l'effet de la déplétion en cellules T régulatrices (Treg) sur l'augmentation de l'immunité anti-tumeur dépendait également du fond génétique des souris [36].

Cette stratégie de vaccination anti-HER2 à base d'ADN jusque-là restreinte aux études précliniques, vient d'entrer dans la phase clinique. En effet, deux essais cliniques de phase I sont en cours, le premier est conduit par les laboratoires Merck et évalue la toxicité et l'efficacité d'un vaccin ADN, le V930, codant pour les Ag HER2 et ACE. Le recrutement de patients atteints de tumeurs du sein, ovaire, colon ou poumons non à petites cellules de stade II, III ou IV, exprimant HER2 et/ou l'ACE a débuté en Octobre 2005, les inclusions sont maintenant terminées et les résultats cliniques devaient être présentés dans les mois à venir (<http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00250419?order = 1>). Le

deuxième essai est conduit par Bavarian Nordic's subsidiary BN ImmunoTherapeutics (BNIT) et a débuté en Juin 2007 ; les patientes incluses sont atteintes de cancers du sein métastatiques surexprimant HER2 après une ou deux lignes de chimiothérapie, associée ou non au trastuzumab. Le vaccin utilisé est le MVA-BN-HER2 formé d'un vecteur viral non répliquant codant une forme tronquée de la protéine HER2 (dépourvue du DIC) et pour 2 épitopes T universaux de la toxine tétanique utilisés comme immunostimulant ([http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00485277?order = 1](http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00485277?order=1)).

5. Vaccins peptidiques

Le plus large volet de la littérature en termes de vaccination anti-HER2 concerne les vaccins à base de peptides dérivés de cet Ag tumoral.

5.1 Vaccins peptidiques induisant une réponse immunitaire à prédominance cellulaire

a. Vaccins multi-peptidiques

Plusieurs études cliniques ont utilisé des peptides dérivés des DIC et DEC de HER2.

Un essai clinique de phase I portant sur 64 patients atteints de cancers du sein, de l'ovaire ou du poumon non à petites cellules surexprimant HER2 [37] a évalué l'effet de trois vaccins contenant chacun 3 peptides différents dérivés d'épitopes CD4+ T-helper de HER2: (1) peptides dérivés du DEC : p42 (aa42-56), p98 (aa98-114) et p328 (aa328-345) ; (2) peptides dérivés du DIC : p776 (aa776-790), p927 (aa927-941) et p1166 (aa1166-1180) ou (3) dérivés des deux domaines : p369 (aa369-386), p688 (aa688-703) et p971 (aa971-984). Chaque dose de vaccin (500µg de chacun des 3 peptides en association avec 100µg de GM-CSF) a été administrée par voie intradermique. Quatre-vingt douze pourcents des patients ont développé une réponse T spécifique d'au moins l'un

des 3 peptides contenu dans leur vaccin. La plupart des patients ont également développé une réponse T dirigée contre les domaines de HER2, 26% contre le DEC et 63% contre le DIC. Cette immunité anti-peptide ou anti-HER2 était encore détectable chez 38% des patients 12 mois après la fin de la vaccination [37]. Aucune corrélation n'a pu être établie entre le développement d'une réponse anti-peptide et la mise en place d'une réponse anti-HER2. De façon très intéressante, les auteurs ont observé chez 84% des patients le développement d'une réponse T spécifique d'un peptide non contenu dans leur vaccin (phénomène d'«epitope spreading»).

La réponse humorale engendrée par ces vaccins a été analysée chez 35 patients atteints de cancers du sein, de l'ovaire ou du poumon non à petites cellules surexprimant HER2 dans un autre essai clinique de phase I [38]. Soixante pourcents des patients ont développé une immunité humorale dirigée contre au moins l'un des 3 peptides contenu dans leur vaccin mais seuls 29% des patients ont développé une immunité humorale anti-HER2 dont 70% ont montré un phénomène d'«epitope spreading». En comparaison avec la réponse cellulaire anti-HER2 engendrée [37], la réponse humorale était de moindre importance [39]. Les auteurs attribuent cette moindre efficacité à plusieurs facteurs : (i) les peptides sont dérivés d'épitopes T HLA-restreints et (ii) l'utilisation du GM-CSF comme adjuvant de vaccination a été décrite pour favoriser la mise en place d'une réponse immunitaire plutôt de type Th1 à prédominance cellulaire avec sécrétion d'IFN γ [40].

Bien que les essais cliniques de vaccination aient pour objectif la mise en place ou le renforcement d'une réponse immunitaire préexistante, ces deux études ont observé la mise en place concomitante du phénomène d'«epitope spreading» susceptible de constituer un meilleur marqueur prédictif de la

réponse immunitaire voire de la réponse clinique dans des essais de vaccination ou d'immunothérapie en oncologie [41].

