

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

(22) Data de pedido: 2008.04.11	(73) Titular(es): THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE, INC.	
(30) Prioridade(s): 2007.06.01 US 941524 P	6720-A ROCKLEDGE DRIVE, SUITE 100	
(43) Data de publicação do pedido: 2010.03.17	BETHESDA, MD 20817	US
(45) Data e BPI da concessão: 2013.11.06 030/2014	(72) Inventor(es): GEORGE E. PEOPLES PONNIAH SATHIBALAN	US US
	(74) Mandatário: LUÍSA MARIA FERREIRA GUERREIRO PRACETA FERNANDO NAMORA, Nº 7, 3º ESQ. 2820-598 CHARNECA DA CAPARICA	PT

(54) Epígrafe: **VACINA PARA A PREVENÇÃO DA RECAÍDA DO CANCRO DA MAMA**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO APRESENTA MÉTODOS PARA INDUZIR E MANTER UMA RESPOSTA PROTETORA DE LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS PARA UM PÉPTIDO DO ONCOGENE HER2/NEU, E75, COM O EFEITO DE INDUZIR E MANTER UMA IMUNIDADE PROTETORA OU TERAPÊUTICA CONTRA O CANCRO DA MAMA NUM PACIENTE EM REMISSÃO CLÍNICA. OS MÉTODOS COMPREENDEM A ADMINISTRAÇÃO AO PACIENTE DE UMA QUANTIDADE EFICAZ DE UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA COMPREENDENDO UM TRANSPORTADOR FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL, UM ADJUVANTE, TAL COMO O GM-CSF HUMANO RECOMBINANTE, E O PEPTÍDEO E75 A UMA DOSE OPTIMIZADA E PROGRAMADA. OS MÉTODOS COMPREENDEM AINDA A ADMINISTRAÇÃO DE UMA DOSE ANUAL OU SEMIANUAL DE VACINA DE REFORÇO DEVIDO À DIMINUIÇÃO DA IMUNIDADE E75 ESPECÍFICO DAS CÉLULAS T. A INVENÇÃO TAMBÉM APRESENTA COMPOSIÇÕES DE VACINA PARA A UTILIZAÇÃO NOS MÉTODOS.

DESCRIÇÃO

VACINA PARA A PREVENÇÃO DA RECAÍDA DO CANCRO DA MAMA

REFERÊNCIA A PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício do Pedido US 60/941,524 depositado 1 de Junho de 2007.

CAMPO

A invenção refere-se genericamente ao campo das vacinas preventivas e terapêuticas. Mais especificamente, a invenção refere-se a vacinas de péptidos para o tratamento de cancro da mama e na prevenção de recaídas em pacientes em remissão do cancro da mama.

ANTECEDENTES

O cancro da mama (BCa) é o diagnóstico de cancro mais comum em mulheres e a segunda maior causa de morte por cancro entre as mulheres (Ries LAG, et al. (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003, National Cancer Institute, Bethesda, MD). Os principais avanços no tratamento do cancro da mama ao longo dos últimos 20 anos levaram a uma melhoria significativa na taxa de sobrevida livre de doença (DFS). Por exemplo, as terapias que utilizam anticorpos reativos contra antigénios relacionados com o tumor têm sido usadas para bloquear processos celulares específicos, a fim de retardar o progresso da doença ou evitar a recorrência da doença. Apesar dos recentes avanços no tratamento do cancro da mama, um número significativo de pacientes acabará por morrer de doença recorrente. Assim, existe uma necessidade de tratamentos que previna ou retarde ou proíba o desenvolvimento da doença recorrente.

As vacinas são um modelo atrativo para tais tratamentos e prevenções, devido à sua facilidade de administração, e devido à sua elevada taxa de sucesso observado para doenças infecciosas. O conceito básico de construção de uma vacina para o cancro é simples em teoria. O desenvolvimento de vacinas contra o cancro eficazes para tumores sólidos na prática, no entanto, encontrou-se com sucesso limitado. Por exemplo, um grupo tentou administrar uma vacina de péptidos dirigidos contra o melanoma metastático observou uma taxa de resposta objectiva de apenas 2,6% (Rosenberg SA et al. (2004) Nat. Med. 10:909-15).

Há muitas explicações possíveis para esta baixa taxa de sucesso (Campoli M et al. (2005) Cancer Treat. Res. 123:61-88). Por exemplo, mesmo que um antigénio seja especificamente relacionado com um tipo específico de célula de tumor, as células de tumor podem expressar apenas níveis baixos de antigénio, ou podem estar localizadas num local críptico ou de outro modo protegido contra a detecção imunológica. Além disso, os tumores muitas vezes mudam o seu perfil antigénico através do derramamento de antígenos consoante eles se desenvolvem. Também contribui para a baixa taxa de sucesso o facto das células de tumor poderem expressar níveis muito baixos de proteínas MHC e outras proteínas co-estimuladoras necessários para gerar uma resposta imunitária.

Surgem problemas adicionais nas tentativas de vacinação contra tumores em pacientes com cancro em estágio avançado. Tais pacientes tendem a ter tumores primários e metastáticos maiores, e as células no interior do tumor não podem ser acessíveis devido à má circulação sanguínea. Isto é consistente com a observação de que as estratégias de

vacina que têm tendência para ser mais eficaz para o tratamento de doenças malignas hematológicas (Radford KJ et al. (2005) Pathology 37:534-50 e, Molldrem JJ (2006) Biol. Bone Marrow Transplant. 12:13-8). Além disso, como os tumores se tornam metastáticos, podem desenvolver a capacidade para libertar factores imunossupressores no seu microambiente (Campoli, 2005, e, Kortylewski M et al. (2005) Nature Med. 11:1314-21). Os tumores metastáticos também têm sido associados a uma diminuição no número de linfócitos do sangue periférico, e disfunção de células dendríticas (Gillanders WE et al. (2006) Breast Diseases: A Year Book and Quarterly 17:26-8).

Enquanto alguns ou todos estes factores podem contribuir para a dificuldade no desenvolvimento de uma vacina preventiva ou terapêutica eficaz, o maior desafio subjacente é que a maior parte dos antígenos tumorais são antígenos próprios ou tem um elevado grau de homologia com antígenos próprios, e espera-se, portanto, que sejam sujeitos a tolerância imunitária rigorosa. Assim, fica claro que muitas das vacinas de cancro com base em peptídeos, com ou sem adjuvantes estimulante do sistema imunológico, podem ser condenadas a apenas um sucesso limitado na prática clínica devido à baixa imunogenicidade e falta de especificidade.

Protótipos de vacinas contra o cancro da mama com base em antígenos individuais foram moderadamente bem-sucedidos em induzir uma resposta imune mensurável em experiências com animais e em testes clínicos com pacientes com cancro da mama. A resposta imune observada, no entanto, não se traduziu numa imunidade protetora clinicamente significativa contra o ressurgimento da doença colocada em

remissão por cirurgia e quimioterapia padrão. Assim, são necessárias abordagens para novas vacinas para melhorar ainda mais as taxas de recorrência e sobrevida global entre pacientes BCa.

Epítomos de vacina preferidos são aqueles que são expressos exclusivamente, ou pelo menos um aumento dos níveis de uma neoplasia. HER2/neu é um proto-oncogene expresso em muitos tumores epiteliais (Slamon DJ et al. (1989) Science 244:707-12). A amplificação genética e a sobre-expressão da proteína HER2/neu é encontrada em 20-25% de BCA, e a sua presença em excesso é um indicador de prognóstico facro (Pritchard Kl et al. (2006) N. Engl. J. Med. 354:2103-11). HER2/neu foi estudado relativamente amplamente, e vários peptídeos imunogénicos foram identificados a partir desta proteína. Um tal péptido é denominado E75, e corresponde aos aminoácidos 369-377 de HER2/neu (SEQ ID N°: 1) (Patente US 6514942).

Têm sido feitas tentativas para utilizar E75 como uma vacina anti-cancro, por exemplo, como uma única vacina de péptido combinado com diferentes imunoadjuvantes (TZ Zaks et al. (1998) Cancer Res. 58:4902-8; Knutson KL et al. (2002) Clin. Cancer Res. 8:1014-8 e Murray JL et al. (2002) Clin. Cancer Res. 8:3407-18); carregados em células dendríticas autólogas e reinfundidas (Brossart P et al. (2000) Blood 96:3102-8 e, Kono K et al. (2002) Clin. Cancer Res. 8:3394-3400); ou incorporado em peptídeos mais capazes de se ligar a moléculas HLA de classe II, a fim de recrutar células T CD4 auxiliares (Disis ML et al. (1999) Clin. Cancer Res. 5:1289-97 e, Disis ML et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20:2624-32). Cada abordagem estimulou uma resposta imune E75 específica

mediada por células T citotóxicas, mas não demonstrou uma imunidade terapêutica ou protetora clinicamente significativa em mulheres com cancro da mama em fase avançada.

HER2/neu é um membro da família de receptores do factor de crescimento epidérmico e codifica para um receptor tirosina-quinase de 185 kDa envolvido na regulação do crescimento e proliferação celular. (Popescu NC, King CR, Kraus MH. A localização do gene erbB-2 humano no cromossoma normal e rearranjado 17 para as bandas q12-21,32. *Genomics* 1989; 4:362-366; Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2001; 2:127-137). Sobre-expressão e/ou amplificação de HER2/neu é encontrada em 25-30% dos casos de cancro da mama invasivo (BCa) e está associada a tumores mais agressivos e de pior evolução clínica. (Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235:177-182; Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogen in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989, 244:707-12; Toikkanen S, Helin H, J Isola, Joensuu H. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: A 30-year follow-up. *J Clin Oncol* 1992; 10:1044-1048).

A determinação do status de HER2/neu é realizada predominantemente através de dois testes, imuno-histoquímica (IHQ) e hibridização fluorescente *in situ* (FISH). A IHC detecta a sobre-expressão da proteína HER2/neu e é reportada numa escala semi-quantitativa de 0 a 3+ (0 = negativo, 1⁺ = baixa expressão, 2⁺ = intermédia, e

3⁺ = sobre-expressão). FISH, por outro lado, detecta a amplificação (cópias excedentes) do gene HER2/neu e é expressa como uma razão de cópias do gene HER2/neu às cópias do gene do cromossoma 17 e interpretado como "sobre-expressão" se FISH é $\geq 2,0$ cópias. (Hicks DG, Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretative guidelines. Hum Pathol 2005; 36:250-261). A taxa de concorrência de IHC e FISH é de aproximadamente 90%. (Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, et al. Specificity of Hercep Test in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. J Clin Oncol 1999; 17:1533-1541). FISH é considerado o padrão-ouro, como análise retrospectiva revela que é um melhor predictor de resposta trastuzumab (Tz); é mais objetivo e reproduzível. (Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, et al. Evaluation of HER-2/neu Gene Amplification and Overexpression: Comparison of Frequently Used Assay Methods in a Molecularly Characterized Cohort of Breast Cancer Specimens. J Clin Oncol 2002; 14:3095-3105; Bartlett J, Mallon E, Cooke T. The clinica evaluation of HER-2 status: which test to use? J Pathol 2003; 199:411-417; Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol 2007; 25:118-145).

A identificação e quantificação de HER2/neu como um proto-oncogene, levou a imunoterapia passiva humoral ou baseada em anticorpo, que incluem a utilização de Tz (Herceptin®). Tz é um anticorpo monoclonal recombinante humanizado que se liga ao domínio justamembranar extracelular da proteína

HER/neu. (Plosker GL, Keam SJ. Trastuzumab: A review of its use in the management of HER2-positive metastatic and early-stage breast cancer. *Drugs* 2006; 66:449-475). Tz é indicado para a sobre-expressão de HER2/neu (IHC3⁺ ou FISH ≥ 2.0) nódulo positivo (NP) e pacientes BCa metastáticos, (Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as single agent in first-time treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20:719-726; Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005; 353:1659-1672) e mostra uma atividade muito limitada em pacientes com baixa a intermediária expressão de HER2/neu. (Herceptin (Trastuzumab) prescription product insert South San Francisco, CA: Genentech Inc; revista em Setembro de 2000).

Outra forma de imunoterapia prosseguida, é a vacinação e a imunoterapia ativa visando uma resposta imune celular para epítomos de antígenos associados a tumores (TAA) como HER2/neu. HER2/neu é uma fonte de diversos peptídeos imunogénicos que podem estimular o sistema imunitário para reconhecer e matar as células cancerosas que expressam HER2/neu. (Fisk B, Blevins TL, Wharton JT, et al. Identification of immunodominant peptide of the HER2/neu proto-oncogen recognized by ovarian tumor-specific CTL lines. *J. Exp. Med.* 1995; 181:2109-2117).

E75 (KIFGSLAFL, HER2/neu, 369-377) é uma sequência peptídica na família do proto-oncogene HER2/neu e está em uso em ensaios clínicos como uma vacina anti-cancro para estimular os linfócitos T citotóxicos (CTL) para destruir células cancerígenas. (Zaks, T. et al. Immunization with a

peptide epitope (369-377) from HER-2/neu leads to peptide specific cytotoxic T Lymphocytes that fail to recognize HER-2/neu+ tumors. Cancer Research. 58 (21):4902-8, 1998; Knutson KL, Schiffman K, Cheever MA, et al: Immunization of cancer patients with HER-2/neu, HLA-A2 peptide, p369-377, results in short-lived peptide-specific immunity. Clin Cancer Res. 8:1014-1018, 2002; Murray JL, Gillogly ME, Przepiórka D, et al: Toxicity, immunogenicity, and induction of E75-specific tumorlytic CTLs by HER-2 peptide E74 (369-377) combined with granulocyte macrophage colony-stimulating factor in HLA-A2+ patients with metastatic breast and ovarian cancer. Clin Cancer Res. 8:3407-3418, 2002; Avigan D, Vasir B, Gong J, et al. Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cell cancer induces immunological responses. Clin Cancer Res 2004; 10:4699-4708; Disis ML, Gooley TA, Rinn K, et al. Generation of T-cell immunity to the HER2/neu protein after active immunization with HER2/neu peptide-based vaccines. J Clin Oncol 2002; 20:2624-32; Disis ML, Grabstein KH, Sleath PR, et al. Generation of immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using peptide-based vaccine. Clin Cancer Res. 5:1289-1297, 1999.

A imunoterapia passiva alvejada baseada no proto-oncogene HER2/neu tem girado principalmente em torno do uso de Tz (Herceptin®). Tz é um anticorpo monoclonal recombinante humanizado que se liga ao domínio justamembranar extracelular da proteína HER2/neu. Tz é aprovado pelas autoridades reguladoras e indicado para o tratamento da sobre-expressão de HER2/neu (IHC 3+ ou FISH > 2,0) de tumores em pacientes com cancro metastático da mama e no tratamento adjuvante para pacientes com cancro da mama com

nódulo positivo. Tz sofreu múltiplos ensaios clínicos e é agora utilizada rotineiramente no tratamento de pacientes com metástases e para o tratamento adjuvante de doentes com cancro da mama de alto risco, com a sobre-expressão de HER2/neu. Tz, no entanto, mostra atividade limitada em pacientes com baixa a intermediária expressão de HER2/neu. Portanto, com base nos resultados anteriores vistos com Tz, com as vacinas de péptidos imunogénicos visando HER2/neu não seria de esperar serem eficazes em pacientes com cancro com níveis baixos e intermédios de expressão de tumor HER2/neu.

Assim, existe uma necessidade na técnica para explorar o potencial terapêutico e imunoprotetor de E75 para produzir vacinas que oferecem aos pacientes de cancro da mama em remissão clínica uma proteção fiável contra a recorrência da doença.

RESUMO

A invenção apresenta composições para utilização em métodos de induzir e manter uma imunidade contra a recaída do cancro da mama em pacientes em remissão clínica do cancro da mama. A invenção proporciona uma composição compreendendo um veículo farmacologicamente eficaz e um péptido tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 2, para utilização na indução de imunidade protetora ou terapêutica contra a recorrência do cancro da mama num paciente, em que o sujeito tem uma classificação imunoquímica (IHC) de 1+ ou 2+ para a expressão da proteína HER2/neu e uma hibridação fluorescente *in situ* (FISH) de classificação inferior a $2,0 \pm 20\%$ para a expressão do gene HER2/neu. A administração pode ser realizada por quaisquer meios adequados na técnica, tais como a inoculação ou

injeção, e, mais particularmente, injeção intradérmica, o que pode ocorrer com uma ou mais doses separadas. Tais doses podem compreender uma concentração igual do péptido e um imunoadjuvante, podem ser administradas substancialmente simultaneamente, e podem ser administradas a um local de inoculação ou afastadas uma da outra sobre a superfície da pele. A composição pode ser administrada cerca de três a seis vezes ou mais numa base mensal, até a imunidade protetora ser estabelecida. Em alguns aspectos, a composição compreende ainda um adjuvante, tal como o factor estimulante de colónias de granulócitos humanos recombinante macrófagos (GM-CSF).

Em alguns aspectos, os métodos compreendem ainda a administração ao indivíduo de uma dose de vacina de reforço, que compreende uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo um veículo farmacêuticamente eficaz e um péptido que possui a SEQ ID N°: 2. Em alguns aspectos, a composição do dispositivo de reforço compreende ainda um adjuvante, tal como GM-CSF. A administração de uma dose de reforço pode ser realizada por meio de inoculação ou injeção, e podem ser podem ser administradas a cada seis ou 12 meses depois.

O paciente pode ser qualquer mamífero, e é de preferência um ser humano. Em certos aspectos, o ser humano é positivo para o antígeno de maior histocompatibilidade do tipo de sangue como antígeno leucocitário humano A2 ou antígeno leucocitário humano A3. Em outros aspectos, o ser humano é positivo para a expressão de níveis detectáveis de HER2/neu. O ser humano expressa HER2/neu a níveis baixos ou intermédios e tem uma classificação de imuno-

histoquímica (IHQ) de 1+ ou 2+ e/ou uma classificação de hibridação fluorescente in situ (FISH) de menos de 2,0.

