

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2007.10.05	(73) Titular(es): BAVARIAN NORDIC INC. 2425 GARCIA AVENUE MOUNTAIN VIEW, CA 94043 US
(30) Prioridade(s): 2006.10.06 US 850031 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.07.01	
(45) Data e BPI da concessão: 2014.06.25 181/2014	(72) Inventor(es): ALAIN DELCAYRE US REINER LAUS US STEFANIE MANDL US
	(74) Mandatário: NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **VÍRUS VACCINIA ANKARA MODIFICADO RECOMBINANTE QUE CODIFICA UM ANTIGÉNIO HER-2 EM ASSOCIAÇÃO COM UM TAXANO PARA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE CANCRO**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A COMPOSIÇÕES, KITS E MÉTODOS PARA TERAPIA DE CANCRO UTILIZANDO VÍRUS MVA RECOMBINANTES QUE CODIFICAM UM ANTIGÉNIO ASSOCIADO A TUMORES, TAL COMO O HER-2, PARTICULARMENTE EM ASSOCIAÇÃO COM TAXANOS. OS TAXANOS PODEM SER ADMINISTRADOS ANTES, AO MESMO TEMPO OU APÓS O VÍRUS MVA RECOMBINANTE.

RESUMO

"VÍRUS VACCINIA ANKARA MODIFICADO RECOMBINANTE QUE CODIFICA UM ANTIGÉNIO HER-2 EM ASSOCIAÇÃO COM UM TAXANO PARA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE CANCRO"

A invenção refere-se a composições, kits e métodos para terapia de cancro utilizando vírus MVA recombinantes que codificam um antigénio associado a tumores, tal como o HER-2, particularmente em associação com taxanos. Os taxanos podem ser administrados antes, ao mesmo tempo ou após o vírus MVA recombinante.

DESCRIÇÃO

**"VÍRUS VACCINIA ANKARA MODIFICADO RECOMBINANTE QUE CODIFICA
UM ANTIGÊNIO HER-2 EM ASSOCIAÇÃO COM UM TAXANO PARA
UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE CANCRO"**

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a vírus MVA recombinantes que codificam o antígeno associado a tumores HER-2 em associação com taxanos para serem utilizados no tratamento de cânceros.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O vírus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) está relacionado com o vírus vaccinia, um membro do género Orthopoxvirus, da família dos Poxviridae. O MVA foi gerado por 516 passagens sucessivas em fibroblastos de embrião de galinha da estirpe Ankara do vírus vaccinia (CVA) (para uma revisão ver Mayr, A., et al. Infection 3, 6-14 (1975)). Como uma consequência destas passagens de longa duração, o genoma do vírus MVA resultante tinha cerca de 31 quilobases suprimidas da sua sequência genómica e, por conseguinte, foi descrito como altamente restrito à célula hospedeira para replicação em células aviárias (Meyer, H. et al., J. Gen. Virol. 72, 1031-1038 (1991)). Foi demonstrado numa variedade de modelos animais que o MVA resultante era significativamente avirulento (Mayr, A. & Danner, K., Dev. Biol. Stand. 41: 225-34 (1978)). Além disso, esta estirpe de MVA foi testada em ensaios clínicos como uma vacina para imunizar contra a varíola humana (Mayr et al., Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Orig. B 167, 375-390 (1987); Stickl et al., Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392 (1974)). Estes estudos envolveram mais de 120 000

humanos, incluindo doentes de alto risco, e provaram que, em comparação com as vacinas à base de vaccinia, o MVA tinha menor virulência ou transmissibilidade, enquanto induzia uma boa resposta imunológica específica.

Nas décadas seguintes, o MVA foi manipulado para ser utilizado como um vetor viral para expressão recombinante de genes ou como uma vacina recombinante (Sutter, G. et al., *Vaccine* 12: 1032-40 (1994)).

Ainda que Mayr et al. tenham demonstrado durante os anos de 1970 que o MVA é altamente atenuado e avirulento em humanos e mamíferos, certos investigadores têm referido que o MVA não está completamente atenuado em linhas de células mamíferas e humanas, uma vez que poderia ocorrer replicação residual nestas células. (Blanchard et al., *J Gen Virol* 79, 1159-1167 (1998); Carroll & Moss, *Virology* 238, 198-211 (1997); Altenberger, Patente U.S. nº 5,185,146; Ambrosini et al., *J Neurosci Res* 55(5), 569 (1999)). Assume-se que os resultados descritos nestas publicações foram obtidos com várias estirpes conhecidas de MVA, uma vez que os vírus utilizados diferem essencialmente nas suas propriedades, em particular no seu comportamento de crescimento em várias linhas de células. Essa replicação residual é indesejável por várias razões, incluindo questões de segurança relacionadas com a utilização em humanos.

Foram descritas estirpes de MVA possuindo perfis de segurança melhorados para o desenvolvimento de produtos mais seguros, tais como vacinas ou produtos farmacêuticos. Ver Patentes U.S. nº 6,761,893 e 6,193,752. Tais estirpes são capazes de replicação reprodutiva em células e linhas de células não humanas, especialmente em fibroblastos de embrião de galinha (CEF), mas não são capazes de replicação

reprodutiva significativa em certas linhas de células humanas que se sabe que permitem a replicação de estirpes de vaccinia conhecidas. Tais linhas de células incluem uma linha de células de queratinócitos humanos, HaCat (Boukamp et al. J Cell Biol 106(3): 761-71 (1988)), uma linha de células de adenocarcinoma do colo do útero humano, HeLa (ATCC n° CCL-2), uma linha de células de rim embrionário humano, 293 (ECACC n° 85120602) e uma linha de células de osteossarcoma ósseo humano, 143B (ECACC n° 91112502). Tais estirpes também não são capazes de replicação reprodutiva significativa *in vivo*, por exemplo, em certas estirpes de rato, tal como no modelo de rato transgênico AGR 129, o qual está gravemente imunocomprometido e é altamente suscetível a um vírus replicante. Ver Patente U.S. n° 6,761,893. Foi descrita uma tal estirpe de MVA e seus derivados e recombinantes, referida como "MVA-BN." Ver Patentes U.S. n° 6,761,893 e 6,193,752.

Os MVA e MVA-BN foram manipulados para serem utilizados como vetores virais para a expressão de genes recombinantes ou como uma vacina recombinante. Ver, por exemplo, Sutter, G. et al., Vaccine 12: 1032-40 (1994), Patentes U.S. n° 6,761,893 e 6,193,752.

Certas abordagens para a imunoterapia do cancro incluíram a vacinação com antigénios associados aos tumores. Kastenmueller (2006), Virology 350(2), 276-288 descreve a infecção de células dendríticas humanas com MVA recombinante que expressa HER-2. Em certos casos, tais abordagens incluíram a utilização de um sistema de administração para promover respostas imunológicas dos hospedeiros aos antigénios associados aos tumores. Em certos casos, tais sistemas de administração incluíram vetores virais recombinantes. Ver, por exemplo, Harrop et al., Front.

Biosci. 11:804-817 (2006); Arlen et al., Semin. Oncol. 32:549-555 (2005); Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (supl. 2):14567-14571 (2004). A EP 1188834 divulga um MVA que codifica o HER-2 para efeitos de imunização. O mesmo é divulgado na WO 2004/058278, a qual ensina, contudo, que a IL-15 é co-expressa.

O HER-2 é um antigénio associado a tumores que é sobreexpresso em células tumorais de um número de doentes com cancro. A imunização com vários polipéptidos de HER-2 tem sido utilizada para gerar uma resposta imunológica contra as células tumorais que expressam este antigénio. Ver, por exemplo, Renard et al., J. Immunology 171:1588-1595 (2003); Mittendorf et al., Cancer 106:2309-2317 (2006).

Os taxanos, tais como paclitaxel e docetaxel, têm sido utilizados como quimioterapias para doentes com cancro. A quimioterapia com taxanos tem sido associada a vários tratamentos com vacinas contra tumores, resultando numa variedade de resultados. Ver, Chu et al., J. Immunotherapy 29: 367-380 (2006); Machiels et al., Cancer Res. 61: 3689-3697 (2001); Prell et al., Cancer Immunol. Immunother. 55: 1285-1293 (2006); Arlen et al., Clinical Breast Cancer 7: 176-179 (2006); e Arlen et al., Clinical Cancer Res. 12: 1260-1269 (2006). A associação de vacinas contra cancros com quimioterapias foi revista em Chong et al., Expert Opin. Pharmacother. 6: 1-8 (2005) e Emens et al., Endocrine-Related Cancer 12: 1-17 (2005). Burris (2000), Seminars Oncol. 27(2), Supl. 3, 19-23 descreve um tratamento de associação utilizando Docetaxel ou Paclitaxel e o anticorpo anti-HER-2 Herceptina®.

Com base no anterior, há uma necessidade na técnica de reagentes e métodos para a terapia de cancro.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção abrange uma associação de um MVA recombinante que codifica um polipéptido compreendendo um antigénio HER-2 e/ou epítipo do mesmo e uma dose tumoricida de um taxano, preferencialmente para ser utilizada em métodos de tratamento de doentes com cancro. Numa forma de realização, o método compreende administrar ao doente um MVA recombinante que codifica um polipéptido compreendendo um antigénio HER-2 e administrar ao doente uma dose tumoricida de um taxano. O tratamento de associação é superior a qualquer um dos tratamentos sozinho.

Numa forma de realização preferida, o MVA é MVA-BN.

Numa forma de realização, o antigénio HER-2 compreende a SEQ ID NO:2.

O MVA recombinante pode ser administrado antes da dose tumoricida do taxano, ao mesmo tempo que a dose tumoricida do taxano ou depois da dose tumoricida do taxano.

Numa forma de realização preferida, o taxano é docetaxel. Noutra forma de realização preferida, o taxano é paclitaxel. Numa forma de realização, o taxano é docetaxel a uma dose de 75-100 mg/m². Numa forma de realização, o taxano é paclitaxel a uma dose de 135-175 mg/m².

Numa forma de realização, o MVA recombinante é administrado 1-26 semanas antes da dose tumoricida do taxano. Numa forma

de realização, o MVA recombinante é administrado 1-3 semanas antes da dose tumoricida do taxano.

Numa forma de realização, o MVA recombinante é administrado 2-60 dias depois da dose tumoricida do taxano. Numa forma de realização, o MVA recombinante é administrado 2-7 dias depois da dose tumoricida do taxano.

A invenção abrange ainda um kit para o tratamento de um doente com cancro contendo um MVA recombinante que codifica um polipéptido compreendendo um antígeno HER-2 e instruções para administrar o MVA recombinante antes da dose tumoricida do taxano, ao mesmo tempo que a dose tumoricida do taxano ou depois da dose tumoricida do taxano.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1A-B. Análise de transferência de Western da expressão de mHER2 em células CEF primárias (A) ou células HeLa (B) após inoculação com MVA-BN-mHER2. Culturas de células foram inoculadas com MVA-BN ou MVA-BN-mHER2 às diluições apresentadas, ou com tampão de TBS, como descrito no Exemplo 1. As células foram colhidas das culturas 24 horas depois e foram preparados lisados celulares. As amostras foram submetidas a eletroforese através de geles de SDS-PAGE e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. A proteína mHER2 foi detetada por incubação com antissoro anti-HER-2 de coelho, seguida de detecção com anticorpo anti-coelho marcado com fosfatase alcalina e um substrato cromogénico como descrito no Exemplo 1. A proteína HER-2 inteira e o domínio extracelular de HER-2 são mostrados para referência. As setas marcam a posição da

proteína detetada com o antissoro anti-HER-2 em lisados de culturas de células.

Figura 2A-C. Respostas de anticorpos anti-HER-2 em diferentes estirpes de ratos tratadas com MVA-BN-mHER2.

Ratos C57BL/6 (A) ou BALB/c (B) (5 animais em cada grupo) foram tratados com 2E6 (◆), 1 E7 (■) e 5E7 (▲) TCID₅₀ MVA-BN-mHER2 nos dias 1, 15 e 29 (indicados pelas setas), como descrito no Exemplo 2. Foram colhidas amostras de sangue e diluições sucessivas de soros agrupados foram analisadas quanto à presença de IgG anti-HER-2 por ELISA, como descrito no Exemplo 2. São mostrados os títulos ou fatores de diluição aos quais foram detetados sinais duas vezes acima do fundo para diferentes pontos no tempo. Ratos (C) BALB/c (◆) e BALB/c NeuT transgênicos com HER-2 (■) foram tratados com MVA-BN-mHER2 (1E7 TCID₅₀). Os títulos de IgG anti-HER-2 foram determinados como nos painéis A e B.

Figura 3A-C. Especificidade para o antígeno das respostas de anticorpos anti-HER-2 induzidas com MVA-BN-mHER2.

(A) Os poços de uma placa de microtitulação foram revestidos com HER-2 ecd-Fc (coluna preta), HER-3 ecd-Fc (coluna cinzenta) e HER-4 ecd-Fc (coluna branca), como descrito no Exemplo 2. Os antígenos foram depois detetados por ELISA utilizando um anticorpo monoclonal anti-HER-2 (HER-2 Ab; AB-5, Calbiochem), um anticorpo monoclonal anti-fragmento Fc da Ig humana (Fc Ab; Southern Biotech) ou um anticorpo monoclonal de controlo de isotipo (Contr Ab). (B) e (C). Os ensaios de ELISA foram realizados utilizando soros de ratos C57BL/6 (B) ou BALB/c (C) tratados com MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID₅₀). Foram colhidos soros pré-tratamento antes do primeiro tratamento; foram colhidos soros pós-tratamento no dia 42, duas semanas após a última de três injeções dadas em intervalos de duas semanas. Os dados apresentados são a

média \pm desvio padrão, indicado pelas barras do erro padrão.

Figura 4A-D. Respostas de células T induzidas com HER-2 em diferentes estirpes de ratos tratadas com MVA-BN-mHER2.

Ratos C57BL/6 (A e B) ou BALB/c (C e D) (5 animais em cada grupo) foram tratados com TBS ou $1E7$ TCID₅₀ de MVA-BN-mHER2 como descrito no Exemplo 3. Cinco dias após o último tratamento, os baços foram recolhidos e foram preparadas suspensões celulares para reestimulação *in vitro*. O IFN γ segregado foi detetado por ensaio ELISpot padrão como descrito no Exemplo 3. A e C, foram adicionadas quantidades incrementais de HER-2 ecd (símbolos a cheio) ou apenas meio (símbolos abertos) a células do baço de ratos tratados com TBS (círculos) ou MVA-BN-mHER2 (losangos). B e D, células do baço de ratos tratados com TBS (barras vazias) ou MVA-BN-mHER2 (barras pretas) foram reestimuladas com um péptido de HER-2 ou um dos péptidos da toxina do tétano (TTP2 ou TTP30) como descrito no Exemplo 3. Os dados apresentados são média \pm desvio padrão, indicado pelas barras do erro padrão.

Figura 5. Análise do crescimento de tumores em ratos pré-tratados com MVA-BN-mHER2 (Panorama profilático).

Ratos BALB/c (5 animais em cada grupo) foram injetados por via subcutânea com TBS (triângulos pretos), MVA-BN-mHER2 ($2E7$ TCID₅₀, círculos pretos) ou MVA-BN-mHER2 ($2E6$ TCID₅₀, círculos abertos), como descrito no Exemplo 5. Seis semanas depois da última injeção, os ratos foram postos à prova com células TUBO ($1E5$) injetadas por via intradérmica. Depois disso, o crescimento dos tumores foi determinado duas vezes por semana. Os dados apresentados são média \pm desvio padrão, indicado pelas barras do erro padrão.

Figura 6. Análise do crescimento de tumores em ratos tratado com MVA-BN-mHER2. Ratos BALB/c (9 animais em cada grupo) foram postos à prova com CT26-HER-2 (5E5 células injetadas por via intravenosa) no dia 1 e tratados por via intraperitoneal no dia 4 com TBS, MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID₅₀), ou MVA-BN (5E7 TCID₅₀), como descrito no Exemplo 5. Os ratos foram sacrificados no dia 14 e os seus pulmões pesados. A massa do tumor foi calculada subtraindo o peso médio dos pulmões de ratos não sujeitos à prova do peso médio dos pulmões de ratos postos à prova com tumor. Os dados apresentados são média \pm desvio padrão, indicado pelas barras do erro padrão.