Récemment, Disis *et coll.*, ont comparé les résultats de 3 essais cliniques de vaccination anti-HER2 sur le long terme (suivi moyen : 2,7 ans) et ont montré que le développement d'une réponse cellulaire T spécifique de HER2 accompagnée du phénomène d'«epitope spreading» pouvait être corrélée à un bénéfice clinique [42]; d'autres études devront néanmoins être menées pour mieux évaluer ces résultats récents. Une autre étude clinique de phase I a évalué la formulation vaccinale 3 décrite précédemment (dérivés des deux domaines : p369 (aa369–386), p688 (aa688–703) et p971 (aa971–984)) chez 19 patientes HLA-A2 positives atteintes de cancers du sein ou de l'ovaire surexprimant HER2 [40]. Quatre-vingt trois pourcents des patientes ont développé une immunité cellulaire T dirigée contre au moins l'un des trois peptides vaccinaux. De plus, les cellules T spécifiques des peptides ont été capables de lyser des cellules tumorales HER2 positives. Cette immunité cellulaire de type T CD8 était encore détectable 1 an après la fin des vaccinations chez les 5 patientes suivies. Concernant la réponse cellulaire anti-HER2, 28% des patientes ont développé une réponse anti-DIC et 50% anti-DEC de HER2 [40].

Une étude clinique de phase I/II évalue actuellement ce vaccin tri-peptidique [40] en association avec le trastuzumab [43]. Les patientes incluses dans cet essai sont HLA-A2 positives, atteintes de cancers du sein ou de l'ovaire de stade IV surexprimant HER2 et sont stables ou sans maladie apparente. Parmi les 10 patientes pour lesquelles la réponse immunitaire a pu être analysée, 5 ont développé une réponse T spécifique de l'un des peptides et/ou de la protéine HER2 native. Cette étude, bien que préliminaire et n'ayant pas encore communiqué les résultats de suivi sur le long terme, prouve qu'il est possible

d'induire une réponse anti-HER2 chez des patientes sous trastuzumab. Il est cependant important de souligner que deux des 14 patientes incluses au moment de la communication de ces résultats ont présenté dans cette étude une altération asymptomatique de la fonction ventriculaire de grade 2 selon l'échelle des toxicités du NCICIC (passant de 54 à 49 % et de 64 à 45 % respectivement), ne permettant pas de conclure à l'absence de toxicité cardiaque.

Les résultats de la première étude clinique de phase I utilisant l'AE37, vaccin peptidique anti-HER2, viennent d'être publiés [44]. Ce vaccin est composé du peptide du CMH classe II de HER2 (AE36 : aa776-aa779) seul ou sur lequel a été greffée en C-terminal une séquence de 4 aa (LRMK) appelée « li-Key » (AE37). Cette séquence est capable d'interagir avec les molécules MHC classe II et d'augmenter la réponse cellulaire T CD4. Le vaccin a été testé chez 15 patientes atteintes de cancers du sein sans envahissement ganglionnaire traitées à visée curative et sans maladie apparente. Le vaccin a été administré par voie intradermique une fois par mois pendant 6 mois à trois doses différentes (100, 500 et 1000 µg) en association avec différentes doses de GM-CSF (de 0 à 250 µg). La vaccination avec l'AE37, avec ou sans GM-CSF, a induit une réponse immunitaire cellulaire dose-dépendante dirigée contre l'AE37 ainsi que contre le peptide natif AE36 mais dans une moindre mesure. Selon les auteurs, cette étude est la première démontrant l'efficacité d'un vaccin que ce soit en présence ou en absence d'adjuvants de vaccination [44]. Les doses optimales d'utilisation (500µg d'AE37 et 62,5µg de GM-CSF) ont été déterminées et cette formulation est en cours d'évaluation dans un essai clinique de phase II.

b. Le peptide E75

Parmi les peptides décrits plus haut, le p369 (aa369–377) dérivé du DEC de HER2, plus connu sous le nom de peptide E75, a fait l'objet de plusieurs études précliniques et cliniques et est en cours d'évaluation dans un essai de phase III randomisé et multicentrique [45]. Des études précliniques avec le peptide E75 ont montré qu'il était capable d'induire une réponse immunitaire spécifique médiée par les CTLs [46,47]. Trois études cliniques ont ensuite utilisé le peptide E75 comme vaccin en association avec l'adjuvant incomplet de Freund (IFA) ou le GM-CSF et ont montré que la vaccination n'entraînait pas de toxicité et induisait la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique du peptide [48-50].

Peoples *et coll.*, ont conduit deux essais cliniques de phase II dans lesquels les patientes incluses étaient en rémission après traitement d'un cancer du sein et considérées comme à risque élevé de récurrence. Au moment de l'inclusion, les patientes étaient sans maladie apparente et avaient terminé les cycles de thérapies adjuvantes conventionnelles (chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie lorsqu'indiquée). Le défi thérapeutique reste aujourd'hui en effet d'éviter les récurrences tumorales, aux possibilités curatives généralement faibles.

Le premier essai a inclus des patientes atteintes de cancer du sein avec envahissement ganglionnaire et le second des patientes atteintes de cancers du sein sans envahissement ganglionnaire.

Dans le premier essai, le peptide E75 se liant à l'allèle HLA-A2, les 29 patientes HLA-A2 négatives ont reçu le placebo et les 24 patientes HLA-A2 positives ont été vaccinées [51]. Le vaccin a été administré par voie intradermique une fois par mois pendant 6 mois et a consisté en différentes doses du peptide E75 (100 à 1000 µg) en association avec 250µg de GM-CSF.

Toutes les patientes vaccinées ont développé des clones T CD8 spécifiques du peptide E75 capables de lyser des cellules tumorales exprimant HER2. Concernant le bénéfice clinique et avec un suivi médian de 22 mois, la survie sans maladie était de 85,7% chez les patientes vaccinées contre 59,8% chez les patientes en observation. Dans le même temps, le taux de récurrence rapporté était de 8% dans le bras vacciné HLA-A2 contre 21% pour les patientes non vaccinées [51]. Cet essai a démontré que l'immunisation de patientes atteintes de cancer du sein avec envahissement ganglionnaire avec le peptide E75 était corrélée à un pourcentage de survie sans maladie plus élevé ainsi qu'à un taux de récurrence plus faible ; avec une différence statistiquement significative entre les deux bras s'agissant du taux de récurrences.