As composições compreendem um veículo farmacologicamente aceitável, uma quantidade eficaz de um péptido tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID N°: 2, um adjuvante, tal como o factor estimulador de colónias de granulócitos macrófagos, e um calendário de imunização otimizado. Em alguns aspectos específicos, as concentrações e as programações da composição de vacina preferidas incluem: (1) 1 mg/ml de péptido e 0,25 mg/ml de adjuvante, (2) 0,5 mg/ml de péptido e 0,25 mg/ml de adjuvante, (3) 0,1 mg/ml de péptido e 0,25 mg/ml de adjuvante, e (4) 0,5 mg/ml de péptido e 0,125 mg/ml de adjuvante, cada um com inoculações mensais durante 6 meses consecutivos, seguido de inoculações de reforço anual para três ou mais anos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Os desenhos anexos, que são incluídos para proporcionar um entendimento adicional da invenção e estão incorporados e constituem uma parte desta especificação, ilustram aspectos da invenção e juntos com a descrição servem para explicar os princípios da invenção. Nos desenhos:

A Figura 1 mostra a toxicidade local e sistémica máxima experimentada por pacientes vacinados com E75. A toxicidade local (eritema e endurecimento no local da injeção) é um efeito desejado que mostra uma resposta à vacina. As toxicidades locais de grau 2 mais comuns foram prurido ou desconforto requerendo medicação. As toxicidades sistémicas mais comuns foram dor óssea, sintomas gripais e fadiga (comummente associado com GM-CSF) e duraram <24 horas. Os dois grau 3 de toxicidades sistémicas foram

angioedema da língua (depois da sexta inoculação) e dor óssea.

A Figura 2 mostra as curvas de Kaplan-Meier de sobrevida livre de doença aos 20 meses de acompanhamento médio. Para 171 pacientes inscritos, a taxa de recorrência no grupo vacinado foi de 5,6% em comparação com 14,2% no grupo de observação ($P = 0,04$) num seguimento médio de 20 meses. As taxas de sobrevida livre de doença nos grupos vacinados e de controlo foram de 92,5% e 77%, respectivamente.

As Figuras 3A e 3B mostram a resposta E75 CTL induzida pela vacina. (A) Vacina induziu E75 CTL específica para todos os pacientes. Os níveis medianos de CD8+ E75 CTL específico foram significativamente aumentados em relação aos níveis pré-vacinação (0,39%, faixa de 0-3,28%), para um nível máximo (1,8, faixa de 0,4-12,2%, $P < 0,0001$), e nível de pós-vacinação (0,70%, faixa de 0,06-2,91%, $P = 0,002$). Não houve diferença entre os níveis de pré-vacinação e níveis de longo prazo de células T CD8+ específicas (seis meses). (B) E75 CTL específica induzidos pela vacina com base na imunidade pré-existente. Os pacientes com e sem imunidade pré-existente mostraram padrões idênticos em resposta à vacinação E75 com níveis médios e máximos pós-vacinais alcançados semelhantes. No entanto, nos pacientes sem imunidade pré-existente, houve um aumento significativo nos níveis de dímero de pré-vacina contra pós-vacinação a seis meses (0,13% [intervalo 0-0,28%] versus 0,45% [0-2,68%], $P < 0,0001$).

As Figuras 4A a 4D mostram os resultados do ensaio de hipersensibilidade do tipo retardado. (A) DTH para todos os pacientes na pós-vacinação. Controlo de $2,1 \pm 0,5$ mm em relação ao peptídeo $14,0 \pm 1,4$ mm, $P < 0,0001$. (B) pré e pós-vacina DTH para pacientes NN. Não houve diferença no controlo salino versus peptídeo pré-vacinação. Pós-

vacinação, houve um aumento significativo na resposta de DTH ao péptido E75 em comparação com o controlo de pós-vacinação ($P < 0,001$) e em relação ao de pré-vacinação E75 DTH ($P < 0,001$). (C) pós-vacinação DTH por ensaio. Os pacientes NP tiveram respostas de DTH significativamente maiores em comparação aos pacientes NN ($17,3 \pm 2,4$ mm vs. $10,9 \pm 1,5$ mm, $P = 0,02$). Isto pode ser devido a uma diferença na dose total de vacina mediana no grupo NN (2000 μ g vs. 4000 μ g, $P < 0,0001$). (D) Pós-vacinação DTH por grupos de dose. Os pacientes que receberam < 6000 μ g de E75 tiveram respostas de DTH significativamente menores em comparação com os pacientes que receberam um total de 6000 μ g. ($13,3 \pm 1,9$ mm vs. $25,1 \pm 4,0$ mm, $P = 0,008$).

A Figura 5 mostra os níveis de células T CD8⁺ em pacientes de reforço. Os pacientes que receberam uma dose de reforço 6 meses após a série de vacinação primária tinham níveis significativamente mais altos de células T CD8⁺ do que os pacientes > 6 meses de vacinação primária. Entre os pacientes > 6 meses, eles demonstraram um declínio não significativo de 0,7% para 0,44% a partir dos seus próprios níveis em 6 meses de vacinação pós-primária.

A Figura 6 mostra toxicidade local e sistémica graduada. A maioria dos pacientes apresentou toxicidade local de grau 1 com apenas 2 doentes com grau 2 de toxicidade local. Mais da metade dos pacientes não tiveram toxicidade sistémica e não houve toxicidades sistémicas de grau 2 ou 3. Os onze pacientes que experimentaram o grau 1 de toxicidade sistémica incluíram (número de casos): fadiga (4), dor de cabeça (4), mialgias (3), arrepios (2), febre (2), diarreia (1), mal-estar (1), dor nos ossos (1), e artralgias (1).

A Figura 7 mostra a resposta de reforço em pacientes com falta de SRI mostrando uma tendência de aumento do número de células T CD8⁺ específicos de antígenos.

A Figura 8 mostra os pacientes que demonstram um aumento de células secretoras de IFN- γ detectados por imunoabsorvência ligada à enzima. No geral, 91% dos pacientes apresentaram aumento células T específicas do antígeno (funcionais), medido pelo ELISPOT, com 50%, mostrando um claro aumento (aumento de células secretoras de IFN- γ em $\geq 50\%$ dos ensaios).

A Figura 9 apresenta as reações locais em pacientes de reforço. Os pacientes que recebem o reforço temporalmente mais perto de terminar a sua série de vacinação primária (≤ 9 meses; barras leves) tinham significativamente maior LR do que aqueles pacientes > 9 meses da sua série de vacinação primária. Os dois grupos tiveram LR semelhante no fim da série primária (lado esquerdo). Estes dados sugerem um efeito aditivo do reforço em pacientes que receberam o reforço mais cedo e um efeito de manutenção para os pacientes que receberam o reforço posterior.

A Figura 10 mostra o aumento de LR sobre o decurso da primeira série, e ilustra que os dois grupos eram os mesmos na série inicial e que a única diferença é o tempo da série primária. O número vax 6 é diferente do último número LR anterior mostrado na Figura 7, porque alguns pacientes receberam apenas quatro inoculações. Os dois grupos eram estatisticamente idênticos em todos os pontos excepto na vacina 3 quando o grupo ≤ 9 meses foi maior (97 vs. 80, $p = 0,04$).

As Figuras 11A a Figura 11D mostram as respostas imunológicas (média \pm SE) e clínicas (taxas de recorrência e mortalidade absoluta) dos pacientes inscritos na Fase II do ensaio E75 por HER2/neu LE vs. OE.

A. resposta imune *in vitro* - tudo aumentou estatisticamente *in vitro* pré-max % células T CD8+ específicas (LE $p < 0,001$,

OE $p < 0,001$) e pacientes LE tinham aumentado a resposta máxima em comparação com pacientes OE ($p = 0,04$).

B. resposta imune *in vivo* - todas as estatísticas aumentaram *in vivo* pré-post DTHs (LE $p < 0,001$, OE $p = 0,02$).

C. taxas de recorrência - as taxas de recorrência diminuíram em pacientes LE e OE vacinados, embora não estatisticamente significativas.

D. taxas de mortalidade - pacientes LE vacinados tinham uma tendência para a diminuição das taxas de mortalidade ($p = 0,08$).

Figuras 12A a 12D mostram respostas imunológicas (média \pm SE) e clínicas (taxas de recorrência absoluta e mortalidade) de pacientes inscritos na Fase II do ensaio E75 pelo nível de expressão de HER2/neu IHC (0, 1+, 2+, 3+).

A. resposta imune *in vitro* - tudo aumentou estatisticamente *in vitro* pré-max % de células T CD8+ específicas, enquanto que apenas HER2/neu 1+ pré-longo prazo tenderam à significância ($p = 0,08$).

B. resposta imune *in vivo* - todas as estatísticas aumentaram *in vivo* pré-post DTHs (0 $p = 0,03$, $p = 1 + 0,02$, $2 + p = 0,02$, $p = 3 + 0,05$).

C. Taxas de recorrência - as taxas de recorrência foram reduzidos em todos os níveis de IHC vacinados, embora não estatisticamente significativas.

D. taxas de mortalidade - as taxas de mortalidade diminuíram em todos os níveis de IHC vacinados e foram estatisticamente significativas em pacientes vacinados HER2/neu IHC 1+ ($p = 0,04$).

As Figuras 13A e 13B mostram o ensaio de dímero e DTH por ODG vs. SDG. (A) A diferença significativa no ODG vs. SDG foi visto nos níveis de células específicas T pré-vacina médios CD8+ E75 (0,91% vs. 0,13 0,54 0,11%, $p = 0,03$). Nenhuma diferença significativa observada entre os níveis de células T CD8+ médias máximas específicas E75. A dose ideal mostrou uma tendência para um aumento na percentagem média pós vacinação mensal de células T CD8+ específicas de E75 (0,87% vs. 0,10 0,67 0,05%, $p = 0,07$). Nenhuma diferença vista no médio a longo prazo dos níveis de células CD8 + T E75 específicas entre os grupos em 6 meses. (B) resposta média ortiogonal de DTH (mm) entre o ODG vs. SDG não mostrou nenhuma diferença para o inoculo de controlo (3,0+1,1 mm vs. 2,0+0,5 mm). Resposta de DTH ao péptido foi significativamente elevada em ODG vs. SDG (21,5+2,5 mm vs. 11,3+1,3 mm, $p = 0,00021$).

A Figura 14 mostra a comparação dos índices de recorrência clínicas entre SDG e ODG. Em comparação com SDG, ODG demonstrou uma tendência de menor taxa de recidiva ($p = 0,27$), mas uma significativamente menor média de acompanhamento. No entanto, DG consistiu em pacientes mais jovens com doença significativamente mais agressiva.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Vários termos relacionados com os métodos e outros aspectos da presente invenção são usados ao longo da descrição e reivindicações. Tais termos são para serem dados o seu significado normal na técnica, a menos que indicado de outra forma. Outros termos definidos especificamente são para serem interpretados de uma forma consistente com a definição aqui proporcionada.

O termo "prevenir" refere-se a qualquer sucesso ou indícios de sucesso em prevenir a recorrência de cancro da mama/recaídas em pacientes em remissão clínica, tal como medido por qualquer parâmetro objectivo ou subjetivo, incluindo os resultados de um exame radiológico ou físico.

"Quantidade eficaz" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" são aqui usados indiferentemente, e referem-se a uma quantidade de um composto, material, ou composição, tal como aqui descrito eficaz para se conseguir um resultado biológico particular, tal como, mas não limitado a, os resultados biológicos divulgados, descritos ou exemplificados aqui. Tais resultados podem incluir, mas não estão limitados a, prevenção do cancro da mama, e, mais particularmente, a prevenção de cancro da mama recorrente, por exemplo, a prevenção da recidiva num sujeito, tal como determinado por qualquer meio apropriado na especialidade. Valor terapêutico óptimo refere-se a dose, horário e a utilização de reforços para alcançar o melhor resultado terapêutico.

"Farmaceuticamente aceitável" refere-se àquelas propriedades e/ou substâncias que são aceitáveis para o paciente de um ponto de vista farmacológico/toxicológico e para o químico farmacêutico fabricante de um ponto de vista físico/químico sobre a composição, formulação, estabilidade, aceitação pelo paciente e biodisponibilidade. "Transportador farmaceuticamente aceitável" refere-se a um meio que não interfere com a eficácia da atividade biológica do ingrediente cativo e não é tóxico para o hospedeiro ao qual é administrado.

A "imunidade de proteção" ou "resposta imunitária protetora" significa que o sujeito monta uma resposta imune ativa para um componente imunogénico de um antigénio tal como os antigénios do cancro da mama descritos e exemplificados aqui, de tal modo que, por exposição subsequente ao antigénio, o sistema imunitário do sujeito é capaz de atacar e destruir as células que expressam o antigénio, reduzindo assim a incidência de morbilidade e mortalidade de recorrência de cancro no sujeito. A imunidade protetora no contexto da presente invenção é, de preferência, mas não exclusivamente, conferida pelos linfócitos T.

O termo "cerca de", tal como aqui utilizado, quando se refere a um valor mensurável, tal como um valor, uma duração temporal e semelhantes, destina-se a englobar as variações de $\pm 20\%$ ou $\pm 10\%$, mais preferivelmente $\pm 5\%$, ainda mais preferencialmente $\pm 1\%$, e ainda mais preferivelmente $\pm 0,1\%$ do valor especificado, uma vez que tais variações são apropriados para executar os métodos divulgados.

"Peptídeo" refere-se a qualquer péptido que compreende dois ou mais aminoácidos ligados uns aos outros por ligações peptídicas ou ligações peptídicas modificadas, isto é, isósteros peptídicos. Polipeptídeo refere-se a cadeias curtas, habitualmente referidas como péptidos, oligopéptidos ou oligómeros, e a cadeias mais longas, geralmente referidas como proteínas. Os polipeptídeos podem conter outros aminoácidos além dos 20 aminoácidos codificados por genes. Os polipeptídeos incluem sequências de aminoácidos modificadas por processos naturais, tais como processamento de pós-tradução, ou por técnicas de

modificação química que são bem conhecidas na técnica. Tais modificações estão bem descritas em textos básicos e em monografias mais pormenorizadas, bem como numa volumosa literatura de investigação. As modificações podem ocorrer em qualquer lugar num polipeptídeo, incluindo a estrutura peptídica, as cadeias laterais de aminoácidos e os terminais amino ou carboxilo. Será apreciado que o mesmo tipo de modificação pode estar presente no mesmo ou em graus variáveis em vários sítios num dado polipeptídeo. Igualmente, um determinado polipeptídeo poderá conter muitos tipos de modificações. Os polipeptídeos podem ser ramificados como resultado de ubiquitinação, e podem ser cíclicos, com ou sem ramificação. Polipeptídeos cíclicos ramificados podem resultar de processos de pós-tradução naturais ou podem ser produzidos por métodos sintéticos. As modificações incluem acetilação, acilação, ADP-ribosilação, amidação, ligação covalente de flavina, ligação covalente de uma porção heme, ligação covalente de um nucleótido ou derivado de nucleótido, ligação covalente de um lípido ou derivado de lípido, ligação covalente de fosfotidilinositol, reticulação, ciclização, formação de ligações dissulfureto, desmetilação, formação de ligações cruzadas covalentes, formação de cistina, formação de piroglutamato, formulação, gama-carboxilação, glicosilação, formação de âncora GPI, hidroxilação, iodação, metilação, miristoilação, oxidação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, racemização, selenoilação, sulfatação, transferência de ARN mediada por adição de aminoácidos a proteínas, como arginilação, e ubiquitinação.

"Reforço" refere-se a uma dose de um imunogénio administrado a um paciente para aumentar, prolongar ou manter a imunidade protetora e para superar a sub-regulação

de respostas de células T mediadas por células T reguladoras.

"Livre de cancro da mama" ou "livre de doença" ou NED (Nenhuma evidência da doença) significa que o paciente está em remissão clínica induzida pelo tratamento com o padrão atual de terapias de cuidados. Por "remissão" ou "remissão clínica", que são usados como sinónimos, entende-se que os sinais clínicos, sinais radiológicos, e sintomas de cancro da mama foram significativamente diminuídos ou desapareceram inteiramente baseado em diagnósticos clínicos, embora ainda possam existir células cancerígenas no corpo. Assim, é contemplado que a remissão abrange remissão parcial e completa. A presença de células cancerosas residuais pode ser enumerada por ensaios, tais como a CTC (células tumorais circulantes) e podem ser preditivos de recorrência.

"Relapso" ou "retorno" ou "ressurgimento" são usados alternadamente aqui, e referem-se ao diagnóstico radiográfico de retorno, ou sinais e sintomas de retorno do cancro da mama após um período de melhoria ou remissão.

O cancro da mama é um importante problema de saúde para as mulheres em todo o mundo. Vacinas contra o cancro da mama que foram tentadas até agora têm sido limitadas em termos de eficácia, especialmente no que diz respeito à prevenção da recaída em pacientes livres da doença. De acordo com a presente invenção, determinou-se que a recorrência de cancro da mama em pacientes livres da doença pode ser eficazmente prevenida pela administração ao paciente de um péptido do oncogene HER2/neu, E75 (SEQ ID No: 2) sob certas

condições. Também foi inesperadamente determinado que o peptídeo E75 está associado com MHC HLA-A2 e-A3, e, assim, pode induzir uma imunidade protetora em doentes com o haplotipo HLA-A2 e-A3.

Por conseguinte, a presente invenção apresenta composições de vacina para induzir imunidade protetora contra a recaída do cancro da mama. A invenção também apresenta estas composições para utilização em métodos para induzir e manter a imunidade protetora contra o cancro da mama, e, mais particularmente, contra o cancro da mama recorrente. Em alguns aspectos, os métodos compreendem a administração a um sujeito de uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo um veículo farmacologicamente eficaz e um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID N°: 2.

O sujeito pode ser qualquer animal, e é preferivelmente um mamífero tal como um ser humano, ratinho, rato, hamster, cobaia, coelho, gato, cão, macaco, vaca, cavalo, porco, e outros semelhantes. Os seres humanos são os mais preferidos. Em aspectos altamente preferidos, os seres humanos são positivos para os haplótipos HLA-A2 ou HLA-A3. Em outros aspectos preferidos, os seres humanos são positivos para a expressão de HER2/neu humano. Os seres humanos têm baixa e/ou intermediária expressão de tumores HER2/neu.

As composições de vacina podem ser formuladas na forma de preparações liofilizadas ou de líquidos de acordo com quaisquer meios apropriados na técnica. Exemplos não limitativos de preparações de forma líquida incluem

soluções, suspensões, xaropes, e emulsões. Os veículos líquidos adequados incluem qualquer solvente orgânico ou inorgânico adequado, por exemplo, água, álcool, solução salina, solução salina tamponada, solução salina fisiológica, solução de dextrose, soluções de água propileno glicol, e outros semelhantes, preferencialmente na forma estéril.