Figura 7. Análise do crescimento de tumores em ratos tratados com MVA-BN-mHER2 ou MVA-BN. Ratos BALB/c (9 animais em cada grupo) foram postos à prova com CT26-HER-2 (5E5 células injetadas por via intravenosa) no dia 1 e tratados por via intraperitoneal no mesmo dia com TBS, MVA-BN (5E6 ou 5E7 TCID₅₀) ou MVA-BN-mHER2 (5E6 ou 5E7 TCID₅₀), como descrito no Exemplo 5. Os ratos foram sacrificados no dia 14 e os seus pulmões pesados. A massa do tumor foi calculada subtraindo o peso médio dos pulmões de ratos que não foram sujeitos à prova do peso médio dos pulmões de ratos postos à prova com tumor. Os dados apresentados são média \pm desvio padrão, indicado pelas barras do erro padrão.

Figura 8 A-B. Respostas de anticorpos anti-HER-2 em ratos co-tratados com MVA-BN-mHER2 e docetaxel. Ratos C57BL/6 foram tratados por via subcutânea com controlo (Soro Fisiológico Tamponado com Tris (TBS); 1 grupo de 5 animais) ou com 5E7 TCID₅₀ de MVA-BN-mHER2 (9 grupos de 5 animais) nos dias 1, 22 e 43 (q3 semanas x 3). O efeito do agente quimioterapêutico docetaxel na indução do anticorpo anti-

HER-2 foi avaliado tratando animais com o fármaco à dose tumoricida (33 mg/Kg) dois dias (dia -2) (A) ou um semana (dia -7) (B) antes do tratamento com MVA-BN-mHER2. O fármaco foi injetado iv uma vez, duas vezes (q3 semanas X2), três (q3 semanas X3) ou quatro vezes (q3 semanas X4) como descrito no Quadro 2.

Figura 9 A-B. Análise do crescimento de tumores em ratos pré-tratados com docetaxel e MVA-BN-mHER2 (Panorama profilático). A integridade da resposta imunológica induzida pelo MVA-BN-mHER2 em ratos tratados com doses tumoricidas de docetaxel foi ainda avaliada medindo a atividade antitumoral do MVA-BN-mHER2. Ratos tratados como descrito na legenda da Figura 8 foram postos à prova com células tumorais MC38-HER-2 no dia 71 e o crescimento dos tumores foi avaliado como descrito na legenda da Figura 5.

Figura 10A-C. Análise do crescimento de tumores em ratos co-tratados com docetaxel e MVA-BN-mHER2. Para cada subconjunto experimental A, B e C, ratos C57BL/6 (40 animais) foram postos à prova com células MC38-HER-2 no dia 1, em seguida tratados por via subcutânea com controle (Soro Fisiológico Tamponado com Tris (TBS); 10 animais tratado 3 vezes), docetaxel sozinho (33 mg/Kg; 10 animais tratados uma vez), MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID50; 10 animais tratados duas vezes) ou docetaxel (1 tratamento) e MVA-BN-mHER2 (dois tratamentos) em alturas diferentes para cada subconjunto experimental, como indicado na Figura. O crescimento de tumores foi avaliado duas vezes por semana até sacrifício no dia 23.

DESCRIÇÃO DETALHADA DE CERTAS FORMAS DE REALIZAÇÃO

Numa forma de realização, a invenção abrange a utilização de MVA recombinante que codifica um polipéptido compreendendo um antigénio HER-2 e/ou epítipo do mesmo, e uma dose tumoricida de um taxano para a terapia de cancro. Os MVA recombinantes são gerados por inserção de sequências heterólogas num vírus MVA. Os exemplos de estirpes de vírus MVA que são úteis na prática da presente invenção e que foram depositadas em conformidade com os requisitos do Tratado de Budapeste são as estirpes MVA 572, depositada na Coleção Europeia de Culturas de Células Animais (ECACC), Salisbury (UK) com o número de depósito ECACC 94012707 em 27 de Janeiro de 1994, e MVA 575, depositada sob ECACC 00120707 em 7 de Dezembro de 2000. A MVA-BN, depositada em 30 de Agosto de 2000 na Coleção Europeia de Culturas de Células (ECACC) sob o número V00083008, e seus derivados, são estirpes ilustrativas adicionais.

Embora o MVA-BN seja preferido pela sua maior segurança (menos competente para replicação), todos os MVA são adequados para esta invenção. De acordo com uma forma de realização da presente invenção, a estirpe de MVA é MVA-BN e seus derivados. Uma definição de MVA-BN e seus derivados é dada na PCT/EP01/13628.

Como aqui mencionado, um MVA compreende pelo menos um antigénio associado a tumores, o qual é o antigénio HER-2. Numa forma de realização, o antigénio HER-2 compreende a sequência de SEQ ID NO:2.

Noutras formas de realização, o antigénio associado a tumores é modificado para incluir um ou mais epítopos T_H estranhos. Um tal agente imunoterapêutico para o cancro é aqui descrito num exemplo não limitativo e é referido como "MVA-BN-mHER2." Como aqui descritos, tais agentes

imunoterapêuticos para o cancro, incluindo, mas não se limitando a MVA-BN-mHER2, são úteis para o tratamento de cancro. A invenção permite a utilização de tais agentes em regímenes de vacinação principal/de reforço de humanos e outros mamíferos, incluindo doentes imunocomprometidos; e a indução de respostas imunológicas humorais e celulares, tal como a indução de uma resposta imunológica Th1 num meio Th2 preexistente.

O termo "polipéptido" refere-se a um polímero de dois ou mais aminoácidos unidos uns aos outros por ligações peptídicas ou ligações peptídicas modificadas. Os aminoácidos podem ser naturais bem como não naturais, ou um análogo químico de um aminoácido natural. O termo também refere-se a proteínas, isto é, biomoléculas funcionais compreendendo pelo menos um polipéptido; quando compreendem pelo menos dois polipéptidos, estes podem formar complexos, estar ligados covalentemente ou podem estar ligados não covalentemente. O(s) polipéptido(s) numa proteína pode(m) estar glicosilado(s) e/ou lipidado(s) e/ou compreender grupos protéticos.

Em certas formas de realização, o MVA é MVA-BN, depositado em 30 de Agosto de 2000, na Coleção Europeia de Culturas de Células (ECACC) sob o número V00083008, e descrito nas Patentes U.S. nº 6,761,893 e 6,193,752. Como descrito naquelas publicações de patente, o MVA-BN não se replica reprodutivamente nas linhas de células 293, 143B, HeLa e HaCat. Em particular, o MVA-BN exhibe uma taxa de amplificação de 0,05 a 0,2 nas linha de células de rim embrionário humano 293. Nas linha de células de osteossarcoma ósseo humano 143B, o MVA-BN exhibe uma taxa de amplificação de 0,0 a 0,6. O MVA-BN exhibe uma taxa de amplificação de 0,04 a 0,8 na linha de células de

adenocarcinoma do colo do útero humano HeLa, e de 0,02 a 0,8 na humano linha de células de queratinócitos humanos HaCat. O MVA-BN tem uma taxa de amplificação de 0,01 a 0,06 nas células do rim do macaco verde Africano (CV1: ATCC n° CCL-70).

A taxa de amplificação do MVA-BN é superior a 1 em fibroblastos de embrião de galinha (CEF: culturas primárias) como descrito nas Patentes U.S. n° 6,761,893 e 6,193,752. O vírus pode ser facilmente propagado e amplificado em culturas primárias de CEF com um proporção acima de 500.

Em certas formas de realização, um MVA recombinante é um derivado de MVA-BN. Tais "derivados" incluem vírus que exibem essencialmente as mesmas características de replicação que a estirpe depositada (ECACC n° V00083008), mas que exibem diferenças em uma ou mais partes do seu genoma. Os vírus que têm a mesmas "características de replicação" que o vírus depositado são vírus que se reproduzem com taxas de amplificação semelhantes à da estirpe depositada em células CEF e nas linhas de células, HeLa, HaCat e 143B; e que exibem características de replicação semelhantes *in vivo*, como determinado, por exemplo, no modelo de rato transgênico AGR129.

Em certas formas de realização, o MVA é um vírus vaccinia recombinante que contém sequências de nucleótidos adicionais que são heterólogas ao vírus vaccinia. Em certas formas de realização desse tipo, as sequências heterólogas codificam epítomos que induzem uma resposta pelo sistema imunitário. Assim, em certas formas de realização, o MVA recombinante é utilizado para vacinar contra as proteínas ou agentes compreendendo o epítomo que é HER-2. Numa forma

de realização, o antigénio HER-2 compreende a sequência da SEQ ID NO:2.

Em certas formas de realização é inserida uma sequência de ácido nucleico heteróloga numa região não essencial do genoma do vírus. Em certas dessas formas de realização, a sequência de ácido nucleico heteróloga é inserida num sítio de supressão natural do genoma do MVA como descrito na WO 97/02355. Os métodos para inserir sequências heterólogas no genoma poxviral são conhecidos para um especialista na técnica.

Em certas formas de realização, as composições farmacêuticas compreendem um ou mais veículos, aditivos, antibióticos, conservantes, adjuvantes, diluentes e/ou estabilizantes farmacêuticamente aceitáveis e/ou aprovados. Tais aditivos incluem, por exemplo, mas não se limitam a, água, soro fisiológico, glicerol, etanol, humectantes ou emulsionantes e substâncias tampão de pH. Os veículos ilustrativos são tipicamente moléculas grandes, metabolizadas lentamente tais como proteínas, polissacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados lipídicos ou semelhantes.

Para a preparação de vacinas, o MVA pode ser convertido numa forma fisiologicamente aceitável. Em certas formas de realização, essa preparação baseia-se na experiência na preparação de vacinas de poxvírus utilizadas para vacinação contra a varíola, como descrito, por exemplo, em Stickl, H. et al., Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392 (1974).

Segue-se uma preparação ilustrativa. O vírus purificado é conservado a -80 °C com um título de 5×10^8 TCID₅₀/mL

formulado em Tris 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. Para a preparação de doses de vacina, por exemplo, 10^2 - 10^8 partículas do vírus podem ser liofilizadas em soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS) na presença de 2% de peptona e 1% de albumina humana numa ampola, preferencialmente um ampola de vidro. Alternativamente, as doses de vacina podem ser preparadas por secagem por congelação por passos do vírus numa formulação. Em certas formas de realização, a formulação contém aditivos adicionais tais como manitol, dextrano, açúcar, glicina, lactose, polivinilpirrolidona ou outros aditivos, tais como, incluindo, mas não se limitando a, antioxidantes ou gases inertes, estabilizantes ou proteínas recombinantes (por exemplo albumina de soro humano) adequados para administração *in vivo*. A ampola é depois selada e pode ser conservada a uma temperatura adequada, por exemplo, entre 4 °C e a temperatura ambiente durante vários meses. No entanto, se não houver essa necessidade, a ampola é preferencialmente conservada a temperaturas inferiores a -20 °C.

Em várias formas de realização que envolvem vacinação ou terapia, o liofilizado é dissolvido em 0,1 a 0,5 mL de uma solução aquosa, preferencialmente soro fisiológico ou tampão de Tris, e administrado por via sistêmica ou local, isto é, pela via parentérica, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intranasal, intradérmica ou qualquer outra via de administração conhecida para um especialista praticante. A otimização do modo de administração, dose e número de administrações está dentro da perícia e conhecimento de um especialista na técnica.

Em certas formas de realização, as estirpes de vírus vaccinia atenuado são úteis para induzir respostas

imunológicas em animais imunocomprometidos, por exemplo, macacos ($CD4 < 400/\mu L$ de sangue) infetados com SIV, ou humanos imunocomprometidos. O termo "imunocomprometido" descreve o estado do sistema imunitário de um indivíduo que exhibe apenas respostas imunológicas incompletas ou tem uma eficiência reduzida na defesa contra agentes infecciosos.

Certos Antígenios Associados a Tumores Ilustrativos

Em certas formas de realização é produzida uma resposta imunológica num indivíduo contra uma antígeno polipeptídico associado a células. Em certas dessas formas de realização, uma antígeno polipeptídico associado a células é um antígeno associado a tumores.

Em certas formas de realização, uma antígeno polipeptídico associado a células é um auto-antígeno proteico que não um antígeno associado a tumores, o qual está relacionado com vários processos patológicos, ou um antígeno viral, ou antígenios derivados de um parasita ou bactéria intracelular. Em certos casos, tais antígenios associados a agentes patogénicos são muitas vezes relativamente maus imunogénios (por exemplo antígenios de micobactérias tais como *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*, mas também de protozoários tais como *Plasmodium spp.*).

Na técnica é conhecido um grande número de antígenios associados a tumores.

O antígeno associado a tumores utilizado na presente invenção é o HER-2. O HER-2 é um membro da família do recetor do fator de crescimento epidérmico (c-erbB) que consiste de quatro recetores diferentes até à data: c-erbB-1 (EGFr), c-erbB-2 (HER-2, c-Neu), c-erbB-3 e c-erbB-4

(Salomon et al, 1995). Os c-erbB-3 e c-erbB-4 estão menos bem caracterizados do que os EGFr e HER-2. O HER-2 é uma glicoproteína da membrana integral. A proteína madura tem um peso molecular de 185 kD com características estruturais que se assemelham de perto com o recetor EGFr (Prigent et al, 1992). O EGFr é também um recetor da membrana integral constituído por uma subunidade. Ele tem um peso molecular aparente de 170 kD e consiste de um domínio de ligação a ligando na superfície de 621 aminoácidos, um domínio transmembranar hidrófobo único de 23 aminoácidos, e um domínio tirosina-cinase citoplasmática altamente conservado de 542 aminoácidos. A proteína está N-glicosilada (Prigent et al, 1994).

Todas as proteínas desta família são tirosina-cinases. A interação com o ligando leva à dimerização do recetor, o qual aumenta a ação catalítica da tirosina-cinase (Bernard. 1995, Chantry 1995). As proteínas dentro da família são capazes de homo- e heterodimerizar, o que é importante para a sua atividade. O EGFr transmite efeitos de promoção do crescimento e estimula a captação de glucose e aminoácidos pelas células (Prigent et al 1992). O HER-2 também transmite sinais promotores do crescimento.

O recetor do fator de crescimento epidérmico é expresso nos tecidos normais em quantidades baixas, mas está sobreexpressado em muitos tipos de cancros. O EGFr está sobreexpressado nos cancros da mama (Earp et al, 1993, Eppenberger 1994), gliomas (Schlegel et al, 1994), cancro gástrico (Tkunaga et al, 1995), carcinoma escamoso cutâneo (Fujii 1995), cancro do ovário (van Dam et al, 1994) e outros. O HER-2 é também expresso em poucos tecidos humanos normais em quantidade baixa, muito caracteristicamente em epitélios secretores. A sobreexpressão de HER-2 ocorre em

cerca de 30% dos cancros da mama, gástrico, pancreático, da bexiga e do ovário.

A expressão destes recetores varia dependendo do grau de diferenciação dos tumores e do tipo de cancro, por exemplo, no cancro da mama, os tumores primários sobreexpressam ambos os recetores; enquanto no cancro gástrico, a sobreexpressão ocorre numa fase posterior em tumores metastáticos (Salomon et al, 1995). O número de recetores sobreexpressos nas células de carcinoma é maior do que 10^6 /célula para vários cancros da cabeça e pescoço, e linhas de cancro da vulva, mama e ovário isolados de doentes (Dean et al, 1994).