Les résultats propres du second essai n'ont pas été présentés seuls mais Peoples *et coll.*, ont récemment publié les résultats conjoints de leurs deux essais cliniques de phase III puisqu'évaluant la même formulation vaccinale et ciblant tous deux des patientes atteintes de cancer du sein, avec ou sans envahissement ganglionnaire, en rémission.

Au total, 177 patientes ont été incluses dans ces deux essais, en faisant la plus large étude conduite à ce jour dans le domaine de la vaccination adjuvante des cancers du sein.

La vaccination avec le peptide E75 a induit ou augmenté significativement une immunité cellulaire T CD8+ spécifique du peptide après la 3ème ou la 4ème immunisation chez 65% des patientes mais seuls 43% ont conservé cette immunité 6 mois après la fin de la vaccination [52]. De plus, la majorité des patientes a développé un phénomène d'«epitope spreading» contre un autre peptide candidat vaccin dérivé de HER2, le GP2 (paragraphe 5.1.c).

Les investigateurs ont également observé une diminution du nombre de cellules tumorales circulantes chez les patientes vaccinées, ce qui pourrait constituer un marqueur prédictif de l'efficacité de la vaccination. De façon intéressante, les investigateurs ont observé une diminution significative du taux de cellules Treg CD4+ CD25+ ainsi que du taux de cellules Treg activées T CD4+ CD25+ CD69+ chez les patientes vaccinées [53]. En effet, l'implication des cellules Treg dans la diminution de l'efficacité des réponses immunitaires dirigées contre des tissus tumoraux avait été démontrée [54].

Avec un recul de 18 mois, il existait un avantage significatif du vaccin en termes de taux de récurrence (5,6% dans le bras vaccin contre 14,2% dans le bras placebo). Au temps d'analyse le plus récent, avec un recul de 26 mois, les résultats étaient toujours en faveur du vaccin mais la différence entre les deux bras en terme de taux de récurrence et de survie n'était plus significative. Les auteurs attribuent ce résultat au fait que le vaccin induit une immunité T CD8 incapable, à elle seule, d'entraîner la mise en place d'une réponse immunitaire mémoire [52].

Au final, le peptide E75 a montré des résultats prometteurs en terme de diminution du taux de récurrence lorsqu'utilisé en situation adjuvante. Néanmoins, ce vaccin devrait être amélioré notamment en vue de la mise en place d'une immunovigilance sur le long terme. L'utilisation d'un vaccin multi-épitopique ou encore l'association avec une autre immunothérapie anti-HER2 telle que le trastuzumab pourraient éventuellement permettre de répondre à cette problématique.

Une étude préclinique avait d'ailleurs montré que le prétraitement de cellules de cancer du sein, surexprimant HER2, par le trastuzumab pouvait induire une augmentation de la cytotoxicité spécifique de CTLs stimulés par les

peptides E75 ou GP2 [55]. Ces résultats pourraient être expliqués par une internalisation plus élevée et un recyclage plus rapide du récepteur sous l'action du trastuzumab. Des résultats similaires ont été obtenus dans des cellules de cancer du sein exprimant très faiblement HER2 [55] permettant ainsi d'envisager l'utilisation du trastuzumab en tant qu'agent potentialisateur du vaccin dans des tumeurs exprimant faiblement HER2. Par ailleurs, des PBMCs de patientes vaccinées avec le peptide E75 ont montré une lyse spécifique plus importante de cellules de cancer du sein prétraitées au trastuzumab par rapport à celles non prétraitées [55]. Ces résultats apportent une preuve de concept quant au bénéfice potentiel que pourrait apporter la combinaison de stratégies d'immunothérapie.

c. Le peptide GP2

Il s'agit d'un peptide HLA-A2 restreint de 9 acides aminés dérivé du domaine transmembranaire de HER2 (aa654-662) [5]. En dépit de sa faible affinité pour la molécule HLA-A2 [5], des études *in vitro* ont montré qu'il se révèle aussi efficace que le E75 à induire une réponse CTL ; suggérant qu'il pourrait être plus immunogène que le peptide E75 [56]. Une étude clinique de phase I utilisant le peptide GP2 en association avec du GM-CSF est en cours. Le but serait de mettre en place par la suite un essai clinique de vaccination multi-épitopique en associant les peptides E75 et GP2 au sein d'un même vaccin.

5.2 Vaccins peptidiques induisant une réponse immunitaire à prédominance humorale

D'autres approches se sont focalisées sur la détermination d'épitopes peptidiques B spécifiques et sur leur développement pour une utilisation en tant que vaccins anti-HER2. La recherche dans ce domaine se situe encore au stade préclinique.

En utilisant la technologie du *phage display*, une équipe a identifié les épitopes peptidiques spécifiques de HER2 reconnus par 3 AcMs anti-HER2 [57]. L'un de ces AcM possède un effet anti-prolifératif *in vitro* contre des cellules tumorales exprimant HER2. Des souris BALB/c immunisées avec le peptide épitopique spécifique de cet AcM ont développé une réponse B anti-peptide mais aussi anti-HER2. De plus, les sérums de ces souris ont été capables d'inhiber *in vitro* la croissance de cellules BT474 surexprimant HER2 [57].