As composições de vacina podem ser formuladas em qualquer forma neutra ou de sal. Os sais farmacêuticamente aceitáveis incluem os sais de adição de ácido (formados com os grupos amino livres dos polipeptídeos ativos) e que são formados com ácidos inorgânicos tais como, por exemplo, ácidos clorídrico ou fosfórico, ou ácidos orgânicos tais como acético, oxálico, tartárico, mandélico, e semelhantes. Os sais formados a partir de grupos carboxilo livres podem também ser derivados de bases inorgânicas tais como, por exemplo, sódio, potássio, amônio, cálcio, ou hidróxidos férricos e bases orgânicas tais como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, e semelhantes.

As composições de vacina são, de preferência formulados para a inoculação ou injeção no sujeito. Para injeção, as composições de vacina da invenção podem ser formulados em soluções aquosas, tais como água ou álcool, ou em tampões fisiologicamente compatíveis tais como solução de Hanks, solução de Ringer, ou tampão salino fisiológico. A solução pode conter agentes de formulação, tais como agentes de suspensão, conservantes, estabilizantes e/ou dispersantes. As formulações de injeção também podem ser preparadas como preparações sólidas que se destinam a ser convertidas, pouco antes da utilização, em preparações na forma líquida

adequadas para injeção, por exemplo, por reconstituição com um veículo adequado, tal como água estéril, solução salina, ou álcool, antes do uso.

As composições de vacina também podem ser formuladas em veículos de libertação sustentada ou preparações de depósito. Tais formulações de ação prolongada podem ser administradas por meio de inoculação ou de implantação (por exemplo subcutaneamente ou intramuscularmente) ou por injeção. Assim, por exemplo, as composições de vacina podem ser formuladas com materiais poliméricos ou hidrofóbicos adequados (por exemplo, como uma emulsão num óleo aceitável) ou resinas de troca iónica, ou como derivados fracamente solúveis, por exemplo, como um sal pouco solúvel. Os lipossomas e emulsões são exemplos bem conhecidos de veículos de distribuição adequados para uso como transportadores.

As composições de vacina podem compreender agentes que aumentam a eficácia protetora da vacina, tais como adjuvantes. Os adjuvantes incluem qualquer composto ou compostos que atuam para aumentar uma resposta imune protetora ao antigénio peptídeo E75, reduzindo assim a quantidade de antigénio necessária para a vacina e/ou a frequência da administração necessária para gerar uma resposta imunitária protetora. Os adjuvantes podem incluir por exemplo, emulsionantes, dipéptidos de muramilo, avridina, adjuvantes aquosos, tais como hidróxido de alumínio, os adjuvantes à base de quitosano, e qualquer dos vários óleos, saponinas e outras substâncias conhecidas na técnica, tais como Amphigen, LPS, extractos da parede de célula bacteriana, ADN bacteriano, sequências de CpG, oligonucleótidos sintéticos e as suas combinações (Schijns *et al.* (2000) *Curr. Opin. Immunol.* 12:456), extracto de parede celular de *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*) (MCWE)

(Patente US 47448«984), M. phlei ADN (M-ADN), e M-ADN-M, complexo da parede celular phlei (MCC). Os compostos que podem servir de emulsionantes incluem agentes emulsionantes naturais e sintéticos, bem como compostos aniônicos, catiónicos e não iónicos. Entre os compostos sintéticos, agentes emulsionantes aniônicos incluem, por exemplo, os sais de potássio, sódio e amónio de ácidos láurico e oleico, sais de cálcio, magnésio e alumínio de ácidos gordos, e sulfonatos orgânicos, tais como lauril sulfato de sódio. Agentes catiónicos sintéticos incluem, por exemplo, brometo de cetiltretilamónio, enquanto que os agentes não iónicos sintéticos são exemplificados por glicerilesteres (por exemplo, monoestearato de glicerilo), ésteres de polioxietileno glicol e éteres, e os ésteres de ácidos gordos de sorbitano (por exemplo, monopalmitato de sorbitano) e os seus derivados de polioxietileno (por exemplo, monopalmitato de polioxietileno sorbitano). Os agentes emulsionantes naturais incluem goma-arábica, gelatina, lecitina e colesterol.

Outros adjuvantes adequados podem ser formados com um componente oleoso, tal como um único óleo, uma mistura de óleos, uma emulsão de água-em-óleo, ou uma emulsão de óleo-em-água. O óleo pode ser um óleo mineral, um óleo vegetal ou um óleo animal. Os óleos minerais são hidrocarbonetos líquidos obtidos a partir de vaselina através de uma técnica de destilação, e são também referidos na técnica como parafina líquida, vaselina líquida, ou óleo mineral branco. Os óleos animais adequados incluem, por exemplo, óleo de fígado de bacalhau, óleo de alabote, óleo de savelha, óleo de vidrado de laranja e óleo de fígado de tubarão, todos os quais estão disponíveis comercialmente. Os óleos vegetais adequados incluem, por exemplo, óleo de canola, óleo de amêndoa, óleo de semente de algodão, óleo

de milho, azeite, óleo de amendoim, óleo de cártamo, óleo de sésamo, óleo de soja, e outros semelhantes. Adjuvante completo de Freund (FCA) e Adjuvante Incompleto de Freund (FIA) são dois adjuvantes comuns que são comumente utilizados em preparações de vacinas, e também são adequados para utilização na presente invenção. Ambos FCA e FIA são emulsões de óleo-em-água mineral; no entanto, FCA também contém um *Mycobacterium sp* morto.

Citoquinas imunomoduladoras também podem ser utilizadas nas composições de vacina para aumentar a eficácia da vacina, por exemplo, como um adjuvante. Exemplos não limitativos de tais citocinas incluem o interferão alfa (IFN- α), interleucina-2 (IL-2) e factor estimulante de colónias de granulócitos macrófagos (GM-CSF), ou suas combinações. GM-CSF é altamente preferido.

As composições de vacina compreendendo antigénios de péptidos E75 e compreendendo ainda adjuvantes podem ser preparadas utilizando técnicas bem conhecidas dos especialistas na técnica, incluindo, mas não limitadas a, mistura, sonicação e microfluidização. O adjuvante pode compreender de cerca de 10% a cerca de 50% (v/v) da composição de vacina, mais preferencialmente cerca de 20% a cerca de 40% (v/v), e mais preferivelmente cerca de 20% a cerca de 30% (v/v), ou qualquer inteiro entre estes intervalos. Cerca de 25% (v/v) é altamente preferido.

A administração das composições de vacina pode ser por infusão ou injeção (por exemplo, por via intravenosa, por via intramuscular, intracutânea, subcutânea, intratecal, intraduodenalmente, por via intraperitoneal, e similares). As composições de vacina também podem ser administradas por via intranasal, por via vaginal, por via rectal, por via oral, ou por via transdérmica. Além disso, as composições

de vacina podem ser administradas por sistemas de libertação "sem agulha". De preferência, as composições são administradas através de injeção intradérmica. A administração pode ser sob a direção de um médico ou médico assistente.

As injeções podem ser divididas em várias injeções, com essas vacinas divididas administradas de preferência substancialmente simultaneamente. Quando administrado na forma de uma inoculação dividida, a dose de imunogénio é, preferivelmente, mas não necessariamente, igualmente proporcionada em cada injeção separada. Se um adjuvante está presente na composição da vacina, a dose de adjuvante é de preferência, mas não necessariamente, igualmente proporcionada em cada injeção separada. As injeções separadas para a inoculação dividida são de preferência administradas substancialmente próximas umas das outras no corpo do paciente. Nalguns aspectos preferidos, as injeções são administradas, pelo menos, cerca de 1 cm de distância uma da outra no corpo. Nalguns aspectos preferidos, as injeções são administradas, pelo menos, cerca de 2,5 cm de distância uma da outra no corpo. Em aspectos altamente preferidos, as injeções são administradas, pelo menos, cerca de 5 cm de distância uma da outra no corpo. Em alguns aspectos, as injeções são administradas, pelo menos, cerca de 10 cm de distância uma da outra no corpo. Em alguns aspectos, as injeções são administradas mais de 10 cm de distância uma da outra no corpo, por exemplo, pelo menos cerca de 12,5. 15, 17,5, 20, ou mais cm de distância uma da outra no corpo. As injeções de imunização primária e injeções de reforço podem ser administradas como uma inoculação dividida, tal como descrito e exemplificado aqui.

Vários sistemas de libertação farmacêuticos alternativos podem ser empregues. Exemplos não limitativos de tais sistemas incluem os lipossomas e emulsões. Certos solventes orgânicos tais como dimetilsulfóxido, também podem ser empregues. Além disso, as composições de vacina podem ser entregues usando um sistema de libertação sustentada, tal como matrizes semipermeáveis de polímeros sólidos contendo o agente terapêutico. Os vários materiais de libertação disponíveis são bem conhecidos pelos peritos na técnica. As cápsulas de libertação sustentada podem, dependendo da sua natureza química, libertar as composições de vacina ao longo de um intervalo de vários dias a várias semanas a vários meses.

Para evitar a recorrência do cancro da mama num paciente que está em remissão do cancro da mama, uma quantidade terapêuticamente eficaz da composição de vacina é administrada ao sujeito. Uma quantidade terapêuticamente eficaz irá proporcionar um aumento clinicamente significativo do número de linfócitos T citotóxicos específicos E75 ($CD8^+$) no paciente, bem como um aumento clinicamente significativo na resposta de linfócitos T citotóxicos contra o antigénio, como medida por qualquer meio adequado na técnica. No paciente, em geral, uma quantidade terapêuticamente eficaz da composição de vacina irá destruir a doença residual microscópica e reduzir ou eliminar o risco de recorrência do cancro da mama no paciente de forma significativa.

A quantidade eficaz da composição de vacina pode ser dependente de um número de variáveis, incluindo, sem limitação, espécie, raça, tamanho, altura, peso, idade, saúde geral do paciente, tipo de formulação, modo ou forma de administração ou presença ou ausência de fatores de risco que aumentam significativamente a probabilidade de

que o cancro da mama se repita no paciente. Tais factores de risco incluem, mas não se limitam ao tipo de cirurgia, estado dos gânglios linfáticos e do número positivo, tamanho do tumor, grau histológico do tumor, presença/ausência de receptores hormonais (receptores de estrogénio e progesterona), expressão HER2/neu, invasão linfática e predisposição genética (BRCA 1 e 2). Nalguns aspectos preferidos, a quantidade eficaz é dependente de se o paciente é linfonodo positivo ou linfonodo negativo, e se o paciente é linfonodo positivo, o número e grau dos nódulos positivos. Em todos os casos, a quantidade efetiva apropriada pode ser determinada rotineiramente pelos peritos na técnica utilizando técnicas de optimização de rotina e o julgamento qualificado e informado do praticante e outros factores evidentes para os peritos na técnica. De preferência, uma dose terapêuticamente eficaz das composições de vacina aqui descritas irá fornecer o benefício terapêutico preventivo sem causar toxicidade substancial para o sujeito.

A toxicidade e a eficácia terapêutica das composições de vacina podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas celulares ou animais experimentais, por exemplo, para a determinação da DL50 (a dose letal para 50% da população) e a ED50 (a dose terapêuticamente eficaz em 50% da população). A razão de doses entre os efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e pode ser expresso como a razão LD50/ED50. As composições de vacina que exibem índices terapêuticos grandes são preferidas. Os dados obtidos a partir de ensaios de cultura de células e estudos em animais podem ser utilizados na formulação de uma gama de dosagem para utilização em pacientes. A dosagem de tais composições de vacina situa-se preferencialmente dentro de uma gama de

concentrações que inclui a ED50 com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro desta gama dependendo da forma de dosagem empregue e da via de administração utilizada.

Informação sobre a toxicidade pode ser utilizada para determinar com maior precisão as doses úteis em um determinado sujeito, tal como um humano. O médico assistente pode terminar, interromper ou ajustar a administração devido a toxicidade, ou a disfunções orgânicas, e pode ajustar o tratamento conforme necessário, se a resposta clínica não for adequada, para melhorar a resposta. A magnitude de uma dose administrada na prevenção do cancro da mama recorrente irá variar com a gravidade da condição do paciente, o risco relativo de recidiva, ou a via de administração, entre outros factores. A gravidade da condição do paciente pode, por exemplo, ser avaliada, em parte, por métodos de avaliação de prognóstico padrão.

As composições de vacina podem ser administradas a um paciente em qualquer calendário adequado para induzir e/ou manter a imunidade protetora contra a recaída do cancro da mama, e, mais especificamente, para induzir e/ou manter uma resposta de linfócitos T citotóxicos a E75 (SEQ ID N°: 2). Por exemplo, aos pacientes pode ser administrada uma composição de vacina como uma imunização primária como aqui descrito e exemplificado, seguido por administração de uma dose de reforço para reforçar e/ou manter a imunidade protetora.

Em alguns aspectos, aos pacientes podem ser administradas as composições de vacina de 1, 2 ou mais vezes por mês. Uma vez por mês, durante seis meses consecutivos é preferida para determinar a resposta imunitária protetora, em particular no que diz respeito ao esquema de imunização

primária. Em alguns aspectos, os reforços podem ser administradas em intervalos regulares, como a cada 6 ou mais meses após o término do esquema de vacinação primária. A administração do reforço é de preferência a cada 6 meses. Os reforços também podem ser administrados numa base de quando necessário.

O esquema de administração de vacina, incluindo a imunização primária e a administração de reforço, pode continuar enquanto for necessário para o paciente, por exemplo, ao longo de vários anos, ao longo do tempo de vida do paciente. Em alguns aspectos, o esquema de vacina inclui uma administração mais frequente no início do esquema de vacina, e inclui a administração menos frequente (por exemplo, reforços) ao longo do tempo para manter a imunidade protetora.

A vacina pode ser administrada em doses mais baixas no início do esquema de vacina, com as doses mais elevadas administradas ao longo do tempo. As vacinas também podem ser administradas em doses mais elevadas no início do regime de vacinação, com doses mais baixas administradas ao longo do tempo. A frequência da vacina e administração de reforço primária e da dose de E75 administrado pode ser adaptado e/ou ajustado para satisfazer as necessidades específicas de cada paciente, conforme determinado pelo médico assistente de acordo com qualquer meio adequado na técnica.

Em alguns aspectos, as composições de vacina, incluindo composições para administração como uma dose de reforço, compreendem entre cerca de 0,1 mg a cerca de 10 mg de peptídeo E75. Nalguns aspectos preferidos, as composições compreendem cerca de 0,5 mg de E75. Nalguns aspectos preferidos, as composições compreendem cerca de 2 mg de

E75. Nalguns aspectos preferidos, as composições compreendem cerca de 1 mg de E75.

Nalguns aspectos preferidos, as composições de vacina compreendendo E75, incluindo composições para administração como uma dose de reforço, compreendem, ainda, GM-CSF. Tais composições compreendem, preferencialmente, cerca de 0,01 mg a cerca de 0,5 mg de GM-CSF. Nalguns aspectos preferidos, as composições compreendem cerca de 0,125 mg de GM-CSF. Nalguns aspectos preferidos, as composições compreendem cerca de 0,25 mg de GM-CSF.

Em alguns aspectos particularmente preferidos, as composições de vacinas compreendem 1 mg de peptídeo E75 e 0,125-0,250 mg de GM-CSF num volume total de 1 ml, e são administradas mensalmente como uma inoculação dividida de 0,5 ml cada, administradas por injeções afastadas cerca 5 cm cada sobre o corpo do paciente, e administradas simultaneamente ou em misturas. O esquema de administração é de preferência mensalmente, durante seis meses. Depois de um período de cerca de 48 horas, o local da injeção pode ser avaliada por reação local do eritema e endurecimento. Se as reações de ambos os locais são confluentes e o âmbito das medidas totais de endurecimento > 100 mm (ou o paciente experimenta qualquer grau 2 de toxicidade sistêmica), em seguida, a dose de GM-CSF pode ser reduzida, por exemplo, para metade, embora se pretenda que a dose de péptido permaneça a mesma. Se o paciente apresentar uma reação forte em doses subsequentes, em seguida, uma maior redução de GM-CSF pode ocorrer, por exemplo, reduzir para metade. Se o paciente não apresenta reação forte, em seguida, o paciente pode continuar com a dose mais elevada de GM-CSF. Em alguns aspectos, o esquema de administração e dosagem do reforço é igualmente determinado, com reforços começando com a administração de composições de vacina compreendendo

1 mg de E75 e 0,25 mg GM-CSF, administrado a cada seis meses após a conclusão do esquema primário de imunização da vacina.

Os seguintes aspectos exemplares de exemplos específicos para levar a cabo a presente invenção são oferecidos apenas para fins ilustrativos, e não se destinam a limitar o âmbito da presente invenção de qualquer forma.

EXEMPLO 1

Seleção de Pacientes

Os ensaios nódulo positivo (NP) e nódulo negativo (NN) foram aprovados pelos Conselhos de Revisão Institucional local e conduzidos no Walter Reed Army Medical Center, Washington, DC e Joyce Murtha Breast Care Center, Windber, PA sob uma nova investigação da aplicação do fármaco (BB-IND#9187). Todos os pacientes apresentavam cancro da mama histologicamente confirmado (BCA), e completaram um curso padrão de cirurgia, quimioterapia e radioterapia (se necessário) antes da inscrição. Pacientes em terapia hormonal foram continuados no seu regime específico. Depois de aconselhamento e consentimento adequado, os pacientes BCa foram inscritos para o ensaio apropriado (NP ou NN) e depois HLA digitado, uma vez que E75 se liga principalmente a HLA-A2 encontrada em cerca de 40-50% da população em geral. Os pacientes HLA-A2⁺ foram vacinados, e os pacientes HLA-A2⁻ foram observados prospectivamente para a recorrência clínica. Os pacientes HLA-A3⁺ foram incluídos num estudo paralelo com os pacientes A2 e tratados na posologia ativa no momento da inscrição. Antes da vacinação, a pele dos pacientes foi testada com um painel de antígenos de memória (papeira, tétano, e *Candida*). Os

pacientes foram considerados imunocompetentes se reagiram (> 5 mm) a > 2 antígenos.

