



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0809247-8 A2



* B R P I 0 8 0 9 2 4 7 A 2 *

(22) Data de Depósito: 17/01/2008
(43) Data da Publicação: 09/09/2014
(RPI 2279)

(51) Int.Cl.:
A61K 39/00

(54) Título: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA A
ABLAÇÃO DO ESCAPE MUTACIONAL DE TERAPIAS
MARCADAS PARA CÂNCER.

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 19/03/2007 US 60/895,689,
09/04/2007 US 60/910,796, 09/04/2007 US 60/910,796, 19/03/2007
US 60/895,689

(73) Titular(es): Globeimmune, Inc.

(72) Inventor(es): Alex Franzusoff, David Apelian, Timothy C.
Rodell

(74) Procurador(es): Orlando de Souza

(86) Pedido Internacional: PCT US2008051348 de
17/01/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/115610 de
25/09/2008

**COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA REMOÇÃO DIRECIONADA DE ESCAPE
MUTACIONAL DE TERAPIAS DIRECIONADAS PARA O CÂNCER**

Campo técnico

A presente invenção relaciona-se de modo geral a
5 composições e métodos para seu uso em combinação com
agentes terapêuticos para câncer para realizar a remoção
direcionada de escape mutacional.

Fundamento da invenção

Novas descobertas na biologia de câncer forneceram a
10 oportunidade de desenhar agentes anticâncer específicos
para alvo e promoveram avanços no desenvolvimento de
fármacos. Essas descobertas tornaram possível desenhar
moléculas com alta seletividade contra alvos específicos em
células cancerosas. Segota & Bukowski, *Cleveland Clinic J.*
15 *Med.*, 71(7):551-560 (2004). Por exemplo, o sucesso do
inibidor de tirosina quinase Bcr-Abl imatinib (Gleevec) no
tratamento de leucemia mielóide crônica (CML) tem inspirado
grande expectativa para essa abordagem direcionada.
Capdeville e cols., *Nature Reviews*, 1:493-502 (2002). A
20 terapia direcionada para câncer apresenta um problema
crítico: os alvos desenvolvem mutações de escape que levam,
finalmente, à resistência ao fármaco. Por exemplo, foi
relatado que as mutações urgem em pacientes que eram
inicialmente responsivos ao tratamento com Gleevec e que,
25 como um resultado dessas mutações, são refratários a
tratamento adicional com Gleevec. Gane e cols., *Science*,
293:876880 (2001); Shah e cols., *Célula cancerosa*, 2:117-
125 (2002); Branford e cols., *Blood*, 99(9):37423745 (2002);
Deininger e cols., *Blood*, 105(7):2640-263 (2005); Walz e
30 cols., *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 57:145-164

(2006); and Burgess e cols., *The Scientific World Journal*, 6:918-930 (2006). De modo similar, as mutações no receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) foram encontradas em pacientes com câncer pulmonar de células não pequenas (NSCLC) que se tornaram resistentes à ação de agentes terapêuticos como gefitinib (Iressa) ou erlotinib (Tarceva) que visam especificamente EGFR. Kobayashi e cols., *N. Engl. J. Med.*, 352(8):786-792 (2005). Portanto, a eficácia desses fármacos para câncer é significativamente limitada pela ocorrência de mutações de escape.

Assim, seria desejável pelo menos minimizar a ocorrência de mutantes que surgem com a administração de agentes terapêuticos e/ou profiláticos.

Métodos para despertar uma resposta imune são revelados, por exemplo, em Thyphronitis e cols., *Anticancer Research*, Vol. 24:2443-2454 (2004) and Plate e cols., *Journal of Cell Biology*, Vol. 94:1069 (2005). Sistemas de levedura são revelados, por exemplo, na Pat. U.S. No. 5.830.463, Stubbs e cols., *Nature Med.* 5:625-629 (2001); Lu e cols., *Cancer Research* 64:5084-5088 (2004); e Franzusoff, e cols., *Expert Opin. Bio. Ther.* Vol.5:565-575 (2005).

Todas as referências aqui citadas, incluindo patentes, pedidos de patente e publicações de patente, são aqui incorporadas em sua totalidade por referência.

Breve sumário da invenção

São aqui fornecidas composições e métodos para a remoção direcionada de um escape mutacional associado ao câncer. Em um aspecto, a invenção fornece métodos para direcionar a remoção de um escape mutacional em um indivíduo em necessidade por administração ao indivíduo de

uma quantidade eficaz de um agente terapêutico direcionado em que o agente terapêutico é selecionado do grupo que consiste em um inibidor de tirosina quinase, um inibidor de Src quinase, um agente que afeta a estabilidade de Bcr-Abl, e um agente que age em uma via de sinalização que é abaixo de Bcr-Abl e uma composição que compreende um ou mais dos seguintes: i) um veículo de levedura que compreende ácido nucleico que codifica pelo menos um polipeptídeo mutante associado ao câncer, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo; ii) um veículo de levedura que compreende pelo menos um polipeptídeo mutante associado ao câncer, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo; iii) um veículo de levedura em associação com pelo menos um polipeptídeo mutante associado ao câncer, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo; iv) um veículo de levedura que compreende ácido nucleico que codifica pelo menos um polipeptídeo mutante associado ao câncer, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo carregado de modo intracelular em uma célula dendrítica; ou v) um veículo de levedura e pelo menos um polipeptídeo mutante associado ao câncer, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo carregado de modo intracelular em uma célula dendrítica, em que o polipeptídeo mutante é conhecido por surgir ou surgiu com pelo menos uma mutação específica em resposta à administração de um agente terapêutico e/ou profilático direcionado para câncer. Em alguns aspectos, o agente terapêutico direcionado é um inibidor de tirosina quinase. Em um aspecto, o inibidor de tirosina quinase é imatinib. Em outros aspectos, o inibidor de tirosina quinase é

selecionado do grupo que consiste em imatinib, nilotinib, PD1866326, PD180970, AP23464, BMS- 354825, ON012380, VX-680, and BIRB-796.

Em outro aspecto, o agente terapêutico direcionado é um inibidor de Src quinase. Em alguns exemplos, o inibidor de Src quinase é selecionado do grupo que consiste em PD166326, PD180970, AP23464, BMS-354825, AZM475271, PP1, PP2, AP-23236, CGP76030, e PD173955. Em outro aspecto, o agente terapêutico direcionado é PKC412 ou SU11248. Em outros aspectos, o agente terapêutico direcionado afeta a estabilidade de Bcr-Abl. Em alguns exemplos, o agente direciona proteínas "heat shock" ou outras proteínas de chaperona que se associam com Bcr-Abl. Em outros exemplos, o agente é Geldanamicina/17-AAG ou NVP-LAQ824.

Em outro aspecto, o agente terapêutico direcionado age em uma via de sinalização que é abaixo de Bcr-Abl. Em alguns exemplos, o agente é selecionado do grupo que consiste em SCH66336, BAY-439006, CI-1040, LY294002, wortmanina, OSU-03012, CCI-779, R115777, BMS-214662, U0126, PD184352, rapamicina, RAD001, CCI-779, e AP23573.

A invenção também fornece kits para remoção direcionada de escape mutacional associado ao câncer em um indivíduo em que o mutante de escapee é conhecido por surgir ou surgiu com pelo menos uma mutação específica em resposta à administração de um agente terapêutico e/ou profilático direcionado e em que o kit compreende uma composição de qualquer um dos agentes terapêuticos acima.

A invenção também fornece kits para remoção direcionada de escape mutacional associado ao câncer em um indivíduo em que o mutante de escapee é conhecido por

surgir ou surgiu com pelo menos uma mutação específica em resposta à administração de um agente terapêutico e/ou profilático direcionado e em que o kit compreende um veículo de levedura e pelo menos um polipeptídeo mutante, fragmentos desse que compreendem uma mutação, ou mimetopos. Em um aspecto, o kit também compreende um agente terapêutico e/ou profilático direcionado. Em outro aspecto, o kit também compreende material instrucional para o uso do kit.

10 Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 mostra uma curva de sobrevivência contra leucemia BCR-ABL de tipo selvagem para camundongos de controle vs. vacinados.

A Figura 2 mostra uma curva de sobrevivência contra leucemia mutada para camundongos de controle vs. vacinados.

A Figura 3 mostra uma curva de sobrevivência para camundongos vacinados imunizados com duas construções diferentes de Tarmogen: GI-10,001 (Tarmogen contendo três mutações de escape (E255K, T315I e M351T)) e GI-10,002 (Tarmogen contendo uma mutação de escape (T315I)).

A Figura 4 mostra as contagens de células leucêmicas nos camundongos de controle vs. vacinados. Os camundongos foram vacinados com Tarmogen contendo a mutação de escape T315I. O eixo y indica a percentagem de células GFP-positivas. Os dois círculos abertos próximo ao 0 indicam camundongos vacinados que mostram muito pouca carga de células leucêmicas.

A Figura 5 mostra contagens de células leucêmicas em camundongos que não receberam vacinação, vacinação com GI-10,001 (Tarmogen contendo três mutações de escape (E255K,

T3151 e M351T)) ou GI-10,002 (Tarmogen contendo uma mutação de escape (T315I)).

Descrição detalhada da invenção

Há uma necessidade por agentes fármacos profiláticos e terapêuticos que visem especificamente vias que são únicas para as células tumorais, mas há uma deficiência em que as células tumorais sofrem mutação(s) que permite que elas escapem ao agente fármaco e/ou tornem-se resistentes. São aqui fornecidas composições e métodos para remoção 5 direcionada de escape mutacional associados aos agentes terapêuticos ou profiláticos (também aqui referidos como um polipeptídeo mutante). Essas composições e métodos podem ser usados para despertar uma resposta imune a um polipeptídeo mutante que é conhecido por surgir ou que 10 surgiu em resposta a um agente de fármaco direcionado, ou a uma célula que expressa o polipeptídeo mutante. Em alguns exemplos, a resposta imune é uma resposta imune celular, em alguns exemplos a resposta imune é uma resposta humoral, e em outro exemplo a resposta imune é tanto celular quanto 15 humoral. Em alguns exemplos, a resposta imune celular visa eliminar a célula, como, por exemplo, uma célula cancerosa ou uma célula que sustenta progressão tumoral que escapou do controle e compreende mutações no polipeptídeo visado pelo agente de fármaco, mas a eliminação da célula não é 20 necessária. Em alguns exemplos, a resposta imune celular e/ou humoral bloqueará a proliferação ou replicação celular.

Portanto, são aqui fornecidos métodos para despertar uma resposta imune a um polipeptídeo mutante, ou uma célula 30 que compreende ácido nucleico que codifica um polipeptídeo

mutante e/ou expressa um polipeptídeo mutante, que é conhecido por surgir ou surgiu com uma mutação específica em resposta à administração de um agente terapêutico e/ou profilático(s). Em alguns exemplos, a resposta imune é uma
5 resposta imune celular. Em alguns exemplos a resposta imune é uma resposta imune humoral. Em outros exemplos a resposta imune inclui tanto uma resposta imune celular quanto humoral. Em alguns exemplos, um polipeptídeo mutante é codificado por um oncogene e/ou é expresso por uma célula
10 cancerosa. Em alguns exemplos, um polipeptídeo mutante é associado a ou expresso por uma célula cancerosa. Em alguns exemplos, o agente é direcionado à célula cancerosa. Em alguns exemplos, o agente é uma molécula pequena ou anticorpo.

15 O agente terapêutico direcionado inclui, sem limitação, agentes que inibem a atividade de quinase das proteínas cuja expressão (ou superexpressão) está associada ao desenvolvimento e progressão de câncer. Exemplos de tais quinases incluem Bcr-Abl, Src, Src/Akt, EGFR, PDGFR, Raf,
20 Mek, Erk, PI3K, PDK, AKT, e mTOR. Em outros exemplos, os agentes agem como inibidores gerais dessas proteínas e outra proteína em sua via. Em alguns exemplos, os agentes agem por meio de ligação direta ao sítio ativo da proteína e em outros casos, os agentes causam mudanças alostéricas
25 na proteína de modo a afetar sua atividade. As composições aqui descritas são usadas em combinação com esses agentes terapêuticos direcionados para controlar e/ou eliminar os mutantes de escape que se desenvolvem a partir do uso desses agentes terapêuticos direcionados.

30 **Técnicas gerais**

A prática da presente invenção empregará, a menos que indicado de outra forma, técnicas convencionais de biologia molecular (incluindo técnicas recombinantes), microbiologia, biologia celular, bioquímica, química de ácido nucleico, e imunologia, que são bem conhecidas por aqueles habilitados na técnica. Tais técnicas são explicadas totalmente na literatura, como , *Methods of Enzymology*, Vol. 194, Guthrie e cols., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); *Biology and activities of yeasts*, Skinner, e cols., eds., Academic Press (1980); *Methods in yeast genetics : a laboratory course manual*, Rose e cols., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); *The Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology*, Pringle e cols., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997); *The Yeast Saccharomyces: Gene Expression*, Jones e cols., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993); *The Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Proteína Synthesis, and Energetics*, Broach e cols., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edição (Sambrook e cols., 1989) e *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, terceira edição (Sambrook and Russell, 2001), (referidos de modo único nessa como "Sambrook"); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel e cols., eds., 1987, incluindo suplemento até 2001); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis e cols., eds., 1994); Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York; Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (referidos de modo

único nessa como "Harlow and Lane"), Beaucage e cols. eds., *Current Protocols in Nucleic Acids Chemistry* John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000) and *Vaccines*, S. Plotkin and W. Orenstein, eds. 3ª edição (1999).

5 Definições

Como aqui usado, as formas singulares "um", "uma" e "o/a" incluem referências no plural a menos que explicitamente determinado em contrário.

Como aqui usado, "câncer" inclui, sem limitação,
10 melanomas, carcinoma de célula escamosa, cânceres de mama, carcinomas da cabeça e pescoço, carcinomas da tireóide, sarcomas de tecidos moles, sarcomas ósseos, cânceres testiculares, cânceres prostáticos, cânceres ovarianos, cânceres da bexiga, cânceres cutâneos, cânceres cerebrais,
15 angiossarcomas, hemangiossarcomas, tumores de mastócitos, cânceres hepáticos primários, cânceres pulmonares, cânceres pancreáticos, cânceres gastrointestinais, carcinomas de célula renal, neoplasias hematopoiéticas, leucemias, e cânceres metastáticos desses.

20 Como aqui usado, um "agente" ou "agente de fármaco" terapêutico e/ou profilático que é direcionado a uma célula significa que o agente é direcionado a uma molécula(s) associada ou funcional para causar a transformação de uma célula ou sustentar a progressão do tumor, no caso de
25 câncer. Exemplos de agentes terapêuticos e/ou profiláticos que são desenhados para serem direcionados a uma célula, como uma célula cancerosa, são aqui revelados e são conhecidos na técnica.

Como aqui usado, um "polipeptídeo mutante" engloba um
30 polipeptídeo de comprimento total codificado no genoma bem

como um fragmento desse desde que o fragmento compreenda uma mutação que é conhecida por surgir ou surgiu com uma mutação específica em resposta a um agente, como um agente profilático e/ou terapêutico. Tais polipeptídeos mutantes que surgem com uma mutação específica em resposta a um agente, como um agente profilático e/ou terapêutico direcionado a uma célula, como uma célula cancerosa, são geralmente referidos na técnica como "mutantes de escape". Polipeptídeos mutantes são também aqui referidos como "escape mutacional" bem como "mutante de escape". Uma mutação pode ser encontrada em qualquer região de um polipeptídeo de comprimento total e pode incluir uma substituição de aminoácido, inserção ou deleção ou combinação desses, ou fusão de seqüências não seqüenciais, como encontradas em eventos de translocação. Em alguns exemplos, um polipeptídeo mutante que é conhecido por surgir ou que surgiu com uma mutação específica em resposta a um agente é imunogênico por si, ou seja, sem estar associado a um adjuvante, ou outro vetor ou veículo, como um veículo de levedura, mas isso não é necessário. Em outros exemplos, um polipeptídeo mutante que é conhecido por surgir ou que surgiu em resposta a um agente é imunogênico em associação com um adjuvante que promove sua antigenicidade.

Como aqui usado, "adjuvantes" incluem, por exemplo, um ligante de agonista para um receptor *Toll-like* (TLR) que desperta respostas de citocina de imunidade inata, e que são relatados por serem associados à maturação e ativação de células de apresentação de antígeno (APC); seqüências de nucleotídeos de CpG; RNA de filamento único ou duplo

(agonistas de TLR7); porções lipídicas, como lipopolissacarídeo (LPS); mananas e glicanos, constituintes de levedura (que são relatados por funcionarem através de interação com TLRs 2, 4 e 6); e veículos de levedura, como aqueles aqui descritos.

A administração de um polipeptídeo mutante ou ácido nucleico que codifica o polipeptídeo mutante (que pode ser produzido por qualquer um dos métodos aqui revelados ou conhecidos na técnica) "junto" com o agente não deve significar que o polipeptídeo mutante e agente estão sendo administrados simultaneamente, embora isso seja englobado nos métodos aqui revelados. Um polipeptídeo mutante pode ser administrado antes, concomitantemente ou depois da administração do agente, ou uma combinação dos acima. Um polipeptídeo mutante ou ácido nucleico que codifica o polipeptídeo mutante pode ser administrado horas, dias ou meses depois do agente. Em alguns exemplos, a administração de um polipeptídeo mutante ou ácido nucleico que codifica o polipeptídeo mutante (que pode ser produzido por qualquer um dos métodos aqui revelados ou conhecidos na técnica) é anterior à administração do agente, e pode ser adicionalmente administrada depois da administração do agente, em particular se o agente for conhecido por interferir diretamente ou indiretamente com a proliferação de qualquer tipo de célula.