L'identification d'épitopes B spécifiques du DEC de HER2, par un logiciel de modélisation informatique, et l'immunisation de lapins avec l'un de ces peptides a induit le développement d'une réponse humorale anti-peptide et anti-HER2 [58]. De plus, l'immunisation de souris transgéniques a permis de protéger 83% des animaux contre le développement de tumeurs mammaires spontanées surexprimant HER2/neu [58].

Deux peptides chimériques MVF HER2 (aa316-339) et MVF HER2 (aa485-503) ont été construits par cette équipe, formés chacun par un épitope B relié par un peptide de liaison de 4 aa avec un épitope T (aa 288-302). L'immunisation de lapins avec l'un ou l'autre des deux candidats vaccins a induit une réponse humorale spécifique du peptide et de la protéine HER2 native. De plus, les sérums de ces souris ont été capables d'inhiber *in vitro* la croissance des cellules BT474 surexprimant HER2 [59]. Cette étude a montré que l'association des deux peptides au sein d'une même vaccin multi-épitopique en combinaison avec l'IL-12, réduisait significativement le nombre de métastases pulmonaires induites par une greffe syngénique, chez des souris BALB/c, de cellules tumorales surexprimant HER2 [59].

Une étude plus récente a associé le même épitope T (aa 288-302) avec un autre épitope B spécifique de HER2 (aa597-626). L'intérêt pour ce peptide réside

dans le fait qu'il a été montré que le site de liaison du trastuzumab à HER2 se situait, entre autres, au niveau des résidus 563-626 [60]. Ce vaccin a été capable d'induire le développement d'Ac anti-HER2, agissant par un mécanisme d'ADCC (*Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*) [61].

Une autre équipe a montré des résultats similaires à la seule différence que les peptides ont été sélectionnés par *phage display* [62]. Cette même équipe a identifié 3 peptides épitopiques anti-HER2 B spécifiques dérivés du DEC de HER2 [63]. Chacun de ces peptides a pu induire une réponse humorale anti-HER2 avec une activité anti-tumorale *in vitro* [63]. Une étude plus récente conduite par la même équipe a montré qu'un vaccin multi-épitopique (formé par l'association de ces 3 peptides) en association avec l'IL-12 était capable de protéger 60% des souris immunisées d'un développement de tumeur mammaire spontanée surexprimant HER2/neu [64]. Cet effet anti-tumoral a été associé à la mise en place d'une réponse immunitaire de type Th1 avec sécrétion d'IFN γ et des taux élevés d'IgG anti-HER2 chez les animaux protégés [64].

Finalement, il est intéressant de signaler qu'une étude a permis d'identifier chez des patientes HLA-A24(+) atteintes de cancers du sein, des peptides capables d'induire une réponse anti-HER2 à la fois cellulaire et humorale [65]. Des IgGs sériques spécifiques des peptides de HER2 (aa342-350), (aa485-493) et (aa553-561) ont été détectées respectivement chez 47, 24 et 24% des patientes [65]. De plus, les PBMCs des patientes ont été capables de lyser spécifiquement des cellules tumorales HLA-A24(+) surexprimant HER2. Ces résultats pourraient donner naissance à de nouveaux vaccins peptidiques anti-HER2 ciblant une sous-population, jusque-là ignorée par ce type de stratégie vaccinale, exprimant l'allèle A24 de la molécule HLA. De plus, ce type de vaccin

serait en théorie plus efficace en termes de bénéfice clinique puisque capable d'induire des réponses immunitaires de types, B et T.

6. Vaccins protéiques

Un essai clinique de phase I a été conduit avec le DIC de HER2 (aa676 à aa1255) en situation adjuvante chez 29 patientes en rémission après un cancer du sein ou de l'ovaire surexprimant HER2 [38]. Le vaccin a été injecté par voie intradermique une fois par mois pendant six mois, à trois doses différentes (25, 150 et 900 mg) en association avec 100 µg de GM-CSF. Une réponse cellulaire T anti-DIC de HER2 a été observée chez 89% des patientes immunisées et 82% ont développé des IgG spécifiques de HER2 [38]. Plus de la moitié de ces patientes ont gardé cette immunité cellulaire 9 à 12 mois après la fin des immunisations [38]. Bien que la dose ne permette pas de prédire l'amplitude de la réponse immunitaire, les auteurs ont tout de même observé que les patientes ayant reçu la dose la plus élevée généraient plus rapidement une immunité anti-HER2 [38].

D'autres études cliniques ont été menées avec un autre vaccin protéique, le dHER2, composé du DEC ainsi que d'une portion du DIC de HER2. Limentani *et coll.*, l'ont évalué chez 15 patientes atteintes de cancer du sein. Les investigateurs ont montré que des Ac anti-DEC et DIC ont été développés après 4 immunisations [66] mais les résultats sur le long terme ne sont pas encore publiés.

Une autre équipe a utilisé un vaccin protéique CHP-HER2 composé de la protéine HER2 tronquée (aa1-146) complexée à un système de délivrance formé d'un nanogel de CHolesteryl Pullulane (CHP). Dans un premier essai clinique, 9 patients ont été immunisés en sous-cutané (s.c.) deux fois par semaine avec 300µg de CHP-HER2 pendant 3 semaines, suivi d'injections de doses de rappel.