Um total de 186 pacientes foi incluído em ambos os testes de vacinas E75 (NP = 95, NN = 91), que estavam livres da doença após a terapia padrão, mas com alto risco de recorrência. Depois de HLA-A2⁺, e mais tarde HLA-A3⁺, os doentes (n = 101) foram vacinados (49 NP e 52 NN, 90 HLA-A2⁺ e 11 HLA-A3⁺). Todos os outros pacientes (n = 85) foram divididos para observação. Cinco pacientes vacinados e quatro de observação foram retirados do estudo, embora nenhum deles devido à toxicidade. Portanto, 96 pacientes vacinados e 81 pacientes de observação estavam disponíveis para análise. Demografia e factores de prognóstico para ambos os grupos estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Demografia e factores de prognóstico para pacientes vacinados e de observação

	Vaccinated, HLA-A2 ⁺ , A3 ⁺ (n=96) [†]	Observed, HLA-A2 ⁺ , A3 ⁺ (n=81) [‡]	P
Median age, years	58.9	55.1	0.33
Range, years	32-80	34-87	
Race			0.12
White, %	89.6	81.5	
Other, %	10.4	18.5	0.20
Tumor size			
T1, %	69.8	60.5	0.20
T2-T4, %	30.2	39.5	
Histological grade			0.50
I-II, %	64.5	59.5	
III, %	35.5	40.5	0.19
Node-positive, %	48.9	56.8	
Median + nodes (NP only)	2.0	2.5	0.17
Range	1-25	1-15	
HER2/neu IHC 3+ or FISH +, %	25.6	28.4	0.32
Hormone receptor negative, %	31.6	17.3	
XRT, %	71.9	80.2	0.20

	Vaccinated, HLA-A2 ⁺ , A3 ⁺ (n=96) [†]	Observed, HLA-A2 ⁺ , A3 ⁺ (n=81) [‡]	P
Chemoprevention, %	65.6	78.8	0.05
Adjuvant Herceptin, %	5.2	3.7	0.60
[†] 101 patients enrolled to vaccine arm, 2 switched to observation, 1 withdrew for adjuvant trastuzumab, 1 due to an extended unrelated illness, and 1 patient for personal reasons. [‡] 85 patients enrolled to observation arm, 2 lost to follow-up and 4 withdrew for our MHC II peptide vaccine trial. Two patients were gained from the vaccine arm.			

Os dois grupos foram equivalentes na maioria das categorias de prognóstico padrão. No entanto, mais pacientes vacinados foram hormona-receptor negativo, e, por conseguinte, menos pacientes no grupo da vacina estavam em terapia hormonal adjuvante. Ao olhar para os estudos individuais, os pacientes mais vacinados no ensaio NN comparados com os controlos tinham tumores sobre-expressando HER2/neu (25,0% vs. 7,1%, $P < 0,05$), e menos receberam radioterapia adjuvante (64,7% vs. 85,7%, $P < 0,05$).

Durante os ensaios, foi determinado que E75 pode ser usado em pacientes HLA-A3⁺ com base nos dados de afinidade obtidos a partir de dois algoritmos de ligação ao péptido de ligação HLA comumente utilizados: BIMAS (SEQ ID N°: 3) e SYFPEITHI (SEQ ID N°: 4). Além disso, a avaliação pré-clínica demonstrou que HLA-A3⁺ CTL estimulada por E75 pode lisar as células cancerosas HLA-A3⁺ expressas por HER2/neu (não mostrados).

Embora não tenha havido diferença no estado nodal do subconjunto de HLA-A3 em relação ao subconjunto de HLA-A2 (54,5% versus 45,9%, $P = 0,59$), que tendem a ter tumores menores (90,9% vs. 65,7% T1, $P = 0,08$), foram menos propensos a ter tumores hormonalmente insensíveis (18,2% vs. 29,6%, $p = 0,4$), e tiveram menos tumores com super-expressão de HER2/neu (0% vs. 31,5%, $p = 0,028$).

EXEMPLO 2

Vacinação e Protocolo Clínico

O peptídeo E75 foi produzido comercialmente em boas práticas de fabricação por NeoMPS, Inc. (San Diego, CA). A pureza do péptido (> 95%) foi verificada por cromatografia líquida de alto desempenho e espectrometria de massa, e o teor de aminoácidos foi determinado por análise de aminoácidos. A esterilidade e segurança geral do teste foram realizadas pelo fabricante. O péptido liofilizado foi reconstituído em solução salina estéril a 100 µg, 500 µg, ou 1000 µg em 0,5 ml. No momento da administração, o peptídeo foi descongelado e misturado com GM-CSF (Berlex, Seattle, WA), em 0,5 mL, e o 1,0 ml de inoculação foi dividida e administrada por via intradérmica, em dois locais afastados 5 cm. Todas as vacinas foram dadas na mesma extremidade.

Séries de Vacinação. O estudo NP foi concebido como um processo de dois estágios com doses crescentes de peptídeo na fase inicial e as alterações de calendário na segunda fase. Detalhes da série da vacina foram previamente publicados (Peoples GE et al. (2005) J. Clin. Oncol. 23:7536-45). Resumidamente, 3-6 pacientes (HLA-A2⁺ ou HLA-A3⁺) foram designados para receber quatro ou seis injeções mensais de 100 µg, 500 µg ou 1000 µg de E75 (100,6, 500,4, 500,6, 1000,4 e 1000,6, respectivamente) (Tabela 2). Os grupos foram finalmente expandido, a fim de determinar e confirmar a dosagem óptima em doentes NP, representando o grande número de pacientes nos grupos de dose deste último.

Tabela 2. Ensaios para NP e NN

Patient Group	No. of patients HLA-A2* (A3*)	Peptide dose † (µg)	GM-CSF dose† (µg)	Months vaccinated‡
<i>Node-positive</i>				
100.6	2*	100	250	0,1,2,3,4,5
500.4	6	500	250	0,1,2,5
500.6	6	500	250	0,1,2,3,4,5
1000.4	9 (2)	1000	250	0,1,2,5
1000.6	16 (4)	1000	250	0,1,2,3,4,5
<i>Node-negative</i>				
500.125.3	10	500	125	0,1,5
500.125.4	10	500	125	0,1,2,5

<i>Node-negative</i>				
500.250.4	10 (3)	500	250	0,1,2,5
500.250.6	10 (2)	1000	250	0,1,2,3,4,5
1000.250.6	6	1000	250	0,1,2,3,4,5
Total	85 (11)			
†Peptide was suspended in 0.5 ml sterile saline and combined with GM-CSF and sterile saline to final volume of 1.0 ml per inoculation.				
‡Vaccines were administered every 3-4 weeks.				
*One patient assigned to 100.6 group withdrew and no replacement at that dose group was designated.				

O ensaio NN foi concebido para explicar ainda mais a dosagem biológica ótima, variando a dose de GM-CSF e alterando a programação da inoculação. Foram autorizados neste estudo pacientes com tumores que não expressavam HER2/neu para determinar a viabilidade de vacinar um hospedeiro presumivelmente ingênuo ao antígeno. Dez pacientes foram designados para cada grupo de dose para receber três, quatro ou seis injeções mensais ao longo de cinco meses (Tabela 2).

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Isolamento e Culturas. Foi colhido sangue antes de cada vacinação e uma vez (pós-vacina) e seis meses (de longo prazo) após a conclusão da série de vacinas. 50 ml de sangue foi tirado e PBMC foram isoladas. As PBMC foram lavadas e re-suspensas em meio de cultura e utilizadas como uma fonte de linfócitos.

Toxicidade. Os pacientes foram observados uma hora após a vacinação para hipersensibilidade imediata e voltaram 48-72 horas depois de ter os seus locais de injeção medidos e questionados sobre toxicidades. As toxicidades foram classificadas por NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events, v3.0 e relatados numa escala de 0-5. A progressão de um grupo de dose para o seguinte ocorreu apenas se nenhuma toxicidade significativa foi observada no grupo de dose mais baixa. Resultados específicos para cada paciente foram registados com base na toxicidade local e sistémica máxima ocorrida durante a série.

As toxicidades locais e sistémicas foram leves, e todos os pacientes completaram a série de vacinas. As toxicidades locais foram de grau 1 (81%) e grau 2 (19%). A toxicidade sistémica foi mínima: grau 0 (12%), grau 1 (71%), grau 2 (14%) e grau 3 (2%) (Figura 1) sem toxicidades sistémicas de grau 4 ou 5 observadas. Uma vez que as toxicidades observadas são consistentes com GM-CSF, uma redução da dose de 50% de GM-CSF foi instituído em caso de reações locais ou sistémicas significativas (18,7% dos pacientes).

Os perfis de toxicidade foram os mesmos em pacientes A3 como os seus homólogos A2: máxima toxicidade local de grau 1 (82%) e grau 2 (18%) para os dois grupos. Toxicidade sistémica máxima (A3 vs. A2): grau 0 (0% vs. 15%), grau 1 (92% vs. 68%), grau 2 (8% vs. 14%) e grau 3 (0% vs. 2%, $p = 0,4$). As respostas locais de pacientes A3 foram idênticas aos pacientes A2 dentro dos respectivos grupos de dose. Assim, não houve nenhuma diferença no perfil de toxicidade entre os pacientes HLA-A3⁺ em comparação com os pacientes a HLA-A2⁺, e as reações locais foram também robustas. A toxicidade local DE Grau 2 foi de 20% contra 18%,

respectivamente, sugerindo semelhante imunogenicidade *in vivo*.

Recorrências clínicas. Todos os pacientes foram observados por recorrência clínica por padrão de rastreamento do cancro como ditado pela oncologista primário do paciente. A paciente foi considerada recorrente se houve biopsia comprovada ou se tratada de recorrência pela equipa de oncologia primária.

Por projeto do protocolo, a análise preliminar foi iniciada em 18 meses de mediana de acompanhamento. Na conclusão dessa análise, 171 pacientes haviam sido inscritos, e a taxa de recorrência no grupo vacinado foi de 5,6% em comparação com 14,2% no grupo de observação ($P = 0,04$) num seguimento médio de 20 meses. As taxas de sobrevida livre de doença nos grupos vacinados e de controlo foram de 92,5% e 77%, respectivamente (Figura 2). Houve quatro mortes no grupo de observação (sobrevida global [OS] 95,1%) em comparação com apenas um óbito no grupo vacinado (OS 99%, $P = 0,1$).

O acompanhamento de ambos os ensaios foi prorrogado por cinco anos, apesar do enfraquecimento da imunidade e da falta de uma inoculação de reforço no projeto do protocolo. Uma análise atualizada documentou recorrências adicionais em ambos os grupos, incluindo uma recidiva tardia no grupo da vacina aos 58 meses. Num seguimento médio de 26 meses, houve 186 pacientes inscritos, e a taxa de recorrência foi de 8,3% no grupo da vacina em comparação com 14,8% no grupo de observação ($P = 0,15$). Houve uma distribuição diferente de recorrências entre estes pacientes. A recorrência óssea

só foi responsável por 50% das recidivas nos pacientes do grupo de controlo (6/12) e 0% dos pacientes recorrentes vacinados ($P = 0,04$).

Entre os pacientes HLA A3⁺, a taxa de recorrência é semelhante à dos pacientes HLA-A2⁺ (9,1% versus 8,2%).

Análise Estatística. Taxas de recorrência foram comparadas entre os grupos por meio de análise de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier, e a proporção de indivíduos que apresentaram a recorrência comparados por análise de classificação. Os valores de P para os fatores clínico-patológicos foram calculados utilizando Wilcoxon, teste exato de Fisher ou χ^2 conforme o caso. Os valores de P para comparar os níveis de dímero pré-vacinação e pós-vacinação foram calculados utilizando Wilcoxon e para DTH usando o teste t de Student.

EXEMPLO 3

HLA-A2: Ensaio de dímero de imunoglobulina

A presença de células específicas T CD8⁺ E75 em PBMC isoladas de fresco a partir de pacientes foi avaliada diretamente por meio de um ensaio de dímero. Em resumo, o dímero de imunoglobulina (Ig) HLA-A2 (PharMingen, San Diego, CA) foi carregado com o péptido E75 ou de controlo (E37, proteína de ligação a folato (25-33) RIAWARTEL (SEQ ID N°: 5)) pela incubação de 1 μ g de dímero com um excesso (5 μ g) de péptido e 0,5 μ g de β 2-microglobulina (Sigma, St. Louis, MO) a 37°C durante a noite, em seguida, armazenado a 4°C até ser utilizado. PBMC foram lavadas e re-suspensas em tampão de coloração PharMingen (PharMingen) e acrescentadas a 5×10^5 células/100 μ l/tubo em tubos de

poliestireno de fundo redondo de 5 ml (Becton Dickinson, Mountain View, CA) e coradass com os dímeros e anticorpos carregados. Em cada paciente, o nível de células CD8⁺ E75 específicas foi determinado em resposta a cada vacinação sucessiva e todas as medições de pós-inoculação foram ponderadas para cada paciente e comparadas com os seus níveis de pré-inoculação.

CTL E75 específicos foram avaliados em fresco *ex vivo* PMBC pelo ensaio de dímero antes de cada vacinação e ao mesmo (pós-vacinação) e seis meses (a longo prazo). O teor de dímero tem sido mostrado previamente para correlacionar com os ensaios imunitários funcionais (citotoxicidade e secreção de citocinas) (Peoples GE et al. (2005) J. Clin. Oncol. 23:7536-45). Um padrão de aumento CD8⁺ CTL específico de E75- foi observado durante a série de vacinas, com um pico e, em seguida, recuando para um patamar de conclusão.

As respostas do dímero cumulativas para todos os pacientes são mostradas na Figura 3A. Houve um aumento estatisticamente significativo nas células CD8⁺ E75 específicas mediana de pré-vacinação para pós-vacinação e para os níveis de pico. Níveis de longo prazo não foram diferentes em relação aos níveis pré-vacinação. Apenas 48,3% dos pacientes mantiveram a imunidade residual significativa (definida como dímero > 0,5) seis meses após a vacinação.

A imunidade pré-existente ao E75 (definida como dímero > 0,3) foi encontrada em 42,7% dos doentes (**Figura 3B**). O mesmo padrão de resposta do dímero foi consistente,

independentemente dos níveis iniciais de dímero. Entretanto, os pacientes que não tinham imunidade pré-existente tiveram um aumento significativo nos seus níveis de dímero de longo prazo.

EXEMPLO 4

Hipersensibilidade retardada

Em ambos os ensaios, uma reação DTH foi avaliada com 100 µg de E75, em 0,5 ml de solução salina normal (sem GM-CSF) e 0,5 ml de solução salina normal como controlo do volume, um mês após a conclusão da série de vacina tal como anteriormente descrito (Peoples GE et al. (2005) J. Clin. Oncol. 23:7536-45). A reação de DTH foi medida em duas dimensões em 48-72 horas utilizando o método sensível esferográfica-caneta e relatados como a média ortogonal em relação ao controlo. No ensaio NN, uma DTH também foi realizada pré-vacinação.

Resposta imune in Vivo. Para medir a eficácia da vacina *in vivo*, a DTH pós-vacina foi medida um mês após a conclusão da série de vacinas com 100 µg de E75 injetado por via intradérmica com um controlo de volume de solução salina. Entre todos os pacientes vacinados, 74% tinham uma DTH pós-vacina positiva com um endurecimento médio de E75 de $14,0 \pm 1,4$ mm em relação ao controle $2,1 \pm 0,5$ mm ($P < 0,0001$) (Figura 4A).

Os pacientes NN tiveram uma DTH pré-vacina, bem como uma DTH pós-vacina (Figura 4B). Na pré-vacinação, não houve diferença de DTH entre E75 e controlo. Na pós-vacinação, a resposta DTH para E75 foi estatisticamente maior do que o controlo, e a DTH de E75 foi significativamente diferente na pós-vacinação em relação à pré-vacinação ($10,9 \pm 1,5$ mm vs. $2,8 \pm 0,8$ mm, $P < 0,0001$).

Os pacientes NP tiveram uma resposta DTH de E75 na pós-vacinação maior do que os pacientes NN (Figura 4C), uma diferença provavelmente devido aos pacientes NN terem recebido quantidades muito menores de E75 globais. Avaliando as respostas de DTH como uma função da dose, os pacientes que receberam 6000 µg de E75 tiveram uma reação DTH significativamente maior em comparação com os pacientes que receberam <6000 µg de péptido ($25,1 \pm 4,0$ mm vs. $13,3 \pm 1,9$ mm, $P = 0,008$) (Figura 4D).

Os pacientes HLA-A3⁺ tiveram DTH pós-vacinação comparável para os HLA-A2⁺ ($10,5 \pm 2,7$ mm vs. $15,1 \pm 1,9$ mm, $P = 0,38$).

EXEMPLO 5

ENSAIO ELISPOT HLA-A3⁺

A resposta vacinal para pacientes HLA-A3⁺ também foi avaliada pelo interferão γ-ELISPOT específico para E75. Por ELISPOT, os pacientes A3 demonstraram uma gama de 0-30 manchas/10⁶ células na linha de base que aumentou para uma gama de 3-448 manchas/10⁶ células pós-vacinação, $p = 0,04$. Mais importante ainda, as recidivas clínicas foram as mesmas em ambos os grupos (A3, 9,1% vs. A2, 8,2%) e em comparação com 14,8% no grupo de controlo.

EXEMPLO 6

VACINA DE REFORÇO DO CANCRO DA MAMA

Pacientes. Os ensaios NP e NN foram aprovados na Institutional Review Boards local e realizados no Walter Reed Army Medical Center (WRAMC), Washington DC e no Joyce Murthe Breast Care Center, Windber, PA. Estes ensaios clínicos estão a ser conduzidos sob a investigação de uma aplicação nova de um fármaco (BB-IND#9187) aprovado pela

Food and Drug Administration. Todos os pacientes apresentavam cancro da mama histologicamente confirmado, tinham completado a terapia padrão, estavam livres de doença e imunocompetentes no momento da inscrição inicial. Os pacientes HLA-A2⁺ e HLA-A3⁺ foram vacinados com doses variadas de E75 e GM-CSF e em programações variadas ao longo de um período de seis meses, como estabelecido nos exemplos anteriores. Aos pacientes foi oferecida uma dose de reforço opcional de E75 (1 mg) + GM-CSF (0,250 mg) se estivessem, pelo menos, seis meses após a conclusão da sua série de vacinação primária.