Como aqui usado, um "mimetopo" refere-se a um epitopo de peptídeo que é capaz de imitar a capacidade de um peptídeo ou polipeptídeo de despertar uma resposta imune, e em alguns exemplos, uma resposta imune celular e/ou humoral, ao polipeptídeo alvo ou célula que expressa o

polipeptídeo alvo. Como aqui usado um "mimetopo" inclui, sem limitação, um peptídeo que imita um ou mais epitopos de uma proteína de polipeptídeo mutante que é conhecida por surgir ou surgiu com uma mutação específica em resposta à
5 administração de um agente terapêutico e/ou profilático. Tais mimetopos podem ser desenhados com o uso de estruturas geradas em computador de complexos MHC-peptídeo e sítios de ligação suposta com o receptor de célula T. Mimetopos também podem ser obtidos por geração de amostras aleatórias
10 de moléculas, como oligonucleotídeos, peptídeos ou outras moléculas orgânicas, e rastreamento de tais amostras para sua capacidade de despertar uma resposta imune, como, por exemplo, uma resposta imune celular, por métodos e ensaios como aqui descritos e conhecidos na técnica.

15 Como aqui usado, "melhoria de um sintoma de uma doença ou infecção" inclui alívio, estabilização, reversão, retardo ou atraso de qualquer sintoma e/ou progressão do estado de doença, que pode ser medido por critérios clínicos e/ou subclínicos.

20 Em alguns exemplos, uma "quantidade eficaz" de um polipeptídeo mutante (ou mimetopo desse), ou ácido nucleico que codifica o polipeptídeo mutante refere-se a uma quantidade capaz de despertar uma resposta imune quando administrada a um mamífero. Em alguns exemplos, a resposta
25 imune é uma resposta imune celular. Em outros exemplos a resposta imune é uma resposta humoral. Em alguns exemplos a resposta imune é uma resposta celular e humoral.

Como aqui usado, "mamífero", "de mamífero" ou "hospedeiro mamífero" inclui humanos e primatas não humanos
30 como chimpanzés e outros símios e espécies de macacos;

animais de fazenda como gado, carneiros, porcos, cabras e cavalos; mamíferos domésticos como cães e gatos; animais de laboratório que incluem roedores como camundongos, ratos e porquinhos da Índia; pássaros, que incluem pássaros domésticos, selvagem e de briga como galinhas, perus e outros galináceos, patos, gansos e outros. O termo não denota uma idade particular. Portanto, indivíduos adultos, juvenis, e recém-nascidos são abrangidos, bem como mamíferos pré-natal.

Um "antígeno" refere-se a uma molécula que contém um ou mais epitopos (linear, conformacional ou ambos) ou determinantes imunogênicos que estimularão um sistema imune do hospedeiro, como um sistema imune de mamífero, para fazer uma resposta específica para antígeno humoral e/ou específica para antígeno celular. Um antígeno pode ser um "imunógeno" por si ou junto com um agente que promove sua antigenicidade. O termo "antígeno" inclui proteína inteira, proteína truncada, fragmento de uma proteína, peptídeo e mimetopo de peptídeo. Os antígenos podem ser de ocorrência natural, ou variantes geneticamente construídas da proteína. O termo "antígeno" inclui antígenos de subunidade, (ou seja, antígenos que são separados e distintos de um organismo inteiro com o qual o antígeno é associado em natureza). Anticorpos como anticorpos anti-idiotipo, ou fragmentos desses, e mimetopos de peptídeo sintético, que são peptídeos sintéticos que podem imitar um antígeno ou determinante antigênico, são também abrangidos pela definição de antígeno como aqui usada. Em alguns exemplos, antígeno engloba um polipeptídeo mutante ou que é obtido a partir de um polipeptídeo mutante que é conhecido

por surgir ou surgiu com uma mutação específica em resposta a um agente profilático e/ou terapêutico, e pode ser de ocorrência natural ou sintético. Um antígeno pode ser tão pequeno quanto um epitopo único, ou maior, e pode incluir múltiplos epitopos. Como tal, o tamanho de um antígeno pode ser tao pequeno quanto 5-12 aminoácidos (por exemplo, um peptídeo) e tão grande quanto uma proteína de comprimento total, incluindo multímeros e proteínas de fusão, proteínas quiméricas, células inteiras, microorganismos inteiros, ou porções desses (por exemplo, lisados de células inteiras ou extratos de microorganismos). Deve-se perceber que em alguns exemplos (ou seja, quando o antígeno é expresso por um vetor, tal como um vetor de levedura, ou vírus de uma molécula de ácido nucleico recombinante), o antígeno inclui, sem limitação, uma proteína, ou fragmento dessa, proteína de fusão, proteína quimérica, multímeros, em vez de uma célula ou microorganismo inteiro.

Como aqui usado, "epitopo" é aqui definido como um sítio antigênico único em um dado antígeno que é suficiente para despertar uma resposta imune, que pode ser uma resposta imune celular e/ou humoral. Aqueles habilitados na técnica reconhecerão que os epitopos da célula T são diferentes em tamanho e composição dos epitopos de célula B, e que os epitopos apresentados na via de complexo de histocompatibilidade principal Classe I (MHC) diferem dos epitopos apresentados na via de MHC Classe II. Geralmente, um epitopo de célula B incluirá pelo menos cerca de 5 aminoácidos mas pode ser tão pequeno quanto 3-4 aminoácidos. Um epitopo de célula T, cmo um epitopo de linfócito T citotóxico (CTL), incluirá pelo menos cerca de

7-10 aminoácidos, e um epitopo de célula T helper pelo menos cerca de 12-20 aminoácidos. Nesse contexto, o antígeno pode ser um mimetopo que é mais eficaz para ativação e amplificação de células T capazes de reconhecer células que expressam o polipeptídeo mutado. Normalmente, um epitopo cujo reconhecimento por células T despertará a remoção de uma célula direcionada incluirá entre cerca de 7 and 15 aminoácidos, como, 8, 9, 10, 12 ou 15 aminoácidos.

Como aqui usado, uma "resposta imunológica" ou "resposta imune" a um polipeptídeo mutante (ou mimetopo desse) ou ácido nucleico que codifica o polipeptídeo (ou ácido nucleico capaz de se ligar ao polipeptídeo mutante, como, por exemplo, siRNA ou RNA anti-senso), ou composição que compreende um polipeptídeo ou ácido nucleico, inclui o desenvolvimento em um mamífero de uma resposta imune celular que reconhece o polipeptídeo. Em alguns exemplos, a resposta imune é uma resposta imune humoral. Em alguns exemplos, a resposta imune celular inclui adicionalmente uma resposta imune humoral. A resposta imune pode ser específica para o polipeptídeo mutante, mas isso não é necessário. A resposta imune que é despertada pela administração de um polipeptídeo mutante, ou ácido nucleico que codifica o polipeptídeo, pode ser qualquer aumento detectável em qualquer faceta da resposta imune (por exemplo, resposta celular, resposta humoral, produção de citocina), quando comparada a uma resposta imune na ausência da administração do polipeptídeo ou ácido nucleico. Uma resposta imune pode ser uma resposta específica de polipeptídeo mutante, mas isso não é necessário. São englobadas na presente invenção composições

em associação com um polipeptídeo mutante (ou mimetopodesse), ou ácido nucleico que codifica o polipeptídeo mutante que desperta a resposta imune.

Como aqui usado, uma "resposta imune humoral" refere-se a uma resposta imune mediada por moléculas de anticorpo ou imunoglobulinas. As moléculas de anticorpo da presente invenção incluem as classes de IgG (bem como subtipos IgG1, IgG2a, e IgG2b), IgM, IgA, IgD, e IgE. Os anticorpos incluem funcionalmente anticorpos de resposta imune primária bem como respostas de anticorpo de memória ou anticorpos de neutralização séricos. Com relação à doença infecciosa, os anticorpos da presente invenção podem servir para, mas não são necessários, neutralizar e ou reduzir a infetividade do vírus que codifica o polipeptídeo mutante, e/ou mediar anticorpo-complemento, ou citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) ao polipeptídeo mutante.

Como aqui usado, uma "resposta imune celular" é uma mediada por linfócitos T e/ou outros leucócitos, incluindo, sem limitação, células "natural killer" (NK) e macrófagos. Os linfócitos T da presente invenção incluem células T que expressam subunidades alfa/beta de receptor de célula T ou receptor gama/delta que expressa células T e podem ser células T efetoras ou supressoras.

Como aqui usado, "linfócitos T" ou "células T" são linfócitos que não produzem anticorpo que constituem uma parte do braço mediado por célula do sistema imune. As células T surgem de linfócitos imaturos que migram da medula óssea para o timo, em que eles sofrem um processo de maturação sob a direção de hormônios tímicos. As células T

em maturação tornam-se imunocompetentes com base em sua capacidade de reconhecer e de se ligar a um antígeno específico. A ativação de células T imunocompetentes é realizada quando um antígeno se liga aos receptores de superfície do linfócito. É conhecido que para gerar respostas de célula T, o antígeno deve ser sintetizado ou introduzido em células, subsequentemente processado em peptídeos pequenos pelo complexo de proteassomo, e translocado para a via secretora do retículo endoplasmático/complexo de Golgi para eventual associação com proteínas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I. Alternativamente, antígenos do peptídeo podem ser introduzidos do exterior das células para deslocar os peptídeos já ligados em receptores de MHC-I ou MHC-II. A imunidade funcional celular inclui células de linfócitos T citotóxicas específicas para antígeno (CTL).

Como aqui usado, "células T *killer* específicas para antígeno", "CTL", ou "células T citotóxicas" como aqui usado referem-se a células que têm especificidade para antígenos do peptídeo apresentados em associação com proteínas do MHC ou antígenos de leucócito humano (HLA) como as proteínas são referidas em humanos. Os CTLs da presente invenção incluem CTL ativado que foi ativado por antígeno específico no contexto de MHC; e CTL de memória ou CTL de recuperação para referir-se a células T que tornam-se reativadas como um resultado de re-exposição ao antígeno bem como CTL *cross-reativo* ou *cross Glade*. Os CTLs da presente invenção incluem células T CD4+ e CD8+. Os CTLs específicos para antígeno ativados da presente invenção

promovem a destruição e/ou lise de células do indivíduo infectado com o patógeno para o qual os CTL são específicos, bloqueando a entrada do patógeno por meio de secreção de quimiocinas e citocinas que incluem, sem
5 limitação, proteína inflamatória de macrófago 1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , e RANTES; e a secreção de fatores solúveis que suprimem as infecções. A imunidade celular da presente invenção também refere-se a resposta específica para antígeno produzida pelo subconjunto *T helper* de células T.
10 As células *T Helper* agem para ajudar a estimular a função, e foco de atividade de células efetoras não específicas contra células que apresentam peptídeo em associação com moléculas de MHC em sua superfície. Uma resposta imune celular também refere-se à produção de citocinas,
15 quimiocinas e outras tais moléculas produzidas por células T ativadas e/ou outros leucócitos que incluem aqueles derivados de células T CD4 e CD8 e células NK. Uma composição que desperta uma resposta imune celular pode servir para sensibilizar um mamífero pela apresentação do
20 polipeptídeo em associação com moléculas de MHC na superfície da célula. A resposta imune mediada por célula é direcionada a, ou próxima, a células que apresentam antígeno em sua superfície. Além disso, linfócitos T específicos para antígeno podem ser gerados para permitir a
25 futura proteção de um hospedeiro imunizado.

A capacidade de um polipeptídeo ou antígeno particular de estimular uma resposta imunológica mediada por célula pode ser determinada por inúmeros ensaios conhecidos na técnica, como por ensaios de linfoproliferação (ativação de
30 linfócito), ensaios de morte de CTL, ou avaliação por

linfócitos T específicos para o antígeno em um indivíduo sensibilizado. Tais ensaios são bem conhecidos na técnica. veja, por exemplo, Erickson e cols., *J. Immunol.* (1993) 151:4189-4199; Doe e cols., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24:2369-2376. Outros métodos de medição de respostas imunes mediadas por célula incluem a medição de citocinas intracelulares ou secreção de citocina por populações de células T, ou por medição de células T específicas para epitopo (por exemplo, pela técnica de tetrâmero) (revista por McMichael, A. J., e O'Callaghan, C. A., *J. Exp. Med.* 187(9)1367-1371, 1998; Mcheyzer-Williams, M. G., e cols., *Immunol. Rev.* 150:5-21, 1996; Lalvani, A., e cols., *J. Exp. Med.* 186:859-865, 1997).

Como aqui usado, uma "resposta imunológica", ou "resposta imune" engloba uma que estimule a produção de CTLs, e/ou a produção ou ativação de células T helper e/ou uma resposta imune mediada por anticorpo. "Linfócitos T" ou "células T" são linfócitos que não produzem anticorpo que constituem uma parte do braço mediado por célula do sistema imune. As células T surgem de linfócitos imaturos que migram da medula óssea para o timo, em que eles sofrem um processo de maturação sob a direção de hormônios tímicos. Aqui, os linfócitos maduros se dividem rapidamente aumentando para um grande número. As células T em maturação tornam-se imunocompetentes com base em sua capacidade de reconhecer e de se ligar a um antígeno específico. A ativação de células T imunocompetentes é realizada quando um antígeno se liga aos receptores de superfície do linfócito no contexto de apresentação por receptores de MHC/HLA e co receptores.

Como aqui usado, uma "composição imunogênica" é uma composição que compreende um polipeptídeo mutante (ou que inclui um mimetopo do epitopo mutado desse) ou ácido nucleico que codifica o polipeptídeo mutante que é conhecido por surgir ou surgiu com uma mutação específica em resposta a um agente terapêutico e/ou profilático, e pode ou não compreender um adjuvante que promove a antigenicidade de um polipeptídeo mutante, em que a administração da composição a um mamífero resulta no desenvolvimento de uma resposta imune celular, uma resposta imune humoral ou uma resposta imune celular e humoral. Uma composição imunogênica inclui uma composição que é capaz de despertar uma resposta imune celular protetora, mas isso não é necessário.

Como aqui usado, "composição profilática" refere-se a uma composição administrada a um mamífero ou hospedeiro que é "imunologicamente naíve" ou não foi previamente exposto ao antígeno do patógeno ou um que não gerou uma resposta imune eficaz para o patógeno para prevenir doença, como câncer e infecção ou reinfeção (no entanto, a presente invenção não requer que a infecção ou re-infecção seja completamente evitada). As composições profiláticas da presente invenção não geram necessariamente a esterilização de imunidade no hospedeiro ou indivíduo ao qual elas foram administradas.

Como aqui usado, "composição terapêutica" refere-se a uma composição administrada a um indivíduo ou hospedeiro que está sujeito a câncer, e em alguns exemplos, progrediu para um estado de doença.

Como aqui usado, o termo "imunização," "imunizar," ou

"imunizado", refere-se ao processo de administração de uma composição imunogênica a um mamífero vivo ou hospedeiro em uma quantidade eficaz para induzir uma resposta imune à composição. Em alguns exemplos, a resposta imune inclui uma
5 resposta imune celular, por exemplo, uma resposta de célula T citotóxica. Em alguns exemplos, a resposta imune inclui uma resposta humoral, por exemplo, produção de anticorpo. Em alguns exemplos, a resposta imune inclui tanto uma resposta celular quanto humoral.

10 Composições e métodos com base em levedura

São aqui fornecidos vetores de levedura, veículos de levedura e composições com base em levedura que compreendem um polipeptídeo mutante que é conhecido por surgir ou surgiu com uma mutação específica em resposta a um agente.

15 Como aqui usado, os termos "vetor de levedura" e "veículo de levedura" são usados de modo intercambiável e incluem, sem limitação, levedura inteira, um esferoplasto de levedura, um citoplasto de levedura, uma levedura fantasma, e um extrato subcelular de membrana de levedura ou fração
20 desses. Em alguns exemplos, uma célula de levedura ou esferoplasto de levedura é usado para preparar o veículo de levedura, que, em alguns exemplos, compreende molécula de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo mutante, de modo que o polipeptídeo é expresso pela célula de levedura ou
25 esferoplasto de levedura. Em alguns exemplos, o veículo de levedura é obtido a partir de uma levedura não patogênica. Em outros exemplos, o veículo de levedura é obtido a partir de uma levedura selecionada do grupo que consiste em:
Saccharomyces, *Schizosaccharomyces*, *Kluveromyces*,
30 *Hansenula*, *Candida* e *Pichia*. Em alguns exemplos, o

Saccharomyces é *S. cerevisiae*.

Em geral, o veículo de levedura e polipeptídeo mutante podem ser associados por qualquer técnica aqui descrita. Em alguns exemplos, o veículo de levedura é carregado intracelularmente com um polipeptídeo mutante. Em outros exemplos, o polipeptídeo mutante é covalentemente ou não covalentemente anexado ao veículo de levedura. Ainda em exemplos adicionais, o veículo de levedura e o polipeptídeo mutante são associados por mistura. Em outros exemplos, o polipeptídeo mutante é expresso recombinantemente pelo veículo de levedura ou pela célula de levedura ou esferoplasto de levedura do qual o veículo de levedura foi derivado.

Conseqüentemente, são aqui fornecidos veículos de levedura que englobam qualquer célula de levedura (por exemplo, uma célula inteira ou intacta) ou um derivado dessa que possa ser usado junto com um polipeptídeo mutante em uma composição, ou como um adjuvante. O veículo de levedura pode assim incluir, sem limitação, um microorganismo de levedura vivo intacto (ou seja, uma célula de levedura que tem todos os seus componentes incluindo uma parede celular), um microorganismo de levedura morto intacto, ou derivados desses incluindo: um esferoplasto de levedura (ou seja, uma célula de levedura desprovida de parede celular), um citoplasto de levedura (ou seja, uma célula de levedura desprovida de parede celular e núcleo), uma levedura fantasma (ou seja, uma célula de levedura desprovida de parede celular, núcleo e citoplasma), ou um extrato de membrana de levedura subcelular ou fração dessa (também referida anteriormente

como uma partícula de levedura subcelular).