Existem várias razões para a família de recetores EGFr constituir um alvo adequado para a imunoterapia de tumores. Primeiro, eles são sobreexpressos em muitos tipos de cancros, o que orientaria a resposta imunológica para o tumor. Segundo, os tumores expressam ou sobreexpressam frequentemente os ligandos para esta família de recetores e alguns são hipersensíveis aos efeitos proliferativos mediados pelo ligandos. Terceiro, os doentes com tumores que sobreexpressam recetores de fatores de crescimento têm frequentemente um mau prognóstico. A sobreexpressão tem sido estreitamente relacionada com mau prognóstico especialmente no cancro da mama, cancro do pulmão e cancro da bexiga e pode ser associada a fenótipos invasivos/metastáticos, os quais são muito insensíveis a terapias convencionais (Eccles et al, 1994).

Antigénios Associados a Tumores Modificados

Em certas formas de realização, uma antigénio polipeptídico associado a células é modificado para que seja induzida uma resposta CTL contra uma célula que apresenta epítomos

derivados de um antigénio polipeptídico na sua superfície, quando apresentado em associação com uma molécula de MHC de classe I na superfície de uma APC. Em certas dessas formas de realização, pelo menos um primeiro epítopo T_H estranho, quando apresentado, está associado a uma molécula de MHC de classe II na superfície da APC. Em certas dessas formas de realização, um antigénio associado a células é um antigénio associado a tumores.

As APCs ilustrativas capazes de apresentar epítomos incluem células dendríticas e macrófagos. As APCs adicionais ilustrativas incluem qualquer APC de pino- ou fagocitação que seja capaz de apresentar simultaneamente 1) epítomos de CTL ligados a moléculas de MHC de classe I e 2) epítomos T_H ligados a moléculas de MHC de classe II.

Em certas formas de realização são feitas modificações ao HER-2 de forma que, após administração a um indivíduo, são desencadeados anticorpos policlonais que reagem predominantemente com o HER-2. Tais anticorpos poderiam atacar e eliminar células tumorais bem como impedir que as células metastáticas se transformem em metástases. O mecanismo efector deste efeito antitumoral seria mediado via citotoxicidade celular dependente de complemento e anticorpo. Além disso, os anticorpos induzidos poderiam inibir também o crescimento de células cancerosas através da inibição da oligo-dimerização e internalização, dependente do fator de crescimento, dos recetores. Em certas formas de realização, esses antigénios polipeptídicos de HER-2 modificados poderiam induzir respostas CTL dirigidas contra epítomos HER-2 conhecidos e/ou previstos apresentados pelas células tumorais.

Em certas formas de realização, um antigénio polipeptídico de HER-2 modificado compreende um epítopo CTL do antigénio

polipeptídico associado a células e uma variante, em que a variante compreende pelo menos um epítipo CTL de um epítipo T_H estranho. Certos desses antígenios polipeptídicos de HER-2 modificados compreendendo pelo menos um epítipo CTL e uma variante compreendendo pelo menos um epítipo CTL de um epítipo T_H estranho, e métodos de produção do mesmo, são descritos na Patente U.S. nº 7,005,498 e Publicações de Patente U.S. nº 2004/0141958 e 2006/0008465.

Em certas formas de realização, um epítipo T_H estranho é um epítipo de células T "promíscuo" natural. Tais epítipos de células T promíscuos estão ativos numa grande parte de indivíduos de uma espécie animal ou uma população animal. Em certas formas de realização, uma vacina compreende tais epítipos de células T promíscuos. Em certas dessas formas de realização, a utilização de epítipos de células T promíscuos reduz a necessidade de um número muito grande de epítipos CTL diferentes na mesma vacina. Os epítipos de células T promíscuos ilustrativos incluem, mas não se limitam aos epítipos da toxina do tétano, incluindo mas não se limitando aos epítipos P2 e P30 (Panina-Bordignon et al., 1989), toxina da difteria, Hemaglutinina do vírus da gripe (HA) e antígeno CS de *P. falciparum*.

Os epítipos de células T promíscuos adicionais incluem péptidos capazes de ligar uma grande proporção de moléculas de HLA-DR codificadas pelos diferentes HLA-DR. Ver, por exemplo, WO 98/23635 (Frazer IH et al., concedida à University of Queensland); Southwood S et al., 1998, J. Immunol. 160: 3363 3373; Sinigaglia F et al., 1988, Nature 336: 778 780; Rammensee HG et al., 1995, Immunogenetics 41: 4 178 228; Chicz RM et al., 1993, J. Exp. Med 178: 27 47; Hammer J et al., 1993, Cell 74: 197 203; e Falk K et al., 1994, Immunogenetics 39: 230 242. A última referência também se ocupa de ligandos de HLA-DQ e -DP. Todos os

epítomos listados nestas referências são relevantes como epítomos naturais candidatos como aqui descritos, já que são epítomos que partilham de motivos comuns com estes.

Em certas outras formas de realização, o epítomo de células T promíscuo é um epítomo de células T artificial que é capaz de ligar uma grande proporção de haplótipos. Em certas dessas formas de realização, o epítomo de células T artificial é um péptido de epítomo DR sintético ("PADRE") como descrito em WO 95/07707 e no artigo correspondente de Alexander J et al., 1994, *Immunity* 1: 751 761.

mHER2

Vários antigénios polipeptídicos de HER-2 modificados e métodos para produzir o mesmo são descritos na Patente U.S. nº 7,005,498 e Publicações de Patente U.S. nº 2004/0141958 e 2006/0008465. Aqueles documentos descrevem vários antigénios polipeptídicos de HER-2 modificados compreendendo epítomos de células T promíscuos em diferentes posições no polipéptido de HER-2.

A sequência do HER-2 humano pode ser dividida num número de domínios baseados exclusivamente na estrutura primária da proteína. Estes domínios são como se segue. O domínio extracelular (recetor) prolonga-se desde os aminoácidos 1-654 e contém vários subdomínios como se segue: Domínio I (domínio N-terminal do polipéptido maduro) prolonga-se desde os aminoácidos 1-173; Domínio II (domínio rico em Cisteína, 24 resíduos de cisteína) prolonga-se desde os aminoácidos 174-323; Domínio III (domínio de ligação a ligando no recetor EGF homólogo) prolonga-se desde os aminoácidos 324-483; e Domínio IV (domínio rico em Cisteína, 20 resíduos de cisteína) prolonga-se desde os aminoácidos 484-623. Os resíduos transmembranares

prolongam-se desde os aminoácidos 654-675. O domínio intracelular (Cinase) prolonga-se desde os aminoácidos 655-1235 e contém o domínio tirosina-cinase, o qual se prolonga desde os aminoácidos 655-1010 (domínio TK central prolonga-se desde 725-992); e o domínio C-terminal, o qual se prolonga dos aminoácidos 1011-1235.

A seleção dos sítios na sequência de aminoácidos do HER-2 a ser substituídos pelos epítomos auxiliares T humanos P2 ou P30 é descrita na Patente U.S. nº 7,005,498 e Publicações de Patente U.S. nº 2004/0141958 e 2006/0008465. Resumindo, foram considerados os seguintes parâmetros:

1. Epítomos CTL conhecidos e previstos;
2. Homologia com recetores relacionados (EGFR em particular);
3. Conservação dos resíduos de cisteína;
4. Estruturas de volta, hélice α e folha β previstas;
5. Sítios potenciais de N-glicosilação;
6. Previsão de resíduos de aminoácidos expostos e ocultos;
7. Organização do domínio.

Os epítomos CTL parecem aglomerar-se nos domínio I, domínio III, domínio TM e em dois ou três "pontos quentes" no domínio TK. Como descrito na Patente U.S. nº 7,005,498 e Publicações de Patente U.S. nº 2004/0141958 e 2006/0008465, estes devem ser, em grande medida, conservados.

As regiões com um alto grau de homologia com outros recetores são, com probabilidade, estruturalmente importantes para a estrutura terciária "global" do HER-2 e, desse modo, para reconhecimento do anticorpo, enquanto as regiões com baixa homologia podem ser provavelmente

trocadas com apenas alterações locais da estrutura, como consequência.

Os resíduos de cisteína estão frequentemente envolvidos na formação de pontes dissulfureto intramoleculares e estão, desse modo, envolvidos na estrutura terciária e não devem ser modificados. As regiões que se prevê que formem estruturas de hélice alfa ou folha beta devem ser evitadas como pontos de inserção de epítomos estranhos, já que se pensa que estas regiões estejam envolvidas na dobragem da proteína.

Os sítios de N-glicosilação potenciais devem ser conservados se for desejada a manosiilação da proteína.

As regiões que se prevê (pelas suas propriedades hidrófobas) que estejam no interior da molécula devem ser preferencialmente conservadas já que estas poderiam estar envolvidas na dobragem. Pelo contrário, as regiões expostas ao solvente poderiam servir como posições candidatas para inserção dos epítomos modelo T_H, P2 e P30.

Finalmente, a organização do domínio da proteína deve ser tida em consideração devido à sua relevância em relação à estrutura e função da proteína.

Como descrito na Patente U.S. nº 7,005,498 e Publicações de Patente U.S. nº 2004/0141958 e 2006/0008465, o foco da estratégia foi conservar a estrutura da parte extracelular do HER-2 tanto quanto possível, porque esta é a parte da proteína que é relevante como um alvo para anticorpos neutralizantes. Pelo contrário, a parte intracelular do HER-2 ligado à membrana nativa na superfície das células cancerosas está inacessível ao sistema imunitário humoral.

Várias construções ilustrativas que utilizam os epítomos P2 e P30 da toxina do tétano inseridos em vários domínios do HER-2 são proporcionadas na Patente U.S. nº 7,005,498 e Publicações de Patente U.S. nº 2004/0141958 e 2006/0008465. Um antigénio polipeptídico de HER-2 modificado ilustrativo, referido como "mHER2," compreende os domínios extracelulares e nove aminoácidos do domínio transmembranar; o epítopo P2 inserido no Domínio II entre os resíduos de aminoácidos 273 a 287 do polipéptido de HER-2 modificado; e o epítopo P30 inserido no Domínio IV entre os resíduos de aminoácidos 655 a 675 do polipéptido de HER-2 modificado.

MVA-BN-mHER2 Recombinante

Numa forma de realização não limitativa, o MVA recombinante compreendendo um antigénio associado a tumores, por exemplo, MVA-BN-mHER2, é construído como se segue. A solução viral inicial é gerada por recombinação em cultura de células utilizando um tipo de células permissiva à replicação, por exemplo, células CEF. As células são inoculadas com um vírus vaccinia atenuado, por exemplo, MVA-BN, e transfetadas com um plasmídeo recombinante (por exemplo, pBN146) que codifica o antigénio associado a tumores, por exemplo, mHER2, sequência e regiões flangeadoras do genoma do vírus. Numa forma de realização não limitativa, o plasmídeo pBN146 contém sequências que estão também presentes no MVA-BN (as grelhas de leitura aberta 14L e 15L). A sequência mHER2 é inserida entre as sequências do MVA-BN para permitir a recombinação no genoma viral do MVA-BN. Em certas formas de realização, o plasmídeo contém também uma cassette de seleção compreendendo um ou mais genes de seleção para permitir a seleção de construções recombinantes nas células CEF. Numa

forma de realização preferida, o MVA recombinante codifica um polipéptido compreendendo a SEQ ID NO:2.

A infecção e transfeção simultânea de culturas permitem que ocorra recombinação homóloga entre o genoma viral e o plasmídeo recombinante. O vírus portador da inserção é depois isolado, caracterizado e preparados lotes de vírus. Em certas formas de realização, o vírus é subcultivado em culturas de células CEF na ausência de seleção para permitir a perda da região que codifica os genes de seleção, gpt e EGFP.

Terapia de associação com agentes citotóxicos

Os agentes citotóxicos exibem atividades imunomoduladoras a sub-doses tumoricidas que poderiam ser benéficas para eficácia da vacina. No entanto, às doses tumoricidas (doses altas), estes agentes poderiam ser prejudiciais para as atividades das vacinas. Foi agora demonstrado que as doses tumoricidas equivalentes humanas de docetaxel dadas a ratos durante o decorrer do tratamento com MVA-BN-mHER2 não afetam os títulos de anticorpos anti-HER-2 induzidos pela vacina. Além do mais, o tratamento de ratos com MVA-BN-mHER2 aumentou a sensibilidade do tumor ao docetaxel in vivo. Assim, a quimioterapia concorrente, anterior ou subsequente ao tratamento com MVA-BN-mHER2 pode ser superior a qualquer um dos tratamentos sozinho.

Os doentes com um cancro mediado por células que sobreexpressam o antígeno associado a tumores HER-2 pode ser tratado pela associação de MVA que codifica um antígeno HER-2 com um taxano. Numa forma de realização preferida, o MVA é MVA-BN. Numa forma de realização

particularmente preferida, o MVA codifica um polipéptido compreendendo a SEQ ID NO:2.

O MVA recombinante que codifica um antígeno HER-2 pode ser administrado por via sistémica ou local, isto é, por via parentérica, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intranasal, intradérmica ou qualquer outra via de administração conhecida para um praticante especialista. Numa forma de realização são administrados ao doente 10^5 - 10^{10} TCID₅₀ do MVA recombinante. Preferencialmente, são administrados ao doente 10^7 - 10^{10} TCID₅₀ do MVA recombinante. Mais preferencialmente, são administrados ao doente 10^8 - 10^{10} TCID₅₀ do MVA recombinante. Muito preferencialmente, são administrados ao doente 10^8 - 10^9 TCID₅₀ do MVA recombinante.

O cancro é preferencialmente um cancro da mama, um cancro do pulmão, um cancro gástrico, um cancro pancreático, um cancro da bexiga ou um cancro do ovário. Numa forma de realização preferida, o cancro é um cancro da mama metastático.

O doente com cancro pode ser qualquer mamífero, incluindo um rato ou ratazana. Preferencialmente, o doente com cancro é um primata, muito preferencialmente, um humano.

Numa forma de realização, o taxano é docetaxel. Noutra forma de realização, o taxano é paclitaxel. O taxano é preferencialmente administrado a uma dose tumoricida. Uma "dose tumoricida" de docetaxel é pelo menos 50 mg/m². Preferencialmente, a dose tumoricida de docetaxel é 75-100 mg/m², o que corresponde a uma dosagem de aproximadamente 25-33 mg/kg. Uma "dose tumoricida" de paclitaxel é pelo menos 90 mg/m². Preferencialmente, a dose tumoricida de paclitaxel é 135-175 mg/m². Uma "sub-dose

tumorícida" de um taxano é uma dosagem abaixo da dosagem tumorícida. O taxano pode ser administrado por um meio conhecido para o especialista, por exemplo, por via intravenosa.

Numa forma de realização, o taxano e o MVA que codifica um polipéptido compreendendo um antígeno HER-2 são administrados ao mesmo tempo. O tratamento de associação é superior a qualquer um dos tratamentos sozinho.

Numa forma de realização, o taxano é administrado antes do MVA que codifica um polipéptido compreendendo um antígeno HER-2. Numa forma de realização, o MVA que codifica um antígeno HER-2 é administrado dentro de 6 meses. Em certas formas de realização, o MVA que codifica um antígeno HER-2 é administrado dentro de 3 meses, dentro de 2 meses ou dentro de 1 mês após o taxano. Numa forma de realização, o MVA que codifica um antígeno HER-2 é administrado dentro de 21 dias após o taxano. Numa forma de realização, o MVA que codifica um antígeno HER-2 é administrado dentro de 14 dias após o taxano. Numa forma de realização, o MVA que codifica um antígeno HER-2 é administrado dentro de 7 dias após o taxano. Em geral, o MVA que codifica um antígeno HER-2 é administrado pelo menos 2 dias após tratamento com o taxano. O tratamento de associação é superior a qualquer um dos tratamentos sozinho.

Numa forma de realização, o taxano é administrado após o MVA que codifica um polipéptido compreendendo um antígeno HER-2. Em geral, o MVA que codifica um antígeno HER-2 é administrado pelo menos 1 semana antes do tratamento com o taxano. Numa forma de realização, o MVA que codifica um antígeno HER-2 é administrado menos de 2 anos antes do taxano. Em certas formas de realização, o MVA que codifica

um antigénio HER-2 é administrado menos de 1 ano, menos de 6 meses ou menos de 3 meses antes do taxano. Numa forma de realização, o MVA que codifica um antigénio HER-2 é administrado 1-26 semanas antes do taxano. Numa forma de realização, o MVA que codifica um antigénio HER-2 é administrado 1-9 semanas antes do taxano. Numa forma de realização, o MVA que codifica um antigénio HER-2 é administrado 1-3 semanas antes do taxano. O tratamento de associação é superior a qualquer um dos tratamentos sozinho.