25 pacientes receberam uma dose de reforço (Tabela 3). Pouco mais da metade (56%) tinha cancro da mama NP. O tempo médio de vacinação prévia foi de 12 meses (variação de 6-24 meses). Os pacientes foram avaliados como pacientes no início do reforço (EB) se receberam o reforço 6 meses após a série primária ou pacientes de reforço final (LB) se fossem > 6 meses a partir da série primária.

Tabela 3. Demografia dos pacientes	
	Pacientes (n=25)
Idade, média (anos)	56 (faixa 31-76)
≥ T2	28%
Nódulo positivo	56%
Grau 3	32%
ER-PR-	28%
Sobre-expressão HER/neu	20%
Tempo após a primeira terapia padrão (meses)	33 (9-200)
Tempo após a primeira série de vacinas (meses)	12 (6-24)

A imunidade a E75 específica residual diminuiu ao longo do tempo, como medido por HLA-A2: dímeros de IgG. O nível médio de células T CD8+ no grupo EB (n = 6) foi de 1,4% (gama de 0,61-3,43%) em comparação com o grupo de LE (n = 13) (0,44%, 0-2,67%, p = 0,02). Para os pacientes LB, o nível mediano de dímero de 6 meses após a primeira série foi de 0,70% (0,19%-1,55%). Esta não foi estatisticamente diferente em relação aos níveis de dímero dos pacientes EB a 6 meses (Figura 5).

Reforço da vacina. O peptídeo E75 foi produzido comercialmente em boas práticas de fabricação por NeoMPS (San Diego, CA). A pureza do peptídeo foi verificada por cromatografia líquida de alto desempenho e espectrometria de massa, e o teor de aminoácidos foi determinado por análise de aminoácidos. O péptido foi purificado para mais

do que 95%. Os testes de esterilidade e segurança geral foram realizados pelo fabricante. O péptido liofilizado foi reconstituído em solução salina estéril a uma concentração de 1000 µg em 0,5 mL. O péptido foi misturado com GM-CSF (Berlex, Seattle, WA), em 0,5 mL, e o 1,0 ml de inoculação foi dividida e administrada por via intradérmica, em dois locais afastados 5 cm cada. A vacinação de reforço foi dada na mesma extremidade como a série primária.

Toxicidade. Os pacientes foram observados 1 hora após a vacinação para reações de hipersensibilidade imediata. As toxicidades foram classificadas pelos NCI Common Toxicity Criteria for Adverse Events, v3.0 e relatados numa escala de 0 a 5. Os pacientes que já tinham tido toxicidade local ou sistêmica significativa (grau 2 ou 3) receberam uma dose reduzida de GM-CSF a 0,125 mg.

A dose de reforço foi muito bem tolerada (Figura 6) principalmente com toxicidade local de grau 1 (um efeito desejado). Mais da metade dos pacientes não tinha queixas sistêmicas. Não houve toxicidades de grau 3 ou 4. Apenas um paciente (4%) apresentou toxicidade de grau superior durante o reforço do que durante a série primária (grau 2 inflamação local).

Isolamento de células mononucleares de sangue periférico de e culturas. Sangue foi tirado antes da vacinação de reforço, e de 3 a 4 semanas após a administração de reforço para isolar as células mononucleares do sangue periférico em tubos Vacutainer CPT, e utilizado como uma fonte de linfócitos.

HLA-A2: Ensaio de dímero de imunoglobulina. A presença de células CD8⁺ de E75 específico em PBMC isolado de fresco a partir de pacientes foi avaliada diretamente utilizando o

ensaio de dímero descrito no Exemplo 3 acima. Resumidamente, o HLA-A2: imunoglobulina (Ig) de dímero (Pharmingen, San Diego, CA), foi carregado com o péptido E75 ou de controlo (peptídeo da proteína de ligação de folato E37 (25-33) RIAWARTEL (SEQ ID N°: 5)) por incubação de 1 µg de dímero com um excesso (5 µg) de péptido e 0,5 µg de β2-microglobulina (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) a 37°C durante a noite, em seguida, armazenada a 4°C até ser utilizada. As PBMC foram lavadas e re-suspensas em tampão de mancha PharMingen (Pharmingen, San Diego, CA) e foram adicionadas, a 5×10^5 células/100µl/tubo, em tubos de poliestireno de fundo redondo de 5 ml (Becton Dickinson, Mountain View, CA) e coradas com os dímeros e anticorpos carregados. Em cada um dos pacientes HLA-A2⁺, o nível de células CD8⁺ de E75 específico foi determinada antes e depois do reforço da vacina.

Os antigénios específicos das células T CD8⁺ foram quantificados antes e 3-4 semanas após a vacinação de reforço. Imunidade residual significativa (SRI, definida como específica do antigénio das células T CD8⁺ $\geq 0,5\%$) foi significativamente diferente nos dois grupos, a 100% (6/6) em pacientes EB comparado com 30,8% (4/13) dos pacientes LB ($p = 0,01$). Entre os pacientes a que falta SRI ($n = 8$), houve uma tendência de aumento de E75 específico nas células T CD8⁺ (Figura 7) de 0,43% (0-0,49%) a 0,87% (0-2,3%, $p = 0,08$).

Ensaio de ligação a enzimas imuno-manchadas. Células produtoras de IFN-γ foram detectadas utilizando o kit BD ELISPOT imediatamente (*ex vivo*) ou após a incubação de 7 dias com péptidos. PBMC frescas foram semeadas em placa de ELISPOT a uma concentração de 5×10^5 células (*ex vivo*) ou 1×10^5 (7 dias) por poço em meio contendo IL-7 (*ex vivo*) ou

em meio com e sem IL-7 (7 dias). As células foram estimuladas durante 16 horas (*ex vivo*) ou 7 dias na presença ou ausência de péptidos (E37, FluM, E75, GP2, HER2/neu 1 µg ou 5 µg). Incubações adicionais nos poços 7-dias incluíram a combinação de E75 + HER2/neu 1 µg ou 5 µg. Um total de 16 ensaios foi realizado em cada amostra de sangue, desde que células suficientes estivessem disponíveis. No final da incubação, as placas foram desenvolvidas conforme as instruções do fabricante. Um anticorpo de detecção biotinilada foi adicionado, e as placas foram incubadas durante a noite a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas, foi adicionada uma solução de avidina-HRP durante 1 hora, e as manchas desenvolvidas usando uma solução de substrato AEC. As manchas foram contadas utilizando o analisador Immunospot Series 2 e software Immunospot.

Todos os pacientes tinham células produtoras de IFN-γ quantificadas antes e após a vacinação de reforço em até 16 ensaios diferentes, dependendo da disponibilidade de PBMC de uma única colheita de sangue. Vinte e dois pacientes tiveram pelo menos um teste pré e pós-reforço emparelhado ELISPOT (mediana de 10 ensaios por paciente, faixa de 1-14). Entre esses pacientes, houve 255 ensaios no total de pré-reforço, dos quais 54,5% mostraram produção de IFN-γ detectável. Entre 194 ensaios emparelhados (amostras de pré e pós-reforço do mesmo paciente com a mesma concentração de peptídeo), 78 (40,2%) apresentaram aumento da produção de células IFN-γ com reforço. No total, 20/22 (91%) dos pacientes mostraram um aumento de células produtoras de IFN-γ em pelo menos um ensaio e 11 (50%) apresentaram aumento de células produtoras de IFN-γ, em,

pelo menos, 50% dos ensaios. Os resultados são mostrados na Figura 8.

Reações locais. Reações locais (LR) foram medidas como uma avaliação funcional da resposta *in vivo*. LR foram medidas 48-72 horas pós-vacinação e medidas em duas direções e relatadas como uma ortogonal média \pm SE usando o método sensível de ponto de bola. LR foram comparadas com as LR anteriores do próprio do paciente para avaliar a resposta ao reforço.

Os pacientes que receberam o reforço ≤ 9 meses ($n = 12$) da sua série principal tiveram LR significativamente maiores (103 ± 7 mm) do que os pacientes > 9 meses ($n = 13$) da série primária (79 ± 4 mm, $p = 0,01$). Não houve diferença entre os dois grupos, quando comparados com o fim da série principal (≤ 9 meses 81 ± 5 mm; > 9 meses 85 ± 8 mm, $p = 0,73$). Os resultados são mostrados nas Figuras 9 e 10.

Análise estatística. Os valores HLA:dímero IgG são reportados como mediana e valores de P foram calculados utilizando o teste de Wilcoxon. Para comparações proporcionais, foi utilizado o teste exato de Fisher. A comparação das reações locais foi feita com o teste t de Student emparelhado ou desemparelhado, como apropriado.

EXEMPLO 7

Resposta da vacina de péptido HER2/neu (E75) por nível de expressão de HER2/neu

Os ensaios clínicos foram realizados com a vacina de péptido HER2/neu E75 em pacientes BCa de nódulo positivo e nódulo negativo. Estes pacientes consistiram em todos os níveis de expressão HER2/neu. A determinação do status de HER2/neu é realizada predominantemente através de dois

testes, imuno-histoquímica (IHQ) e de hibridização de fluorescência *in situ* (FISH). IHC detecta a sobre-expressão de proteína da HER2/neu e é reportada numa escala semi-quantitativa de 0 a 3+ (0 = negativo, 1+ = baixa expressão, 2+ = intermédia, e 3+ = sobre-expressão). FISH por outro lado detecta a amplificação (excesso de cópias) do gene de HER2/neu e é expressa como uma razão de HER2/neu no cromossoma 17 e interpretada como a sobre-expressão se FISH $\geq 2,0$ cópias. A taxa de concorrência de IHC e FISH é de aproximadamente 90%.

Materiais e Métodos:

A análise de subconjunto foi realizada em 163 pacientes BCa inscritos nos nossos testes de vacinas E75 de fase II com base no nível de expressão de HER2/neu. Os pacientes foram avaliados como de baixa expressão (LE = IHC 1+-2+ e FISH $< 2,0$, mas $\geq 2,0$) vs. Super-expressão (OE = IHC 3+ e/ou FISH $\geq 2,0$), e pelo status IHC (0, 1+, 2+, 3+). A análise foi realizada segundo fatores clinico-patológicos padrão, resposta imunológica à vacina (reações de DTH *in vivo* e ensaio de HLA-A2: dímero IgG *in vitro*), e respostas clínicas (taxas de recorrência e mortalidade absolutas).

Características dos pacientes e protocolos clínicos: Os ensaios E75 NP e NN foram aprovados pelo Institutional Review Boards local e realizados no Walter Reed Army Medical Center, Washington, DC, e no Joyce Murtha Breast Care Center, Windber, PA sob uma investigação de uma aplicação nova do fármaco (BB-IND#9187). Todos os pacientes tinham BCa confirmado histologicamente, e haviam concluído um curso padrão de cirurgia, quimioterapia e radioterapia (se necessário) antes da inscrição. Pacientes em terapia hormonal foram continuados no seu regime. Depois de aconselhamento e consentimento adequado, os pacientes BCa

foram inscritos para o estudo apropriado (NP ou NN) e HLA digitado uma vez que E75 se liga principalmente a HLA-A2 encontrada em cerca de 40-50% da população em geral. Os pacientes HLA-A2+ foram vacinados, e os pacientes HLA-A2- foram observados prospectivamente para recidiva clínica. Posteriormente os pacientes HLA-A3+ foram vacinados. Antes da vacinação, a pele dos pacientes foi testada com um painel de antigénios de memória (teste de Mantoux). Os pacientes foram considerados imunocompetentes se reagissem (> 5 mm) de > 2 antígenos.

Vacina: O peptídeo E75 foi produzido comercialmente em boas práticas de fabricação por NeoMPS, Inc. (San Diego, CA). A Pureza DO Péptido (> 95%) foi verificada por cromatografia líquida de alto desempenho e espectrometria de massa. O teste de esterilidade e segurança geral foi realizado pelo fabricante. O péptido liofilizado foi reconstituído em 0,5 ml de solução salina estéril a 100 mcg, 500 mcg ou 1000 mcg. O péptido foi misturado com GM-CSF (Berlex, Seattle, WA) em 0,5 ml. A inoculação de 1,0 ml foi dividida e aplicada por via intradérmica em dois locais separados cinco centímetros na mesma extremidade.

Séries de vacinação: O estudo NP foi concebido como um processo de dois estágios com doses crescentes de peptídeo na fase inicial e alterações de programação na segunda fase. Detalhes da série da vacina foram publicados anteriormente. Resumidamente, 3-6 pacientes foram designados para receber cada quatro ou seis injeções mensais de 100 mcg, 500 mcg ou 1000 mcg de peptídeo E75 (100:6, 500:4, 500:6, 1000:4 e 1000:6, respectivamente). Os grupos foram finalmente expandidos, a fim de determinar e confirmar a dosagem óptima em doentes NP, representando o grande número de pacientes nos grupos de dose deste último.

O ensaio NN foi concebido para explicar ainda mais a dose biológica óptima através da variação da dose de GM-CSF e alterar a programação da inoculação. Doze pacientes com tumores HER2/neu IHC 0 foram autorizados neste estudo para determinar a viabilidade de vacinar um hospedeiro presumivelmente ingênuo ao antígeno. Dez pacientes foram designados para cada grupo de dose com peptídeo E75 constante de 500 mcg para receber três, quatro, ou seis injeções mensais com diferentes doses de GM-CSF (125 mcg ou 250 mcg).

Toxicidade: Os pacientes foram observados uma hora após a vacinação para hipersensibilidade imediata e voltaram 48-72 horas depois de terem os seus locais de injeção medidos e questionados sobre toxicidades. As toxicidades foram classificadas pelo NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events. v3.0 (relatado numa escala de 0-5). A progressão de um grupo de dose para o seguinte ocorreu apenas se nenhuma toxicidade significativa foi observada no grupo de dose mais baixa. Resultados específicos para cada paciente são relatados com base na toxicidade local e sistémica máxima ocorrida durante a série.

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC), isolamento e culturas: Foi colhido sangue antes de cada vacinação e em um (pós-vacina) e seis meses (de longo prazo) após a conclusão da série de vacinas. 50 ml de sangue foi tirado e PBMC isolada. As PBMC foram lavadas e re-suspensas em meio de cultura e utilizadas como uma fonte de linfócitos como anteriormente descrito.

Ensaio de dímero de imunoglobulina:HLA-A2: A presença de células T CD8+ em E75específico em PBMC isoladas de fresco a partir de pacientes foi avaliada diretamente utilizando o ensaio de dímero, como descrito anteriormente. Resumidamente, o HLA-A2: dímero de imunoglobulina (Ig)

(PharMingen, San Diego, CA), foi carregado com o péptido E75 ou de controlo (E37, proteína de ligação a folato (25-33) RIAWARTEL (SEQ ID No: 5)) por incubação de 1mcg de dímero com um excesso (5 mcg) de péptido e 0,5 mcg de β 2-microglobulina (Sigma, St. Louis, MO) a 37°C durante a noite, em seguida, armazenada a 4°C até ser utilizada. PBMC foram lavadas e re-suspensas em Tampão de coloração PharMingen (PharMingen) e adicionadas em 5×10^5 células/100 μ l/tubo em tubos de poliestireno de fundo redondo de 5 ml (Becton Dickinson, Mountain View, CA) e corados com os dímeros e anticorpos carregados. Em cada paciente, o nível de E75 específico em células CD8+ foi determinado em resposta a cada vacinação sucessiva, e os níveis médios de pós-inoculação foram comparados com os níveis de pré-inoculação.

Decomposição de hipersensibilidade de Tipo (DTH): Em ambos os testes, uma reação DTH foi avaliada com 100 mcg de péptido E75 em 0,5 ml de solução salina normal (sem GM-CSF) e 0,5 ml de solução salina normal como controlo do volume um mês após a conclusão das séries de vacinas, como descrito anteriormente. A reação de DTH foi medida em duas dimensões em 48-72 horas utilizando o método sensível esferográfica-caneta e relatada como a média ortogonal em relação ao controlo. No ensaio NN, uma DTH de pré-vacinação também foi realizada.

Recorrências clínicas: Todos os pacientes foram observados por recorrência clínica por padrão de rastreamento do cancro como ditado pelo oncologista primário do paciente. O paciente foi considerado recorrente se comprovado por biopsia ou se tratado de recorrência pela equipa de oncologia primária.

Análise estatística: As taxas de recorrência foram comparadas entre os grupos por meio de análise de sobrevida

pelo método de Kaplan-Meier, e a proporção de indivíduos que apresentaram a recorrência comparados por análise de classificação. Os valores de P para os fatores clínico-patológicos foram calculados utilizando Wilcoxon, teste exato de Fisher ou χ^2 conforme o caso. Os valores de P para comparação de níveis de dímero de pré e pós-vacinais e DTH foram calculados utilizando o teste t de Student emparelhado ou não emparelhado bicaudal.

Resultados:

Os pacientes LE (controle = 44, vacina = 56) versus pacientes OE (controle = 22, vacina = 29) e status de grupos controle de IHC e de vacinas (0 = 5 vs. 7, 1+ 15 vs. 25, 2+ 24 vs. 26, 3+ 13 vs. 19, respectivamente) foram avaliados. Ambos LE vs OE e todos os status IHC de grupos vacinados responderam imunologicamente; no entanto pacientes LE, e mais especificamente pacientes IHC 1+, tiveram um aumento a longo prazo na resposta imune in vitro ($p = 0,04$ e $p = 0,08$, respectivamente). Além disso, pacientes LE tenderam, e pacientes IHC 1+ tiveram, diminuição da mortalidade em comparação com os seus grupos de controle ($p = 0,08$ e $p = 0,04$, respectivamente).

Pacientes: 186 pacientes foram incluídos nos estudos de vacinas E75; 9 foram retirados (4 pacientes de controle e 5 pacientes vacinados - não foram retirados devido à toxicidade), resultando em 177 que completaram os estudos. Todos os os pacientes de controle (C) e vacinados (V) no estudo NP (C = 46, V = 45, total = 91 pacientes) tiveram IHC, FISH, ou ambos os testes realizados. No estudo NN (C = 35, V = 51, total = 86 pacientes) 12 pacientes tiveram tumores HER2/neu IHC 0 (C = 5, V = 7). Também no estudo NN, (C = 7, V = 7) os tumores de 14 dos pacientes não foram submetidos a IHC ou FISH - esses 14 pacientes foram

excluídos da análise do subconjunto, portanto 163 pacientes estavam disponíveis para análise.