Esferoplastos de levedura são tipicamente produzidos por digestão enzimática da parede celular da levedura. Tal método é descrito, por exemplo, em Franzusoff e cols.,
5 *Meth. Enzymol.* 194: 662-674, (1991). Os citoplastos de levedura são tipicamente produzidos por enucleação das células de levedura. Tal método é descrito, por exemplo, em Coon, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 48: 45-55 (1978). Leveduras fantasmas são tipicamente produzidas por re-
10 selagem de uma célula permeabilizada ou lisada e podem, mas não precisam, conter pelo menos algumas das organelas daquela célula. Tal método é descrito, por exemplo, em Franzusoff e cols., *J. Biol. Chem.* 258: 3608-3614 (1983) and Bussey e cols., *Biochim. Biophys. Acta* 553: 185-196
15 (1979). Um extrato de membrana de levedura subcelular ou fração desse refere-se a uma membrana de levedura que é desprovida de um núcleo ou citoplasma natural. A partícula pode ser de qualquer tamanho, incluindo tamanhos que variam do tamanho de uma membrana de levedura natural a
20 micropartículas produzidas por sonificação ou outros métodos de rompimento de membrana conhecidos por aqueles habilitados na técnica, seguido por re-elagem. Um método para a produção de extratos de membrana de levedura subcelulares é descrito, por exemplo, em Franzusoff e
25 cols., *Meth. Enzymol.* 194: 662-674 (1991). Uma pessoa também pode usar frações de extratos de membrana de levedura que contêm porções de membrana de levedura e, quando o antígeno é expresso recombinantemente pela levedura antes da preparação do extrato de membrana de levedura, o antígeno
30 de interesse é parte do extrato. A levedura também pode

sofrer eletroporação ou pode ser carregada com antígenos
alvo, como peptídeos.

Qualquer cepa de levedura pode ser usada para produzir
e um veículo de levedura da presente invenção. As leveduras
5 são microorganismos unicelulares que pertencem a uma de
três classes: Ascomycetes, Basidiomycetes e Fungi
Imperfecti. Embora cepas patogênicas de levedura, ou
mutantes não patogênicas dessas possam ser usadas, em
alguns exemplos, cepas não patogênicas de levedura são
10 usadas. O gênero das cepas de levedura para uso nas
composições e métodos aqui revelados incluem *Saccharomyces*,
Candida (que pode ser patogênica), *Cryptococcus*, *Hansenula*,
Kluyveromyces, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* e
Yarrowia. Em alguns exemplos, as cepas de levedura incluem
15 *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* e
Schizosaccharomyces. Em alguns exemplos, a cepa de levedura
é *Saccharomyces*. As espécies de cepas de levedura incluem
Saccharomyces cerevisiae, *Saccharomyces carlsbergensis*,
Candida albicans, *Candida kefyr*, *Candida tropicalis*,
20 *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus neoformans*, *Hansenula*
anomala, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*,
Kluyveromyces lactis, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*,
Pichia pastoris, *Rhodotorula rubra*, *Schizosaccharomyces*
pombe, e *Yarrowia lipolytica*. Deve ser observado que
25 inúmeras dessas espécies incluem várias subespécies, tipos,
subtipos etc. que devem estar incluídos nas espécies
anteriormente mencionadas. Em alguns exemplos, as espécies
de levedura incluem *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *H.*
polymorpha, *P. pastoris* e *S. pombe*. Em alguns exemplos, *S.*
30 *cerevisiae* é usada por ser ela de manipulação relativamente

fácil e ser "geralmente reconhecida como segura" ou "GRAS" para uso como aditivos de alimentos (GRAS, norma proposta pelo FDA 62F(18938, 17 de abril de 1997). Em alguns exemplos, uma cepa de levedura que é capaz de replicar plasmídeos a um número de cópia particularmente alto, como uma cepa de *S. cerevisiae* cir° é usada. Outras cepas úteis são conhecidas na técnica.

Em alguns exemplos, um veículo de levedura da presente invenção é capaz de se fundir com o tipo de célula ao qual o veículo de levedura e o polipeptídeo mutante estão sendo liberados, como uma célula dendrítica ou macrófago, assim efetuando a liberação particularmente eficiente do veículo de levedura, e em vários exemplos, o antígeno, para o tipo de célula. Como aqui usado, a fusão de um veículo de levedura com um tipo de célula alvo refere-se à capacidade da membrana celular da levedura, ou partícula dessa, de se fundir com a membrana de tipo de célula alvo (por exemplo, célula dendrítica ou macrófago), levando à formação sincicial. Como aqui usado, um sincício é uma massa multinucleada de protoplasma produzida pelo agrupamento de células. É observado, no entanto, que a incorporação de uma porção de direcionamento ou fusogênica no veículo de levedura, embora possa ser desejável sob algumas circunstâncias, não é necessário. Foi mostrado que os veículos de leveduras são prontamente retidos por células dendríticas (bem como outras células, como macrófagos).

Veículos de levedura podem ser formulados em composições com base em levedura, incluindo composições para administração direta a indivíduos sujeitos ou em risco para câncer ou infecção diretamente ou primeiramente

carregadas ex vivo em um carreador como uma célula dendrítica, com o uso de inúmeras técnicas conhecidas por aqueles habilitados na técnica, antes da administração.

São aqui fornecidos veículos de levedura e composições
5 que os compreendem, que compreendem pelo menos um polipeptídeo mutante para administração a um mamífero. Também são fornecidos veículos de levedura e composições que os compreendem que compreendem dois ou três polipeptídeos mutantes para administração ao animal. Esses
10 incluem vacinas com base em levedura que contêm polipeptídeos mutantes com um, dois, três ou mais mutantes de escape para um agente profilático conhecido ou direcionado. Em um aspecto, os veículos de levedura contêm uma mutação de escape. Em outros aspectos, os veículos de
15 levedura contêm duas mutações de escape. Em outros aspectos, os veículos de levedura contêm três mutações de escape.

Em alguns exemplos, a composição compreende um ou mais dos seguintes:

20 i). um veículo de levedura que compreende ácido nucleico que codifica pelo menos um polipeptídeo mutante, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo;

ii). um veículo de levedura que compreende pelo menos
25 um polipeptídeo mutante, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo;

iii). um veículo de levedura em associação com pelo menos um polipeptídeo mutante, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo;

30 iv). um veículo de levedura que compreende ácido

nucleico que codifica pelo menos um polipeptídeo mutante, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo carregado de modo intracelular em uma célula dendrítica; ou

5 v). um veículo de levedura e pelo menos um polipeptídeo mutante, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo carregado de modo intracelular em uma célula dendrítica, em que o polipeptídeo mutante é conhecido por surgir ou surgiu com pelo menos uma mutação
10 específica em resposta à administração de um agente terapêutico e/ou profilático direcionado.

Tais composições podem incluir, um, dois, alguns, vários ou uma pluralidade de polipeptídeos mutantes incluindo um ou mais domínios imunogênicos de um ou mais
15 polipeptídeos mutantes, como desejado. Como aqui usado, polipeptídeo inclui "antígeno". Como aqui usado, um antígeno, inclui qualquer porção de uma proteína (peptídeo, fragmento de proteína, proteína de comprimento total), em que a proteína é de ocorrência natural ou sinteticamente
20 derivada, uma composição celular (célula inteira, lisado de célula ou células rompidas), um organismo (organismo inteiro, lisado ou células rompidas), um carboidrato, um lipídeo, ou outra molécula, ou uma porção desses, em que o antígeno deperta uma resposta imune específica para
25 antígeno (resposta imune humoral e/ou celular).

A levedura exhibe várias das características particulares de complexos imuno-estimulantes, com a vantagem adicional de que ela possui naturalmente propriedades semelhantes a adjuvante e pode ser facilmente
30 construída para expressar múltiplos polipeptídeos,

incluindo antígenos. Lu e cols., *Cancer Research* 64, 5.084-5.088 (2004), demonstraram que uma imunoterapia com base em levedura foi capaz de despertar respostas imunes mediadas por célula a tumores que expressam oncoproteínas Ras que portam uma mutação de aminoácido única. Os resultados demonstraram a capacidade dos veículos de levedura e sistemas com base em levedura de direcionar imunoterapia contra polipeptídeos que portam mutações de aminoácido únicas. Portanto, são aqui fornecidos veículos de levedura e composições com base em levedura que compreendem um polipeptídeo mutante(s) que é conhecido por surgir ou que surgiu em resposta a um agente, e métodos para uso deles para despertar uma resposta imune ao polipeptídeo mutante. Em alguns exemplos, a resposta imune é uma resposta imune celular. Em alguns exemplos, a resposta imune é uma resposta humoral. Em outros exemplos, a resposta imune é tanto celular quanto humoral. Em alguns exemplos adicionais, o veículo de levedura é construído para liberar seletivamente o antígeno aos tipos de célula desejados. Também é fornecido um veículo de levedura que compreende uma cepa de levedura capaz de produzir uma proteína precursora heteróloga que tem um sítio de processamento de aminoácido dibásico. Tal cepa de levedura é capaz de processar corretamente a proteína precursora em pelo menos uma proteína de produto de clivagem.

Em alguns exemplos, o polipeptídeo mutante é codificado por um oncogene, como, por exemplo, Ras. Em alguns exemplos o polipeptídeo mutante é um antígeno associado a tumor ou uma proteína expressa por células cancerosas.

Preparação de Vetores

São aqui fornecidas composições que compreendem um vetor, como um veículo de levedura, em associação com um polipeptídeo mutante. Tal associação inclui a expressão do polipeptídeo pelo vetor, como, por exemplo, por uma levedura recombinante, introdução de um polipeptídeo mutante em um vetor, anexação física do polipeptídeo mutante ao vetor, e mistura do vetor e polipeptídeo mutante, como em um tampão ou outra solução para formulação. Tais métodos são considerados rotineiros para o profissional habilitado.

Por via de ilustração, um vetor de levedura é descrito abaixo. Em alguns exemplos, uma célula de levedura usada para preparar o veículo de levedura é transformada com uma molécula de ácido nucléico heterólogo que codifica um polipeptídeo mutante de modo que o polipeptídeo é expresso pela célula de levedura. Tal levedura é também referida como uma levedura recombinante ou um veículo de levedura recombinante. A célula de levedura pode ser então carregada em uma célula dendrítica como uma célula intacta, a célula de levedura pode ser morta, ou ela pode ser derivada como por formação de esferoplastos de levedura, citoplastos, levedura fantasma, ou partículas subcelulares, qualquer um desses seguido por carga do derivado na célula dendrítica. Esferoplastos de levedura também podem ser diretamente transfectados com uma molécula de ácido nucleico recombinante (por exemplo, o esferoplasto é produzido a partir de uma levedura inteira, e então transfectado) para produzir um esferoplasto recombinante que expressa um antígeno.

De acordo com a presente invenção, uma molécula de ácido nucleico isolado, ou sequência de ácidos nucleicos, é uma molécula ou sequência de ácidos nucleicos que foi removida de pelo menos um componente com o qual ela é naturalmente associada. Assim, "isolado" não reflete necessariamente a extensão em que a molécula de ácido nucleico foi purificada. Uma molécula de ácido nucleico isolado útil para transfectar um vetor, como um veículo de levedura, inclui DNA, RNA, ou derivados de DNA ou RNA. Uma molécula de ácido nucleico isolado pode ser de filamento duplo ou de filamento único. Uma molécula de ácido nucleico isolado útil na presente invenção inclui moléculas de ácido nucleico que codificam uma proteína ou um fragmento dessa, desde que o fragmento contenha pelo menos um epitopo útil em uma composição da presente invenção.

As moléculas de ácido nucleico podem ser transformadas em um vetor, como um veículo de levedura, por qualquer método conhecido na técnica, incluindo, sem limitação, difusão, transporte ativo, fusão de lipossomo, eletroporação, sonificação em banho, e engenharia genética.

As moléculas de ácido nucleico transformadas em veículos de levedura podem incluir sequências de ácidos nucleicos que codificam um ou mais polipeptídeos mutantes. Tais moléculas de ácido nucleico podem compreender regiões de codificação parciais ou inteiras, regiões reguladoras, ou combinações dessas. Uma vantagem das cepas de levedura é sua capacidade de carregar inúmeras moléculas de ácido nucleico e de serem capazes de produzir inúmeras proteínas heterólogas. Em alguns exemplos, um número de antígenos a serem produzidos por um veículo de levedura é qualquer

número de antígenos que possam ser razoavelmente produzidos por um veículo de levedura, e tipicamente varia de pelo menos um a pelo menos cerca de 5 ou mais. Em um exemplo, cerca de 2 a cerca de 5 antígenos são produzidos pelo
5 veículo de levedura.

Um polipeptídeo mutante codificado por uma molécula de ácido nucleico em um veículo de levedura pode ser uma proteína de comprimento total, ou pode ser uma proteína funcionalmente equivalente em que os aminoácidos foram
10 deletados (por exemplo, uma versão truncada da proteína), inseridos, invertidos, substituídos e/ou derivados (por exemplo, acetilados, glicosilados, fosforilados, atado por uma âncora de glicerofosfatidil inositol (GPI)) de modo que a proteína modificada tem uma função biológica
15 substancialmente similar àquela da proteína natural (ou que tem função aumentada ou inibida quando comparada à proteína natural, se desejado). As modificações podem ser realizadas por técnicas conhecidas na prática que incluem, sem limitação, modificações diretas à proteína ou modificações
20 à seqüência de ácidos nucleicos que codifica a proteína com o uso, por exemplo, de técnicas de DNA clássicas ou recombinantes para efetuar mutagênese aleatória ou direcionada.

A expressão of polipeptídeos mutantes em vetores é
25 realizada com o uso de técnicas conhecidas por aqueles habilitados na técnica. Resumidamente, a molécula de ácido nucleico que codifica pelo menos um polipeptídeo mutante desejado é inserida em um vetor de expressão detal maneira que a molécula de ácido nucleico é operacionalmente ligada
30 a uma seqüência de controle de transcrição para ser capaz

de efetuar a expressão constitutiva ou regulada da molécula de ácido nucleico quando transformada em uma célula de levedura hospedeira. As moléculas de ácido nucleico que codificam um ou mais polipeptídeos mutantes podem ser n um
5 ou mais vetores de expressão operacionalmente ligados a uma ou mais seqüência de controle de transcrição.

Em uma molécula recombinante da presente invenção, as moléculas de ácido nucleico são operacionalmente ligadas a vetores de expressão que contêm seqüências reguladoras como
10 seqüências de controle de transcrição, seqüências de controle de tradução, origens de replicação, e outras seqüências reguladoras que são compatíveis com o vetor e que controlam a expressão de moléculas de ácido nucleico. Em particular, as moléculas recombinantes da presente
15 invenção incluem moléculas de ácido nucleico que são operacionalmente ligadas a uma ou mais seqüências de controle de transcrição. A frase "operacionalmente ligada" refere-se à ligação de uma molécula de ácido nucleico a uma seqüência de controle de transcrição em uma maneira que a
20 molécula seja capaz de ser expressa quando transfectada (ou seja, transformada, transduzida ou transfectada) em uma célula hospedeira.

A seqüência de controle de transcrição, que pode controlar a quantidade de proteína produzida, inclui
25 seqüências que controlam a iniciação, alongamento, e terminação da transcrição. Seqüências de controle de transcrição particularmente importantes são aquelas que controlam a iniciação da transcrição, como seqüências de ativação promotoras e acima. Inúmeras seqüências de
30 ativação acima (UASs), também referidas como

intensificadoras são conhecidas e podem ser usadas em vetores.

A transfecção da molécula de ácido nucleico em um vetor pode ser realizada por qualquer método pelo qual a
5 molécula de ácido nucleico é administrada na célula e inclui, sem limitação, difusão, transporte ativo, sonificação em banho, eletroporação, microinjeção, lipofecção, adsorção, e fusão de protoplasto. As moléculas transfectadas de ácido nucleico podem ser integradas em um
10 cromossomo ou mantidas em vetores extracromossômicos com o uso de técnicas conhecidas por aqueles habilitados na técnica. No caso de levedura, citoplastos de levedura, leveduras fantasmas, e extratos de membrana de levedura subcelular ou frações desses também podem ser produzidos de
15 modo recombinante por transfecção de microorganismos de levedura intactas ou esferoplastos de levedura com as moléculas de ácido nucléico desejadas, produzindo o antígeno nela, e então manipulando os microorganismos ou esferoplastos com o uso de técnicas conhecidas por aqueles
20 habilitados na técnica para produzir citoplastos, fantasmas ou extratos de membrana de levedura subcelulares ou frações desses contendo os antígenos desejados.

As condições eficazes para a produção de vetores recombinantes e expressão do polipeptídeo mutante pelo
25 vetor incluem um meio eficaz em que o vetor pode ser cultivado. Um meio eficaz é tipicamente um meio aquoso que compreende fontes assimiláveis de carboidrato, nitrogênio e fosfato, bem como sais adequados, minerais, metais e outros nutrientes, como vitaminas e fatores de crescimento. O meio
30 pode compreender nutrientes complexos ou pode ser um meio

mínimo. Os vetores da presente invenção podem ser cultivados em vários recipientes, que incluem, sem limitação, biorreatores, frascos de Erlenmeyer, tubos de teste, placas de microtítulo, e placas de Petri. A cultura é realizada em uma temperatura, pH e conteúdo de oxigênio adequados para a cepa de levedura. Tais condições de cultura estão dentro do conhecimento da pessoa de habilidade comum na técnica (veja, por exemplo, Guthrie e cols. (eds.), 1991, *Methods in Enzymology*, vol. 194, Academic Press, San Diego).