Le vaccin a été bien toléré et a induit une réponse cellulaire T CD4 et/ou CD8 spécifiques de la protéine HER2 (aa1-146) tronquée [67]. Cette équipe vient de publier les résultats d'un second essai clinique dans lequel 9 patients ont reçu le vaccin seul pendant les 4 premières immunisations puis en association avec les adjuvants de vaccination GM-CSF ou OK-432, 6 autres patients ont reçu dès le début du protocole le vaccin CHP-HER2 en association avec le GM-CSF. Les auteurs ont observé que 14 patients ont développé des IgG spécifiques de la protéine HER2 tronquée. Néanmoins, aucun de ces patients n'a développé d'Ac capables de reconnaître l'antigène HER2 exprimé sous sa forme native à la surface des cellules [68].

7. Les Anticorps anti-idiotypiques (anti-Id)

Les résultats concernant l'utilisation d'Ac anti-Id mimant HER2 pour le traitement des cancers du sein restent très préliminaires et en sont encore au stade de l'établissement de la preuve de concept.

Baral *et coll.*, ont immunisé des souris C57BL/6 avec l'AcM murin anti-Id 520C9-6b mimant un épitope humain de l'Ag HER2. Les résultats de cette étude préclinique ont montré qu'une immunisation avec le 520C9-6b pouvait induire des Ac anti-HER2 chez les souris vaccinées [69].

Au laboratoire, nous avons sélectionné par *phage display* puis caractérisé deux fragments scFv, nommés 40 et 69, d'Ac humains [70]. Ces fragments sont capables de mimer l'Ag HER2 humain et *in vivo*, d'induire une réponse humorale anti-HER2 chez des souris BALB/c.

Plus récemment, une équipe a développé et caractérisé un AcM murin, le 6D12, sélectionné suite à l'immunisation de souris avec l'AcM murin anti-HER2 4D5 (forme murine du trastuzumab). L'immunisation de souris C57Bl/6 avec le 6D12, en association avec un adjuvant de vaccination le QS21, a conduit au

développement d'une réponse humorale anti-6D12 mais également anti-HER2. Les sérums des souris immunisées ont été capables de lyser spécifiquement *in vitro* des cellules tumorales surexprimant HER2 à travers un mécanisme d'ADCC. De plus, les souris immunisées avec le 6D12 ont été protégées contre une greffe syngénique de ces mêmes cellules contrairement aux souris non immunisées ou aux souris greffées avec la même lignée tumorale n'exprimant pas HER2 [71,72].

Conclusion

Les Ag utilisés dans les stratégies vaccinales anti-HER2 peuvent être soit à base de cellules HER2 positives soit spécifiques de HER2 (ADN, peptides, protéines ou encore Ac anti-idiotypiques).

Actuellement, les vaccins peptidiques ou protéiques sont les plus aboutis en termes de développement clinique (comme le peptide E75 actuellement en étude clinique de phase III). Cependant, les vaccins de ce type sont restreints aux patients HLA-A2 positifs et induisent, en général, une réponse immunitaire soit humorale soit cellulaire mais rarement les deux. Les Ac anti-Id quant à eux, bien qu'actuellement encore dans les stades précoces de développement clinique, offrent l'avantage de pouvoir s'adresser à toute la population (indépendamment de la molécule HLA).

Les vaccins anticancéreux sont développés de manière à être spécifiques pour cibler uniquement, ou du moins préférentiellement, les cellules tumorales préservant ainsi les tissus sains d'une toxicité non spécifique. Les données émanant jusqu'à présent des essais cliniques ont montré que les vaccins anticancéreux induisent très peu de toxicité, ce qui représente un avantage majeur en comparaison avec les thérapies conventionnelles telles que la chimiothérapie ou la radiothérapie. En particulier, le risque potentiel de

développer une réponse auto-immune induite par les vaccins n'a pas été rapporté dans les essais cliniques conduits. Il faut cependant se souvenir que, dans le cadre du traitement adjuvant du cancer du sein surexprimant HER2, le risque de cardiotoxicité lié au trastuzumab est réel mais cependant faible. Si le risque lié au vaccin venait à être du même ordre, de quelques pourcents, les données actuelles issues des études cliniques ne seraient pas à même de le mettre en évidence. De plus, l'approche vaccinale présente le désavantage potentiel de la persistance de l'effet du ciblage anti-HER2, même en cas d'interruption du schéma vaccinal, alors même que la cardiotoxicité du trastuzumab est généralement réversible à l'interruption des administrations de l'Ac. De larges études toxicologiques cliniques et précliniques restent indispensables.

Bien que les vaccins anti-HER2 soient capables d'induire une réponse immunitaire spécifique, le réel bénéfice clinique engendré reste encore discutable. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ces résultats négatifs : (i) impact délétère des traitements précédant la vaccination sur le système immunitaire tels que la chimiothérapie et la radiothérapie, (ii), difficulté de rompre la tolérance immunologique, (iii) capacité des tumeurs à échapper au système immunitaire et (iv) stades avancés de la maladie des patients immunisés. Mais, il est cependant à noter que de nombreuses études cliniques se sont adressées à des populations de patientes en situation adjuvante, donc présentant une masse tumorale minimale.