Análise do subconjunto LE vs. OE:

Pacientes por expressão: a análise do subconjunto foi realizada comparando LE (IHC 1+-2+ ou FISH > 0 e <2,0) vs. OE (IHC 3+ ou FISH > 2,0). Sessenta e seis pacientes do grupo de controlo tiveram IHC ou FISH realizada (LE = 44, OE = 22). Um total de 85 pacientes no grupo da vacina E75 tinha IHC ou FISH realizada (OE = 56, EO = 29). Um número comparável de pacientes C e V estavam nos grupos LE (67% vs. 66%, respectivamente) e OE (33% vs. 34%, respectivamente).

Demografia, fatores prognósticos e perfis de tratamento de pacientes LE vs. OE são apresentados na Tabela 4. No que diz respeito aos pacientes LE não foram observadas diferenças estatísticas entre pacientes C e V. Com pacientes OE, estatisticamente um maior número de pacientes V eram receptores hormonais negativos do que no grupo C ($p = 0,02$) (Tabela 4).

Tabela 4. Demografia, fatores prognósticos e perfis de tratamento de pacientes inscritos no estudo E75 fase II por LE vs. OE

	LE			OE		
	LE Control (n = 44)	Vaccine (n = 56)	P	OE Control (n = 22)	OE Vaccine (n = 29)	P
Median age, years	55	56		50	52	
Range years	31-82	27-77	0.7	32-75	37-68	0.1
Race						
White, %	86.4%	89.3%	0.8	72.7%	86.2%	0.3
Other, %	13.6%	10.7%	0.8	27.3%	13.8%	0.3
Tumor size						
T2-T4, %	38.6%	33.9%	0.7	31.8%	34.5%	0.9
Histological grade						
Grade III, %	27.2%	30.4%	0.8	63.6%	62.1%	0.9
Node Positive (NP), %	54.5%	58.9%	0.7	90.1%	55.2%	0.06
Hormone receptor -, %	15.9%	19.6%	0.8	27.3%	62.1%	0.02*
Chemotherapy, %	72.7%	75.0%	0.8	86.4%	96.6%	0.3
XRT, %	84.1%	75.0%	0.3	72.7%	75.9%	NS
Hormonal therapy, %	81.8%	76.6%	0.6	63.6%	41.4%	0.2
Herceptin, %	0.2%	0.2%	NS	9.1%	24.1%	0.3
*Statistically significant difference.						

Resposta imunológica por expressão: A vacina E75 foi capaz de induzir uma resposta imune in vitro em ambos os pacientes LE e OE. Aumentos significativos de pré-vacina para o E75 específico máximo em células T CD8+ foram observados em ambos os grupos (LE p <0,001, OE p <0,001). Os pacientes LE tiveram resposta imune máxima estatisticamente maior em relação aos pacientes OE (p = 0,04) (Figura 11a).

Ambos os pacientes LE e OE foram capazes de induzir uma resposta imune in vivo, como medido através de DTH pré e pós-vacina. Aumentos significativos pré e pós DTH foram observados em ambas as categorias (LE p <0,001, OE p = 0,02) (Figura 11B). Embora LE pós DTH seja maior do que OE pós DTH (15,9+1,9 mm vs. 12,8+2,0 mm, respectivamente), não há nenhum significado estatístico (p = 0,5). No geral, a

vacina E75 parece mais imunologicamente ativa em pacientes LE.

Resposta clínica por expressão: A resposta clínica, avaliada pela recorrência e mortalidade, é anotada nas Figuras 11C e 11D. Todos os pacientes V (OE = 10,7% vs OE = 13,8%) parecem ter diminuído as taxas de recorrência quando comparado com os pacientes C (LE & OE = 18,2%), mas estes números não foram estatisticamente significativos. Mais importante, verificou-se uma tendência para a diminuição da mortalidade nos doentes V, mais impressionantemente observado nos pacientes LE (C = 6,8% vs V = 0,0%, $p = 0,08$).

Análise de subconjunto do status IHC:

Pacientes por status de IHC: O grupo C teve 57 espécimes de patologia dos pacientes que foram submetidos a IHC (0 = 5, 1+ = 15, 2+ = 24, 3+ = 13). O grupo E75 V tinha patologia 77 dos pacientes que foram submetidos a IHC (0 = 7, 1+ = 25, 2+ = 26, 3+ = 19). Uma percentagem equivalente de pacientes C e V estavam em cada grupo IHC (0 C = 8,8% vs. V = 9,1%; 1+ C = 26,3% vs. V = 32,5%, 2+ C = 42,1% vs. V = 33,8 %, 3+ C = 22,8% vs. V = 24,7%).

Demografia, fatores prognósticos e perfis de tratamento por estado IHC são apresentados na **Tabela 5**. Havia duas diferenças significativas nos fatores prognósticos para grupos de status de IHC. Os pacientes IHC 1+ tiveram uma maior percentagem de tumores T2-T4 no grupo C em comparação com o grupo V (66,7% vs. 30,8%, $p = 0,05$). Os pacientes C IHC 3+ foram todos NP e 42,1% dos pacientes V eram NP ($p = 0,003$).

Tabela 5. Demografia, fatores prognósticos e perfis de tratamento de pacientes inscritos no estudo E75 fase II por nível de expressão HER/neu

	0		1 ⁺		2 ⁺		3 ⁺	
	Control (n=5)	Vaccine (n=7)	Control (n=15)	Vaccine (n=25)	Control (n=24)	Vaccine (n=26)	Control (n=13)	Vaccine (n=19)
	<i>p</i>		<i>p</i>		<i>p</i>		<i>p</i>	
Median age, years	50	60	54	54	50	57	49	51
Range years	38-74	31-74	44-82	42-71	31-75	27-77	31-74	37-62
Race	0.4		0.4		0.2		0.2	
White, %	100.0%	71.4%	73.3%	84.0%	87.5%	92.3%	61.5%	89.5%
Other, %	0.0%	28.6%	26.7%	16.0%	12.5%	7.7%	40.5%	10.5%
Tumor size	NS		NS		NS		NS	
T2-T4, %	40.0%	14.3%	66.7%	28.0%	29.2%	46.2%	38.5%	36.8%
Histological grade	0.5		0.05*		0.2		0.8	
Grade III, %	20.0%	14.3%	33.3%	36.0%	37.5%	38.5%	61.5%	57.9%
Node Positive (NP), %	0.0%	0.0%	80.0%	60.0%	79.2%	80.8%	100.0%	42.1%
Hormone receptor -, %	20.0%	14.3%	13.3%	28.0%	16.7%	11.5%	38.5%	63.2%
Chemotherapy, %	80.0%	42.9%	80.0%	76.0%	87.5%	96.2%	92.3%	94.7%
XRT, %	100.0%	42.9%	66.7%	76.0%	87.5%	96.2%	69.2%	94.7%
Hormonal therapy, %	80.0%	85.7%	80.0%	72.0%	79.2%	73.1%	53.8%	73.7%
Herceptin, %	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	8.3%	7.7%	7.7%	10.5%
	NS		NS		0.9		0.7	

* Statistically significant differences.

Resposta Imunológica por status de IHC: A vacina E75 foi capaz de desencadear uma resposta imunitária *in vitro* em

todas as categorias de IHC. Todos os grupos de IHC (0, 1+, 2+, 3+) responderam à vacina como foi observado por aumentos significativos de E75 específico máximo para as células T CD8+ na pré-vacina (0 $p = 0,007$, 1+ $p < 0,001$, 2+ $p = 0,004$, 3+ $p = 0,002$). Apenas pacientes IHC+ tenderam para o aumento pré e longo prazo no E75 específico para células T CD8+ ($p = 0,08$) (Figura 12A).

Além disso, todos os pacientes foram capazes de induzir uma resposta imune in vivo, como medido através de DTH pré e pós-vacina. Aumentos significativas pré e pós DTH foram observados em todas as categorias de IHC (0 $p = 0,03$, 1+ $p = 0,02$, 2+ $p = 0,02$, 3+ $p = 0,05$). Em geral, independentemente da expressão de HER2/neu como medido por IHC, a vacina foi imunologicamente eficaz, mas parece ser mais eficaz nos doentes IHC 1+ (Figura 12B).

Resposta clínica por status IHC: A resposta clínica, avaliada pela recorrência e mortalidade, é anotada nas Figuras 12C e 12D. Em todas as categorias IHC (exceto IHC 0, onde nenhum paciente retornou), houve diminuição das taxas de recorrência quando se comparam pacientes C e V, embora os números não atinjam significância estatística. Mais importante, verificou-se uma diminuição significativa da mortalidade em pacientes IHC 1+, C = 20% e V = mortalidade de 0% ($p = 0,04$).

Num ensaio clínico de fase II anterior, a administração da vacina E75 resultou em diminuição das taxas de recorrência e uma tendência para a diminuição da taxa de mortalidade em 20 meses, mas essas diferenças perdem importância com a diminuição da imunidade sem o uso de reforços. Foi demonstrado que os pacientes com todos os níveis de

expressão de HER2/neu responderam imunologicamente à vacina, mas que os pacientes LE (e especificamente IHC+) tiveram respostas imunológicas mais robustas, e maior benefício clínico com a diminuição da mortalidade. Mostrou-se também que os pacientes ingênuos ao antigénio respondem imunologicamente, também, à vacina.

Quando intervalos são aqui utilizados para as propriedades físicas, tais como peso molecular, ou propriedades químicas, tais como fórmulas químicas, todas as combinações e subcombinações de gamas de aspectos específicos nelas se destinam a ser incluídas.

Embora a invenção anterior tenha sido descrita em algum detalhe por meio de ilustração e exemplo para fins de clareza de entendimento, será prontamente aparente para um vulgar perito na técnica à luz dos ensinamentos desta invenção que certas alterações e modificações podem ser feitas sem nos afastarmos do escopo das reivindicações anexas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

SEQ ID NO:1 (HER2/neu amino acid sequence)

MKLRLPASPETHLOMLRHLHQGCQVQGNLELTYLPTNASLSFL-
 QDIQEVQGYVLIHQNVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGA
 SPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDITLWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSR
 ACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAAGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPK
 HSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRTYFGASCVTACPYNYLST
 DVGSCITLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEF
 AGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLDL
 SVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNNHLCFVHTV
 FWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGFGPTQCVNCSQFLRGQ
 ECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFFC
 VARCPGSKPDLSPYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCAPAEQRASPLTSI
 ISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQM
 RILKETELRKVKVLGSGAFGTIVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDE
 AYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRRGLGSQDLLNWCMQ
 IAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEHADGGKVP
 KWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTIFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQF
 PICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNEIDLGPASPLDS
 TFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCFDPAPGAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLT
 LGLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPHTDPSPLQRYSEDPTV
 PLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSPG
 KNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPQGGAAPQHPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPP
 STFKGIPTAENPEYLGLDVPV

SEQ ID NO:2 (E75 peptide)

[0152] KIFGSLAFL

SEQ ID NO:3

[0153] BIMAS

SEQ ID NO:4

[0154] SYFPEITHI

SEQ ID NO:5

[0155] RIAWARTEL

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Henry M. Jackson Foundation for the Advancement of
Military Medicine, Inc.

People, George E.

Ponniah, Sathibalan

<120> VACINA PARA A PREVENÇÃO DA RECAÍDA DO CANCRO DA MAMA

<130> HMJF-0009

<150> US 60/941,524

<151> 2007-06-01

<160> 5

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 1225

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> construtor sintético

<400> 1

Met	Lys	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met	Leu
1				5					10					15	
Arg	His	Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu
		20						25					30		
Thr	Tyr	Leu	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Gln
		35					40						45		
Glu	Val	Gln	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln	Val	Arg	Gln	Val
	50					55					60				
Pro	Leu	Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp
65				70						75					80
Asn	Tyr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr
			85						90					95	
Thr	Pro	Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu
			100					105					110		
Arg	Ser	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg	Asn
		115					120					125			
Pro	Gln	Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile	Phe	His

130											135											140																											
Lys	Asn	Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg	145											150											155											160
Ala	Cys	His	Pro	Cys	Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp	Gly	165											170											175											180
Glu	Ser	Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala	Gly	180											185											190											195
Gly	Cys	Ala	Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	195											200											205											210
Gln	Cys	Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	210											215											220											225
Cys	Leu	His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro	Ala	225											230											235											240
Leu	Val	Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro	Glu	245											250											255											260
Gly	Arg	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr	Asn	260											265											270											275
Tyr	Leu	Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	Pro	Leu	His	275											280											285											290
Asn	Gln	Glu	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	290											295											300											305
Ser	Lys	Pro	Cys	Ala	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	305											310											315											320
Arg	Glu	Val	Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Asn	Ile	Gln	Glu	Phe	Ala	Gly	325											330											335											340
Cys	Lys	Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	340											345											350											355
Gly	Asp	Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Pro	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	355											360											365											370
Val	Phe	Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	370											375											380											385

Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val
 385 390 395 400
 Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln
 405 410 415
 Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly
 420 425 430
 Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His
 435 440 445
 Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu
 450 455 460
 His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala
 465 470 475 480
 Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr
 485 490 495
 Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu
 500 505 510
 Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg
 515 520 525
 His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val
 530 535 540
 Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr
 545 550 555 560
 Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro
 565 570 575
 Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala
 580 585 590
 Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp
 595 600 605
 Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile
 610 615 620

Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val
 625 630 635 640

Phe Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr
 645 650 655

Met Arg Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro
 660 665 670

Ser Gly Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr
 675 680 685

Glu Leu Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val
 690 695 700

Tyr Lys Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val
 705 710 715 720

Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu
 725 730 735

Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val
 740 745 750

Ser Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr
 755 760 765

Gln Leu Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg
 770 775 780

Gly Arg Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala
 785 790 795 800

Lys Gly Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu
 805 810 815

Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr
 820 825 830

Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His
 835 840 845

Ala Asp Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile
 850 855 860

Leu Arg Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val
 865 870 875 880

Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile
 885 890 895

Pro Ala Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro
 900 905 910

Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys
 915 920 925

Trp Met Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser
 930 935 940

Glu Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln
 945 950 955 960

Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg
 965 970 975

Ser Leu Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu
 980 985 990

Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly
 995 1000 1005

Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
 1010 1015 1020

Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
 1025 1030 1035

Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser
 1040 1045 1050

Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu
 1055 1060 1065

Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser
 1070 1075 1080

Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val
 1085 1090 1095

Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro

1100	1105	1110
Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro	Ser Pro Arg Glu Gly	Pro Leu Pro
1115	1120	1125
Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala	Thr Leu Glu Arg Pro	Lys Thr Leu
1130	1135	1140
Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val	Val Lys Asp Val Phe	Ala Phe Gly
1145	1150	1155
Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu	Tyr Leu Thr Pro Gln	Gly Gly Ala
1160	1165	1170
Ala Pro Gln Pro His Pro Pro	Pro Ala Phe Ser Pro	Ala Phe Asp
1175	1180	1185
Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln	Asp Pro Pro Glu Arg	Gly Ala Pro
1190	1195	1200
Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr	Pro Thr Ala Glu Asn	Pro Glu Tyr
1205	1210	1215
Leu Gly Leu Asp Val Pro Val		
1220	1225	

<210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 2

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 3

Asx Ile Met Ala Ser
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 4

```
Ser Tyr Phe Pro Glu Ile Thr His Ile
1                               5
```

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 5

```
Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu
1                               5
```

REIVINDICAÇÕES

1. Composição compreendendo um veículo farmacologicamente eficaz e um péptido tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 2, para utilização na indução de imunidade protetora ou terapêutica contra a recorrência do cancro da mama num paciente, em que o sujeito tem uma classificação imunoquímica (IHC) de 1+ ou 2+ para a expressão da proteína HER2/neu e uma hibridização de fluorescência *in situ* (FISH) de classificação inferior a $2,0 \pm 20\%$ para a expressão do gene HER2/neu.
2. Composição da reivindicação 1, em que a composição é formulada para ser administrada mensalmente, por inoculação ou injeção, de preferência por injeção intradérmica, até que a imunidade protetora seja estabelecida.
3. Composição da reivindicação 2, em que a composição é formulada para ser administrada por três a seis injeções mensais, e de preferência até seis injeções mensais.
4. Composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a composição é formulada para ser administrado como uma composição de reforço da vacina, em que a composição de reforço da vacina compreende um veículo farmacologicamente eficaz e um péptido tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 2.
5. Composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que a composição de reforço é formulada para ser administrada por meio de inoculação ou de injeção, de preferência através de injeção intradérmica.
6. Composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que a composição é formulada para a inoculação ou

injeção em uma ou mais doses divididas e/ou a composição de reforço é formulada para a inoculação ou injeção em uma ou mais doses separadas.

7. Composição da reivindicação 6, em que duas doses da composição e/ou duas doses da composição de reforço contêm concentrações iguais de péptido.
8. Composição de reivindicações 6 ou 7, em que os locais de inoculação ou injeção no corpo estão localizados pelo menos, 5 cm de distância uns dos outros.
9. Composição de qualquer uma das reivindicações 4-8, em que a composição de reforço é formulada para ser administrada de seis em seis a 12 meses, de preferência de seis em seis meses, após o esquema de imunização primária estar concluído.
10. Composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que o sujeito é um ser humano.
11. Composição da reivindicação 10, em que o humano expressa leucócito humano antigénio A2 ou antigénio leucocitário humano A3.
12. Composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que o sujeito está em remissão clínica completa após o diagnóstico de nódulo positivo ou nódulo negativo do cancro da mama, ou em que o sujeito está em remissão parcial para o cancro da mama.
13. Composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que a composição compreende ainda um adjuvante, de preferência, em que o adjuvante é um factor estimulante de colónias de granulócitos humanos recombinante macrófagos.