Em um exemplo da presente invenção, como uma alternativa à expressão de um polipeptídeo mutante em um vetor, um vetor, como um veículo de levedura é carregado intracelularmente no polipeptídeo mutante, ou peptídeos ou mimetopos que agem como epitopos para ativação da resposta imune mediada por célula T contra as células que portam o polipeptídeo mutado. Subseqüentemente, o vetor, que agora contém intracelularmente os epitopos específicos para o polipeptídeo mutante, pode ser administrado ao paciente ou carregado em um carreador como uma célula dendrítica (como abaixo descrito). Com relação aos veículos de levedura, os polipeptídeos mutantes podem ser inseridos diretamente nos veículos de levedura da presente invenção por técnicas conhecidas por aqueles habilitados na técnica, como por difusão, transporte ativo, fusão de lipossomo, eletroporação, fagocitose, ciclos de congelamento-descongelamento e sonificação em banho.

Os veículos de levedura que podem ser diretamente carregados com um polipeptídeo mutante ou peptídeos que visam os epitopos mutados incluem levedura intacta, bem

como esferoplastos, fantasmas ou citoplastos, que podem ser carregados com antígenos depois da produção, mas antes do carregamento em células dendríticas. Alternativamente, a levedura intacta pode ser carregada com o antígeno, e então

5 esferoplastos, fantasmas, citoplastos, ou partículas subcelulares podem ser preparadas a partir deles. Qualquer número de antígenos pode ser carregado em um veículo de levedura, de pelo menos 1, 2, 3, 4 ou qualquer número inteiro até centenas ou milhares de antígenos, como seria

10 fornecido pela carga de um microorganismo, pela carga de uma célula de tumor de mamífero, ou porções dessas, por exemplo.

Em outro exemplo, um antígeno mutante é fisicamente anexado ao vetor, como um veículo de levedura. A anexação

15 física do polipeptídeo mutante ao vetor pode ser realizada por qualquer método adequado na técnica, incluindo métodos de associação covalente e não covalente que incluem, sem limitação, entrecruzamento químico do polipeptídeo mutante à superfície externa do vetor, ou ligação biológica do

20 polipeptídeo mutante à superfície externa do vetor, como pelo uso de um anticorpo ou outro parceiro de ligação. O entrecruzamento químico pode ser realizado, por exemplo, por métodos que incluem ligação de glutaraldeído, rotulagem por fotoafinidade, tratamento com carbodiimidas, tratamento

25 com agentes químicos capazes de realizar ligações de dissulfeto, e tratamento com outros agentes químicos de entrecruzamento padrão na técnica. Alternativamente, no caso de levedura, um agente químico pode fazer contato com o veículo de levedura que altera a carga da bicamada de

30 lipídeo da membrana da levedura ou a composição da parede

celular de modo que a superfície externa da levedura mais provavelmente se funde ou liga a antígenos que têm características de carga particulares. O direcionamento de agentes como anticorpos, peptídeos de ligação, receptores solúveis, e outros ligantes também podem ser incorporados em um antígeno mutante como uma proteína de fusão ou associados com um antígeno para ligação do antígeno ao vetor.

Ainda em outro exemplo, o vetor e polipeptídeo mutante são associados um com o outro por um mecanismo de ligação não específico ou não covalente mais passivo como por mistura leve do vetor e o antígeno juntos em um tampão ou outra formulação adequada.

Em alguns exemplos da invenção, um vetor e antígeno mutante são ambos carregados de modo intracelular em um carreador como uma célula dendrítica ou macrófago para formar uma composição imunogênica. Uma célula dendrítica pode ser qualquer célula dendrítica conhecida na técnica. As células dendríticas são células de linhagens de monócito e linfócito, e são conhecidas por serem as células de apresentação de antígeno mais potentes (APC) e por estimular as respostas de célula T específicas para antígeno. As células dendríticas maduras são tipicamente identificadas como tendo os seguintes fenótipos de marcador de superfície celular: MACS⁻, CD80⁺, CD83⁺, CD86⁺, CD401^w, CD54⁺, MHC Classe I e MHC Classe II, e são capazes de captação de FITC-dextrano. A célula dendrítica usada na composição da presente invenção é em alguns exemplos, isolada de um paciente ao qual a composição é administrada (ou seja, células autólogas). As células dendríticas podem

ser isoladas da medula óssea ou de sangue periférico. Tais células podem ser geradas, por exemplo, de monócitos do sangue periférico por cultura na presença de fator estimulante de colônia de granulócito macrófago, IL-4, e 5 TNF- α , por exemplo. Outros métodos para isolar e gerar células dendríticas são conhecidos na técnica. (veja, por exemplo, Wilson e cols., 1999, *Immunol* 162: 3.070-8; Romani e cols., 1994, *J. Exp Med* 180: 83-93; Cauxetal., 1996, *J. Exp Med* 184: 695-706; e Kiertscher e cols., 1996, *J. Leukoc. Biol* 59: 208-18).

Para que as células dendríticas apresentem de modo eficaz antígenos para células T nativas, células dendríticas imaturas devem ser ativadas a maduras, como definido pela supra-regulação de MHC e moléculas co-estimulantes. A levedura fornece um estímulo de ativação poderoso para células dendríticas, através de receptores Toll-like (TLRs) e receptores fagocíticos (veja, por exemplo, D.M. Underhill e B. Gantner, 2004, *Microbes and Infection* vol. 6: páginas 1.368-1.373; Takeda K. e Akira S., 2005, *International Immunology*, vol. 17: páginas 1-14), 15 receptores de manana, glicano e dectina, resultando na supra-regulação de receptores imunes co-estimulantes, moléculas MHC, e secreção de citocinas imunomoduladoras. Além disso, quando a levedura é pré-carregada com o 25 antígeno antes de ser carregada nas células dendríticas, é fornecido antígeno para células dendríticas em pacotes concentrados distintos que são avidamente internalizados, assim aumentando de modo eficaz a quantidade de antígeno disponível para o processamento. Como será percebido pelo 30 profissional habilitado, vetores adicionais podem ser

usados para carregar as células dendríticas.

Várias formas em que a carga de ambos componentes pode ser realizada são discutidas em maiores detalhes abaixo. Como aqui usado, o termo "carregada" e derivados desse
5 refere-se à inserção, introdução, ou entrada de um componente (por exemplo, o veículo de levedura e/ou antígeno) em uma célula (por exemplo, uma célula dendrítica). Para carregar um componente intracelularmente refere-se à inserção ou introdução do componente a um
10 compartimento intracelular da célula (por exemplo, através da membrana plasmática e no mínimo, no citoplasma, um fagossomo, um lisossomo, ou algum espaço intracelular da célula). Para carregar um componente em uma célula faz-se referência a qualquer técnica pela qual o componente é
15 forçado a entrar na célula (por exemplo, por eletroporação) ou é colocado em um ambiente (por exemplo, em contato com ou próximo a uma célula) em que o componente deverá provavelmente entrar na célula por algum processo (por exemplo, fagocitose). As técnicas de carga incluem, sem
20 limitação, difusão, transporte ativo, fusão de lipossomo, eletroporação, fagocitose, e sonificação em banho. Em alguns exemplos, os mecanismos passivos para a carga de uma célula dendrítica com o veículo de levedura e/ou antígeno são usados, tais mecanismos passivos incluem fagocitose do
25 veículo de levedura e/ou antígeno pela célula dendrítica.

No caso de levedura, o veículo de levedura e o polipeptídeo mutante podem ser carregados na célula dendrítica aproximadamente ao mesmo tempo ou simultaneamente, embora também seja possível carregar um
30 componente na célula, seguido pelo outro em algum período

posterior. Em alguns exemplos, o veículo de levedura e o polipeptídeo mutante são associados um com o outro antes da carga na célula dendrítica. Por exemplo, um veículo de levedura recombinante que expressa um polipeptídeo mutante ou qualquer outro complexo ou mistura de veículo de levedura ande polipeptídeo mutante pode ser carregado em uma célula dendrítica. A célula dendrítica pode ser adicionalmente carregada com polipeptídeo mutante livre, ou seja, um polipeptídeo que não é diretamente associado com um veículo de levedura quando ele é introduzido (carregado) na célula dendrítica. A adição do polipeptídeo livre com um complexo de veículo de levedura-antígeno pode fornecer uma melhoria adicional da resposta imune contra o polipeptídeo. O polipeptídeo(s) livre carregado na célula dendrítica não precisa ser o mesmo que o expresso pelo veículo de levedura, carregado no veículo de levedura, ou associado com o veículo de levedura. Desse modo, a resposta imune contra um alvo pode ser aumentada.

Em alguns exemplos, uma composição que compreende o polipeptídeo mutante ou ácido nucleico que o codifica, compreende um ou mais adjuvantes, incluindo aqueles como aqui descrito, e/ou carreadores, embora isso não seja necessário. Os adjuvantes são tipicamente substâncias que geralmente aumentam a resposta imune de um animal a um antígeno específico. Adjuvantes adequados incluem, sem limitação, agonistas de TLR como aqui descrito, seqüências de CpG (veja, por exemplo, Krieg e cols. WO 96/02555), RNA de filamento único, RNA de filamento duplo, adjuvante de Freund, outros componentes da parede celular bacteriana (incluindo LPS, flagelina), sais com base em alumínio, sais

com base em cálcio, sílica, polinucleotídeos, toxóides, proteínas séricas, proteínas de revestimento viral, outras preparações derivadas de bactéria, interferon gama, adjuvantes de copolímero em bloco, como adjuvante *Hunter's*
5 *Titermax* (CytRx.TM., Inc. Norcross, Ga.), adjuvantes Ribi (disponível por Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.); e saponinas e seus derivados, como Quil A (disponível por Superfos Biosector A/S, Denmark).

Os carreadores são tipicamente compostos que aumentam
10 a meia-vida de uma composição terapêutica no animal tratado. Carreadores adequados incluem, sem limitação, formulações poliméricas de liberação controlada, implantes biodegradáveis, lipossomos, óleos, ésteres e glicóis.

As composições imunogênicas da presente invenção
15 também podem compreender um ou mais excipientes farmacologicamente aceitáveis. Como aqui usado, um "excipiente farmacologicamente aceitável" refere-se a qualquer substância adequada para liberação de uma composição útil nos métodos da presente invenção a um local
20 adequado *in vivo* ou *ex vivo*. Em alguns exemplos, os excipientes farmacologicamente aceitáveis são capazes de manter um vetor (ou uma célula dendrítica que compreende o vetor) em uma forma que, depois da chegada do vetor ou célula em uma célula alvo, tecido, ou local no corpo, o
25 vetor (associado com um polipeptídeo mutante) ou a célula dendrítica (carregada com um vetor e antígeno mutante), é capaz de despertar uma resposta imune, incluindo uma resposta imune celular, uma resposta imune humoral, ou ambas, no local alvo (observando que o local alvo pode ser
30 sistêmico). excipientes adequados da presente invenção

incluem excipientes ou fórmulas que transportam, mas não direcionam especificamente a composição ou vacina a um local (também aqui referido como um carreador não direcionado). Exemplos de excipientes farmaceuticamente
5 aceitáveis incluem, sem limitação, água, solução salina, solução salina tamponada por fosfato, solução de Ringer, solução de dextrose, soluções que contêm soro, solução de Hank, outras soluções aquosas fisiologicamente equilibradas, óleos, ésteres e glicóis. Carreadores aquosos
10 podem conter substâncias auxiliares adequadas necessárias para aproximar às condições fisiológicas do receptor, por exemplo, por aumento da estabilidade química e isotonicidade. As substâncias auxiliares adequadas incluem, por exemplo, acetato de sódio, cloreto de sódio, lactato de
15 sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, e outras substâncias usadas para produzir tampão de fosfato, tampão Tris, e tampão de bicarbonato. As substâncias auxiliares podem também incluir conservantes, como timerosal, m- ou o-cresol, formalina e álcool benzol.

20 **Câncer**

Como aqui usado, câncer inclui qualquer tipo de tumor ou neoplasia, incluindo, sem limitação, câncer colo-retal, melanomas, carcinoma de célula escamosa, cânceres de mama, carcinomas da cabeça e pescoço, carcinomas da tireóide,
25 sarcomas de tecidos moles, sarcomas ósseos, cânceres testiculares, cânceres prostáticos, cânceres ovarianos, cânceres da bexiga, cânceres cutâneos, cânceres cerebrais, angiossarcomas, hemangiossarcomas, tumores de mastócitos, cânceres hepáticos primários, cânceres pulmonares, cânceres
30 pancreáticos, cânceres gastrointestinais, carcinomas de

célula renal, neoplasias hematopoiéticas, leucemias, e cânceres metastáticos desses. A invenção contempla as leucemias em sua definição de "câncer". Leucemia mielogênica crônica é um tipo de câncer para o qual essa invenção contemplou o uso no tratamento e profilaxia.

Exemplos de antígenos de cânceres específicos incluem, sem limitação, MAGE (incluindo, sem limitação MAGE3, MAGEA6, MAGEA10), NY-ESO-1, gp100, tirosina, EGFR, PSA, PSMA, VEG-F, PDGFR, KIT, PMSA, CEA, HER2/neu, Muc-1, hTERT, MART1, TRP-1, TRP-2, Bcr-Abl, e formas oncogênicas mutantes de p53 (TP53), p'73, Ras, Raf, PTENSrc, p38, BRAF, APC (polipose adenomatosa coli), myc, VHL (proteína de von Hippel Lindau), Rb-1 (retinoblastoma), Rb-2, BRCA1, BRCA2, AR (receptor de androgênio), Smad4, MDR1 e FLT3.

Em alguns exemplos, um antígeno de câncer é, ou é obtido de, uma molécula (como uma proteína, um peptídeo, uma glicoproteína, ou um carboidrato) que é adequada para direcionamento por um agente terapêutico e/ou profilático. Os alvos moleculares para agentes terapêuticos e/ou profiláticos de câncer são conhecidos na técnica, e incluem, sem limitação, receptores de superfície celular (como tirosina fosfatases receptoras, serine/treonina quinases receptoras, etirosina quinases receptoras), moléculas de sinalização intracelular (como tirosina quinases intracelulares e outras moléculas de sinalização secundárias), e fatores de transcrição, reguladores de ciclo celular, componentes de proteassomo, proteínas envolvidas na angiogênese, proteínas envolvidas no controle da apoptose, e proteínas de chaperona.

Foi observado que o direcionamento de agentes

terapêuticos e/ou profiláticos para câncer resulta na presença de mutantes de escape, ou seja, polipeptídeos mutantes. Por exemplo, as mutações foram encontradas em Bcr-Abl que foram relatados por fazerem os indivíduos
5 previamente responsivos ao tratamento do Bcr-Abl inibidor de tirosina quinase imatinib (Gleevec) tornarem-se resistentes ao tratamento. Gorre e cols., *Science*, 293:876-880 (2001); Shah e cols., *Cancer Cell*, 2:117-125 (2002); Branford e cols., *Blood*, 99(9):3742-3745 (2002); Deininger
10 e cols., *Blood*, 105(7):2640-2663 (2005). De modo similar, as mutações em EGFR também foram encontradas em pacientes com câncer pulmonar de células não pequenas (NSCLC) o que os torna resistentes ao tratamento com gefitinib (Iressa) ou erlotinib (Tarceva). Kobayashi e cols., *N. Engl. J. Med.*,
15 352(8):786-792 (2005). A eficácia desses agentes anticâncer é portanto significativamente limitada pelo surgimento de polipeptídeos mutantes.

Conseqüentemente, são aqui fornecidas composições imunogênicas que compreendem polipeptídeos mutantes
20 codificados por oncogenes e/ou expressos por células cancerosas ou ácido nucleico que codifica os polipeptídeos mutantes que são conhecidos por surgirem ou que surgiram com uma mutação específica em resposta à administração de um agente terapêutico e/ou profilático, bem como métodos
25 para despertar uma resposta imune ao polipeptídeo mutante ou célula que expressa o polipeptídeo mutante. Em alguns exemplos, a resposta imune é uma resposta imune celular. Em alguns exemplos, a resposta imune é uma resposta imune humoral. Em outros exemplos, a resposta imune inclui tanto
30 respostas celulares quanto humorais.

Os polipeptídeo mutantes de antígenos de câncer podem ser pré-existent no mamífero, ou seja, presentes no momento do diagnóstico, e surgem seletivamente como um resultado da administração do agente terapêutico e/ou profilático(s). Alternativamente, os polipeptídeo mutantes podem surgir como um resultado da pressão imposta pelo agente. A mutação pode estar localizada em qualquer posição de aminoácido no antígeno de câncer. Embora as mutações de polipeptídeos sejam descritas no contexto de uma mutação única, deve-se entender que o polipeptídeo mutante pode compreender mais de uma (como duas, três, quatro, cinco, ou mais) mutações de aminoácidos.

Em alguns exemplos, o polipeptídeo mutante compreende uma mutação além da região de junção em Bcr-Abl. Bcr-Abl é uma tirosina quinase constitutivamente ativa que resulta de uma translocação de DNA entre o cromossomo 9 e 22, e assim funde os genes Bcr e Abl no cromossomo Filadelfia. Bcr-Abl é relatado por ser causador da patogênese de leucemia mielóide crônica (LMC), e sua atividade de quinase constitutiva central a sua capacidade de transformar células hematopoiéticas *in vivo*. Imatinib (Gleevec, 2-fenilaminopirimidina), um inibidor de tirosina quinase, é um agente terapêutico para LMC. Várias mutações de escape em BcrAbl que tornam a proteína resistentes à terapia com fármaco (por exemplo, tratamento com Gleevec) foram identificadas *in vivo* e *in vitro*. Deininger e cols., *Blood*, 105(7):2640-2653 (2005); Azam e cols., *Cell*, 112:831-43 (2003). Essas mutações estão localizadas em vários domínios de Bcr-Abl, incluindo, sem limitação, um domínio de quinase (como a alça P, a alça A, T315, a hélice C, a região de

contato SH3, ou a região de contato SH2), o domínio cap, o domínio SH3, o domínio SH2, e outras regiões de ligante. Em uma modalidade, o polipeptídeo mutante compreende E255K, T315I, e M351T. Em outras modalidades, o polipeptídeo mutante compreende T315I. Em outras modalidades, o polipeptídeo mutante compreende E255K. Em outras modalidades, o polipeptídeo mutante compreende M351T. ainda em outras modalidades, o polipeptídeo mutante compreende uma combinação de dois dos seguintes: E255K, T315I, e M351T (por exemplo, E255K/T315I ou T315I/M351T ou E255K/M351T). em outra modalidade, o mutante de escape é V299L. Em outra modalidade, o mutante de escape é T315A. Em outra modalidade, o mutante de escape é F317V. Em outra modalidade, o mutante de escape é F311I. para revisões sobre direcionamento de mutantes de escape para imatinib (Gleevec), veja, por exemplo, Walz e cols., *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 57:145-164 (2006) e Burgess e cols., *The Scientific World Journal*, 6:918-930 (2006).