Pour valider une stratégie vaccinale, il est donc important de bien définir la population la plus à même de bénéficier du vaccin en tenant compte des thérapies actuelles standard utilisées au sein de cette population pour les associer à l'approche vaccinale. En particulier, une vaccination anti-HER2 serait

envisageable après traitement au trastuzumab, afin d'essayer de réduire encore le risque de récurrence, même si l'utilisation du trastuzumab en adjuvant semble prévenir environ 50% des récurrences dans cette population initialement à haut risque. C'est dans ce cadre qu'une stratégie vaccinale peut prendre le relais et induire une surveillance immunitaire sur le long terme évitant ou retardant ainsi l'apparition de récurrences.

Les prochains essais cliniques devraient donc s'adresser à des populations ayant un risque accru de récurrence, par exemple les patientes atteintes de tumeurs HER2-positives avec envahissement ganglionnaire. Au sein de cette population, il est important de démontrer qu'un taux élevé de réponse immunitaire dirigée contre l'Ag cible est un marqueur positif de bénéfice clinique. D'autres points critiques des essais de vaccination concernent l'absence de toxicité clinique, notamment cardiaque, les doses, les schémas de vaccination, les modes d'administration, la durée de la vaccination et les doses de rappel permettant d'induire la mise en place d'une réponse immunitaire effectrice et mémoire.

Pour un développement de stratégies vaccinales efficaces le défi reste aujourd'hui de déterminer (i) des marqueurs moléculaires prédictifs de la réponse au vaccin, (ii) le meilleur schéma thérapeutique et (iii) le meilleur adjuvant de vaccination capable d'engendrer la meilleure réponse immunitaire la plus efficace possible. Néanmoins, il n'est pas encore clair aujourd'hui si le développement des deux types de réponse immunitaire cellulaire et humorale soit nécessaire pour obtenir un meilleur effet protecteur.

Références bibliographiques

1. Slichenmyer, W.J. and D.W. Fry, *Anticancer therapy targeting the erbB family of receptor tyrosine kinases*. *Semin Oncol*, 2001. **28**(5 Suppl 16): p. 67-79.
2. Schmidt, M., et al., *Long-term prognostic significance of HER-2/neu in untreated node-negative breast cancer depends on the method of testing*. *Breast Cancer Res*, 2005. **7**(2): p. R256-66.
3. Martin, M., et al., *Randomized phase 3 trial of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide alone or followed by Paclitaxel for early breast cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2008. **100**(11): p. 805-14.
4. Ross, J.S. and J.A. Fletcher, *The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy*. *Oncologist*, 1998. **3**(4): p. 237-252.
5. Peoples, G.E., et al., *Breast and ovarian cancer-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER2/neu-derived peptide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(2): p. 432-436.
6. Slamon, D.J., et al., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(11): p. 783-92.
7. Nahta, R. and F.J. Esteva, *Herceptin: mechanisms of action and resistance*. *Cancer Lett*, 2006. **232**(2): p. 123-38.
8. Berns, K., et al., *A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer*. *Cancer Cell*, 2007. **12**(4): p. 395-402.
9. Cobleigh, M.A., et al., *Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease*. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(9): p. 2639-2648.
10. Bengala, C., et al., *Cardiac toxicity of trastuzumab in metastatic breast cancer patients previously treated with high-dose chemotherapy: a retrospective study*. *Br J Cancer*, 2006. **94**(7): p. 1016-20.
11. Disis, M.L., et al., *Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer*. *Cancer Res*, 1994. **54**(1): p. 16-20.
12. Fisk, B., et al., *Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines*. *J Exp Med*, 1995. **181**(6): p. 2109-2117.
13. Disis, M.L., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines*. *Blood*, 1996. **88**: p. 202-210.
14. Huber, C.H. and T. Wolfel, *Immunotherapy of cancer: from vision to standard clinical practice*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004. **130**(7): p. 367-74.
15. Dols, A., et al., *Vaccination of women with metastatic breast cancer, using a costimulatory gene (CD80)-modified, HLA-A2-matched, allogeneic, breast cancer cell line: clinical and immunological results*. *Hum Gene Ther*, 2003. **14**(11): p. 1117-23.
16. Dols, A., et al., *Identification of tumor-specific antibodies in patients with breast cancer vaccinated with gene-modified allogeneic tumor cells*. *J Immunother*, 2003. **26**(2): p. 163-70.
17. Park, J.W., et al., *Treatment with autologous antigen-presenting cells activated with the HER-2 based antigen Lapuleucel-T: results of a phase I study in immunologic and clinical activity in HER-2 overexpressing breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(24): p. 3680-7.
18. Bernhard, H., et al., *Adoptive transfer of autologous, HER2-specific, cytotoxic T lymphocytes for the treatment of HER2-overexpressing breast cancer*. *Cancer Immunol Immunother*, 2008. **57**(2): p. 271-80.
19. Sakai, Y., et al., *Vaccination by genetically modified dendritic cells expressing a truncated neu oncogene prevents development of breast cancer in transgenic mice*. *Cancer Res*, 2004. **64**(21): p. 8022-8.
20. Chen, Y., et al., *Induction of ErbB-2/neu-specific protective and therapeutic antitumor immunity using genetically modified dendritic cells: enhanced efficacy by cotransduction of gene encoding IL-12*. *Gene Ther*, 2001. **8**(4): p. 316-23.
21. Chen, Z., et al., *Enhanced HER-2/neu-specific antitumor immunity by cotransduction of mouse dendritic cells with two genes encoding HER-2/neu and alpha tumor necrosis factor*. *Cancer Gene Ther*, 2002. **9**(9): p. 778-86.
22. Brossart, P., et al., *Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells*. *Blood*, 2000. **96**(9): p. 3102-8.
23. Czerniecki, B.J., et al., *Targeting HER-2/neu in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion*. *Cancer Res*, 2007. **67**(4): p. 1842-52.
24. Campbell, M., et al., *An adenoviral vector containing an arg-gly-asp (RGD) motif in the fiber knob enhances protein product levels from transgenes refractory to expression*. *Cancer Gene Ther*, 2003. **10**(7): p. 559-70.
25. Sas, S., et al., *Vaccination of fiber-modified adenovirus-transfected dendritic cells to express HER-2/neu stimulates efficient HER-2/neu-specific humoral and CTL responses and reduces breast carcinogenesis in transgenic mice*. *Cancer Gene Ther*, 2008. **15**(10): p. 655-66.