14. Composição de qualquer uma das reivindicações 4 a 13, em que a composição de reforço da vacina compreende ainda um adjuvante, de preferência, em que o adjuvante é um factor estimulante de colónias de granulócitos humanos recombinante macrófagos.
15. Composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 14, em que o composto induz uma resposta de linfócitos T citotóxicos para o péptido possuindo a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 2.
16. Composição de qualquer uma das reivindicações 10 a 15, em que o humano tinha um nódulo positivo de cancro da mama, ou em que o humano tinha um nódulo negativo de cancro da mama.
17. Composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 16, em que a composição compreende
- (i) 0,1 mg a 10 mg do péptido, de preferência de 0,1, 0,5 ou 1 mg de péptido; e
 - (ii) 0,01 a 0,5 mg de factor estimulante de colónia de granulócitos macrófagos humanos - (GM-CSF) como um adjuvante, de preferência, 0,25 ou 0,125 mg de GM-CSF.
18. Composição da reivindicação 1, para utilização num sujeito humano que tem uma classificação imunohistoquímica (IHC) de 1+ ou 2+ para a expressão da proteína HER2/neu e uma hibridização de fluorescência *in situ* (FISH) de classificação inferior a $2,0 \pm 20\%$ para a expressão do gene HER2/neu, em que a composição compreende,

(i) uma composição de vacina compreendendo 1 mg do peptídeo com a sequência de aminoácidos da SEQ ID. N°: 2, e 0,125 ou 0,250 mg de fator estimulante colónias de granulócitos macrófagos humano (GM-CSF), como um adjuvante, em que a composição de vacina é formulada para administração por três a seis injeções mensais, de preferência, como injeções intradérmicas; e

(ii) uma composição de reforço da vacina, compreendendo de 1 mg do peptídeo com a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 2, e 0,125 ou 0,250 mg de factor estimulante de colónias de granulócitos macrófagos humanos (GM-CSF) como um adjuvante, em que a composição de reforço da vacina é formulada para administração por injeção, injeção intradérmica de preferência, a cada seis meses após o esquema de vacinação primária estar completo.

19. Composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 18, em que o sujeito tem um índice de imuno-histoquímica (IHQ) de 1+ para a expressão da proteína HER2/neu.

RESUMO

VACINA PARA A PREVENÇÃO DA RECAÍDA DO CANCRO DA MAMA

A invenção apresenta métodos para induzir e manter uma resposta protetora de linfócitos T citotóxicos para um péptido do oncogene HER2/neu, E75, com o efeito de induzir e manter uma imunidade protetora ou terapêutica contra o cancro da mama num paciente em remissão clínica. Os métodos compreendem a administração ao paciente de uma quantidade eficaz de uma composição de vacina compreendendo um transportador farmacologicamente aceitável, um adjuvante, tal como o GM-CSF humano recombinante, e o peptídeo E75 a uma dose otimizada e programada. Os métodos compreendem ainda a administração de uma dose anual ou semianual de vacina de reforço devido à diminuição da imunidade E75 específico das células T. A invenção também apresenta composições de vacina para a utilização nos métodos.