O antígeno de câncer pode conter uma ou mais mutações em diferentes posições de aminoácido. Para Bcr-Abl e sua resposta ao tratamento com imatinib (Gleevec), várias mutações de escape foram descritas na técnica. Em um aspecto, a mutação é uma mutação de escape T315I. Em outro aspecto, a mutação é uma mutação E255K. Ainda em outro aspecto, a mutação é uma mutação M351T. Em outros aspectos, as mutações são uma combinação de todas as três E255K, T315I e M351T. Em outros aspectos, as mutações são uma combinação de duas das três mutações acima reveladas (por exemplo, E255K/T315I ou T315I/M351T ou E255K/M351T). O antígeno de câncer também pode conter outras mutações, como

mutações associadas com eventos de transformação.

Em alguns exemplos, um polipeptídeo mutante pode ser um polipeptídeo de fusão que contém múltiplos domínios imunogênicos de um ou mais polipeptídeos mutantes de
5 antígenos de câncer. Por exemplo, é conhecido que há várias diferentes mutações na proteína Bcr-Abl que surgem como mutações de escape mesmo com a administração de Gleevec (por exemplo, E255K, T315I, M351T, V299L, T315A, F317V, ou F311I). Um polipeptídeo mutante pode compreender uma ou
10 mais mutações de Bcr-Abl na mesma posição e/ou em posições diferentes e/ou combinações de mutações em mais de uma posição.

Assim, em um aspecto, a invenção fornece um método para direcionamento da remoção de um escape mutacional em
15 um indivíduo em necessidade, por administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um agente terapêutico direcionado e uma composição que compreende um ou mais dos seguintes: i) um veículo de levedura que compreende ácido nucleico que codifica pelo menos um polipeptídeo mutante
20 associado ao câncer, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo; ii) um veículo de levedura que compreende pelo menos um polipeptídeo mutante associado ao câncer, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo; iii) um veículo de levedura em associação com
25 pelo menos um polipeptídeo mutante associado ao câncer, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo; iv) um veículo de levedura que compreende ácido nucleico que codifica pelo menos um polipeptídeo mutante associado ao câncer, um fragmento desse que compreende uma mutação,
30 ou um mimetopo carregado de modo intracelular em uma célula

dendrítica; ou v) um veículo de levedura e pelo menos um polipeptídeo mutante associado ao câncer, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo carregado de modo intracelular em uma célula dendrítica, em que o polipeptídeo mutante é conhecido por surgir ou surgiu com pelo menos uma mutação específica em resposta à administração de um agente terapêutico e/ou profilático direcionado para câncer.

O agente terapêutico direcionado pode ser qualquer tipo de câncer que é usado para a profilaxia ou tratamento de câncer. Exemplos não limitantes para o agente são: um inibidor de tirosina quinase, um inibidor de Src quinase, um inibidor duplo de Src/Abl, um agente que age sobre a via de Ras/Raf/Mek, um agente que age na via de PI3K; um agente que age sobre as proteínas de chaperona que estão envolvidas em vias de transdução de sinal oncogênico. A combinação do agente terapêutico e a metodologia de remoção direcionada é eficaz para a eliminação de células que contêm uma mutação de escape. Vários dos agentes terapêuticos existentes não eliminam as células com mutações de escape embora elas possam eliminar o fenótipo de tipo selvagem. Como tal, o agente isolado ou a metodologia de remoção direcionada isolada não é tão eficaz quando usado por si quanto eles são usados em combinação um com o outro.

Exemplos não limitantes de agentes terapêuticos direcionados que agem como inibidores de tirosina quinase são imatinib, nilotinib, PD1866326, PD180970, AP23464, BMS-354825, ON012380, VX-680, e BIRB-796.

Exemplos não limitantes de agentes terapêuticos

direcionados que agem como inibidores de Src quinase são PD166326, PD180970, AP23464, BMS-354825, AZM475271, PP1, PP2, AP- 23236, CGP76030, e PD173955.

Exemplos não limitantes de agentes terapêuticos
5 direcionados que afetam a estabilidade das proteínas que estão envolvidas em câncer (por exemplo, Bcr-Abl) incluem proteínas "heat shock" ou outras proteínas de chaperona que se associam com a proteína que está envolvida em câncer. Em alguns aspectos, o agente é geldanamicina/17-AAG ou NVP-
10 LAQ824.

O agente terapêutico direcionado também pode agir em uma via de sinalização que é abaixo de Bcr-Abl. Exemplos das vias de sinalização que são contempladas no escopo dessa invenção incluem, sem limitação, Ras, Raf, Mek, Erk,
15 Src, PI3K, PDK, ASK, mTOR. Exemplos não limitantes de agentes que visam as vias de sinalização acima mencionadas incluem: SCH66336, BAY-439006, CI-1040, LY294002, wortmanina, OSU-03012, CCI-779, R115777, BMS-214662, U0126, PD184352, rapamicina, RAD001, CCI-779, e AP23573. Em
20 adição, os agentes que visam proteína associada com a ativação dessas vias são também contemplados no escopo da invenção. Por exemplo, inibidores de farnesil transferase como SCH66336, R115777, e BMS-214662, podem ser usados em combinação com a metodologia de remoção direcionada aqui
25 descrita.

Além do direcionamento de proteínas como Bcr-Abl, outros agentes terapêuticos para câncer são direcionados para outros alvos como FLT3, PDGFR, VEGF, PKC, e c-Kit, como discutido em maiores detalhes abaixo. Em algumas
30 modalidades, D816V e V560G são mutações de escape em c-Kit

que podem ser direcionadas pelas metodologias aqui descritas. A remoção direcionada para escape mutacional também pode ser usada em combinação com agentes direcionados para os alvos acima mencionados e qualquer
5 outro antígeno de câncer e/ou proteínas associadas ao câncer. Por exemplo, PKC412 e sunitinib (SU11248) podem ser usados para o direcionamento de FLT3, PDGFR, VEGFR, PKC, e c-Kit. A remoção direcionada para escape mutacional também pode ser usada em combinação com agentes para tratar outros
10 cânceres, como síndrome hipoeosinófila resistente a imatinib (HES) ou tumor do estroma gastrointestinal (GIST).

Em alguns exemplos, o polipeptídeo mutante compreende uma mutação em EGFR. EGFR é uma tirosina quinase receptor que tem um papel fundamental na iniciação da divisão
15 celular tanto em célula normal quanto cancerosa. Em inúmeros tipos de cânceres, incluindo câncer pulmonar de célula não pequena (NSCLC) e glioblastoma (câncer cerebral), é relatado que EGFR é superexpresso ou mutado, e acredita-se que essas mudanças estejam associadas à
20 formação e crescimento de tumores. Dois inibidores orais de anilinoquinazolina EGFR de tirosina quinases, gefitinib (Iressa) e erlotinib (Tarceva), foram aprovados nos Estados Unidos da América para tratamento de NSCLC. Uma mutação de escape, T790M, foi encontrada em EGFR que é relatada por
25 tornar o indivíduo mamífero resistente ao tratamento com Iressa ou Tarceva. Como tal, o uso de remoção direcionada para escape mutacional também pode ser feito em combinação com Iressa ou alternativamente, com Tarceva para tratar indivíduos que desenvolveram mutações de escape para esses
30 agentes.

Conseqüentemente, são aqui fornecidas composições que compreendem um polipeptídeo mutante de EGFR (ou mimetopodesse) ou ácido nucleico que codifica EGFR e métodos para seu uso para despertar uma resposta imune. Em alguns
5 exemplos, a resposta imune é uma resposta imune celular. Em alguns exemplos, a resposta imune é uma resposta imune humoral. Em outros exemplos, a resposta imune inclui tanto resposta imune celular quanto humoral. Em alguns exemplos, o polipeptídeo mutante compreende uma mutação no domínio de
10 quinase de EGFR.

Em alguns exemplos, o polipeptídeo mutante compreende uma mutação no receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR). PDGFR é uma tirosina quinase receptora. A ativação de PDGFR é relatada como sendo crítica para a
15 progressão de vários tipos de cânceres como glioblastoma, dermatofibrossarcoma protuberans, e LMC. Portanto, são aqui fornecidas composições que compreendem um polipeptídeo mutante de PDGFR (ou mimetopodesse) ou ácido nucleico que codifica PDGFR e métodos para seu uso para despertar uma
20 resposta imune. Em alguns exemplos, a resposta imune é uma resposta imune celular. Em alguns exemplos, a resposta imune é uma resposta imune humoral. Em outros exemplos, a resposta imune inclui tanto uma resposta imune celular quanto humoral. Em alguns exemplos, o polipeptídeo mutante
25 compreende uma mutação no domínio de quinase de PDGFR.

Em algumas modalidades, o polipeptídeo mutante compreende uma mutação de KIT. KIT é uma tirosina quinase receptora para fato de célula tronco (SCF). A ativação de KIT por mutações no domínio de quinase é relatada como
30 sendo associada a tumor do estroma gastrointestinal (GIST)

e outros tipos de tumores. Mutações de escape frequentes, como D816V ou V560G, em c-kit foram descritas em pacientes tratados com Gleevec. Veja, por exemplo, Walz e cols., *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 57:145-164 (2006).

5 Conseqüentemente, são aqui fornecidas composições que compreendem um polipeptídeo mutante de KIT (ou mimetopodesse) ou ácido nucleico que codifica KIT e métodos para seu uso para despertar uma resposta imune. Em alguns exemplos, a resposta imune é uma resposta imune celular. Em
10 alguns exemplos, a resposta imune é uma resposta imune humoral. Em outros exemplos, a resposta imune inclui uma resposta imune tanto celular quanto humoral. Em alguns exemplos, o polipeptídeo mutante compreende uma mutação no domínio de quinase de KIT. Em alguns exemplos, o
15 polipeptídeo mutante compreende a mutação T670I com relação ao polipeptídeode KIT de tipo selvagem.

Portanto, são aqui fornecidas composições que compreendem tais polipeptídeos mutantes (ou mimetopodesses) ou ácido nucleico que codifica os polipeptídeos
20 mutantes e métodos para seu uso para despertar uma resposta imune. Em alguns exemplos, a resposta imune é uma resposta imune celular. Em alguns exemplos, a resposta imune é uma resposta imune humoral. Em outros exemplos, a resposta imune inclui uma resposta imune tanto celular quanto
25 humoral. Em alguns exemplos, um polipeptídeo mutante que é conhecido por surgir ou que surgiu com uma mutação específica em resposta a um agente é imunogênico por si, ou seja, sem ser associado com um adjuvante mas isso não é necessário. Em outros exemplos, um polipeptídeo mutante que
30 é conhecido por surgir ou que surgiu em resposta a um

agente é imunogênico em associação com um adjuvante, como um ligante ou agonista de receptor *Toll-like*, ou seqüência de nucleotídeos de CpG, ou outro vetor ou veículo, como um veículo de levedura, que promove sua antigenicidade.

5 Portanto, as composições aqui descritas são usadas para despertar uma resposta imune a um polipeptídeo mutante em um mamífero, que compreende a administração ao mamífero de uma quantidade eficaz da composição junto com o agente terapêutico e/ou profilático direcionado. Em alguns
10 exemplos, a composição compreende um ou mais dos seguintes:

 i). um veículo de levedura que compreende ácido nucleico que codifica pelo menos um polipeptídeo mutante, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo;

15 ii). um veículo de levedura que compreende pelo menos um polipeptídeo mutante, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo;

 iii). um veículo de levedura em associação com pelo menos um polipeptídeo mutante, um fragmento desse que
20 compreende uma mutação, ou um mimetopo;

 iv). um veículo de levedura que compreende ácido nucleico que codifica pelo menos um polipeptídeo mutante, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo carregado de modo intracelular em uma célula
25 dendrítica; ou

 v). um veículo de levedura e pelo menos um polipeptídeo mutante, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo carregado de modo intracelular em uma célula dendrítica, em que o polipeptídeo mutante é
30 conhecido por surgir ou surgiu com pelo menos uma mutação

específica em resposta à administração de um agente terapêutico e/ou profilático direcionado.

Adicionalmente, as composições podem ser usadas na preparação ou manufatura de medicamentos para despertar uma
5 resposta imune a um polipeptídeo mutante em um mamífero junto com um agente terapêutico e/ou profilático direcionado. Em alguns exemplos, o polipeptídeo mutante é um oncogene, um antígeno associado a tumor ou um polipeptídeo expresso pela célula cancerosa. Em alguns
10 exemplos a célula cancerosa é selecionada do grupo que consiste em câncer colo-retal, melanomas, carcinoma de célula escamosa, cânceres de mama, carcinomas da cabeça e pescoço, carcinomas da tireóide, sarcomas de tecidos moles, sarcomas ósseos, cânceres testiculares, cânceres
15 prostáticos, cânceres ovarianos, cânceres da bexiga, cânceres cutâneos, cânceres cerebrais, angiossarcomas, hemangiossarcomas, tumores de mastócitos, cânceres hepáticos primários, cânceres pulmonares, cânceres pancreáticos, cânceres gastrointestinais, carcinomas de
20 célula renal, neoplasias hematopoiéticas, leucemias, e cânceres metastáticos desses.

Em alguns exemplos a resposta imune é uma resposta imune celular. Em outros exemplos a resposta imune é uma resposta imune humoral. Ainda em outros exemplos a resposta
25 imune inclui uma resposta imune tanto celular quanto humoral.

Alem disso, as composições aqui descritas são usadas para tratar uma doença em um mamífero, que compreende a administração ao mamífero de uma quantidade eficaz da
30 composição, em que a doença é associada com um polipeptídeo

mutante que é conhecido por surgir ou surgiu com pelo menos uma mutação específica em resposta à administração de um agente terapêutico e/ou profilático direcionado. Em alguns exemplos as composições são usadas junto com o agente terapêutico e/ou profilático direcionado. Além disso, as composições podem ser usadas na preparação ou manufatura de medicamentos para o tratamento da doença em um mamífero junto com um agente terapêutico e/ou profilático direcionado. Em alguns exemplos, o polipeptídeo mutante, é um oncogene, um antígeno associado a tumor ou um polipeptídeo expresso por uma célula cancerosa. Em alguns exemplos a célula cancerosa é selecionada do grupo que consiste em câncer colo-retal, melanomas, carcinoma de célula escamosa, cânceres de mama, carcinomas da cabeça e pescoço, carcinomas da tireóide, sarcomas de tecidos moles, sarcomas ósseos, cânceres testiculares, cânceres prostáticos, cânceres ovarianos, cânceres da bexiga, cânceres cutâneos, cânceres cerebrais, angiossarcomas, hemangiossarcomas, tumores de mastócitos, cânceres hepáticos primários, cânceres pulmonares, cânceres pancreáticos, cânceres gastrointestinais, carcinomas de célula renal, neoplasias hematopoiéticas, leucemias, e cânceres metastáticos desses. Em alguns exemplos a doença é câncer.

Métodos de identificação de novos polipeptídeos mutantes em um antígeno de câncer que surgem como um resultado da administração de agentes são conhecidos na técnica. As mutações de escape identificadas por métodos *in vitro* mostraram um alto grau de correlação com aquelas que se desenvolvem *in vivo*. Veja, por exemplo, Azam e cols.,

Cell, 112:831-843 (2003); Cools e cols., *Cancer Research*, 64:6385-6389 (2004); Blencke e cols., *Chem. Biol.*, 11:691-701 (2004). Por exemplo, Azam e cols., forneceram um método de rastreamento para a identificação de polipeptídeos mutantes resistentes a agentes anticâncer direcionados para alvo, que é geralmente aplicável a qualquer par agente-polipeptídeo mutante (Azam e cols., *Biol. Proced. Online*, 5(1):204-210 (2003)). Resumidamente, o cDNA que codifica o polipeptídeo mutante alvo é clonados em um vetor de clonagem e submetido a mutagênese aleatória, criando uma biblioteca de mutações no polipeptídeo de câncer alvo. A biblioteca é então introduzida em células suscetíveis ao tratamento com o agente. As colônias que são resistentes ao tratamento com o agente são então selecionadas na presença do agente terapêutico, isoladas, e seqüenciadas para revelar as mutações supostas. Para validar o fenótipo resistente de cada mutação candidata, também podem ser criadas mutações no cDNA nativo de novo por mutagênese sítio-direcionada. Os cDNAs mutantes são introduzidos em células sensíveis a fármaco para confirmar seus fenótipos resistentes a fármaco. A resistência a fármaco também pode ser confirmada por ensaios de proliferação celular. As mutações também podem ser analisadas para suas conseqüências estruturais por mapeamento em um modelo da estrutura em cristal da proteína.