Em certas formas de realização, o taxano é administrado antes e depois do MVA que codifica um antigénio HER-2. Noutras formas de realização, o MVA que codifica um antigénio HER-2 é administrado antes e após o taxano. A administração do MVA e do taxano pode ser uma única administração ou administrações múltiplas. Por exemplo, as administrações podem ser separadas de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 semanas.

A invenção abrange kits compreendendo MVA recombinante. O MVA recombinante pode estar contido num frasco ou recipiente. Preferencialmente, o MVA recombinante codifica um polipéptido compreendendo um antigénio HER-2. Em várias formas de realização, os kits para vacinação compreendem um MVA recombinante para a primeira vacinação ("condicionamento") num primeiro frasco ou recipiente e para uma segunda vacinação ("reforço") num segundo frasco ou recipiente.

Numa forma de realização, o kit pode conter um MVA recombinante e instruções para a administração do MVA recombinante antes da administração de uma dose tumorícida de um taxano. As instruções podem instruir que o MVA é para

ser administrado em qualquer ponto no tempo entre 6 meses e 1 semana antes da administração do taxano. Em formas de realização preferidas, as instruções instruem que o MVA é para ser administrado em qualquer ponto no tempo entre 3 meses e 1 semana, seis semanas e 1 semana, 1 mês e 1 semana, 3 semanas e 1 semana, e 2 semanas e 1 semana antes da administração do taxano. Numa forma de realização, as instruções podem instruir que o MVA é para ser administrado em qualquer ponto no tempo entre 1 semana e 0 dias antes da administração do taxano.

O kit pode conter também um MVA recombinante e instruções para a administração do MVA recombinante ao mesmo tempo que a administração de uma dose tumoricida de um taxano.

O kit pode conter também um MVA recombinante e instruções para a administração do MVA recombinante após administração de uma dose tumoricida de um taxano. As instruções podem instruir que o MVA é para ser administrado em qualquer ponto no tempo entre 1 dia e 6 meses após administração do taxano. Em formas de realização preferidas, as instruções instruem que o MVA é para ser administrado em qualquer ponto no tempo entre 2 dias e 1 semana, 2 dias e 2 semanas, 2 dias e 3 semanas, 2 dias e 1 mês, 2 dias e 2 meses, e 2 dias e 3 meses, e 2 dias e 6 meses após administração do taxano. Numa forma de realização, as instruções podem instruir que o MVA é para ser administrado em qualquer ponto no tempo entre 0 e 2 dias após administração do taxano.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Construção de MVA-BN-mHER2 e Análise da Expressão da Proteína nas Células Infetadas

A infecção e transfeção simultânea de culturas permitiram a recombinação homóloga entre o genoma viral e o plasmídeo recombinante. O vírus portador da inserção foi isolado, caracterizado e foram preparados lotes de vírus.

O plasmídeo pBN146 contém sequências que estão também presentes no MVA-BN (as grelhas de leitura aberta 14L e 15L). A sequência de mHER2 foi inserida entre as sequências do MVA-BN para permitir a recombinação no genoma viral do MVA-BN. Assim, foi construído um plasmídeo que continha a sequência de mHER2 a jusante de um promotor de poxvírus, especificamente o gene promotor do corpo de inclusão de tipo A do vírus da varíola bovina. O plasmídeo também continha uma cassete de seleção compreendendo um promotor sintético do vírus vaccinia (Ps), um gene de resistência a fármaco (guanina-xantina fosforribosiltransferase; Ecogpt), um sítio de entrada ribossômico interno (IRES) e a proteína fluorescente verde melhorada (EGFP). Ambos os genes de seleção (gpt e EGFP) foram codificados por um único transcrito bicistrônico.

A sequência de HER-2 foi modificada por adição de sequências nucleotídicas que codificam epítomos da toxina do tétano de p2 e p30 para aumentar a resposta imunológica contra a mesma. Depois de o mHER2 ter sido inserido no genoma do MVA-BN, a "região de inserção" do vírus tinha a seguinte estrutura:

Promotor ATI - sequência de mHER2 - promotor Ps - gpt - IRES - EGFP. A região de inserção foi flanqueada por sequências da região intergênica I4L do MVA-BN (F1 e F2) no plasmídeo recombinante bacteriano pBN146. A sequência de nucleótidos da construção é mostrada abaixo.

AGTATGCATTTTTACGGATGGAGTCTCGGTCTAAAAACGGGAATGTACTATCTACGTACG
AAACCCGCATCCGCTCCCATTC AATTCACATTGGACAAGGATAAAATAAAACCACTGGTG
GTTTGCGATTCCGAAATCTGTACATCATGCAGTGGTTAAACAAATCTAGAACTAGTTTAA
TTAAGGAGCTGTTTTGAATAAAATTTTTTTATAATAAATCTAGAACTAGTGGATCCCCCG
GGCTGCAGGAATTGCATCTAGCCGCCACCATGGAGCTGGCGGCCTTGTGCCGCTGGGGGC
TCCTCCTCGCCCTCTTGCCCCCGGAGCCGCGAGCACCCAAGTGTGCACCGGCACAGACA
TGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCTCTACC
AGGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAACCTGGAACCTACCTACCTGCCCACCAATGCCAGCT
TAAGTTTCCTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAACCAAG
TGAGGCAGGTCCCCTGCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACA
ACTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGAGACCCGCTGAACAATACCACCCCTGTACAG
GGGCTCCCCAGGAGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCACAGAGATCTTGAAAG
GAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCCAGCTCTGCTACCAGGACACGATTTTGTGGAAGG
ACATCTTCCACAAGAACAACCAGCTGGCTCTCACACTGATAGACACCAACCGCTCTCGGG
CCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGCTGGGGAGAGAGTTCTGAGG
ATTGTCAGAGCCTGACGCGCACTGTCTGTGCCGGTGGCTGTGCCCGCTGCAAGGGGGCCAC
TGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTGCACGGGGCCCCAAGCACTCTG
ACTGCCTGGCCTGCCTCCACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCCCAGCCC
TGGTCCAGTACATCAAAGCTAACTCCAAATTCATCGGTATCACCGAGCTGCGGTATACAT
TCGGCGCCAGCTGTGTGACTGCCTGTCCCTACAACCTACCTTTCTACGGACGTGGGATCCT
GCACCCCTCGTCTGCCCCCTGCACAACCAAGAGGTGACAGCAGAGGATGGAACACAGCGGT
GTGAGAAGTGCAGCAAGCCCTGTGCCCGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATGGAGCACTTGC
GAGAGGTGAGGGCAGTTACCAGTGCCAATATCCAGGAGTTTGCTGGCTGCAAGAAGATCT
TTGGGAGCCTGGCATTCTGCGGAGAGCTTTGATGGGGACCCAGCCTCCAACACTGCCC
CGCTCCAGCCAGAGCAGCTCCAAGTGTGTTGAGACTCTGGAAGAGATCACAGGTACCTAT
ACATCTCAGCATGGCCGGACAGCCTGCCTGACCTCAGCGTCTTCCAGAACCTGCAAGTAA
TCCGGGGACGAATTCTGCACAATGGCGCCTACTCGCTGACCCTGCAAGGGCTGGGCATCA
GCTGGCTGGGGCTGCGCTCACTGAGGGAACTGGGCAGTGGACTGGCCCTCATCCACCATA
ACACCCACCTCTGCTTCGTGCACACGGTGCCCTGGGACCAGCTCTTTCGGAACCCGCACC
AAGCTCTGCTCCCACTGCCAACC GGCCAGAGGACGAGTGTGTGGGCGAGGGCCTGGCCT

GCCACCAGCTGTGCGCCCGAGGGCACTGCTGGGGTCCAGGGCCACCCAGTGTGTCAACT
 GCAGCCAGTTCCCTTCGGGGCCAGGAGTGCCTGGAGGAATGCCGAGTACTGCAGGGGCTCC
 CCAGGGAGTATGTGAATGCCAGGCACTGTTTGCCGTGCCACCCTGAGTGTGAGCCCCAGA
 ATGGCTCAGTGACCTGTTTTGGACCGGAGGCTGACCAGTGTGTGGCCTGTGCCCACTATA
 AGGACCCTCCCTTCTGCGTGGCCCGCTGCCCCAGCGGTGTGAAACCTGACCTCTCCTACA
 TGCCCATCTGGAAGTTTCCAGATGAGGAGGGCGCATGCCAGCCTTGCCCCATCAACTGCA
 CCCACTCCTGTGTGGACCTGGATGACAAGGGCTGCCCCGCCGAGCAGAGAGCCAGCCCTC
 TGACGTCCTTCAACAACTTCACCGTGAGCTTCTGGCTGCGCGTGCCCAAGGTGAGCGCCA
 GCCACCTGGAGATCGTCTCTGCGGTGGTTGGCATTCTGTAGAAGCTTGGTACCGAGCTCG
 GATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCATCAAG
 CTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGGGCCCGGTACCCAGTTAATTAAGGATCCCCCG
 GGCTGCAGGAATTCCATTTTTATTCTCAAATGAGATAAAGTGAAAATATATATCATATAT
 ACAAAGTA

(SEQ ID NO:1).

Os codões de início e paragem do HER2 são indicados a negrito. As sequências flanqueadoras são indicadas em itálico.

A tradução do polipéptido de mHER2 codificado é mostrada abaixo:

MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNL
 ELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTLQFEDNYALAVLDNG
 DPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLA
 LTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQC
 AAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVQYIKANSKFIGITELRYTFGASCVTACP
 YNYLSTDVGSCTLVCPHNLQEVTAEDGTQRCCKSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSAN
 IQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVPETLEEITGYLYISAWPDSL
 PDLVVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNNHLCFVHTV
 PWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQEC
 VEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVAHAHYKDPFFCVARC
 PSGVKPDLSPYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQQRASPLTSFNNFTVS
 FWLRVPKVSASHLEIVSAVVGIL.

(SEQ ID NO:2).

Os epítomos da toxina do tétano de sequências p2 e p30 são indicados a negrito.

As culturas de CEF foram inoculadas com MVA-BN e também transfetadas com ADN do plasmídeo de pBN146. Por sua vez, as amostras destas culturas de células foram inoculadas em culturas de CEF em meio contendo fármacos de seleção e os clones virais que expressam o EGFP foram isolados por purificação em placa. Os lotes de vírus que cresciam na presença dos fármacos de seleção e expressavam o EGFP foram designados MVA-BN-mHER2. A geração de MVA-BN-mHER2 e preparação do lote de vírus envolveu doze (12) passagens sequenciais, incluindo cinco (5) purificações em placa.

Em seguida, o MVA-BN-mHER2 foi subcultivado em culturas de células CEF na ausência de fármacos de seleção. A ausência de fármacos de seleção permitiu a perda da região que codifica os genes de seleção, gpt e EGFP e do promotor associado (a cassete de seleção) da sequência inserida. A recombinação que resulta na perda da cassete de seleção é mediada pela região I4L de F1 e uma subsecção dessa região, a repetição F1 (F1 rpt), que flanqueia a cassete de seleção no plasmídeo pBN146. Estas sequências duplicadas foram incluídas para mediar a recombinação que resulta na perda da cassete de seleção, deixando apenas a sequência de mHER2 inserida na região intergénica I4L.

Foi preparado o vírus purificado em placa que carece da cassete de seleção. Essa preparação envolveu quinze (15) passagens incluindo cinco (5) purificações em placa.

A presença da sequência de mHER2 e a ausência do vírus MVA-BN parental nos lotes de MVA-BN-mHER2 foi confirmada através de análise por PCR e foi utilizada PCR com

iniciadores internos para verificar a ausência da cassette de seleção (os genes gpt e EGFP).

Foi demonstrada a expressão da proteína mHER2 nas células inoculadas com MVA-BN-mHER2 *in vitro*. Culturas de fibroblastos de embrião de galinha (CEF) ou células HeLa foram inoculadas com MVA-BN-mHER2, ou MVA-BN, às diluições apresentadas ou com tampão de TBS. As células foram colhidas das culturas 24 horas depois e foram preparados lisados celulares. Foram aplicadas amostras em geles de SDS-PAGE (geles de Bis-Tris 4% a 12% Novex NuPAGE®, Invitrogen) e submetidas a eletroforese em tampão de MOPS sob condições de redução (ditiotreitól). Foram incluídos dois Padrões de Referência obtidos de Pharmexa A/S, nomeadamente Padrão de HER-2 e padrão do domínio extracelular de HER-2 (0,3 ug de HER-2 ecd). Os geles foram eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose, as quais foram incubadas com antissoro anti-HER-2 de coelho (obtido de Pharmexa A/S). O anticorpo-HER-2 ligado foi revelado com anticorpo anti-coelho marcado com fosfatase alcalina e substrato cromogénico (Western Breeze™, Invitrogen).

Os resultados são mostrados na Figura 1. As setas marcam a posição da proteína detetada com antissoro anti-HER-2 em lisados de culturas de células inoculadas com MVA-BN-mHER2. O antigénio foi detetado em lisados de ambos os tipos de células inoculadas com MVA-BN-mHER2 (assinaladas por setas na Figura 1) que tinha um tamanho semelhante aos padrões de referência da proteína HER-2. Não foram detetadas proteínas em lisados de culturas inoculadas com MVA-BN ou com Soro Fisiológico Tamponado com Tris (TBS) que fossem semelhantes em tamanho a padrões de referência da proteína HER-2.

Estes dados demonstram a expressão, em células aviárias e humanas, de mHER2 após inoculação das células com MVA-BN-mHER2. Por conseguinte, o MVA-BN representa um veículo de administração eficaz para a expressão de antígenos transgênicos como o mHER2 em células humanas.

Exemplo 2

Indução de uma resposta imunológica anti-HER-2 em ratos tratados com MVA-BN-mHER2

A indução de uma resposta imunológica anti-HER-2 após tratamento com MVA-BN-mHER2 foi avaliada em ratos BALB/c e C57BL/6, duas estirpes de ratos com bases ou haplótipos imunológicos diferentes. A indução de uma resposta imunológica anti-HER-2 após tratamento com MVA-BN-mHER2 foi também avaliada em ratos BALB/c NeuT, uma estirpe de rato transgênica para HER-2. Nestes estudos, várias doses de MVA-BN-mHER2 que vão desde 2×10^6 a 5×10^7 TCID₅₀ foram avaliadas como descrito mais abaixo. Amostras de sangue foram recolhidas um dia antes de cada tratamento e várias vezes durante e após tratamento como descrito abaixo. As respostas humorais (produção de IgG de anti-HER-2) foram analisadas por ensaio ELISA. Foram recolhidos esplenócitos após o tratamento final e as respostas celulares foram analisadas por ELISpot. Aqueles estudos são descritos no Exemplo 3.

Estirpes de ratos: Ratos BALB/c e C57BL/6 fêmeas com 8-10 semanas de idade foram obtidos de HSD. Os ratos BALB/c NeuT foram uma oferta generosa de Guido Forni. Estes ratos expressam um oncogene HER-2/Neu ativado sob o controle de um promotor do vírus do tumor mamário de rato (MMTV) quimérico. As fêmeas de BALB/c NeuT não apresentam

quaisquer anormalidades morfológicas da glândula mamária até às 3 semanas de idade. Em seguida, elas progridem através de hiperplasia atípica até carcinoma lobular in situ. Às 25 semanas de idade, todas as 10 glândulas mamárias exibem carcinomas invasivos (Boggio et al, 1998, J. Exp. Med.). Todas as experiências utilizaram cinco a dez ratos por grupo.