26. Chan, T., et al., *HER-2/neu-gene engineered dendritic cell vaccine stimulates stronger HER-2/neu-specific immune responses compared to DNA vaccination*. *Gene Ther*, 2006. **13**(19): p. 1391-402.
27. Viehl, C.T., et al., *A tat fusion protein-based tumor vaccine for breast cancer*. *Ann Surg Oncol*, 2005. **12**(7): p. 517-25.
28. Wei, W.Z., et al., *Protection against mammary tumor growth by vaccination with full-length, modified human ErbB-2 DNA*. *Int J Cancer*, 1999. **81**(5): p. 748-54.
29. Pilon, S.A., M.P. Piechocki, and W.Z. Wei, *Vaccination with cytoplasmic ErbB-2 DNA protects mice from mammary tumor growth without anti-ErbB-2 antibody*. *J Immunol*, 2001. **167**(6): p. 3201-3206.
30. Piechocki, M.P., S.A. Pilon, and W.Z. Wei, *Complementary antitumor immunity induced by plasmid DNA encoding secreted and cytoplasmic human ErbB-2*. *J Immunol*, 2001. **167**(6): p. 3367-74.
31. Wei, W.Z., et al., *Concurrent induction of antitumor immunity and autoimmune thyroiditis in CD4+ CD25+ regulatory T cell-depleted mice*. *Cancer Res*, 2005. **65**(18): p. 8471-8.
32. Jacob, J., et al., *Activity of DNA vaccines encoding self or heterologous Her-2/neu in Her-2 or neu transgenic mice*. *Cell Immunol*, 2006. **240**(2): p. 96-106.
33. Jacob, J.B., et al., *Control of Her-2 tumor immunity and thyroid autoimmunity by MHC and regulatory T cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(14): p. 7020-7.
34. Rovero, S., et al., *DNA vaccination against rat her-2/Neu p185 more effectively inhibits carcinogenesis than transplantable carcinomas in transgenic BALB/c mice*. *J Immunol*, 2000. **165**(9): p. 5133-42.
35. Gallo, P., et al., *Xenogeneic immunization in mice using HER2 DNA delivered by an adenoviral vector*. *Int J Cancer*, 2005. **113**(1): p. 67-77.
36. Radkevich-Brown, O., et al., *Genetic regulation of the response to Her-2 DNA vaccination in human Her-2 transgenic mice*. *Cancer Res*, 2009. **69**(1): p. 212-8.
37. Disis, M.L., et al., *Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(11): p. 2624-2632.
38. Disis, M.L., et al., *Effect of dose on immune response in patients vaccinated with an her-2/neu intracellular domain protein--based vaccine*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(10): p. 1916-25.
39. Disis, M.L., et al., *Humoral epitope-spreading following immunization with a HER-2/neu peptide based vaccine in cancer patients*. *J Clin Immunol*, 2004. **24**(5): p. 571-8.
40. Knutson, K.L., K. Schiffman, and M.L. Disis, *Immunization with a HER-2/neu helper peptide vaccine generates HER-2/neu CD8 T-cell immunity in cancer patients*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(4): p. 477-84.
41. Butterfield, L.H., et al., *Determinant spreading associated with clinical response in dendritic cell-based immunotherapy for malignant melanoma*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(3): p. 998-1008.
42. Disis, M.L., Strickler JH, Wallace D, Goodell V, Salazar G, Higgins D, Childs J, Tietje K, Dang Y, Slota M, *Cellular immune parameters associated with improved long-term survival in advanced stage breast cancer patients after active immunization with a HER2-specific vaccine*. *ASCO*, 2008. **Abstract 3015**.
43. Webster, D.J., Waisman J, Macleod B, Dela Rosa C, Higgins D, Fintak P, Childs J, Slota M, Salazar LG, Disis ML, *A phase I/II study of a HER2/neu (HER2) peptide vaccine plus concurrent trastuzumab*. *ASCO*, 2006. **Abstract 2528**.
44. Holmes, J.P., et al., *Results of the first phase I clinical trial of the novel II-key hybrid preventive HER-2/neu peptide (AE37) vaccine*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(20): p. 3426-33.
45. Mittendorf, E.A., et al., *The E75 HER2/neu peptide vaccine*. *Cancer Immunol Immunother*, 2008. **57**(10): p. 1511-21.
46. Lustgarten, J., et al., *Identification of Her-2/Neu CTL epitopes using double transgenic mice expressing HLA-A2.1 and human CD.8*. *Human Immunology*, 1997. **52**: p. 109-118.
47. Anderson, B.W., et al., *Peptide priming of cytolytic activity to HER-2 epitope 369-377 in healthy individuals*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(11): p. 4192-200.
48. Knutson, K.L., et al., *Immunization of cancer patients with a HER-2/neu, HLA-A2 peptide, p369-377, results in short-lived peptide-specific immunity*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(5): p. 1014-8.
49. Murray, J.L., et al., *Toxicity, immunogenicity, and induction of E75-specific tumor-lytic CTLs by HER-2 peptide E75 (369-377) combined with granulocyte macrophage colony-stimulating factor in HLA-A2+ patients with metastatic breast and ovarian cancer*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(11): p. 3407-18.
50. Zaks, T.Z. and S.A. Rosenberg, *Immunization with a peptide epitope (p369-377) from HER-2/neu leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/neu+ tumors*. *Cancer Res*, 1998. **58**(21): p. 4902-8.
51. Peoples, G.E., et al., *Clinical trial results of a HER2/neu (E75) vaccine to prevent recurrence in high-risk breast cancer patients*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(30): p. 7536-45.
52. Peoples, G.E., et al., *Combined Clinical Trial Results of a HER2/neu (E75) Vaccine for the Prevention of Recurrence in High-Risk Breast Cancer Patients: U.S. Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(3): p. 797-803.