Composições e formulações farmacêuticas e administração dessas

São aqui fornecidas composições que compreendem vetores em associação com um polipeptídeo mutante, que incluem composições a serem administradas a um paciente

diretamente ou primeiramente carregadas em um carreador como uma célula dendrítica, com o uso de inúmeras técnicas conhecidas por aqueles habilitados na técnica. Por exemplo, os vetores podem ser secos por liofilização ou congelados por exposição a nitrogênio líquido ou gelo seco. As composições que compreendem veículos de levedura também podem ser preparadas por embalagem de levedura em um bolo ou um comprimido, como é feito para levedura usada em operações de cervejaria ou de panificação. Em adição, antes da carga em uma célula dendrítica, ou outro tipo de administração, os vetores também podem ser misturados com um excipiente farmacologicamente aceitável, como um tampão isotônico que é tolerado pela célula hospedeira. Exemplos de tais excipientes incluem água, solução salina, solução de Ringer, solução de dextrose, solução de Hank e outras soluções aquosas fisiologicamente equilibradas. Veículos não aquosos, como óleos fixados, óleo de gergelim, oleato de etila, ou triglicerídeos também podem ser usados. Outras formulações úteis incluem *suspensões* que contêm agentes intensificadores de viscosidade, como polietileno glicólico (PEG) carboximetilcelulose de sódio, sorbitol, glicerol ou dextrano. Os excipientes também podem conter quantidades menores de aditivos, como substâncias que aumentam a isotonicidade e estabilidade química. Exemplos de tampões incluem tampão de fosfato, tampão de bicarbonato e tampão Tris, enquanto exemplos de conservantes incluem timerosal, m- ou o-cresol, formalina e álcool benzílico. As formulações padrão podem ser injetáveis líquidos ou sólidos que podem ser capturados em um líquido adequado como uma suspensão ou solução para injeção. Portanto, em uma

formulação não líquida, o excipiente pode compreender, por exemplo, dextrose, albumina sérica humana, e/ou conservantes aos quais água estéril ou solução salina podem ser adicionados antes da administração.

5 São aqui fornecidos métodos que compreendem a administração de uma composição (como uma composição imunogênica) que compreende um vetor em associação com um antígeno mutante a um mamífero em risco por câncer ou infecção ou sujeito ao câncer ou infecção. Os métodos são
10 geralmente úteis para despertar uma resposta imune, que em alguns exemplos, é uma resposta imune celular no mamífero. Acredita-se que tais métodos sejam úteis em despertar uma resposta imune celular a um polipeptídeo mutante que surgiu em resposta a um agente(s) ou é que surgirá em resposta a
15 um agente; assim minimizando ou revertendo a resistência ao agente, e/ou estendendo a eficácia do agente e/ou minimizando, reduzindo ou revertendo alguns sintomas da doença ou infecção.

Portanto, são aqui fornecidos métodos para minimizar a
20 resistência a um agente profilático e/ou terapêutico em um mamífero, que compreende a administração ao mamífero de uma quantidade eficaz de uma composição que compreende um vetor, como, por exemplo, um veículo de levedura, em associação com um polipeptídeo mutante que surgiu em
25 resposta ao agente. Também, são aqui fornecidos métodos para reduzir a resistência a um agente administrado a um mamífero em risco de doença ou infecção ou sujeito a doença ou infecção, seja o agente administrado profilaticamente e/ou terapeuticamente, que compreendem a administração ao
30 mamífero de uma quantidade eficaz de uma composição junto

com o agente, em que a referida composição compreende,

a. um célula, vetor ou vírus que compreendem ácido nucleico que codifica o polipeptídeo mutante;

b. uma célula, vetor ou vírus em associação com o
5 polipeptídeo mutante;

c. o polipeptídeo mutante, ou um peptídeo (mimetopo) que desperta uma resposta imune ao polipeptídeo mutante; ou

d. ácido nucleico que codifica o polipeptídeo mutante, ou ácido nucleico, como siRNA ou RNA anti-senso que se liga
10 ao ácido nucleico, em que uma quantidade eficaz da composição é administrada junto com o agente.

Em alguns exemplos, a composição compreende um ou mais dos seguintes:

i). um veículo de levedura que compreende ácido
15 nucleico que codifica pelo menos um polipeptídeo mutante, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo;

ii). um veículo de levedura que compreende pelo menos um polipeptídeo mutante, um fragmento desse que compreende
20 uma mutação, ou um mimetopo;

iii). um veículo de levedura em associação com pelo menos um polipeptídeo mutante, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo;

iv). um veículo de levedura que compreende ácido
25 nucleico que codifica pelo menos um polipeptídeo mutante, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo carregado de modo intracelular em uma célula dendrítica; ou

v). um veículo de levedura and pelo menos um
30 polipeptídeo mutante, um fragmento desse que compreende uma

mutação, ou um mimetopo carregado de modo intracelular em uma célula dendrítica, em que o polipeptídeo mutante é conhecido por surgir ou surgiu com pelo menos uma mutação específica em resposta à administração de um agente terapêutico e/ou profilático direcionado.

Em alguns exemplos, a composição é capaz de despertar uma resposta imune celular. Em outros exemplos, a resposta imune é uma resposta imune humoral. Em outros exemplos, a resposta imune inclui tanto uma resposta imune celular quanto humoral.

Em alguns exemplos dos métodos, a composição compreende i, adjuvante. Em outros exemplos, a composição também compreende um agonista ou ligante para um receptor *Toll-like* ou um receptor fagocítico ou ambos. Em outros exemplos, a composição compreende um veículo de levedura. Ainda em outros exemplos, a composição compreende uma sequência de CpG. Em outros exemplos, a célula é uma célula dendrítica. Em alguns exemplos, o mamífero é um ser humano.

Também são aqui fornecidos vetores, que incluem, por exemplo, veículos de levedura, vírus e composições, como, por exemplo, composições com base em levedura que compreendem veículos de levedura, que incluem composições imunogênicas, para uso nos métodos para despertar uma resposta imune específica para polipeptídeo mutante em um mamífero que foi, será, ou está sendo administrado com o agente(s). Em alguns exemplos, o mamífero está em risco para o desenvolvimento de uma doença, e um vetor associado com um polipeptídeo mutante, um fragmento desse que compreende uma mutação ou um mimetopo, e/ou composições que compreendem tal vetor, são administrados profilaticamente,

antes, concomitantemente e/ou depois do agente. Em outros exemplos, o mamífero é submetido à doença e um vetor associado com um polipeptídeo mutante, e/ou composições que compreendem tais vetores, é administrado terapeuticamente, antes, concomitantemente e/ou depois do agente. A administração de tais veículos de levedura em associação com um polipeptídeo mutante pode ser feita, por exemplo, para aumenta a suscetibilidade do mamífero a um agente terapêutico e/ou profilático; e/ou para aumentar a eficácia terapêutica de tais agentes; e/ou na extensão do ciclo de vida eficaz de tais agentes. Em alguns exemplos, um polipeptídeo mutante é identificado antes da administração de um vetor ou composição como aqui descrito, e em outros exemplos, um polipeptídeo mutante é previsto para ocorrer resposta a um agente.

As composições aqui descritas que compreendem vetores, como veículos de levedura, em associação com um polipeptídeo mutante, um fragmento desse que compreende uma mutação ou um mimetopo, e o agente terapêutico ou profilático pode ser administrado simultaneamente ou seqüencialmente, antes ou depois da administração do agente(s). A administração simultânea engloba a administração junto com uma composição ou alternativamente, como composições separadas. Em alguns exemplos, o agente e polipeptídeo mutante, ou ácido nucleico que o codifica, estão em diferentes formulações e são administrados simultaneamente e separadamente. Como sera percebido, em alguns exemplos, em que o agente e polipeptídeo mutante, ou ácido nucleico que o codifica, são administrados seqüencialmente, a administração pode ser em uma base

diária, semanal, ou mensal como for considerado adequado pelo profissional para o mamífero. O termo "administração simultânea" como aqui usado, significa que a composição que compreende o veículo de levedura e o agente terapêutico são administrados no mesmo dia. A composição que compreende o polipeptídeo mutante ou o agente terapêutico pode ser administrada primeiramente. Quando administrada simultaneamente, a composição que compreende o veículo de levedura e o agente terapêutico podem ser contidos na mesma dosagem (ou seja, uma dosagem unitária que compreende tanto a composição que compreende o veículo de levedura quanto o agente terapêutico) ou em dosagens distintas (por exemplo, a composição que compreende o veículo de levedura é contida em uma forma de dosagem e o agente terapêutico é contido em outra forma de dosagem).

Em alguns exemplos, a composição que compreende o polipeptídeo mutante é administrada como um "tratamento de acompanhamento", ou seja, depois do tratamento do agente ter sido iniciado ou depois de um aumento em um sintoma da doença ser observado. No entanto, a composição que compreende o vetor, como um veículo de levedura, também pode ser administrada antes de o tratamento com o agente terapêutico ou profilático ter sido iniciado.

Os métodos aqui descritos também podem compreender a administração de um vetor e um polipeptídeo mutante a um mamífero, em que o vetor e o polipeptídeo não estão em complexo um com o outro, ou seja, o polipeptídeo não é recombinantemente expresso pelo vetor, carregado no vetor, ou fisicamente anexados ao vetor. O vetor e o polipeptídeo mutante podem ser misturados em uma formulação

antes da administração ao indivíduo, ou administrados separadamente. O processo de administração pode ser realizado *ex vivo*, como por introdução por células dendríticas carregadas com o veículo de levedura, ou *in vivo*. A administração *ex vivo* refere-se à realização de parte da etapa reguladora fora do mamífero, como administração de uma composição da presente invenção a uma população de células (células dendríticas) removidas de um mamífero sob condições de modo que o vetor e o polipeptídeo mutante sejam carregados na célula, e devolução das células ao mamífero. A composição que compreende um vetor pode ser então devolvida a um mamífero, ou administrada a um mamífero, por qualquer modo adequado de administração.

A administração de uma composição, que inclui uma composição que compreende uma célula dendrítica carregada com um vetor e polipeptídeo mutante, pode ser, por exemplo, sistêmica, ou mucosa. As vias de administração serão aparentes para aqueles habilitados na técnica, dependendo do tipo de condição, do polipeptídeo mutante usado, e/ou da população de células alvo ou tecido. Os métodos de administração incluem, sem limitação, administração intravenosa, administração intraperitoneal, administração intramuscular, administração intranodal, administração intracoronariana, administração intra-arterial (por exemplo, em uma artéria carótida), administração subcutânea, liberação transdérmica, administração intratraqueal, administração subcutânea, administração intra-articular, administração intraventricular, inalação (por exemplo, aerossol), intracraniana, intra-espinhal, intra-ocular, aural, intranasal, oral, administração

pulmonar, impregnação de um cateter, e injeção direta a um tecido. As vias de administração incluem: intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intradérmica, intranodal, intramuscular, transdérmica, inalada d, intranasal, oral, intra-ocular, intra-articular, intracraniana, e intra-espinha

liberação parenteral pode incluir as vias intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapleural, intrapulmonar, intravenosa, subcutânea, por cateter atrial e cateter venoso. A liberação auricular pode incluir gotas auriculares, a liberação intranasal pode incluir gotas nasais ou injeção intranasal, e a liberação intra-ocular pode incluir colírios. A liberação por aerossol (inalação) também pode ser realizada com o uso dos métodos padrão na técnica (veja, por exemplo, Stribling e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 189:11277-11281 (1992)). Por exemplo, em um exemplo, uma composição que compreende um veículo de levedura pode ser formulado em uma composição adequada para liberação nebulizada com o uso de um dispositivo de inalação adequado ou nebulizador. A liberação oral pode incluir sólidos e líquidos que podem ser tomados através da boca, e é útil no desenvolvimento de imunidade de mucosa e já que as composições que compreendem os veículos de levedura podem ser facilmente preparadas para liberação oral, por exemplo, como comprimidos ou cápsulas, bem como ser formuladas em produtos alimentícios e bebidas. Outras vias de administração que modulam a imunidade mucosa são úteis no tratamento de câncer ou doença infecciosa. Tais vias incluem brônquica, intradérmica, intramuscular, intranasal, outra via inalatória, retal, subcutânea, tópica, transdérmica l, vaginal e uretral. A via de

liberação é qualquer via de liberação de uma composição que compreende um veículo de levedura ao sistema respiratório, incluindo, sem limitação, inalação, intranasal, intratraqueal e outras.

5 A administração eficaz de uma célula, vetor, como um veículo de levedura, ou vírus, ou composição que compreende uma célula, vetor, vírus ou veículo de levedura como aqui descrito a um mamífero em risco ou sujeito à doença não requer que o mamífero seja protegido da doença. Os
10 parâmetros de dose eficaz podem ser determinados com o uso de métodos padrão na técnica que são adequados para minimizar ou reduzir os sintomas de doença, ou minimizar a progressão da doença. Tais métodos incluem, por exemplo, a determinação de taxas de sobrevivência, efeitos colaterais
15 (ou seja, toxicidade) e progressão ou regressão da doença.

 Para uso com um veículo de levedura, um tamanho de dose única adequadas é uma dose que seja capaz de despertar uma resposta imune em um mamífero, em alguns exemplos, uma resposta imune celular, que pode ser uma resposta imune
20 específica para antígeno, quando administrada uma ou mais vezes por um período de tempo adequado. Como será compreendido pelo profissional habilitado, a dose da composição necessária para despertar uma resposta imune depende de inúmeros fatores. Uma pessoa habilitada na
25 técnica pode determinar facilmente tamanhos adequados de dose única para administração com base no tamanho do mamífero e da via de administração.

 Uma dose única adequada de uma composição que compreende um vetor em associação com um polipeptídeo
30 mutante é uma dose que é capaz de fornecer de modo eficaz

um vetor e/ou polipeptídeo mutante a um dado tipo de célula, tecido, ou região do corpo do paciente em uma quantidade eficaz para despertar uma resposta imune, quando administrada uma ou mais vezes por um período de tempo

5 adequado. No caso de levedura, uma dose única de um veículo de levedura da presente invenção é de cerca de 0,004 YU (4×10^3 células) a cerca de 100 YU (1×10^9 células), como 0,1 YU (1×10^6 células) a cerca de 100 YU (1×10^9 células) por dose (ou seja, por organismo), incluindo qualquer dose

10 intermediária, em aumentos de $0,1 \times 10^6$ células (ou seja, $1,1 \times 10^6$, $1,2 \times 10^6$, $1,3 \times 10^6$ etc.). Em uma modalidade, 2 YU (2×10^7 levedura) são usados. Essa faixa de doses pode ser usada de modo eficaz em qualquer organismo de qualquer tamanho, incluindo camundongos, macacos, humano, etc.

15 Quando a composição é administrada por carga do veículo de levedura e antígeno mutante em células dendríticas, uma dose única de uma composição aqui descrita é de cerca de $0,5 \times 10^6$ a cerca de 40×10^6 células dendríticas por mamífero por administração. Em outros exemplos, uma dose

20 única é de cerca de 1×10^6 a cerca de 20×10^6 células dendríticas por indivíduo, e ainda outros exemplos de cerca de 1×10^6 a cerca de 10×10^6 células dendríticas por mamífero. Uma dose "de reforço" de uma composição que compreende um veículo de levedura como aqui descrito pode

25 ser administrada quando a resposta imune contra o antígeno mutante declinou, ou como necessário para fornecer uma resposta imune ou induzir uma resposta de memória contra um polipeptídeo mutante particular. As doses de reforço podem ser administradas de cerca de 1 semana a vários anos depois

30 da administração original. Em um exemplo, um esquema de

administração é um em que de cerca de 1×10^5 a cerca de 1×10^9 equivalentes de célula de levedura de uma composição é administrado semanalmente por 3 meses, a semanalmente por 1 mês (5 doses) seguido por administração mensal.

5 Em alguns exemplos, uma composição de célula dendrítica que compreende um veículo de levedura como aqui descrito contém de cerca de $0,5 \times 10^6$ a cerca de 40×10^6 células dendríticas por dose única por paciente, e em outro exemplo, de cerca de 1×10^6 a cerca de 10×10^6 células
10 dendríticas por dose única por paciente. Essas doses são dadas para um ser humano típico ou outro primata. As doses adequadas para outros animais podem ser determinadas por aqueles habilitados na técnica. Por exemplo, para um camundongo, uma dose adequada é de cerca de 1×10^6 a cerca
15 de 3×10^6 por dose única por camundongo. Outras doses podem ser determinadas pelo profissional habilitado e está dentro da capacidade daqueles habilitados na técnica. Uma composição eficaz para administrar a um mamífero contém de cerca de $0,5 \times 10^6$ a cerca de 40×10^6 células dendríticas
20 por dose única por indivíduo mamífero.

 Estará óbvio para pessoa habilitada na técnica que o número de doses administradas a um mamífero é dependente da natureza do veículo de levedura e da resposta de um mamífero à administração. Assim, está dentro do escopo da
25 presente invenção que um número adequado de doses incluem qualquer número necessário para o objetivo desejado. Por exemplo, a dosagem repetida pode aumentar o número de células T disponíveis para atacar células alvo. A dosagem e frequência da administração podem ser ajustadas durante a
30 administração como será aparente para o profissional

habilitado.

Uma pessoa habilitada na técnica também pode monitorar os efeitos da dosagem pelo uso de modelos animais, como modelos de leucemia em camundongo. Tais modelos de camundongo são facilmente conhecidos por pessoa habilitada na técnica. Um método de monitorar o efeito da dosagem é o monitoramento da taxa de sobrevivência dos camundongos (vacinado e não vacinados) depois de uma dose ou uma dose de reforço. Outros métodos de monitoramento do efeito da dosagem é a medição da percentagem de células leucêmicas pelo tempo. Existem alguns modelos de camundongo em que as células leucêmicas são marcadas com um marcador, como uma proteína verde green fluorescente (GFP). As células GFP-positivas indicam células leucêmicas e podem ser monitoradas em vários compartimentos do corpo, como medula óssea.