Indução de respostas de anticorpos anti-HER-2 em ratos tratados com MVA-BN-mHER2

Ratos BALB/c, C57BL/6 e BALB/c NeuT foram injetados por via subcutânea com solução de controlo (Soro Fisiológico Tamponado com Tris (TBS)), ou com 2E6, 1E7 ou 5E7 TCID₅₀ de MVA-BN-mHER2 nos dias 1, 15 e 29. Estavam cinco animais em cada um daqueles grupos de tratamento de ensaio. Foram colhidas amostras de sangue nos dias 0, 14, 28, 42 e 56. Os soros de cada um dos cinco animais em cada grupo de ensaio foram agrupados e analisados quanto à presença de IgG anti-HER-2 utilizando um ensaio ELISA.

O ensaio ELISA foi realizado como se segue. Placas ELISA foram primeiro revestidas com Quimera ErbB2/Fc humana recombinante (R+D System, diluída em tampão de revestimento (Na₂CO₃ 200mM, pH 9,6)) a 2 µg/mL (50 µL/poço) durante uma hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS + 0,05% de Tween seis vezes utilizando um lavador de placas (Wellwash AC, Thermo Electronics) e subsequentemente bloqueadas durante 1 hora com PBS + 0,05% de Tween. As placas foram novamente lavadas seis vezes. O soro de rato foi diluído em PBS + 0,05% de Tween e adicionado a 50 µL/poço. As placas foram incubadas durante uma hora à temperatura ambiente. As placas foram em seguida lavadas 6 vezes e foi adicionado (50 µL/poço a 1:1000 diluído em PBS

+ 0,05% de Tween) anticorpo secundário de IgG-HRP anti-rato de ovelha (Southern Biotech J3003-VI4513). As placas foram incubadas durante uma hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas seis vezes e, em seguida, foram adicionados 100µL/poço de substrato TMB a todos os poços. As placas foram incubadas durante vinte minutos no escuro, em seguida foram adicionados 100 µL de H₂SO₄ 0,5M a todos os poços. A absorvância a 450 nm em cada poço foi determinada utilizando um leitor de placas (Thermo Electronics).

Os resultados são mostrados nas Figuras 2A-C. As Figuras 2A e 2B mostram que foi detetada uma resposta de anticorpos anti-HER-2 em todos os grupos tratados com MVA-BN-mHER2 em ratos C57BL/6 e BALB/c. Em ambas as estirpes, os títulos de anticorpos anti-HER-2 aumentaram com as administrações múltiplas de MVA-BN-mHER2 e estabilizaram depois dos tratamentos pararem. A Figura 2C mostra que uma resposta de anticorpos anti-HER-2 foi também detetada em ratos BALB/c NeuT transgênicos para HER-2 que expressam constitutivamente HER-2. Assim, estes dados demonstram que o MVA-BN-mHER2 é um imunogénio potente que pode superar a tolerância imunológica ao HER-2, um atributo que pode ser útil para o tratamento de doentes com cancro.

Especificidade para o antigénio da resposta de anticorpos anti-HER-2 induzida pelo MVA-BN-mHER2

Os soros de ratos tratados com MVA-BN-mHER2 foram também avaliados por ELISA utilizando o procedimento descrito acima. Foram utilizadas as proteínas quiméricas HER-2, HER-3 e HER-4 ecd-Fc como antigénios revestidos nos poços de um placa de microtitulação. Os antigénios foram detetados utilizando um anticorpo monoclonal anti-HER-2 (HER-2 Ab;

AB-5, Calbiochem), um anticorpo monoclonal anti-fragmento Fc da Ig humana (Fc Ab; Southern Biotech) ou um anticorpo monoclonal de controlo de isotipo (Contr Ab). Os resultados são mostrados na Figura 3. A Figura 3A mostra os controlos por ELISA: o anticorpo monoclonal anti-HER-2 reage especificamente apenas com os poços revestidos com HER-2 ecd-Fc, enquanto o anticorpo monoclonal anti-fragmento Fc da Ig humana reage com todas as três proteínas quiméricas. As Figuras 3B e 3C mostram que em ratos C57BL/6 e BALB/c tratados com MVA-BN-mHER2, o soros apenas detetaram a químera HER-2 ecd-Fc. Estes dados mostram que, em ambas as estirpes de ratos, a resposta de anticorpos induzida após tratamento com MVA-BN-mHER2 é altamente específica para HER-2 e não reage de forma cruzada com certos outros membros da família do recetor do Fator de Crescimento Epidérmico, tais como HER-3 e HER-4.

A indução de anticorpos anti-HER-2 em ratos tratados com MVA-BN-mHER2 foi também avaliada através de análise por varrimento celular ativado por fluorescência (FACS) utilizando uma linha de células murídea que expressa HER-2 humano (CT26-HER-2; descrito abaixo). Os soros de ratos tratados com MVA-BN-mHER2 continham anticorpos que se ligavam a células que expressavam o HER-2 humano, mas não aos seus homólogos parentais que não expressavam este recetor (dados não apresentados).

Em resumo, estes dados demonstram que o tratamento de ratos com MVA-BN-mHER2 estimula a formação de anticorpos que são capazes de se ligar aos polipéptidos de HER-2 humanos bem como ao HER-2 humano expresso na superfície das células.

Exemplo 3

Indução de respostas de células T anti-HER-2

Ratos BALB/c e C57BL/6 (5 animais em cada grupo) foram injetados por via subcutânea com controlo (TBS) ou 1E7 TCID₅₀ de MVA-BN-mHER2 nos dias 1, 15, 29 e 43. Os baços foram colhidos dos animais no dia 48 e as suspensões celulares de cada grupo de ensaio foram agrupadas para análise. A indução de respostas de células T foi avaliada por um ensaio ELISpot que mediu a produção de IFN γ após reestimulação específica para o antígeno *in vitro*. O HER-2 ecd, um péptido de HER-2 do MHC de Classe I, e os dois péptidos auxiliares T do MHC de Classe II da toxina do tétano que estão incluídos na sequência de mHER2 foram utilizados individualmente para reestimulação. O péptido de HER-2 de classe I tinha a sequência de aminoácidos, TILPTNASL (SEQ ID NO:3). O péptido da toxina do tétano auxiliar T do MHC de Classe II P2 tinha a sequência de aminoácidos, QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO:4) (marcada TTp2 na Figura 4) e o péptido da toxina do tétano auxiliar T do MHC de Classe II P30 tinha a sequência de aminoácidos, FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO:5) (marcada TTp30 na Figura 4).

O ensaio ELISpot foi realizado como se segue. As placas de ensaio foram preparadas pré-humedecendo membranas de placas de filtração de 96 poços Multiscreen da Millipore adicionando 15 μ L de etanol a 35% a cada poço. O etanol foi eliminado por inversão imediata da placa e as placas foram lavadas duas vezes com 200 μ L/poço de PBS. As placas foram revestidas com anticorpo de captura anti-IFN- γ de rato de ratazana (BD Pharmingen, 551216, lot#34503) a 2 μ g/mL (50 μ L/poço diluído em PBS) e incubadas de um dia para o

outro a 4 °C. O anticorpo de revestimento foi eliminado por inversão e as placas foram lavadas três vezes com PBS sob condições estéreis. As placas foram bloqueadas com 100 µL/poço de RPMI-10 (RPMI + 10% de FCS + β-mercaptoetanol) durante pelo menos 30 minutos à temperatura ambiente e subsequentemente lavadas duas vezes com PBS.

Foram adicionadas células efetoras em 50 µL de RPMI-10 (RPMI + 10% de FCS + 2-ME 5x10⁻⁵ M + 1 x Pen/Strep.) às concentrações indicadas. As proteínas de HER-2, péptido de HER-2 ou proteínas e péptidos da toxina do tétano foram diluídas em RPMI-10 e adicionadas em diluições apropriadas (começando geralmente a 10 ug/mL para as proteínas e 25 µM para os péptidos, mas variaram ao longo das experiências) a poços efetores (50 µL/poço). As placas foram incubadas a 37 °C numa incubadora de CO₂ durante aproximadamente 18 horas.

As células foram eliminadas dos poços por inversão e foram adicionados 100 µL/poço de dH₂O a todos os poços durante 5 minutos à temperatura ambiente. Os poços foram lavados três vezes com 100 µL/poço de dH₂O. As placas foram em seguida lavadas com um lavador de placas (Wellwash AC, Thermo Electron) seis vezes, com PBS + 0,05% de Tween como tampão de lavagem.

Foram adicionados 50 µL/poço de anti-IFN-γ-biotina (Serotec, MCA1548B, lote#0803) a uma diluição de 1:5000 em PBS + 5% de FCS a todos os poços e incubados durante uma a duas horas à temperatura ambiente. As placas foram em seguida lavadas utilizando um lavador de placas (Wellwash AC, Thermo Electron) durante 6 ciclos, com PBS + 0,05% de Tween como tampão de lavagem. Em seguida foram adicionados 50 µL/poço de Estreptavagina-Fosfatase Alcalina (BD Pharmingen, 554065, lote#46484) a uma diluição de 1:5000 em

PBS + 5% de BSA a todos os poços e incubados durante uma hora à temperatura ambiente.

As placas foram em seguida lavadas novamente utilizando uma lavador de placas (Wellwash AC, Thermo Electron) durante 6 ciclos e subsequentemente desenvolvidas no escuro adicionando 50 µL/poço de substrato BCIP/NBT durante 15 minutos. O substrato foi eliminado por inversão numa banca e lavado exaustivamente com água corrente. Foram retirados os apoios das placas e as placas foram secas numa hote. As placas foram rastreadas e lidas num analisador de placas ImmunoSpot utilizando o software CellCount Pro.

Os resultados são mostrados nas Figuras 4A-D. As Figuras 4A e C mostram que foi detetada uma resposta de células T dependente da dose nas células do baço de estirpes de ratos C57BL/6 (Fig. 4A) e BALB/c (Fig. 4C) após reestimulação com HER-2 ecd.

A Figura 4B (ratos C57BL/6) e a Figura 4D (ratos BALB/c) mostram que foi também detetada produção de IFN γ neste ensaio após incubação com um péptido de HER-2 do MHC de Classe I bem como com ambos os péptidos da toxina do tétano do MHC de Classe II. Este resultado indica que eram induzidas células T CD8 específicas para o MHC de Classe I e células T CD4 específicas para o MHC de Classe II em ratos tratados com MVA-BN-mHER2. Estes dados confirmam que os péptidos da toxina do tétano em mHER2 atuam como epítomos auxiliares T e indicam que o tratamento com MVA-BN-mHER2 induz células T, incluindo células T CD8, que reagem com epítomos presentes na proteína nativa de HER-2.

Em resumo, estes estudos mostram que o tratamento repetido de ratos com MVA-BN-mHER2 induz uma resposta imunológica adaptativa específica para o antigénio alargada que inclui anticorpos bem como os subtipos CD4 e CD8 das células T.

Foram obtidos resultados semelhantes em ratos C57BL/6 e BALB/c que indicam que estes animais com haplótipos MHC diferentes respondem de forma análoga. Como discutido acima no Exemplo 2 foi obtida uma resposta de anticorpos específica em ratos tolerantes a HER-2. Por conseguinte, o tratamento com MVA-BN-mHER2 tem o potencial de mediar a eliminação de células tumorais que expressam auto-antígenos por vias múltiplas e em vários ambientes de MHC, o que é desejável para o tratamento de cancro. Assim, os regimes de tratamento que utilizam injeções múltiplas de MVA-BN-mHER2 podem ser utilizados no tratamento de doentes humanos com cancro.

Exemplo 4

Modulação imune Th1 em ratos tratados com MVA-BN-mHER2

Os dados nos Exemplos anteriores indicam que o MVA-BN é um veículo de administração de transgenes eficaz que também exibe fortes propriedades imunogénicas. Foi anteriormente referido que o MVA desencadeia respostas imunológicas adaptativas Th1 que conferem proteção contra a varíola (Earl et al., 2004; Wyatt et al., 2004) e induz também respostas imunológicas inatas (Brutkiewicz et al., 1992; Dokun et al., 2001). Por conseguinte, as propriedades imunes intrínsecas do MVA-BN são potencialmente úteis para modular respostas imunológicas contra transgenes.

Sabe-se que a análise de certos subtipos de anticorpos produzidos após administração de imunogénios revela certas características da resposta imunológica. Por exemplo, foi demonstrado que os anticorpos de IgG2a são prevaletentes em ambientes imune Th1, enquanto os anticorpos de IgG1 são prevaletentes quando é induzida uma resposta imunológica

Th2. Os ambientes imunes Th1 compreendem ambas as componentes humoral e celular da resposta imunológica e, deste modo, conduzem a respostas de proteção duradouras que podem ser desejáveis num contexto imunoterapêutico do cancro. Os ambientes imunes Th2, pelo contrário, compreendem componentes humorais de curta duração da resposta imunológica, as quais são menos desejáveis num contexto imunoterapêutico do cancro. Assim, a medição da razão dos subtipos de IgG2a em relação à IgG1 após administração de um imunogénio em ratos é um meio de avaliar as características Th1/Th2 da resposta imunológica. Um aumento da razão de IgG2a/IgG1 após administração de um imunogénio é uma indicação de um desvio para um ambiente Th1. Contrariamente, uma razão inferior indica um desvio para uma resposta Th2.

A aptidão de MVA-BN-mHER2 para modular a resposta imunológica para o HER-2 foi avaliada medindo a razão dos subtipos IgG2a em relação a IgG1 dos anticorpos anti-HER-2 produzidos após tratamento de ratos com várias formulações compreendendo sequências de HER-2. A razão IgG2a/IgG1 dos anticorpos anti-HER-2 induzidos após tratamento de ratos BALB/c com MVA-BN-mHER2, proteína mHER2 em emulsão de adjuvante de Freund ou linhas de células tumorais HER-2 (+) foi determinada por ELISA utilizando anticorpos de deteção específicos para o subtipo de anticorpo. Os ensaios ELISA foram realizados como descrito acima, exceto com a substituição dos anticorpos de deteção. Os resultados são mostrados no Quadro 1 abaixo.

Os resultados mostram que a razão IgG2a/IgG1 foi significativamente maior em ratos tratados com MVA-BN-mHER2 em comparação com os ratos tratados com HER-2 em adjuvante de Freund ou células tumorais HER-2 (+). Além disso, os resultados mostram que a razão IgG2a/IgG1 de anticorpo no

soro de ratos tratados com linhas de células tumorais HER-2 (+) aumentou quando estes ratos foram co-tratados com MVA-BN-mHER2. Aquele resultado indica que mesmo num ambiente Th2, o qual resultou da administração de linhas de células tumorais HER-2 (+), a administração adicional de MVA-BN-mHER2 induziu eficazmente uma resposta Th1.

Quadro 1. Razão IgG2a/IgG1 das respostas de anticorpos anti-HER-2 induzida por várias formulações compreendendo sequências de HER-2.

Formulação	Tratamento de ratos	Razão IgG2a/IgG1*
MVA-BN-mHER2	3 injeções subcutâneas em intervalos de 2 semanas com doses que variam entre 2E6 e 5E7 TCID ₅₀	0,38 ± 0,09
HER-2 ECD em Adjuvante de Freund	3 injeções subcutâneas em intervalos de 2 semanas com 10 µg proteína emulsionada em CFA, em seguida IFA	0,08 ± 0,02
Células TUBO	1E5 células injetadas por via intradérmica	0,03 ± 0,02
MC38-HER-2	1E5 células injetadas por via intradérmica	0,03 ± 0,02
Células TUBO + MVA-BN-mHER2	1E5 células injetadas por via intradérmica e 3 injeções subcutâneas em intervalos de 1 semana com 5E7 TCID ₅₀ MVA-BN-mHER2 (1ª dose no mesmo dia das células)	0,69 ± 0,07
MC38-HER-2 + MVA-BN-mHER2	1E5 células injetadas por via intradérmica e 3 injeções subcutâneas em intervalos de 1 semana com 5E7 TCID ₅₀ MVA-BN-mHER2 (1ª dose no mesmo dia das células).	0,5 ± 0,07
*Valores representam a média ± desvio padrão de pelo menos dois conjuntos de poços em duplicado.		