53. Hueman, M.T., et al., *Levels of circulating regulatory CD4+CD25+ T cells are decreased in breast cancer patients after vaccination with a HER2/neu peptide (E75) and GM-CSF vaccine*. Breast Cancer Res Treat, 2006. **98**(1): p. 17-29.
54. Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi, *Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity*. J Immunol, 1999. **163**(10): p. 5211-8.
55. Mittendorf, E.A., et al., *Investigating the combination of trastuzumab and HER2/neu peptide vaccines for the treatment of breast cancer*. Ann Surg Oncol, 2006. **13**(8): p. 1085-98.
56. Mittendorf, E.A., et al., *Evaluation of the HER2/neu-derived peptide GP2 for use in a peptide-based breast cancer vaccine trial*. Cancer, 2006. **106**(11): p. 2309-17.
57. Yip, Y.L., et al., *Identification of epitope regions recognized by tumor inhibitory and stimulatory anti-ErbB-2 monoclonal antibodies: implications for vaccine design*. J Immunol, 2001. **166**(8): p. 5271-8.
58. Dakappagari, N.K., et al., *Prevention of mammary tumors with a chimeric HER-2 B-cell epitope peptide vaccine*. Cancer Res, 2000. **60**(14): p. 3782-3789.
59. Dakappagari, N.K., et al., *A chimeric multi-human epidermal growth factor receptor-2 B cell epitope Peptide vaccine mediates superior antitumor responses*. J Immunol, 2003. **170**(8): p. 4242-53.
60. Cho, H.S., et al., *Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab*. Nature, 2003. **421**(6924): p. 756-60.
61. Garrett, J.T., et al., *Novel engineered trastuzumab conformational epitopes demonstrate in vitro and in vivo antitumor properties against HER-2/neu*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 7120-31.
62. Riemer, A.B., et al., *Generation of Peptide mimics of the epitope recognized by trastuzumab on the oncogenic protein Her-2/neu*. J Immunol, 2004. **173**(1): p. 394-401.
63. Jasinska, J., et al., *Inhibition of tumor cell growth by antibodies induced after vaccination with peptides derived from the extracellular domain of Her-2/neu*. Int J Cancer, 2003. **107**(6): p. 976-83.
64. Wagner, S., et al., *Delayed tumor onset and reduced tumor growth progression after immunization with a Her-2/neu multi-peptide vaccine and IL-12 in c-neu transgenic mice*. Breast Cancer Res Treat, 2007. **106**(1): p. 29-38.
65. Azuma, K., et al., *Identification of HER2/ neu-derived peptides capable of inducing both cellular and humoral immune responses in HLA-A24 positive breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2004. **86**(1): p. 19-29.
66. Limentani, S., Dorval T, White S, Curigliano G, Campone M, Disis N, Piccart M, Cheever M, Gérard C, Brichard V, *Phase I dose-escalation trial of a recombinant HER2 vaccine in patients with Stage II/III HER2+ breast cancer*. ASCO, 2005. **Abstract 2520**.
67. Kitano, S., et al., *HER2-specific T-cell immune responses in patients vaccinated with truncated HER2 protein complexed with nanogels of cholesteryl pullulan*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(24): p. 7397-405.
68. Kageyama, S., et al., *Humoral immune responses in patients vaccinated with 1-146 HER2 protein complexed with cholesteryl pullulan nanogel*. Cancer Sci, 2008. **99**(3): p. 601-7.
69. Baral, R., et al., *Murine monoclonal anti-idiotypic antibody as a surrogate antigen for human Her-2/neu*. Int J Cancer, 2001. **92**(1): p. 88-95.
70. Coelho, M., et al., *Isolation and characterisation of a human anti-idiotypic scFv used as a surrogate tumour antigen to elicit an anti-HER-2/neu humoral response in mice*. Br J Cancer, 2004. **90**(10): p. 2032-41.
71. Mohanty, K., et al., *Anti-tumor immunity induced by an anti-idiotypic antibody mimicking human Her-2/neu*. Breast Cancer Res Treat, 2007. **104**(1): p. 1-11.
72. Pal, S., et al., *Generation of Her-2/neu vaccine utilizing idiotypic network cascade*. Cancer Biol Ther, 2007. **6**(12): p. 1916-25.