Kits

São aqui fornecidos kits para a realização de qualquer um dos métodos aqui descritos. Os kits da invenção podem compreender pelo menos um veículo de levedura e pelo menos um polipeptídeo mutante associado ao câncer que é conhecido por surgir ou surgiu com uma mutação específica em resposta à administração de a um agente de fármaco terapêutico e/ou profilático direcionado. O kit também pode compreender um agente de fármaco terapêutico e/ou profilático. Em alguns exemplos, o agente de fármaco é direcionado para as células cancerosas. Exemplos de agentes incluem, sem limitação, imatinib, nilotinib, PD166326, PD180970, AP23464, BMS-354825, ON012380, VX-680, BIRB-796, AZM475271, PP1, PP2, AP-23236, CGP76030, PD173955, Geldanamicina/17-AAG, NVP-

LAQ824, SCH66336, BAY-439006, CI-1040, LY294002, wortmanina, OSU-03012, CCI-779, R115777, BMS-214662, U0126, PD184352, rapamicina, RAD001, CCI-779, AP23573, PKC412 ou SU11248. O kit também pode compreender instruções para a
5 realização do método aqui descrito.

Os kits que compreendem um componente único terão geralmente o componente englobado em um recipiente (por exemplo, um frasco, ampola, ou outro recipiente de estocagem adequado). Do mesmo modo, os kits que incluem
10 mais de um componente também podem ter os reagentes em recipientes (separadamente ou em uma mistura).

As instruções em relação ao uso do kit para a realização da invenção geralmente descrevem como o conteúdo do kit deve ser usado para realizar os métodos da invenção.
15 As instruções supridas nos kits da invenção são tipicamente instruções escritas em um rótulo ou inserção (por exemplo, uma folha de papel incluída no kit), mas instruções lidas em máquinas (por exemplo, instruções em um disco de armazenamento magnético ou ótico) são também aceitáveis.

20 Embora a invenção anterior tenha sido descrita em algum detalhe por via de ilustração e exemplo para objetivos de clareza de compreensão, será aparente para aqueles habilitados na técnica que certas mudanças e modificações podem ser praticadas. Portanto, as descrições
25 e exemplos não devem ser interpretados como limitantes do escopo da invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1 Construção de veículos de levedura que compreendem mutações de escape

30 O objetivo desse exemplo é descrever construções de

levedura que contêm mutantes de escape conhecidos por ocorrer com a administração de Gleevec.

Vetores com base em levedura que expressam cerca de 400 aminoácidos da porcao Abl de p210 Bcr-Abl foram feitos. 5 Esses vetores estavam sob o controle de um promotor constitutivo TEF2 (fator de alingamento de transcrição 2). As leveduras que contêm as seguintes construções foram cultivadas, coletadas, lavadas com PBS, mortas por calor a 56 graus C por 1 hora, lavadas novamente com PBS e entao 10 ressuspensas em PBS para administração aos camundongos.

As seguintes seqüências foram usadas para gerar várias construções de levedura:

Construção #1 VK13 - BA5M - VAX E1.E2.E3

	MADEAPNLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEWCEAQTKNG	50
15	QGWVPSNYITPVNSLEKHSWYHGPVSRNAAEYLLSSGINGSFLVRESESS	100
	PGQRSISLRYEGRVYHYRINTASDGKLYVSSESFRNTLAELVHHHSTVAD	150
	GLITTLHYPAPKRNKPTIYGVSPNYDKWEMERTDITM <u>K</u> HKLGGGQYGKVY	200
	EGVWKKYSLTVAVKTLKEDTMEVEEFLKEAAVMKEIKHPNLVQLLGVCTR	250
	EPPFYII <u>I</u> EFMTYGNLLDYLRECNRQEVSAVVLLYMATQISSA <u>T</u> EYLEKK	300
20	NFIHRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDHHHHHH* (Id de Seq. N°:	
	1)	

Essa construção contém três mutantes de escape: E255K, T3151, e M351T.

Essa seqüência foi modificada em V227I e N336S, que 25 correspondem a uma mudança dos resíduos humanos para resíduos que podem corresponder a resíduos de camundongo. A seqüência de MADEAP no início foi adicionada à seqüência de Bcr-Abl para estabilidade de expressão de levedura. O texto em negrito, sublinhado mostra mutações que 30 correspondem a mutantes de escape (E255K, T315I, e M351T).

Os últimos 6 resíduos são um tag de hexahistidina. Os 328 aminoácidos entre a seqüência de MADEAP e o tag de hexahistidina são do domínio de quinase Abl humana. O aminoácido final é um códon de parada (*).

5 Construção #2 VK14 -VAX E2 ONLY

```
MADEAPNLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEWCEAQTKNG      50
QGWVPSNYITPVNSLEKHSWYHGPPVSRNAAEYLLSSGINGSFLVRESESS      100
PGQRSISLRYEGRVYHYRINTASDGKLYVSSESFRFNTLAELVHHHSTVAD      150
GLITTLHYPPAPKRNKPTIYGVSPNYDKWEMERTDITMKHKLGGGQYGEVY      200
10  EGVWKKYSLTVAVKTLKEDTMEVEEFLKEAAVMKEIKHPNLVQLLGVCTR      250
EPPFYIIIIEFMTYGNLLDYLRECNRQEVSAVVLLYMATQISSAMEYLEKK      300
NFIHRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDHHHHHH* (Id de Seq. N°:
2)
```

Essa construção contém apenas um mutante de escape:

15 T315I. Essa seqüência foi modificada em V227I e N336S, que correspondem a uma mudança dos resíduos humanos para resíduos que podem corresponder a resíduos de camundongo. A seqüência de MADEAP no início foi adicionada à seqüência de Bcr-Abl para estabilidade de expressão de levedura.

20 texto em negrito, sublinhado mostra mutações que correspondem a mutantes de escape (T315I). Os últimos 6 resíduos são um tag de hexahistidina. A seqüência entre a seqüência de MADEAP e o tag de hexahistidina são do domínio de quinase Abl humana. O aminoácido final é um códon de

25 parada (*).

Construção #3 VK15 - JCN-BAM - VAX b3a2

```
MADEAPCFRSFSLTSVEOQMLTNSCVKLQTVHHIPLTINKEDDESPGLYG      50
FLHVIVHSATGFKQSSKALQRPVASDFEPQGLSEAARWNSKENLLAGPSE      100
NDPNLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEWCEAQTKNGQGW      150
30  VPSNYTTPVNSLEKHSWYHGPPVSRNAAEYLLSSGINGSFLVRESESSPGQ      200
```

RSISLRYEGRVYHYRINTASDGKLYVSSSRFNTLAELVHHHSTVADGLI 250
 TTLHYPAPKRNKPTIYGVSPNYDKWEMERTDITMKHKLGGGQYGEVYEGV 300
 WKKYSLTVAVKTLKEDTMEVEEFLKEAAVMKEIKHPNLVQLLGVCTREPP 350
 FYIII`EFMTYGNLLDYLRECNRQEVSAV VLLYMATQISSAMEYLEKKNFI 400
 5 HRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDHHHHHH* (Id de Seq. N°: 3)

Essa construção é Bcr-Abl de tipo selvagem com
 resíduos de camundongo na junção de Bcr e Abl. Essa
 seqüência foi modificada em V227I e N336S e duas mudanças
 aos resíduos acima da junção de Bcr-Abl humana que foram
 10 substituídos com aminoácidos de camundongo correspondentes,
 que corresponde a uma mudança dos resíduos humanos para
 resíduos que correspondem a resíduos de camundongo (essas
 mudanças são indicadas acima em negrito com um duplo
 sublinhado). A seqüência de MADEAP no início foi adicionada
 15 à seqüência de Bcr-Abl para estabilidade de expressão de
 levedura. Os últimos 6 resíduos são um tag de
 hexahistidina. A seqüência entre a seqüência de MADEAP e o
 tag de hexahistidina são da quinase Bcr-Abl humana que
 contém 97 resíduos acima da junção de Bcr-Abl. O aminoácido
 20 final é um códon de parada (*).

Construção #4 E2 totalmente humano ONLY

MADEAPNLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEWCEAQTKNG 50
 QGWVPSNYITPVNSLEKHSWYHGPVSRNAEYLLSSGINGSFLVRESESS 100
 PGQRSISLRYEGRVYHYRINTASDGKLYVSSSRFNTLAELVHHHSTVAD 150
 25 GLVTTLHYPAPKRNKPTIYGVSPNYDKWEMERTDITMKHKLGGGQYGEVY 200
 EGVWKKYSLTVAVKTLKEDTMEVEEFLKEAAVMKEIKHPNLVQLLGVCTR 250
 EPPFYIIIEEFMTYGNLLDYLRECNRQEVNAVLLYMATQISSAMEYLEKK 300
 NFIHRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDHHHHHH* (Id de Seq. N°:
 4)

30 Essa construção contém resíduos totalmente humanos de

Bcr-Abl com uma mutação de escape, T315I. A sequência de MADEAP no início foi adicionada à sequência de Bcr-Abl para estabilidade de expressão de levedura. O texto em negrito, sublinhado são mutações que correspondem ao mutante de escape (T315I). Os últimos 6 resíduos são um tag de hexahistidina. Os 328 aminoácidos entre a sequência de MADEAP e o tag de hexahistidina são do domínio de quinase Abl humana. O aminoácido final é um códon de parada (*).

Construção #5 sequência de tipo selvagem de Bcr-Abl totalmente humana que contém junção

```
MADEAPCFRSFSLTSVELQMLTNSCVKLQTVHSIPLTINKEDDESPGLYG      50
FLHVIVHSATGFKQSSKALQRPVASN'EPQGLSEAARWNSKENLLAGPSE      100
NDPNLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEWCEAQTKNGQGW      150
VPSNYITPVNSLEKHSWYHGPPVSRNAAEYLLSSGINGSFLVRESESSPGQ      200
RSISLRYEGRVYHYRINTASDGKLYVSSSESFRNTLAELVHHHSTVADGLI    250
TTLHYPAPKRKNKPTVYGVSPNYDKWEMERTDITMKHKLGGGQYGEVYEGV      300
WKKYSLTVAVKTLKEDTMEVEEFLKEAAVMKEIKHPNVLQLLGVCTREPP      350
FYIITEFMTYGNLLDYLRECNRQEVNAVVLVLYMATQISSAMEYLEKKNFI      400
HRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDHHHHHH* (Id de Seq. N°:5)
```

Essa construção é a sequência de Bcr-Abl de tipo selvagem humana que contém a junção de Bcr e Abl. A sequência de MADEAP no início foi adicionada à sequência de Bcr-Abl para estabilidade de expressão de levedura. Os últimos 6 resíduos são um tag de hexahistidina. A sequência entre a sequência de MADEAP e o tag de hexahistidina são da sequência de Bcr-Abl humana que contém 97 resíduos acima da junção de Bcr-Abl. O aminoácido final é um códon de parada (*).

Construção #6 E1.E2.E3 totalmente humanos

```
MADEAPNLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEWCEAQTKNG      50
```

QGWVPSNYITPVNSLEKHSWYHGPPVSRNAAEYLLSSGINGSFLVRESESS 100
 PGQRSISLRYEGRVYHYRINTASDGKLYVSSESFRFNTLAELVHHHSTVAD 150
 GLITTTLHYAPAKRNKPTVYGVSPNYDKWEMERTDITMKHKLGGGQY**GKVY** 200
 EGVWKKYSLTVAVKTLKEDTMEVEEFLKEAAVMKEIKHPNLVQLLGVCCTR 250
 5 EPPFYIIIIEFMTYGNLLDYLRECNRQEVNAVVL~~LY~~MATQISSATEYLEKK 300
 NFIHRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDHHHHHH* (Id de Seq. N°:
 6)

Essa construção contém três mutantes de escape: E255K,
 T315I, e M351T. A sequência de MADEAP no início foi
 10 adicionada à sequência de Bcr-Abl para estabilidade de
 expressão de levedura. O texto em negrito, sublinhado
 mostra mutações que correspondem a mutantes de escape
 (E255K, T315I, e M351T). Os últimos 6 resíduos são um tag
 de hexahistidina. Os 328 aminoácidos entre a sequência de
 15 MADEAP e o tag de hexahistidina são do domínio de quinase
 Abl humana. O aminoácido final é um códon de parada (*).

Exemplo 2 Modelo de camundongo de leucemia

O modelo de camundongo de leucemia foi usado segundo o
 qual os camundongos foram injetados com um retrovírus que
 20 contém várias formas de Bcr-Abl. Essas células leucêmicas
 foram construídas para expresser a proteína verde
 fluorescente (GFP), um marcador para objetivos de
 monitoramento.

Os camundongos foram imunizados 3 vezes em intervalos
 25 de duas semanas com 2 YU levedura (20 milhões de
 leveduras). A dose foi com 500.000 células de leucemia no
 7º dia após a última vacinação. Os estudos de camundongo
 foram divididos em duas partes:

Havia 2 grupos de camundongos no experimento #1:

30 (1) O primeiro grupo não foi imunizado mas recebeu

dose de LMC de tipo selvagem rotulado com GFP (Bcr-Abl mas sem mutações de escape) (5 animais). (2) o segundo grupo de camundongos foi imunizado com uma vacina com base em levedura que contém proteína Abl que porta três mutações de escape encontradas em tratamento com Gleevec (Bcr-Abl com 3 epitopos TAME - E255K, T315I, M351T, aka GI-10.001) e então com dose de de LMC de tipo selvagem rotulado com GFP (Bcr-Abl mas sem mutações TAME) (5 animais)

Os resultados foram como se segue:

10 A Figura 1 mostra as curves de Kaplan-Meier, que foram idênticas para esses grupos

- todos os camundongos morreram no mesmo período de 24 horas no 10° dia. Os camundongos vacinados tiveram números elevados de células T e B em seus baços também confirmando a administração da vacina com base em levedura e indicando
15 uma ativação imune inata geral para a vacina administrada.

Havia 3 grupos de camundongos na parte 2 dos estudos de camundongo:

(1) O primeiro grupo não foi imunizado mas recebeu
20 dose de LMC T315I rotulado com GFP (Bcr-Abl com 1 mutação TAME - T315I) (5 animais).

(2) o segundo grupo de camundongos foi imunizado com uma vacina com base em levedura que contém proteína Abl que porta três mutações de escape (Bcr-Abl com 3 epitopos TAME
25 - E255K, T315I, M351T) e então com dose de LMC T315I rotulado com GFP (Bcr-Abl com 1 mutação TAME - T315I) (3 animais).

(3) O terceiro grupo de camundongos foi imunizado com a vacina com base em levedura que contém proteína Abl com
30 uma mutação de escape (Bcr-Abl com 1 epitopo TAME - T315I),

e então com dose de LMC T315I rotulada com GFP (Bcr-Abl com 1 mutação TAME - T315I) (4 animais)

os resultados são como se segue:

A Figura 2 mostra as curvas de Kaplan-Meier, que
5 mostraram uma clara vantagem na sobrevivência para os
camundongos vacinados. Nos grupos de controle (grupo #1),
todos os camundongos morreram em um período de 24 horas nos
dias 10-11 (5/5 morte). Em contraste, no grupo vacinado de
camundongos todos sobreviveram depois do 11° dia. Não houve
10 camundongos mortos de um total de 7 camundongos no grupo
vacinado no 13° dia, e dois camundongos sobreviveram pelo
menos além do 35° dia.

A Figura 3 mostra as curvas de Kaplan-Meier para o
mesmo grupo de camundongos com os camundongos vacinados
15 também delineados naqueles que receberam a vacina com as
três mutações de escape (GI-10.001) e aqueles que receberam
a vacina com a mutação T315I.

A partir das figuras 1-2, é aparente que a metodologia
de remoção direcionada visa as células com a mutação de
20 escape(s) e não Bcr-Abl de tipo selvagem. Como tal, ela
fornece uma ferramenta muito útil para o reconhecimento
imune de células leucêmicas que escaparam em face de
agentes terapêuticos existentes para câncer. Figuras 2 e 3
mostram que cada um dos tipos de vacina será eficaz para
25 direcionar a destruição de células que expressam uma
mutação de escape. O uso de cada vacina pode ser feito para
prolongar a sobrevivência dos camundongos que receberam
doses de células leucêmicas. O uso de um cassete de mutação
múltipla ou um cassete de mutação única pode ser feito para
30 direcionar células que expressam mutação de escape.

Quando a percentagem de células leucêmicas foi medida na segunda parte do experimento, os camundongos vacinados tiveram diminuição estatisticamente significativa na percentagem de células leucêmicas em seu sangue no 10° dia quando comparados a camundongos não vacinados. Esses resultados são mostrados na Figura 4. Os dois pontos abertos próximos ao marco 0 indicam camundongos com carga muito pequena ou nenhuma carga detectável de célula leucêmica.

A Figura 5 mostra a carga leucêmica como distribuído pelas diferentes vacinas. Tanto GI-10.001 (mutação tripla) quanto GI-10.002 (mutação T315I) são eficazes para direcionar as células imunes que expressam a mutação de escape.

Reivindicações

1. Método para direcionamento da remoção de um escape mutacional em um indivíduo em necessidade caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo de
5 uma quantidade eficaz de um agente terapêutico direcionado em que o agente terapêutico é selecionado do grupo que consiste em um inibidor de tirosina quinase, um inibidor de Src quinase, um agente que afeta a estabilidade de Bcr-Abl, e um agente que age em uma via de sinalização que é abaixo
10 de Bcr-Abl e uma composição que compreende um ou mais dos seguintes:

i) um veículo de levedura que compreende ácido nucleico que codifica pelo menos um polipeptídeo mutante associado ao câncer, um fragmento desse que compreende uma
15 mutação, ou um mimetopo;

ii) um veículo de levedura que compreende pelo menos um polipeptídeo mutante associado ao câncer, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo;

iii) um veículo de levedura em associação com pelo
20 menos um polipeptídeo mutante associado ao câncer, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo;

iv) um veículo de levedura que compreende ácido nucleico que codifica pelo menos um polipeptídeo mutante associado ao câncer, um fragmento desse que compreende uma
25 mutação, ou um mimetopo carregado de modo intracelular em uma célula dendrítica; ou

v) um veículo de levedura e pelo menos um polipeptídeo mutante associado ao câncer, um fragmento desse que compreende uma mutação, ou um mimetopo carregado de modo
30 intracelular em uma célula dendrítica,

em que o polipeptídeo mutante é conhecido por surgir ou surgiu com pelo menos uma mutação específica em resposta à administração de um agente terapêutico e/ou profilático direcionado para câncer.