Em resumo, estes dados demonstram que a imunogenicidade intrínseca do MVA-BN, a qual se caracteriza por um forte

desvio para respostas imunológicas Th1, influencia a resposta imunológica contra o HER-2 para um ambiente Th1. Isto foi também verdade quando havia uma resposta de anticorpos anti-HER-2 deslocada para Th2 induzida por células tumorais que expressam HER-2. A propriedade de modulação imune potente do MVA-BN aqui descrita é desejável num contexto terapêutico, uma vez que têm sido descritas respostas de anticorpos anti-HER-2 preexistentes induzidas por tumores em doentes com cancro da mama. Assim, mesmo que já exista uma resposta Th2 indesejável para o HER-2, o tratamento de doentes com MVA-BN-mHER2 deve refocar a resposta imunológica para um perfil Th1.

Exemplo 5

Atividade antitumoral em ratos tratados com MVA-BN-mHER2

Tratamento profilático

A aptidão do MVA-BN-mHER2 para prevenir o crescimento de tumores num contexto profilático foi avaliada utilizando células TUBO transplantadas como um modelo de cancro da mama em ratos. As células TUBO são derivadas de um carcinoma da glândula mamária que se desenvolveu num rato BALB/c transgénico para o oncogene HER-2 de ratazana transformante (HER-2/neu) (Rovero et al, J. Immunol. 165, 5133-5142 (2000)). Uma vez que a sequência HER-2 é altamente conservada entre a ratazana e os humanos, as células TUBO são utilizadas rotineiramente para avaliar a eficácia de vacinas compreendendo os homólogos de ratazana ou humano do HER-2 (Dela Cruz et al., Vaccine 23, 4793-4803 (2005)).

Neste estudo de eficácia, os ratos foram imunizados com MVA-BN-mHER2 como descrito acima, isto é, três vezes em intervalos de 2 semanas com TBS ou MVA-BN-mHER2 (2E6 ou 5E7 TCID₅₀). Os ratos tratados foram em seguida submetidos a prova com tumor injetando 3E5 células TUBO por via intradérmica seis semanas após a última injeção de vacina. O crescimento de tumores no sítio de injeção foi observado duas vezes por semana depois disso e o tamanho dos tumores sólidos sob a pele foi medido utilizando paquímetros. O volume do tumor (mm³) foi calculado utilizando a fórmula: $V = (L \times W^2) / 2$, em que L= comprimento, W= largura, (1 mm³ = 1 mg). Os resultados apresentados na Figura 5 mostram que os tumores em animais pré-tratados com MVA-BN-mHER2 foram significativamente menores do que os tumores em ratos tratados com controlo.

As diferenças no tamanho do tumor foram estatisticamente significativas em ratos que receberam MVA-BN-mHER2 em qualquer das doses, em comparação com o tamanho de tumores em ratos tratados com TBS ($p < 0,005$). No dia 25, vários ratos tratados com MVA-BN-mHER2 exibiram estabilização, regressão ou até mesmo erradicação do tumor. Uma vez que os ratos foram postos à prova com células tumorais seis semanas após o último tratamento com MVA-BN-mHER2, estes dados mostram que a inibição observada no crescimento de tumores foi muito provavelmente mediada pela invocação de uma resposta imunológica de memória induzida pela administração de MVA-BN-mHER2.

Em resumo, estes dados mostram que o tratamento de ratos com MVA-BN-mHER2 induz uma resposta imunológica adaptativa específica para o antígeno e o estabelecimento de memória imune. Quando os ratos são subsequentemente postos à prova com células tumorais que expressam HER-2, a memória imune é

novamente invocada e inibe o crescimento das células tumorais.

Tratamento terapêutico: Supressão de Tumores Estabelecidos por Tratamento com MVA-BN-mHER2

A aptidão do MVA-BN-mHER2 para suprimir tumores estabelecidos foi avaliada num modelo experimental de metástases do pulmão utilizando células CT26 que expressam de modo estável o HER-2 humano. O CT26 é um carcinoma colorretal induzido quimicamente de ratos BALB/c (Brattain et al., 1980). Neste modelo, células CT26-HER-2 são injetadas por via intravenosa em ratos BALB/c e a carga tumoral é avaliada nos pulmões onde crescem nódulos de tumor.

Os ratos foram postos à prova com células CT26-HER-2 (5E5) injetadas por via intravenosa no dia 1 e tratados por via intraperitoneal no dia 4 com uma única injeção de TBS, MVA-BN (5E7 TCID₅₀) ou MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID₅₀). Os ratos foram em seguida sacrificados no dia 14 e os seus pulmões foram pesados. A massa do tumor foi calculada subtraindo o peso médio dos pulmões de ratos não inoculados (não postos à prova com células tumorais) do peso médio dos pulmões de ratos postos à prova com tumor.

Os resultados são apresentados na Figura 6. Os resultados mostram que a carga tumoral em ratos tratados com MVA-BN-mHER2 foi significativamente inferior à dos ratos de controlo ($p < 0,000001$). De facto foi observado um peso pulmonar acentuadamente menor em todos os animais do grupo MVA-BN-mHER2 em comparação com o grupo de controlo. Pelo contrário, a carga tumoral foi semelhante nos ratos dos grupos de controlo e tratados com MVA-BN. Em resumo, o

tratamento de ratos com MVA-BN-mHER2 inibe o crescimento de tumores HER-2 (+) estabelecidos em ratos.

Tratamento terapêutico: Indução de imunidade inata protetora após tratamento com MVA-BN-mHER2 ou MVA-BN

A aptidão do MVA-BN para contribuir para a atividade antitumoral do MVA-BN-mHER2 desencadeando imunidade inata foi avaliada no modelo do tumor CT26 descrito acima. Nesta experiência, ratos foram tratados com MVA-BN (5E6 ou 5E7 TCID₅₀) ou MVA-BN-mHER2 (5E6 ou 5E7 TCID₅₀) no dia da prova com tumor, ponto em que a carga tumoral é baixa. A carga tumoral foi avaliada como descrito acima nos pulmões de ratos postos à prova. Os resultados são apresentados na Figura 7. Os resultados mostram que a inibição do crescimento de tumores (TGI) por tratamento com MVA-BN (5E7 TCID₅₀) foi >70% ($p < 0,0001$). A atividade antitumoral do MVA-BN era dependente da dose, uma vez que o tratamento com MVA-BN (5E6 TCID₅₀) foi menos eficaz (TGI de 32 %; $p = 0,002$) do que o tratamento com 5E7 TCID₅₀. Pelo contrário, os ratos tratados com MVA-BN-mHER2 (5E6 ou 5E7 TCID₅₀) exibiram proteção semelhante (TGI >70%; $p < 0,000001$).

Na globalidade, os dados apresentados nas Figuras 6 e 7 demonstram que ambos, MVA-BN e MVA-BN-mHER2, têm atividade antitumoral, contudo a atividade do MVA-BN-mHER2 é superior. De facto, o tratamento de ratos no modelo de metástases pulmonares no dia 1 (Figura 7) com MVA-BN-mHER2 (5E6 TCID₅₀) foi mais eficaz do que o tratamento com a mesma dose de MVA-BN. Neste modelo, o tratamento de ratos no dia 4 (Figura 6) com MVA-BN-mHER2 também suprimiu o crescimento de tumores enquanto o MVA-BN não teve qualquer efeito. Assim, a atividade antitumoral de MVA-BN observada em certas experiências é muito provavelmente devida à estimulação de imunidade inata. A atividade superior do

MVA-BN-mHER2 observada para todas as experiências é provavelmente devida à estimulação combinada do sistema imunitário inato e à indução de uma resposta imunológica adaptativa anti-HER-2 específica.

Exemplo 6

Terapia de associação com agentes citotóxicos

Ratos C57BL/6 foram tratados por via subcutânea com controle (Soro Fisiológico Tamponado com Tris (TBS); 1 grupo de 5 animais) ou com 5E7 TCID₅₀ de MVA-BN-mHER2 (9 grupos de 5 animais) nos dias 1, 22 e 43 (q3 semanas x 3). O efeito do agente quimioterapêutico docetaxel na indução do anticorpo anti-HER-2 foi avaliado tratando animais com o fármaco a doses tumoricidas (33 mg/Kg) uma semana (dia -7) ou dois dias (dia -2) antes do tratamento com MVA-BN-mHER2. O fármaco foi injetado iv uma vez, duas vezes (q3 semanas X2), três (q3 semanas X3) ou quatro vezes (q3 semanas X4). A organização dos grupos de animais, regime e plano de administração estão resumidos no Quadro 2.

Quadro 2: Grupos de Estudo

Grupos de tratamento (n=5)	Regimen de docetaxel (33mg/Kg)			Regimen de Vacina
	Tipo	Plano	Via	
1	Nenhum	N/A	N/A	Nenhum
2	Nenhum	N/A	N/A	MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID ₅₀ , SC nos d1, 22 e 43)
3	Doc d-2 X1	d-2	IV	MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID ₅₀ , SC nos d1, 22 e 43)
4	Doc d-2 X2	d-2 e d20	IV	MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID ₅₀ , SC nos d1, 22 e 43)

Grupos de tratamento (n=5)	Regimen de docetaxel (33mg/Kg)			Regimen de Vacina
	Tipo	Plano	Via	
5	Doc d-2 X3	d-2, d20 e d41	IV	MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID ₅₀ , SC nos d1, 22 e 43)
6	Doc d-2 X4	d-2, d20, d41 e d62	IV	MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID ₅₀ , SC nos d1, 22 e 43)
7	Doc d-8 X1	d-7	IV	MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID ₅₀ , SC nos d1, 22 e 43)
8	Doc d-8 X2	d-7 e d15	IV	MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID ₅₀ , SC nos d1, 22 e 43)
9	Doc d-7 X3	d-7, d15 e d36	IV	MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID ₅₀ , SC nos d1, 22 e 43)
10	Doc d-7 X4	d-7, d15, d36 e d57	IV	MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID ₅₀ , SC nos d1, 22 e 43)

Foram colhidas amostras de sangue no dia -9 (pré-sangramento), 13 dias após cada tratamento de vacina (d14, 35, 56) e uma semana após o último tratamento com fármaco (d70). Os soros de cada grupo de ensaio foram agrupados e analisados por ELISA utilizando uma proteína quimérica HER-2 ecd-Fc comercialmente disponível como antigénio revestido sobre os poços de uma placa de microtitulação. Esta proteína quimérica compreende o domínio extracelular do HER-2 humano nativo fundido com o domínio Fc de uma imunoglobulina G humana. Como se mostra nas Figuras 8A e B, foi detetada uma resposta de anticorpos anti-HER-2 em todos os grupos tratados com MVA-BN-mHER2 e para cada ponto no tempo, os títulos não foram significativamente diferentes quando os ratos foram pré-tratados dois ou sete dias antes da vacinação com doses tumorícidas de docetaxel (33 mg/Kg). Além do mais, as respostas de anticorpos não foram afetadas

mesmo quando o tratamento com docetaxel prosseguiu ao longo do plano de três vacinações.

A integridade da resposta imunológica induzida pelo MVA-BN-mHER2 em ratos tratados com doses tumorícidas de docetaxel foi ainda avaliada medindo a atividade antitumoral do MVA-BN-mHER2. De facto foi anteriormente demonstrado (Exemplo 5) que o MVA-BN-mHER2 induz respostas de memória capazes de retardar o crescimento de tumores implantados após vacinação (modelo profilático do tumor). Os ratos dos grupos de estudo no Quadro 2 acima foram, por isso, postos à prova com células tumorais MC38-HER-2 (Penichet et al., Laboratory Animal Science 49, 179-188(1999)) no dia 71 e o crescimento de tumores foi avaliado como descrito no Exemplo 5. Como se mostra nas Figuras 9A e B, o crescimento de tumores foi retardado em todos os grupos de ratos tratados com MVA-BN-mHER2. O pré-tratamento bem como o tratamento simultânea com docetaxel em doses tumorícidas não teve qualquer efeito significativo no adiamento do crescimento de tumores. Uma vez que esta experiência foi realizada num plano profilático, o efeito antitumoral medido foi muito provavelmente mediado pelas respostas imunológicas anti-HER-2 induzidas pelo MVA-BN-mHER2, enquanto o docetaxel não teve qualquer efeito citotóxico direto no tumor. De facto, o intervalo de tempo mais curto entre o tratamento com docetaxel e a prova com tumor foi de nove dias (Grupo 6 recebeu a sua dose final de docetaxel no dia 62). Dadas as propriedades farmacológicas dos agentes quimioterapêuticos, a concentração de fármaco foi provavelmente demasiado baixa na altura da implantação do tumor para ser eficaz. Assim, os dados confirmaram que o tratamento associado com MVA-BN-mHER2 e docetaxel não é prejudicial para a indução de resposta imunológica protetora pela vacina. Isto é verdade mesmo quando o agente quimioterapêutico foi utilizado em doses tumorícidas em

intervalos de três semanas, o que espelha o régimen de tratamento padrão em humanos.

O benefício potencial proporcionado pelo tratamento de associação de quimioterapia e imunoterapia foi então avaliado num contexto terapêutico do modelo de tumor MC38-HER-2 em rato. Nesta experiência, os animais foram divididos em três subconjuntos (Subconjunto A, B e C) aos quais foi dado um tratamento de quimioterapia antes, durante ou após dois tratamentos de imunoterapia, respetivamente.

No subconjunto A, ratos C57BL/6 (40 animais) foram postos à prova com células MC38-HER-2 no dia 1, em seguida tratados por via subcutânea com controlo (Soro Fisiológico Tamponado com Tris (TBS); 10 animais tratados nos d1, 8 e 15), Docetaxel sozinho (33 mg/Kg; 10 animais tratados no d1), MVA-BN-mHER2 (5E7 TCID50; 10 animais tratados nos d8 e 15) ou Docetaxel no dia 1, em seguida MVA-BN-mHER2 nos d8 e 15. O crescimento de tumores foi avaliado duas vezes por semana até ao sacrifício no dia 23. Como se mostra na Figura 10A, o tratamento com Docetaxel no dia 1 resultou num atraso modesto e transitório do crescimento de tumores (foi detetada diferença estatisticamente significativa apenas até ao dia 19) enquanto o tratamento com MVA-BN-mHER2 nos dias 8 e 15 não teve qualquer efeito no crescimento de tumores. Em contraste, o tratamento associado de Docetaxel (d1) antes da administração de MVA-BN-mHER2 nos d8 e 15 foi altamente eficaz na inibição do crescimento de tumores ao longo do estudo ($p=0,001$ no dia 23).

Para o subconjunto B, a experiência foi realizada com os mesmos grupos de 4 animais; contudo, o Docetaxel foi dado no d8 enquanto o MVA-BN-mHER2 foi administrado nos dias 1 e 15. Foi anteriormente determinado que o Docetaxel não tinha

qualquer efeito no crescimento do MC38-HER-2 assim que o tamanho do tumor excedesse os 50 mg de peso, o qual é atingido cerca do dia 8 para este modelo. como esperado, o tratamento com Docetaxel no dia 8 não teve qualquer efeito no crescimento dos tumores (Figura 10B) enquanto duas administrações de MVA-BN-mHER2 com duas semanas de intervalo (nos dia 1 e dia 15) foram altamente eficazes na inibição do crescimento de tumores ($p=0,002$ no dia 23). Mais importante, esta atividade antitumoral não foi negativamente afetada por doses altas de Docetaxel administradas entre os tratamentos da vacina (Figura 10B).

Para o subconjunto C, a experiência foi também realizada com os mesmos grupos de 4 animais; contudo o Docetaxel foi dado no d15 enquanto o MVA-BN-mHER2 foi administrado nos dias 1 e 8. Como para o Subconjunto B, os tumores em todos os grupos excederam o tamanho limite além do qual o Docetaxel não é eficaz na redução do crescimento de MC38-HER-2 na altura do tratamento de quimioterapia (dia 15). E como esperado, a Figura 10C mostra que o docetaxel não teve qualquer efeito no crescimento dos tumores quando administrado sozinho. Como no Subconjunto A, o tratamento com a vacina consistindo de duas administrações de MVA-BN-mHER2 com uma semana de intervalo foi também subótimo e não teve também qualquer efeito no crescimento dos tumores. Surpreendentemente, o tamanho médio dos tumores de ratos do grupo tratado com MVA-BN-mHER2 que receberam também Docetaxel após a administração da vacina foi significativamente mais pequeno ($p=0,036$ no dia 23) que o tamanho médio do tumor de ratos tratados apenas com MVA-BN-mHER2. Estes dados mostram que o tratamento com MVA-BN-mHER2 aumenta a sensibilidade do MC38-HER2 ao Docetaxel in vivo.

Na globalidade, os dados mostram que o MVA-BN-mHER2 e as doses tumorícidas de agentes quimioterapêuticos podem ser associados sem efeitos prejudiciais na potência da vacina. De facto, verificou-se que a associação destas duas terapias pode ser mutuamente benéfica, uma vez que o pré-tratamento com quimioterapia aumentou a eficácia da vacina enquanto o pré-tratamento com vacina aumentou a sensibilidade das células tumorais à quimioterapia. Por conseguinte, antecipa-se que o tratamento associado de administração alternada contínua de vacina e quimioterapia proporciona também um novo meio para gerar um regime mais potente para o tratamento de cancro.

Exemplo 7

Disseminação do epítipo/antígeno

A disseminação do epítipo/antígeno resulta da indução de respostas imunológicas desencadeadas pela exposição dos epítipos/antígenos das células tumorais moribundas. A disseminação do epítipo/antígeno induzida pela vacina é altamente vantajosa para atividade antitumoral máxima. Verificou-se que o tratamento com MVA-BN-mHER2 resulta em disseminação do epítipo/antígeno, uma vez que ratos protegidos contra o tumor HER-2+ resistem a uma segunda prova com o tumor parental que não expressa HER-2. Assim, o MVA-BN-mHER2 possibilita o desencadeamento de uma resposta imunológica protetora lata que se pode alargar a antígenos tumorais que não o HER-2, o que é um pré-requisito para tratar tumores heterogêneos e prevenir a evasão de tumores.

Exemplo 8

Tumores espontâneos em ratos NeuT

É necessário um alto título e espectro largo de anticorpos para atrasar tumores espontâneos que surgem em ratos transgênicos que expressam o HER-2/neu de ratazana (ratos NeuT) tratados com HER-2 heterólogo (por exemplo, HER-2 humano). A formulação de vacinas do HER-2 heterólogo como ADN nu não conseguiu atrasar o crescimento de tumores nestes modelos enquanto a formulação de base viral exibiu atividade antitumoral. Verificou-se que o MVA-BN-mHER2 retardava o crescimento de tumores espontâneo em NeuT, mesmo quando o tratamento era iniciado durante as fases finais do desenvolvimento do tumor. Assim, o MVA-BN proporciona uma formulação de antígenos superior para a indução de atividade antitumoral.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> BN Immunotherapeutics Inc.

<120> MÉTODOS DE TRATAMENTO DE CANCRO COM MVA

<130> BNIT0001PCT-EP

<150> PCT/US2007/021436

<151> 2007-10-05

<150> 60/850,031

<151> 2006-10-06

<160> 5

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1

<211> 2528

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cassete de expressão de HER-2

<400> 1

agtâtgcatt tttacggatg gagtctcggg ctaaaaacgg gaatgtacta tctacgtacg	60
aaacccgcat ccgctcccat tcaattcaca ttggacaagg ataaaataaa accactgggtg	120
gtttgcgatt ccgaaatctg tacatcatgc agtgggttaaa caaatctaga actagttaa	180
ttaaggagct gttttgaata aaatTTTTTT ataataaatc tagaactagt ggatcccccg	240
ggctgcagga attcgatcta gccgccacca tggagctggc ggccctgtgc cgctgggggc	300
tcctcctcgc cctcttgcgc cccggagccg cgagcaccca agtgtgcacc ggcacagaca	360
tgaagctgcg gctccctgcc agtcccagga cccacctgga catgctccgc cacctctacc	420
agggctgcca ggtgggtgcag ggaaacctgg aactcaccta cctgcccacc aatgccagct	480
taagtttctt gcaggatata caggaggtgc agggctacgt gctcatcgtc cacaaccaag	540
tgaggcaggt cccactgcag aggctgcgga ttgtgcgagg caccagctc tttgaggaca	600
actatgccct ggccgtgcta gacaatggag acccgctgaa caataccacc cctgtcacag	660
gggcctcccc aggaggcctg cgggagctgc agcttcgaag cctcacagag atcttgaaag	720
gaggggtctt gatccagcgg aacccccagc tctgctacca ggacacgatt ttgtggaagg	780
acatcttcca caagaacaac cagctggctc tcacactgat agacaccaac cgctctcggg	840
cctgccaccc ctgttctccg atgtgtaagg gctcccgtg ctggggagag agttctgagg	900
attgtcagag cctgacgcgc actgtctgtg ccggtggctg tgcccgtgc aaggggccac	960
tgcccactga ctgctgccat gagcagtgtg ctgccggctg cacgggcccc aagcactctg	1020
actgcctggc ctgcctccac ttcaaccaca gtggcatctg tgagctgcac tgcccagccc	1080
tggtccagta catcaaagct aactccaaat tcacgggtat caccgagctg cggtatacat	1140
tcggcgccag ctgtgtgact gcctgtccct acaactacct ttctacggac gtgggatcct	1200
gcaccctcgt ctgccccctg cacaaccaag aggtgacagc agaggatgga acacagcggg	1260

```

gtgagaagtg cagcaagccc tgtgcccagag tgtgctatgg tctgggcatg gagcacttgc 1320
gagagggtgag ggcagttacc agtgccaata tccaggagtt tgctggctgc aagaagatct 1380
ttgggagcct ggcatttctg ccggagagct ttgatgggga cccagcctcc aacactgccc 1440
cgctccagcc agagcagctc caagtgtttg agactctgga agagatcaca ggttacctat 1500
acatctcagc atggccggac agcctgcctg acctcagcgt cttccagaac ctgcaagtaa 1560
tccggggacg aattctgcac aatggcgctt actcgctgac cctgcaaggg ctgggcatca 1620
gctggctggg gctgcgctca ctgagggaaac tgggcagtggt actggccctc atccaccata 1680
acacccacct ctgcttcgtg cacacgggtg cctgggacca gctctttcgg aacccgcacc 1740
aagctctgct ccacactgcc aaccggccag aggacgagtg tgtgggagag ggcttggcct 1800
gccaccagct gtgcgcccga gggcactgct ggggtccagg gcccaccag tgtgtcaact 1860
gcagccagtt ctttcggggc caggagtgcg tggaggaatg ccgagtactg caggggctcc 1920
ccagggagta tgtgaatgcc aggcactgtt tgccgtgccca ccctgagtgt cagccccaga 1980
atggctcagt gacctgtttt ggaccggagg ctgaccagtg tgtggcctgt gccactata 2040
aggaccttcc cttctgcgtg gcccgtgcc ccagcgggtgt gaaacctgac ctctcctaca 2100
tgcccatctg gaagtttcca gatgaggagg gcgcagtcca gccttgcccc atcaactgca 2160
cccactcctg tgtggacctg gatgacaagg gctgccccgc cgagcagaga gccagccctc 2220
tgacgtcctt caacaacttc accgtgagct tctggctgctg cgtgcccagg gtgagcgcca 2280
gccacctgga gatcgtctct gcggtggttg gcattctgta gaagcttggg accgagctcg 2340
gatccactag tccagtgtgg tgggaattctg cagatatcca gcacagtggc ggccatcaag 2400
cttatcgata ccgtcgacct cgaggggggg cccgggtaccc agttaattaa ggatcccccg 2460
ggctgcagga attccatttt tattctcaaa tgagataaag tgaaaatata tatcatatat 2520
acaaagta 2528

```

<210> 2

<211> 683

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Proteína HER-2 codificada pela cassette de expressão de HER-2

<400> 2

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
 20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
 35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
 50 55 60
 Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
 65 70 75 80
 Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
 85 90 95
 Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
 100 105 110
 Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
 115 120 125
 Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
 130 135 140
 Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
 145 150 155 160
 Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
 165 170 175
 Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
 180 185 190
 His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
 195 200 205
 Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
 210 215 220
 Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
 225 230 235 240
 Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
 245 250 255
 His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
 260 265 270
 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Arg
 275 280 285
 Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
 290 295 300
 Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
 305 310 315 320

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
 325 330 335
 Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
 340 345 350
 Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
 355 360 365
 Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
 370 375 380
 Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
 385 390 395 400
 Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 405 410 415
 Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
 420 425 430
 Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
 435 440 445
 Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
 450 455 460
 Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
 465 470 475 480
 Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
 485 490 495
 Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
 500 505 510
 Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
 515 520 525
 Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
 530 535 540
 Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
 545 550 555 560
 Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
 565 570 575
 Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
 580 585 590

Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
610 615 620

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
625 630 635 640

Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Phe Asn Asn
645 650 655

Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His
660 665 670

Leu Glu Ile Val Ser Ala Val Val Gly Ile Leu
675 680

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Péptido de HER-2 do MHC de Classe I

<400> 3

Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu
1 5

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Péptido da toxina do tétano auxiliar T do MHC de
Classe II P2

<400> 4

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 1 5 10 15

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Péptido da toxina do tétano auxiliar T do MHC de
 Classe II P30

<400> 5

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu
 20

Lisboa, 15 de Setembro de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Associação de um vírus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) recombinante que codifica um polipéptido compreendendo um antígeno HER-2 e/ou epítipo do mesmo, e uma dose tumoricida de um taxano.
2. Associação de acordo com a reivindicação 1, em que o antígeno HER-2 é modificado para incluir um ou mais epítopos T_H estranhos.
3. Associação de acordo com a reivindicação 1, em que o antígeno HER-2 é modificado por adição dos epítopos p2 e p30 da toxina do tétano.
4. Associação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o antígeno HER-2 compreende a SEQ ID NO:2.
5. Associação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o taxano é docetaxel ou paclitaxel.
6. Associação de acordo com a reivindicação 5, em que o taxano é docetaxel a uma dose de pelo menos 50 mg/m², preferencialmente a uma dose de 75-100 mg/m².
7. Associação de acordo com a reivindicação 5, em que o taxano é paclitaxel a uma dose de pelo menos 90 mg/m², preferencialmente a uma dose de 135-175 mg/m².
8. Associação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores para administrar o MVA

recombinante 1-26 semanas, preferencialmente 1-3 semanas, antes do taxano.

9. Associação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores para administrar o MVA recombinante 2-60 dias, preferencialmente 2-7 dias, após o taxano.
10. Associação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores para administrações múltiplas.
11. Associação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o MVA é MVA-BN.
12. Composição farmacêutica compreendendo a associação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores 1 a 11.
13. Utilização da associação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores 1 a 11 para a preparação de uma composição farmacêutica ou medicamento.
14. Kit contendo um MVA recombinante que codifica um polipéptido compreendendo um antígeno HER-2 e/ou epítopo do mesmo, e uma dose tumoricida de um taxano como uma preparação de associação.
15. Kit de acordo com a reivindicação 14, compreendendo o referido kit o MVA recombinante num primeiro frasco ou recipiente para uma primeira administração ("condicionamento") e num segundo frasco ou recipiente para uma segunda administração ("reforço").

16. Associação de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores 1 a 11, composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 12, utilização de acordo com a reivindicação 13 e/ou kit de acordo com a reivindicação 14 ou 15 para serem utilizados num método de tratamento e/ou prevenção de cancro da mama.
17. Associação de qualquer uma das reivindicações 1 a 11 e 16, composição farmacêutica da reivindicação 12 ou kit da reivindicação 14 ou 15, em que o MVA recombinante é administrado antes, ao mesmo tempo ou depois da dose tumoricida do taxano.