Figura 1

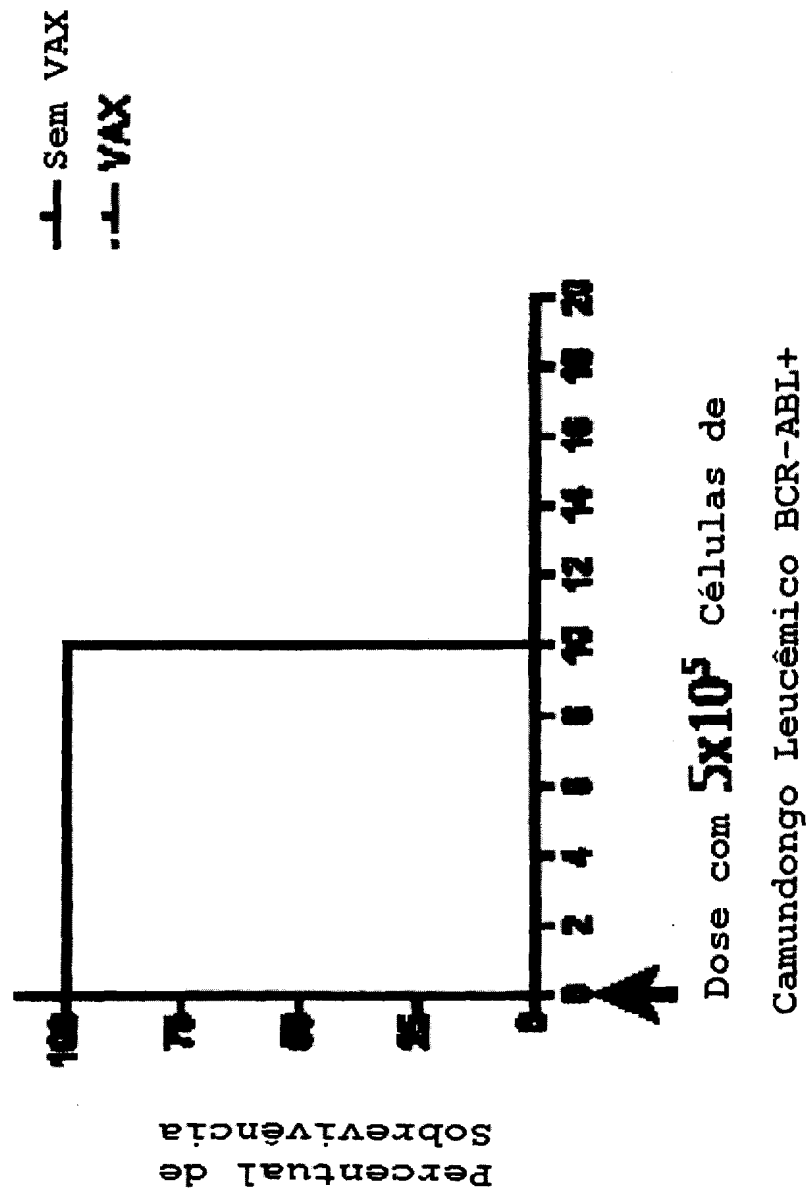
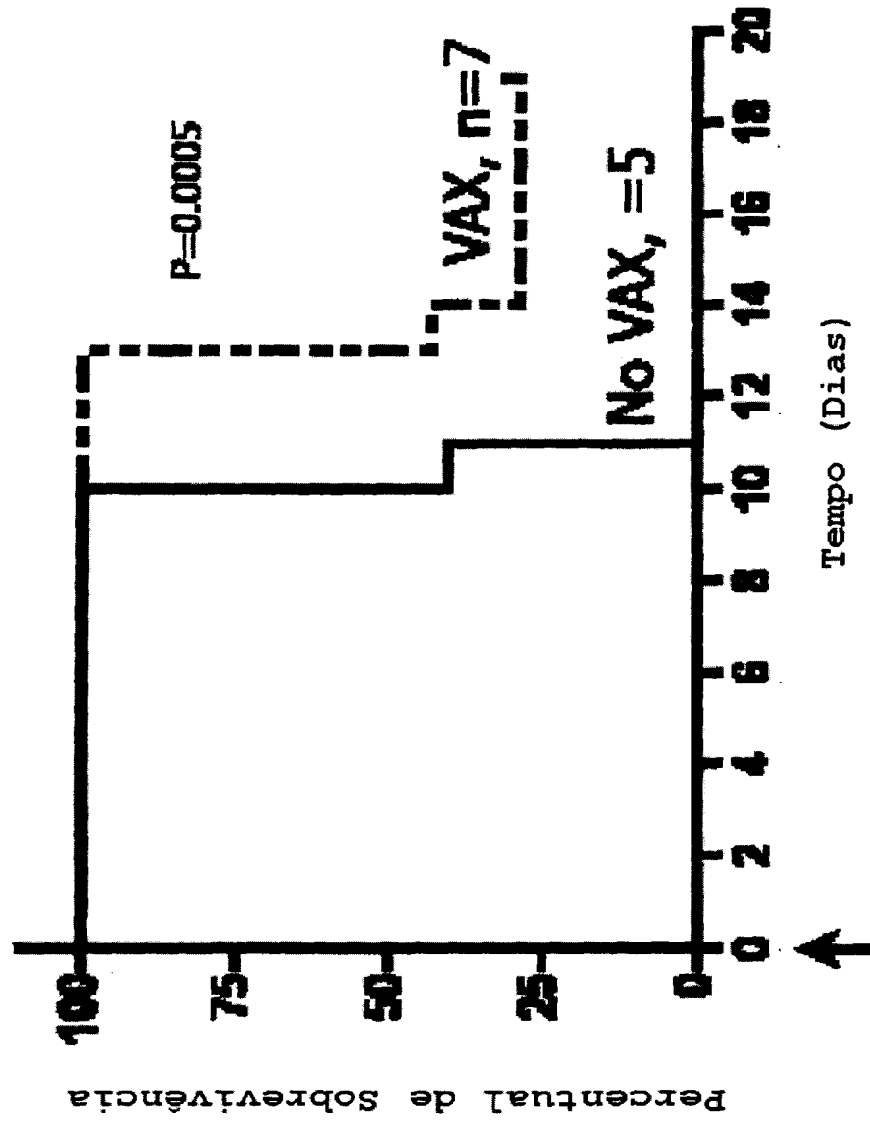


Figura 2



Dose com

 5×10^5 Células de Camundongo Leucêmico

BCR-ABL T315

Figura 3

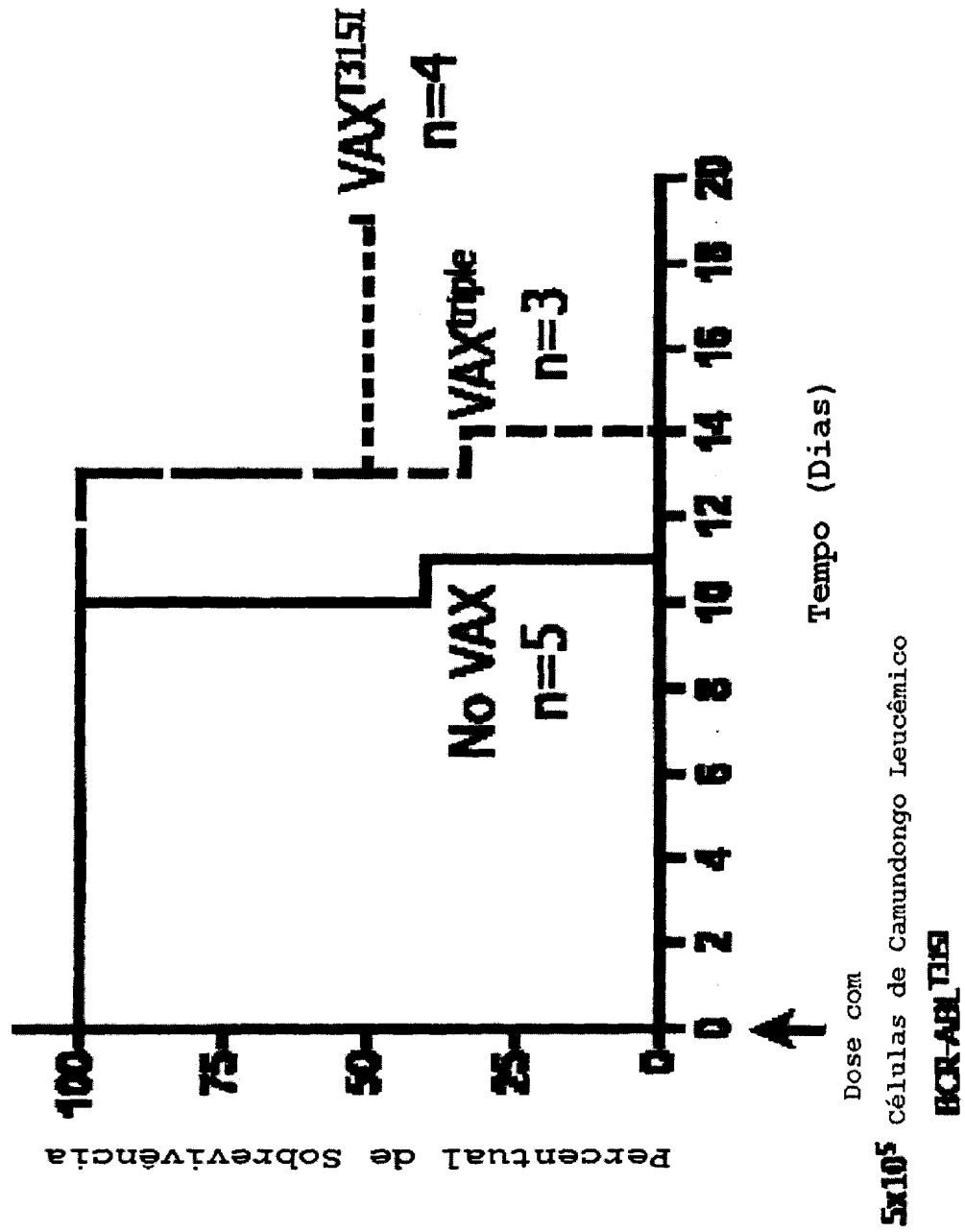


Figura 4

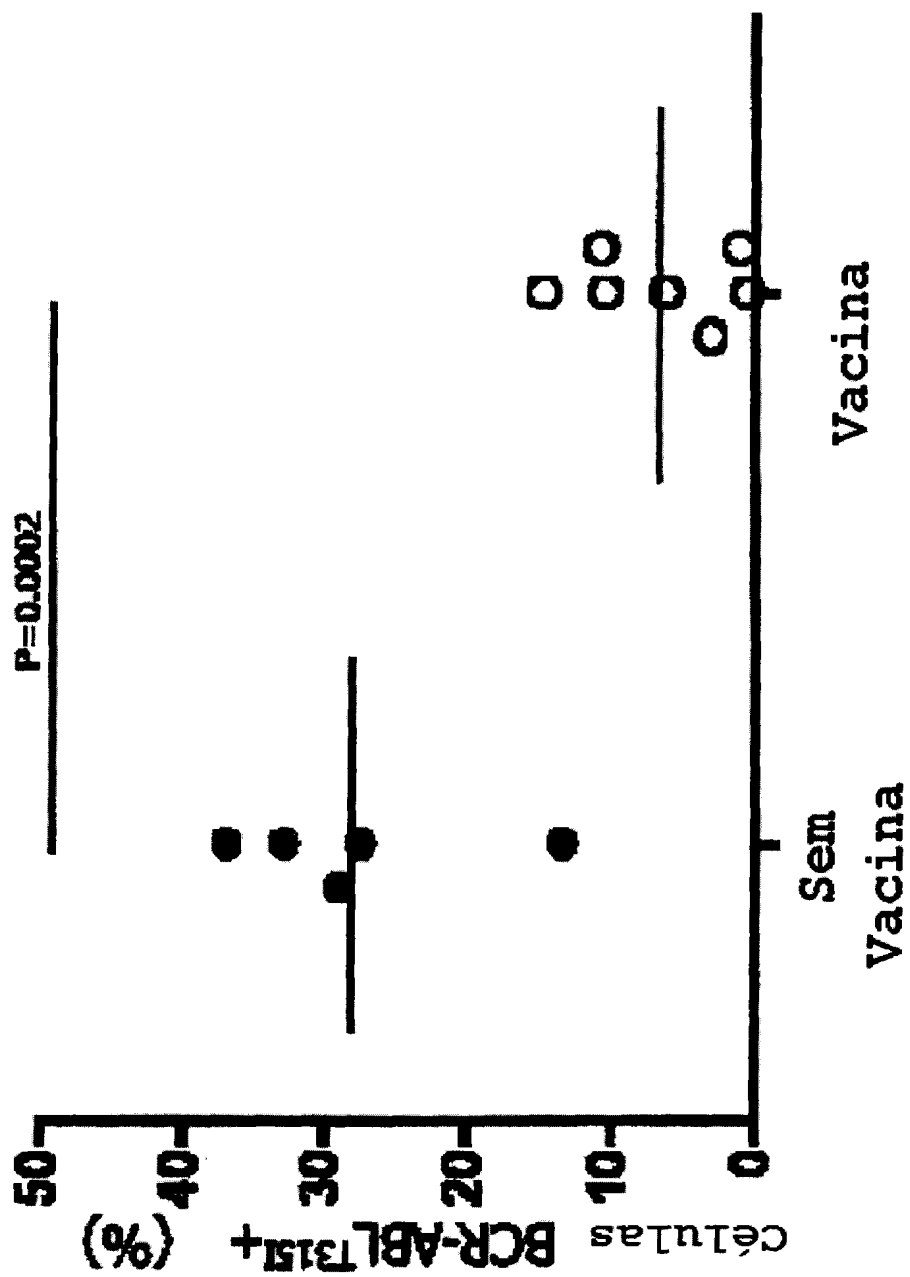
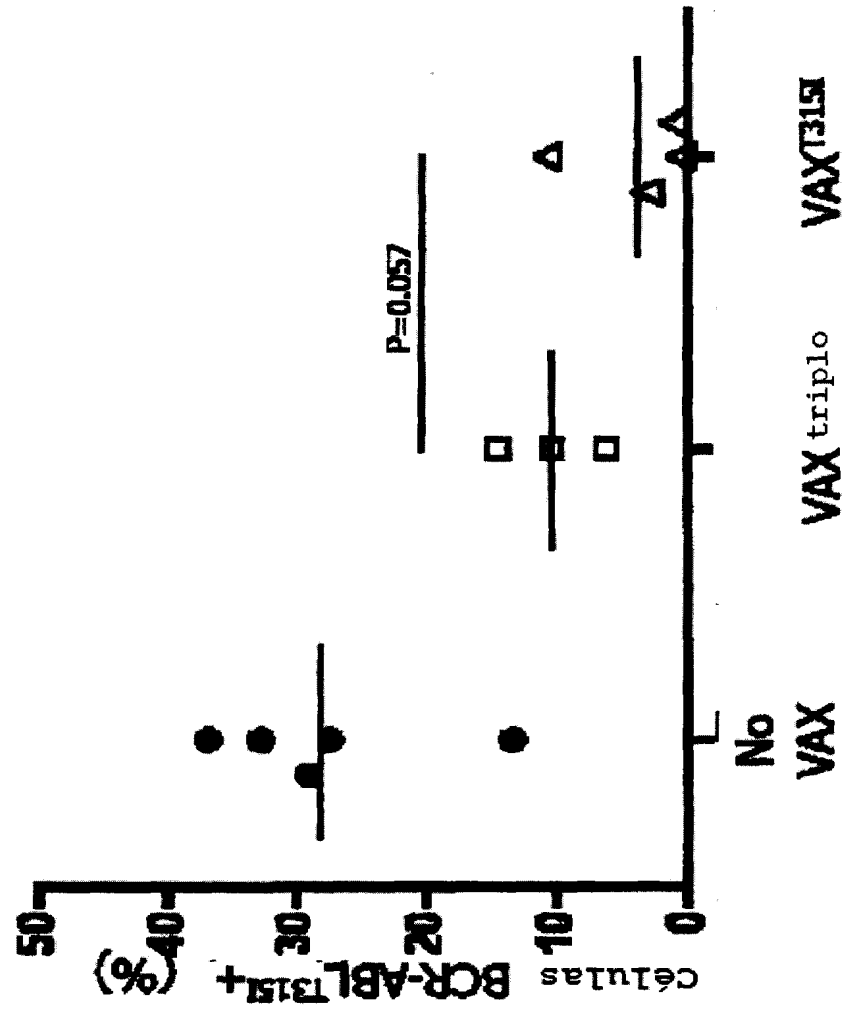


Figura 5



Resumo

COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA REMOÇÃO DIRECIONADA DE ESCAPE
MUTACIONAL DE TERAPIAS DIRECIONADAS PARA O CÂNCER

São aqui fornecidas composições e métodos para remoção
5 direcionada de escape mutacional na presença de agentes
terapêuticos para câncer. As composições que compreendem os
veículos com base em levedura são usadas em combinação com
outros agentes terapêuticos para câncer.