Lisboa, 15 de Setembro de 2014

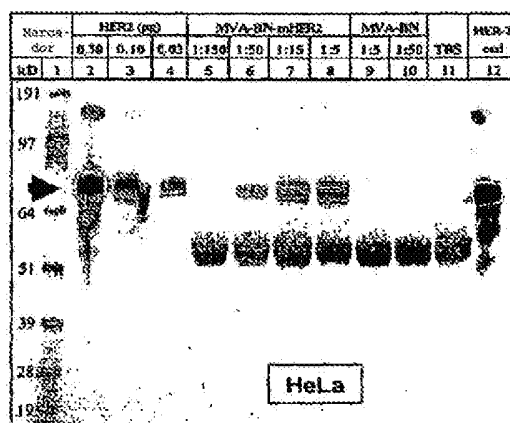


FIGURA 2

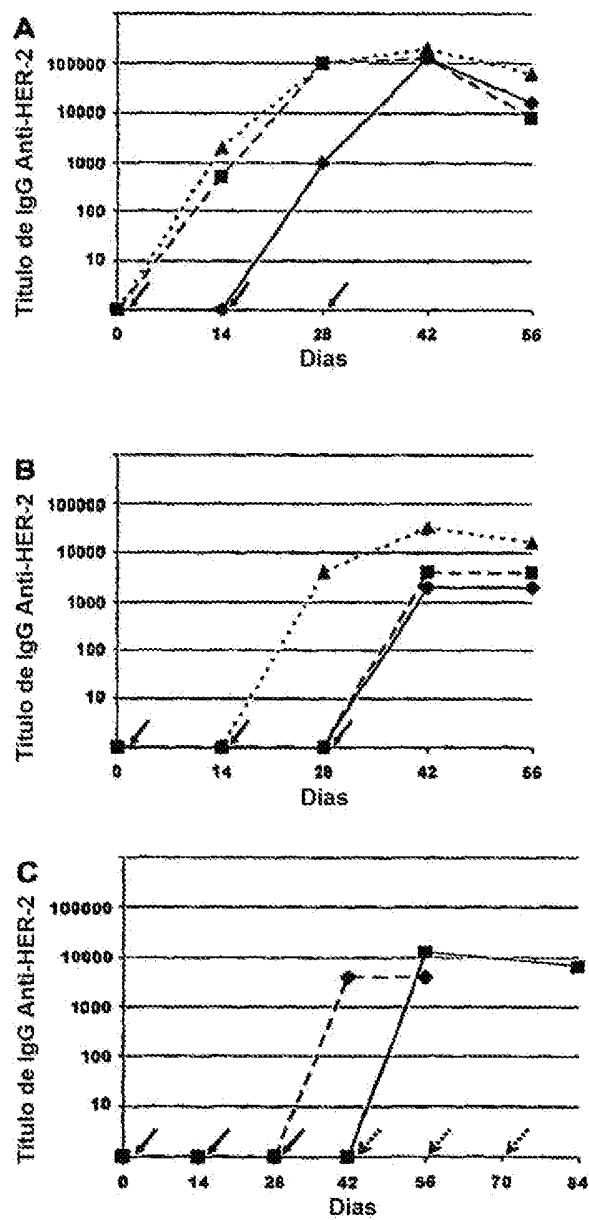


FIGURA 3

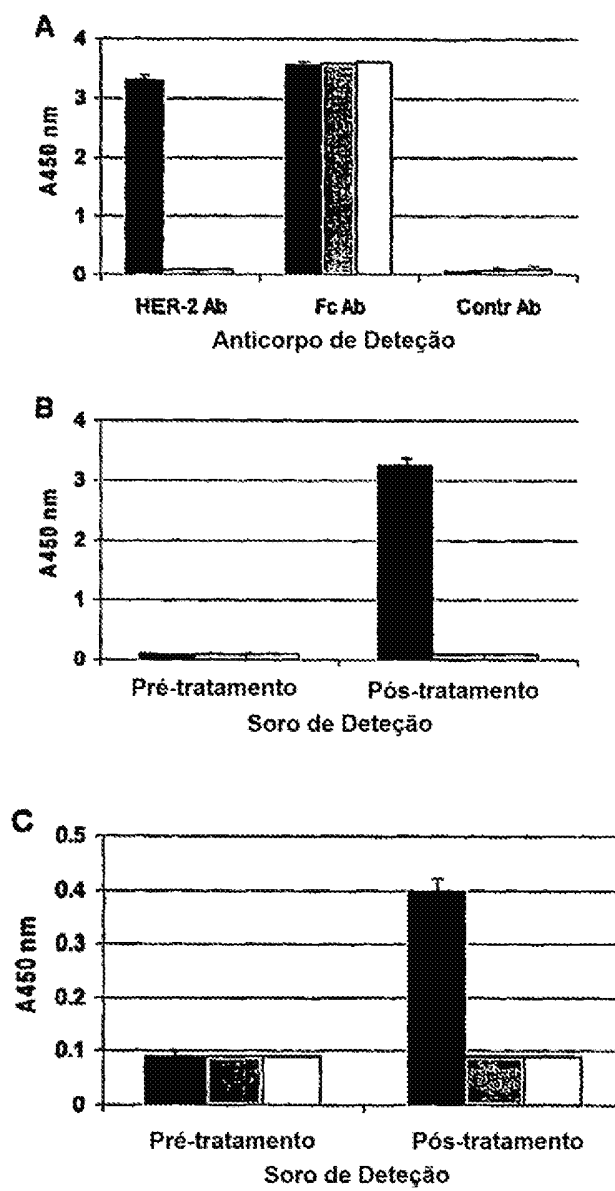


FIGURA 4

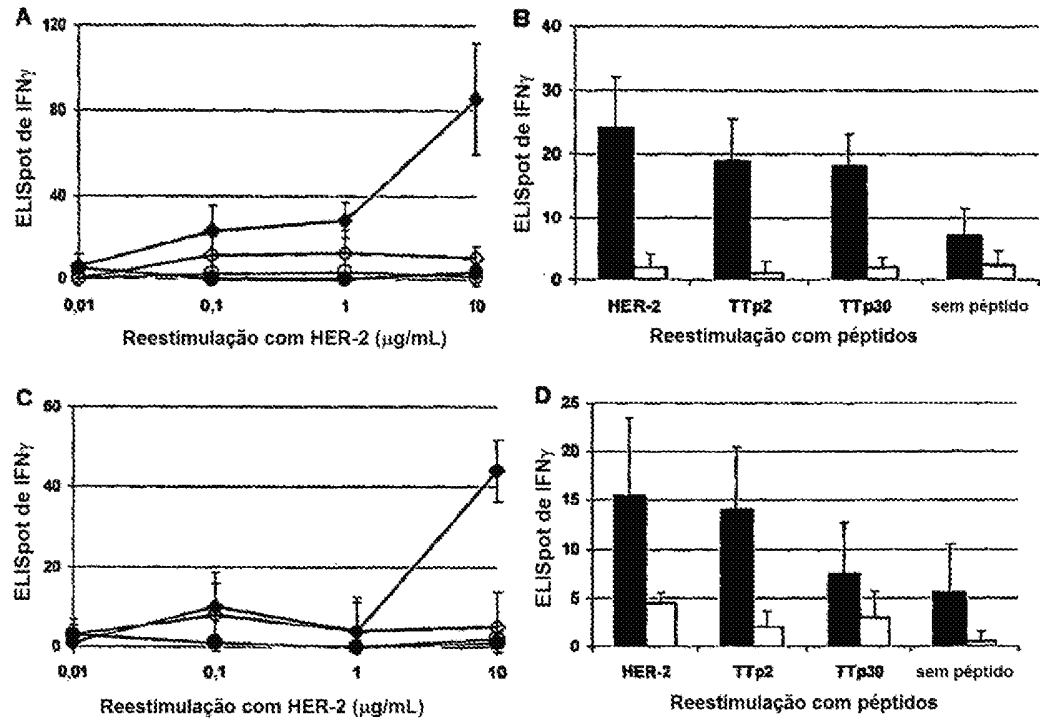


FIGURA 5

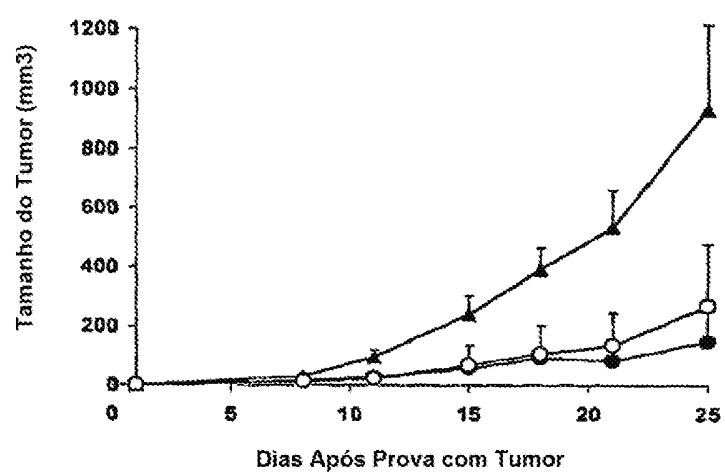


FIGURA 6

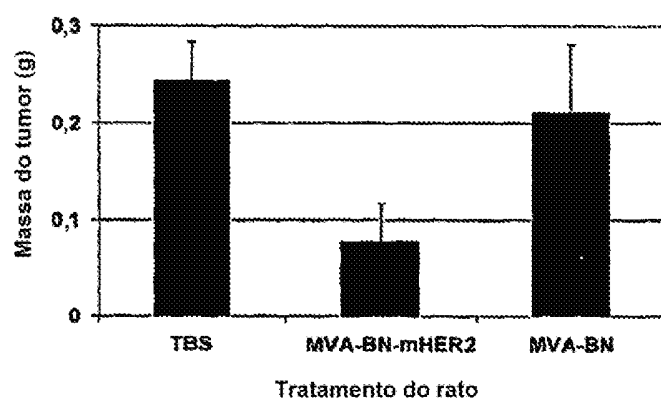


FIGURA 7

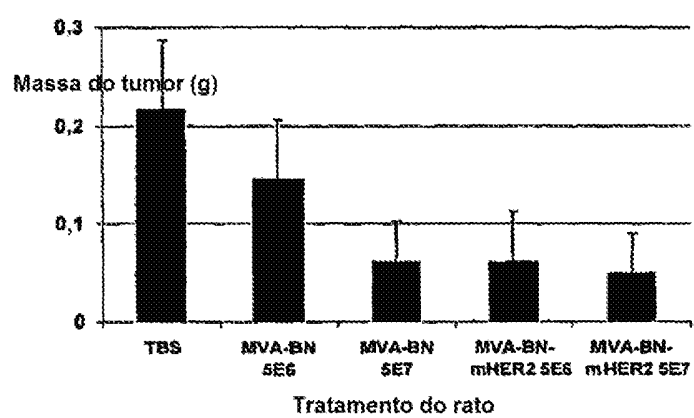
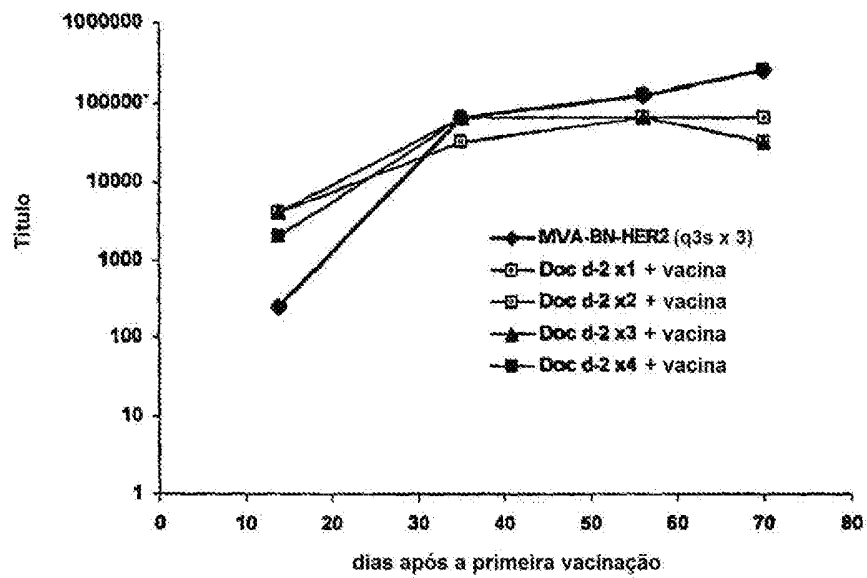


FIGURA 8

A

Títulos de HER2 06-041 (grupos dia 2)



B

Títulos de HER2 06-041 (grupos dia 7)

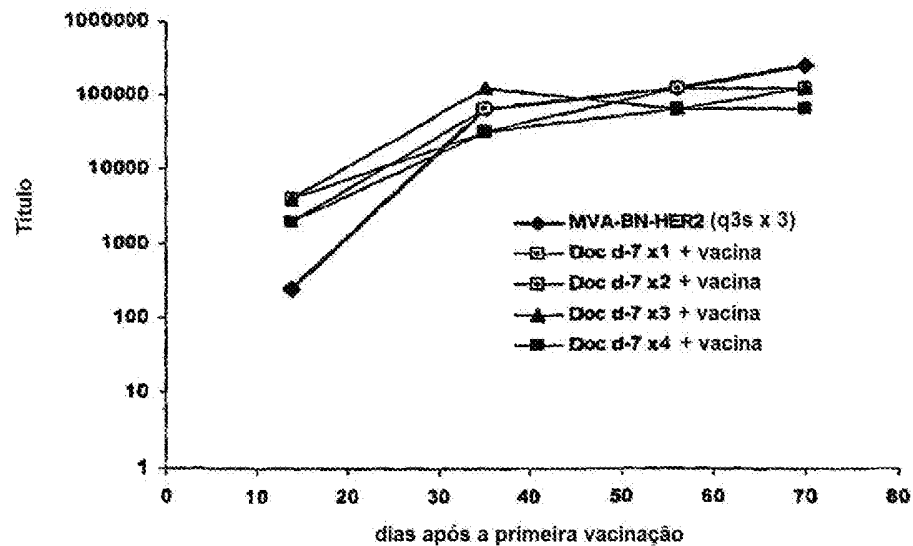
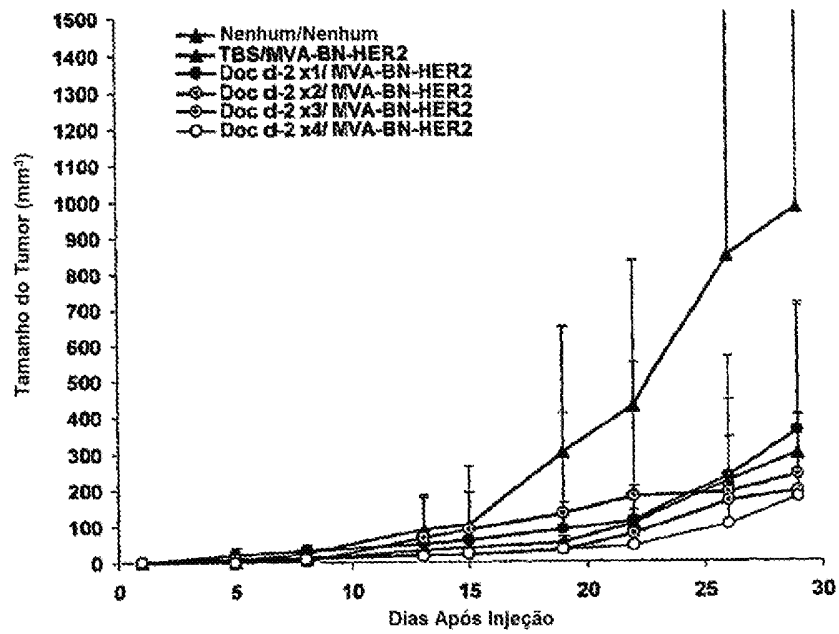


FIGURA 9

A



B

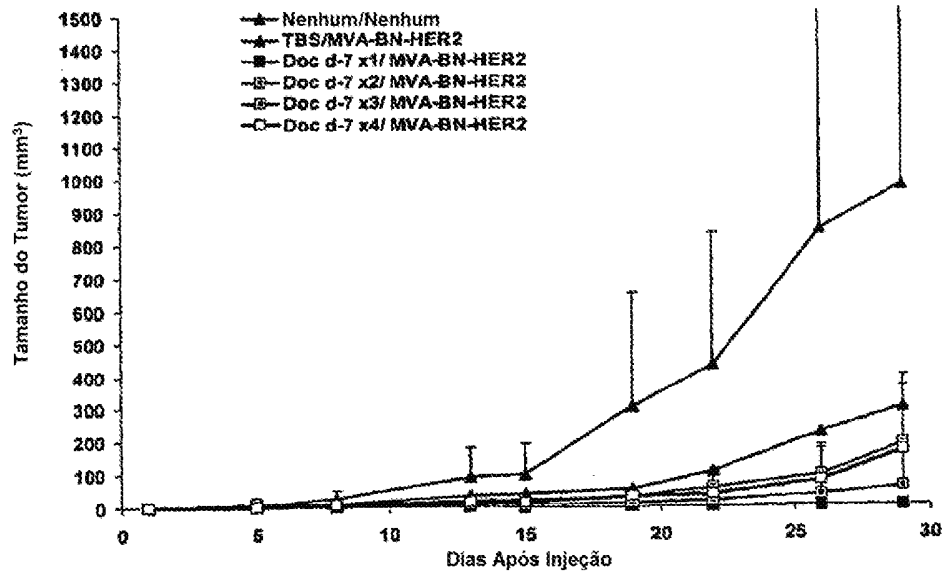
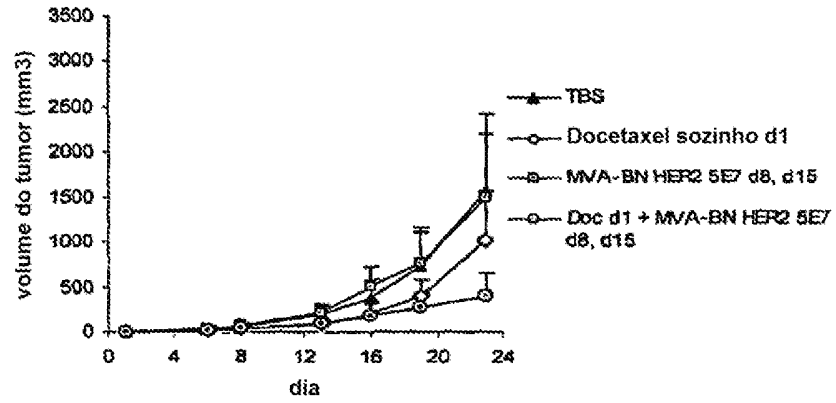


Figura 10

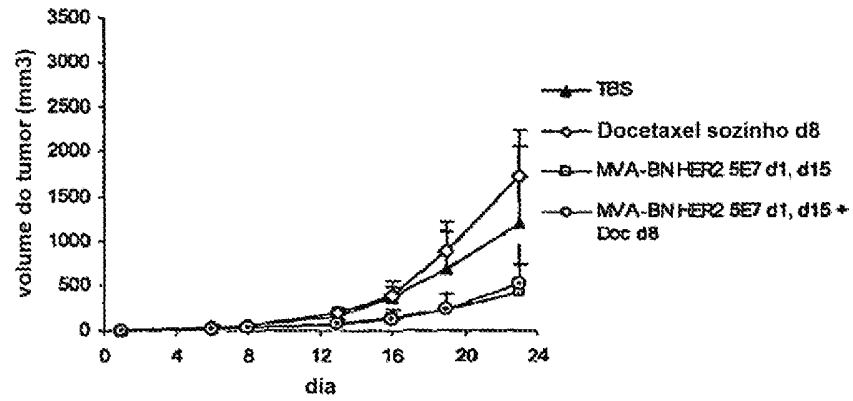
A

Subconjunto A: Curvas de Crescimento do Tumor



B

Subconjunto B: Curvas de Crescimento do Tumor



C

Subconjunto C: Curvas de Crescimento do Tumor