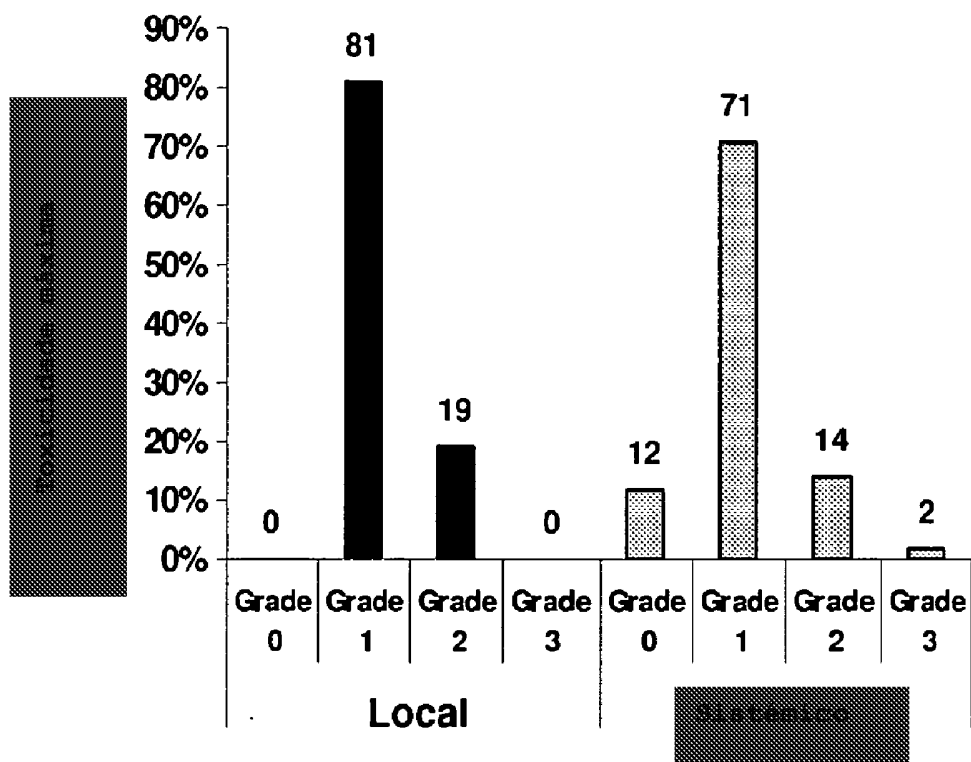


Figura 1

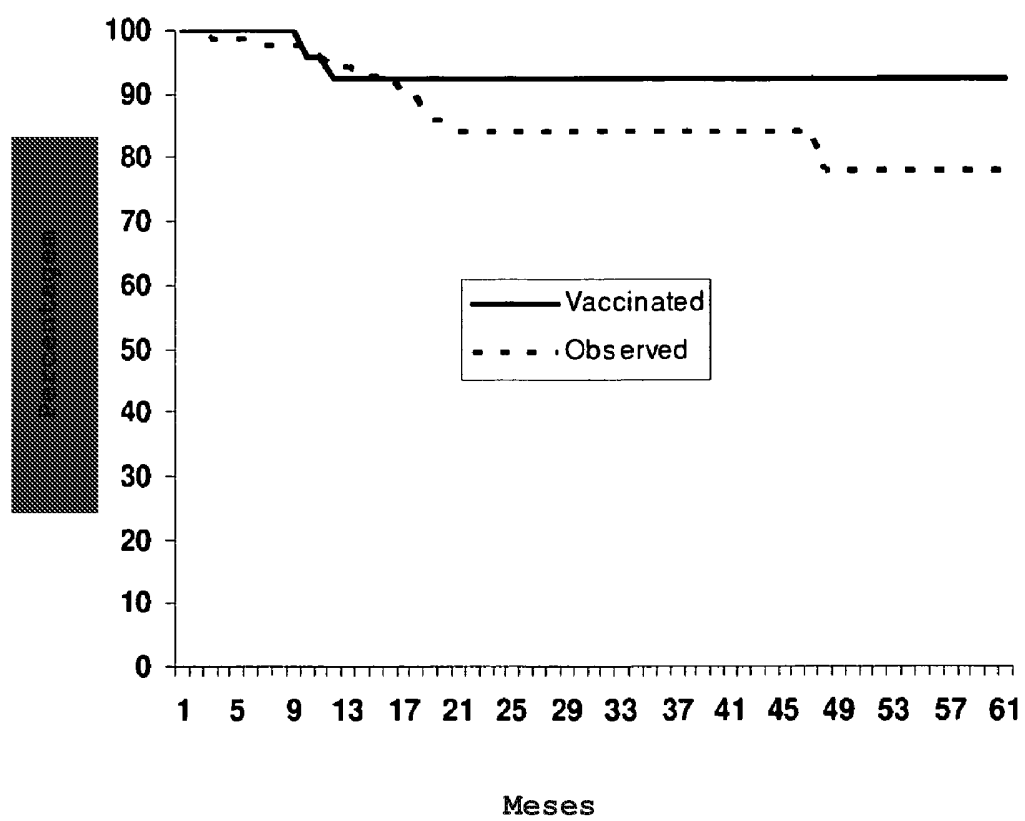


Figura 2

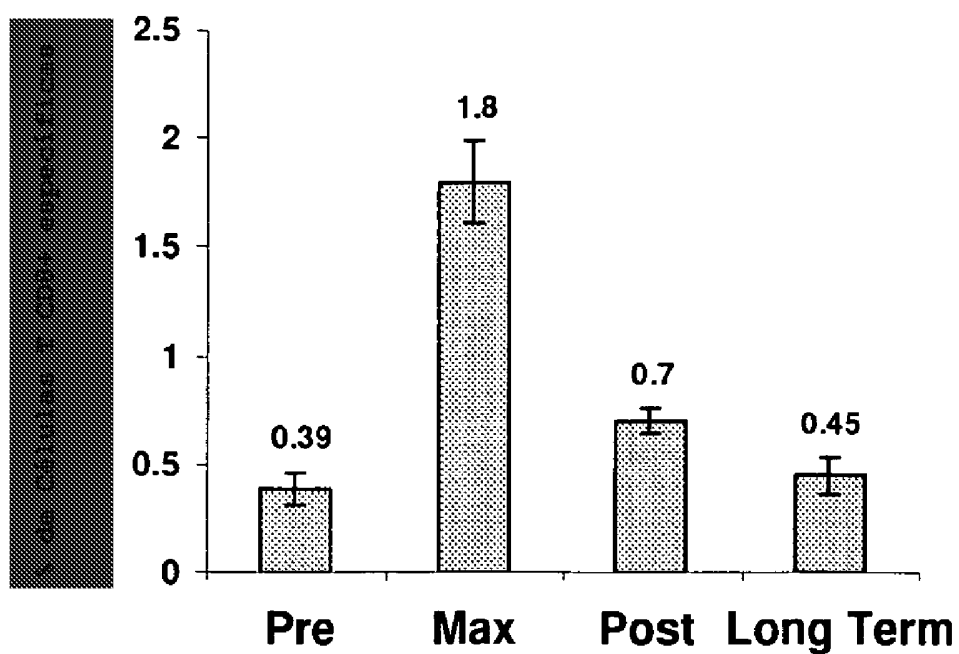


Figura 3A

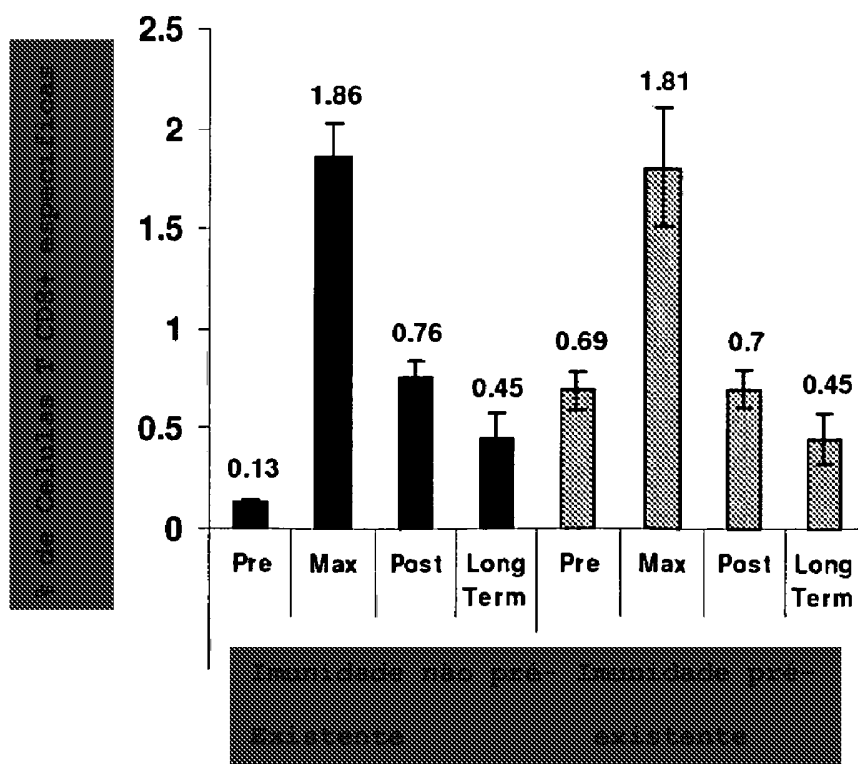


Figura 3B

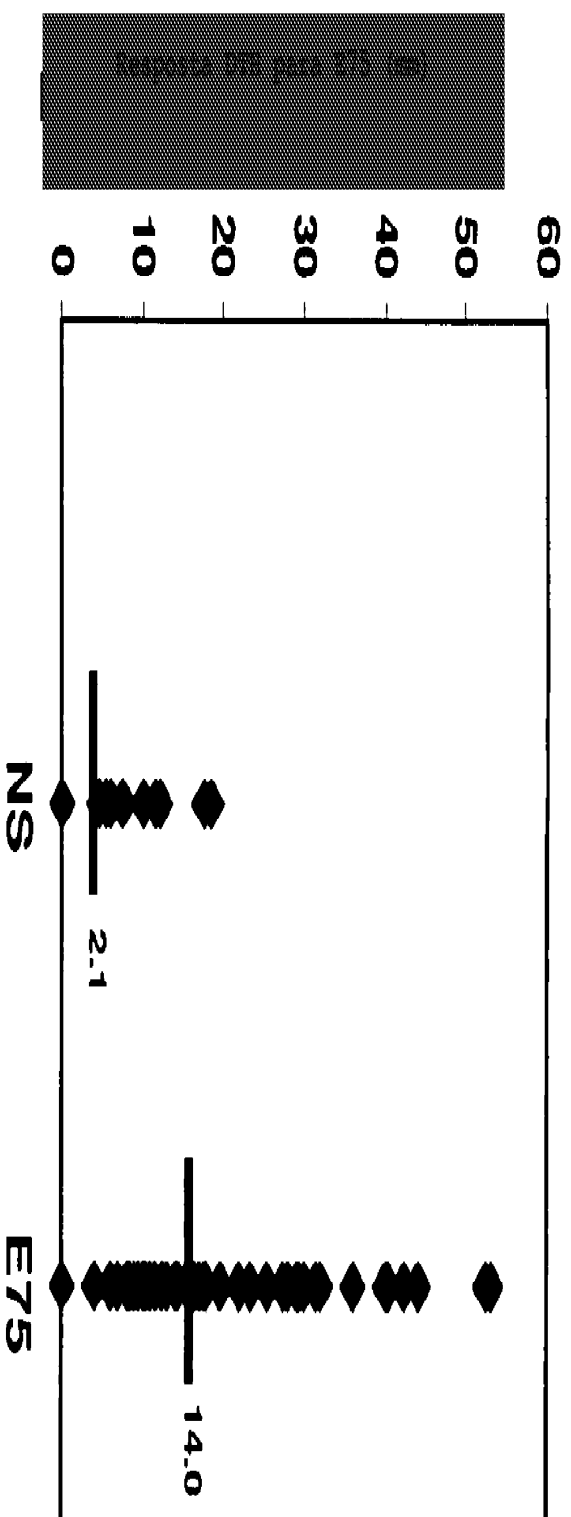


Figura 4A

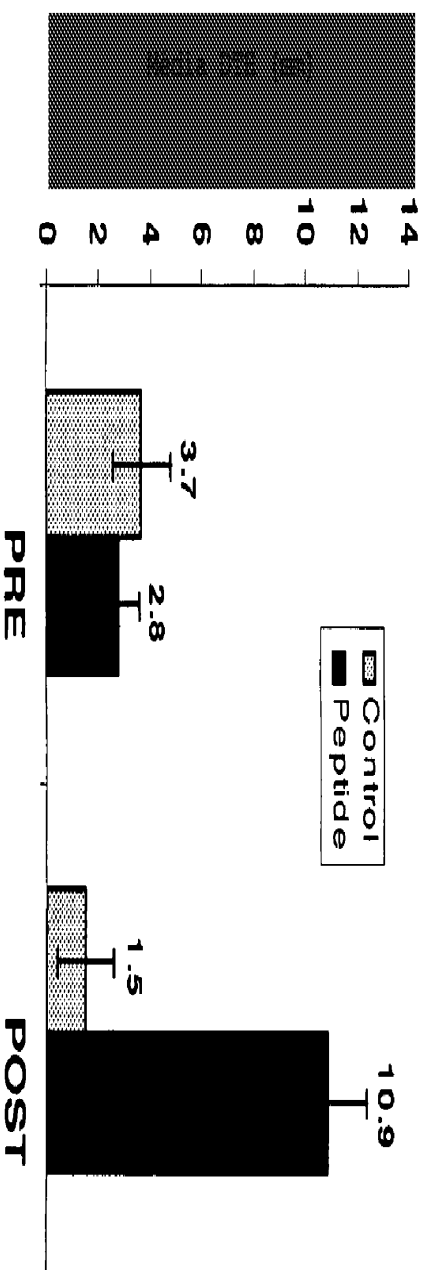


Figura 4B

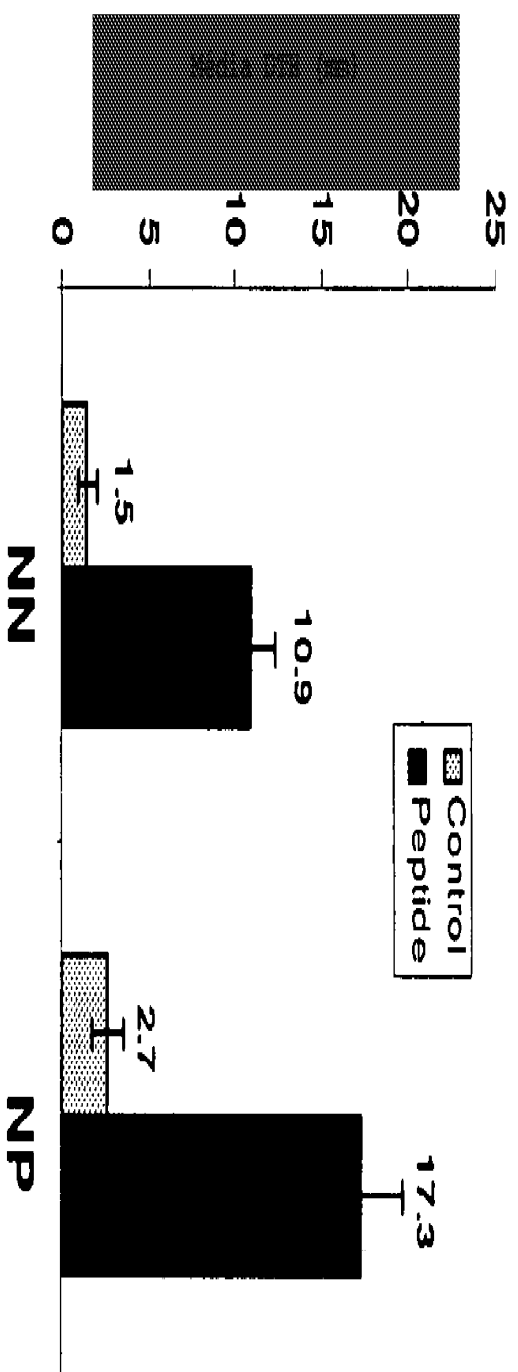


Figura 4C

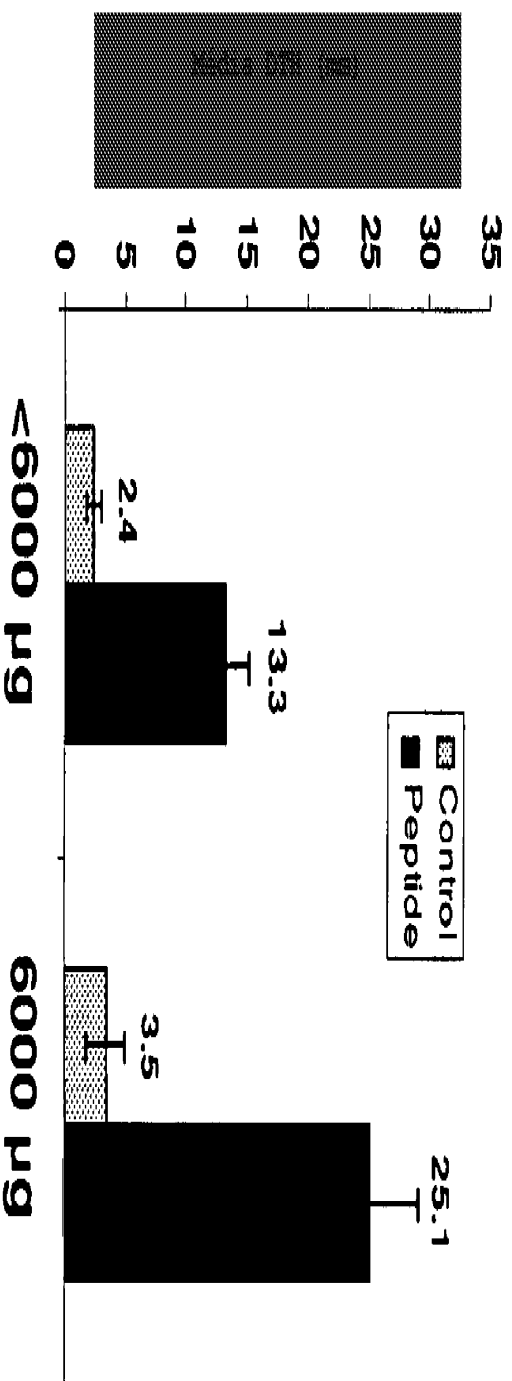


Figura 4D

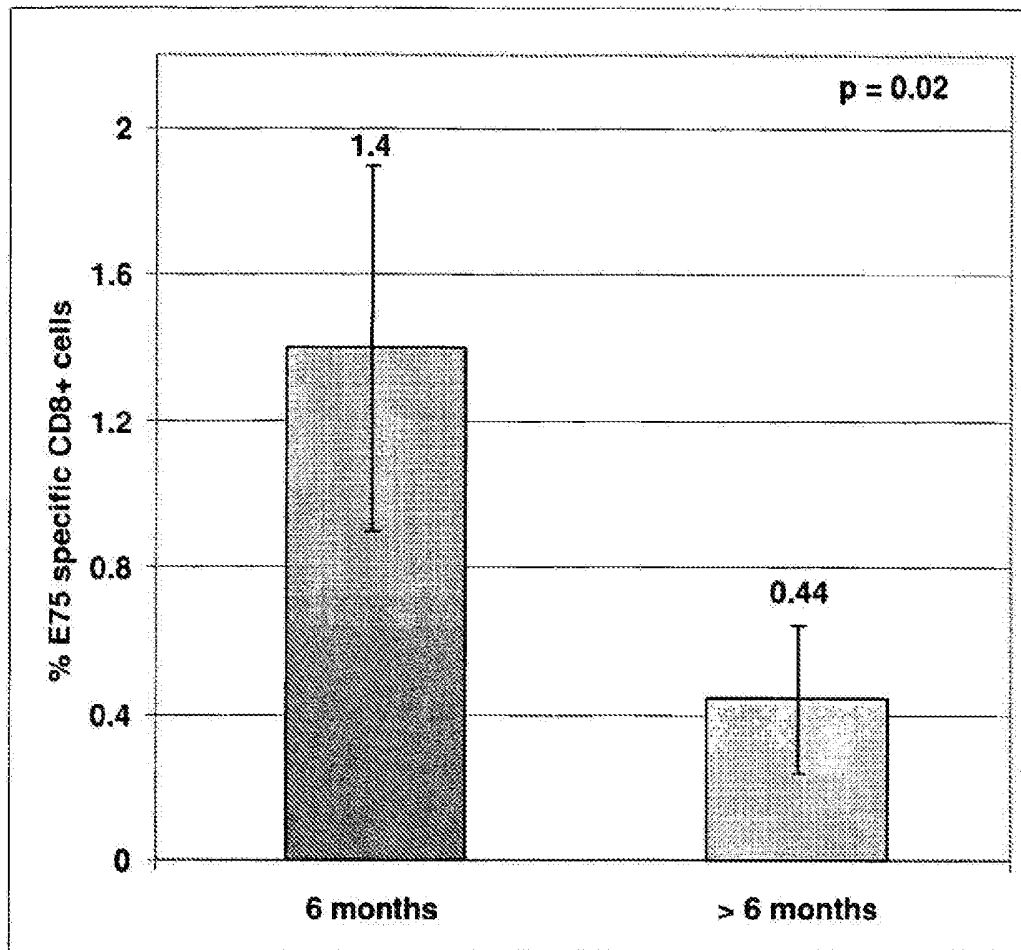


Figura 5

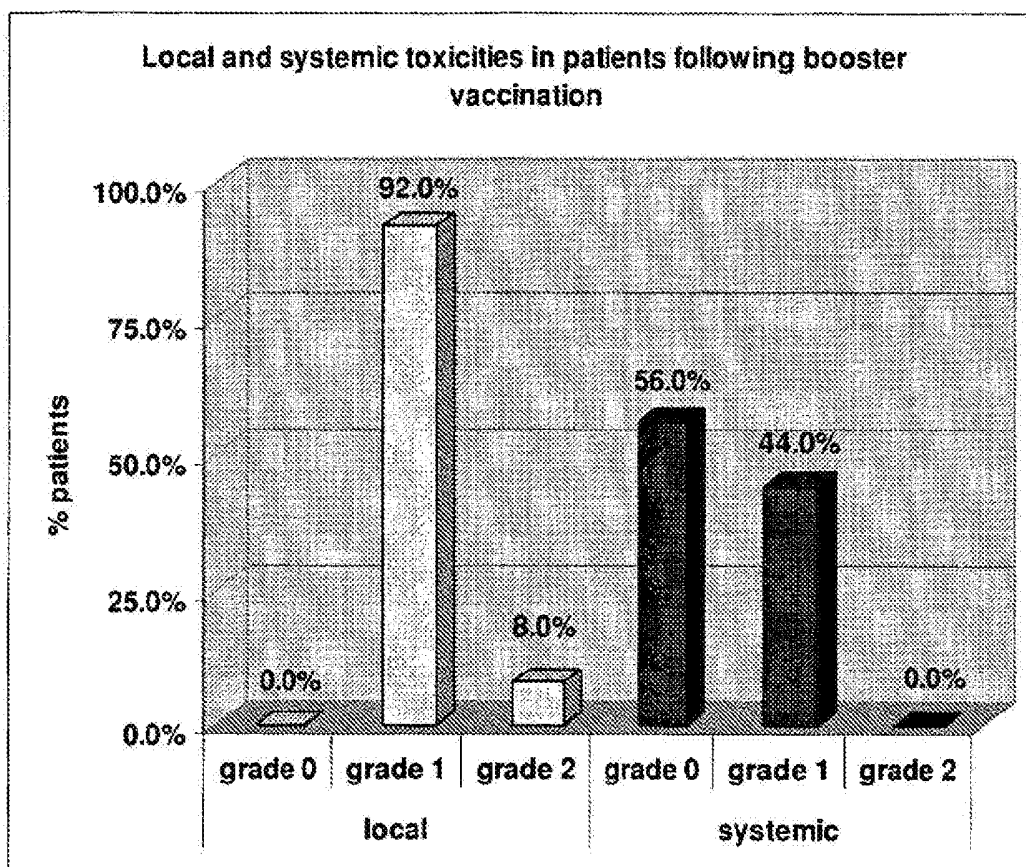


Figura 6

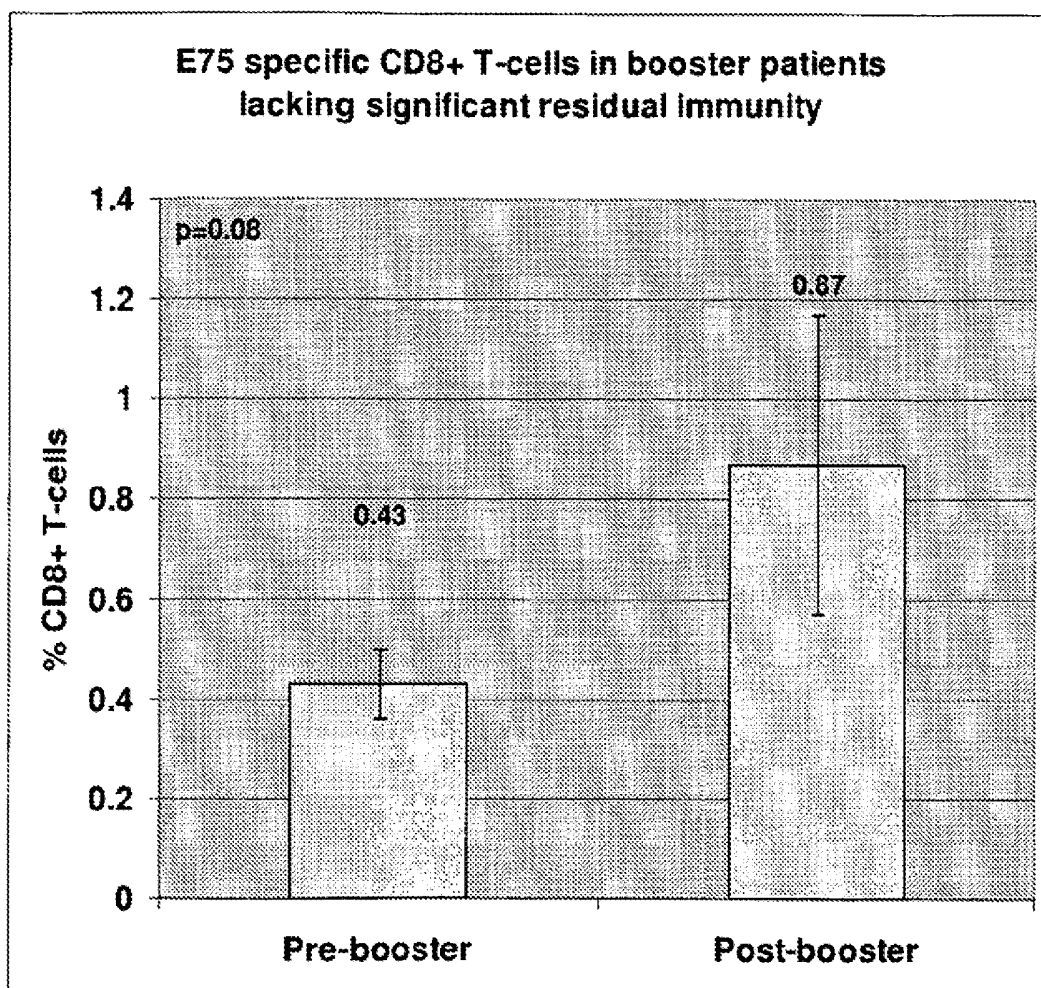


Figura 7

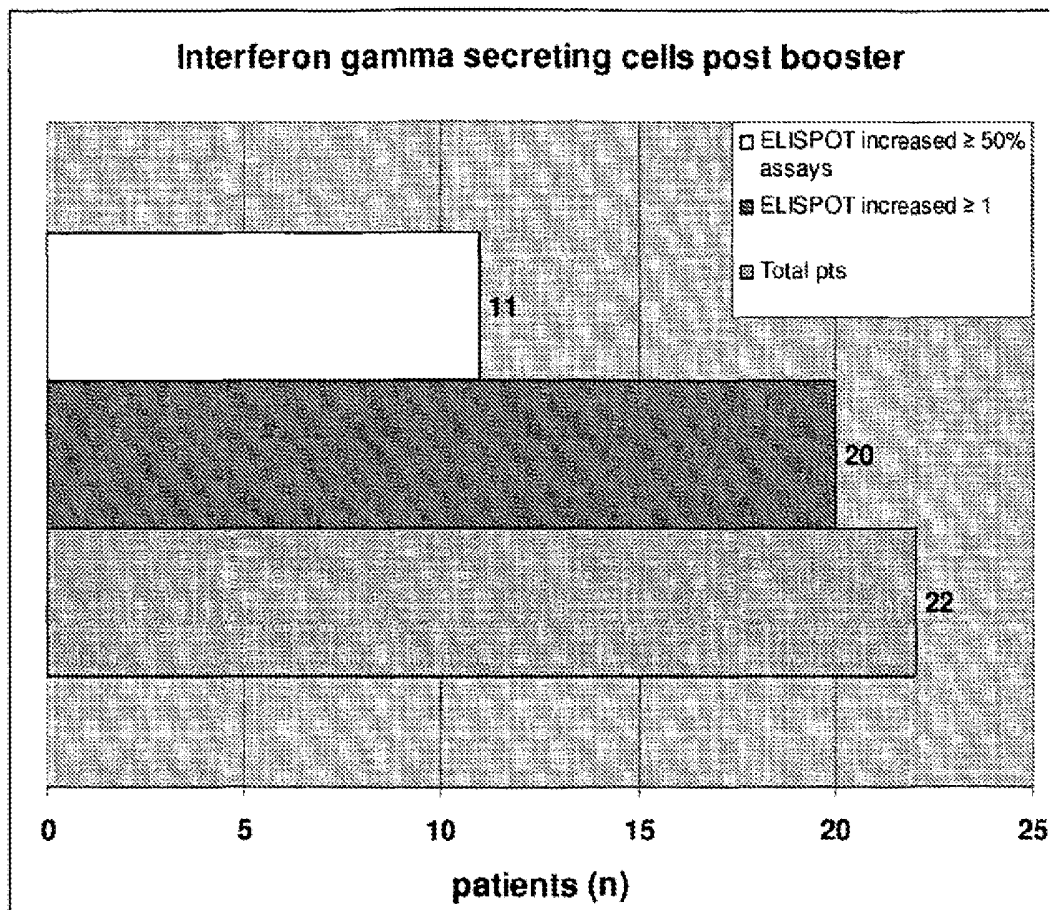


Figura 8

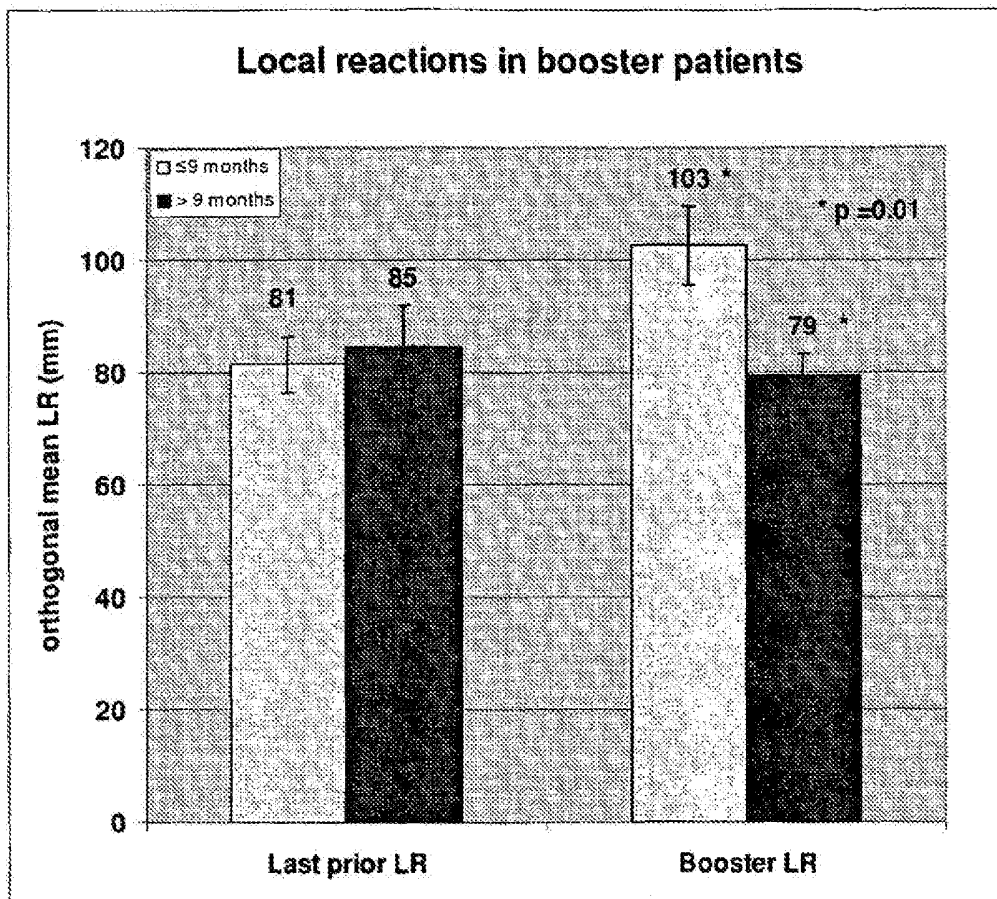


Figura 9

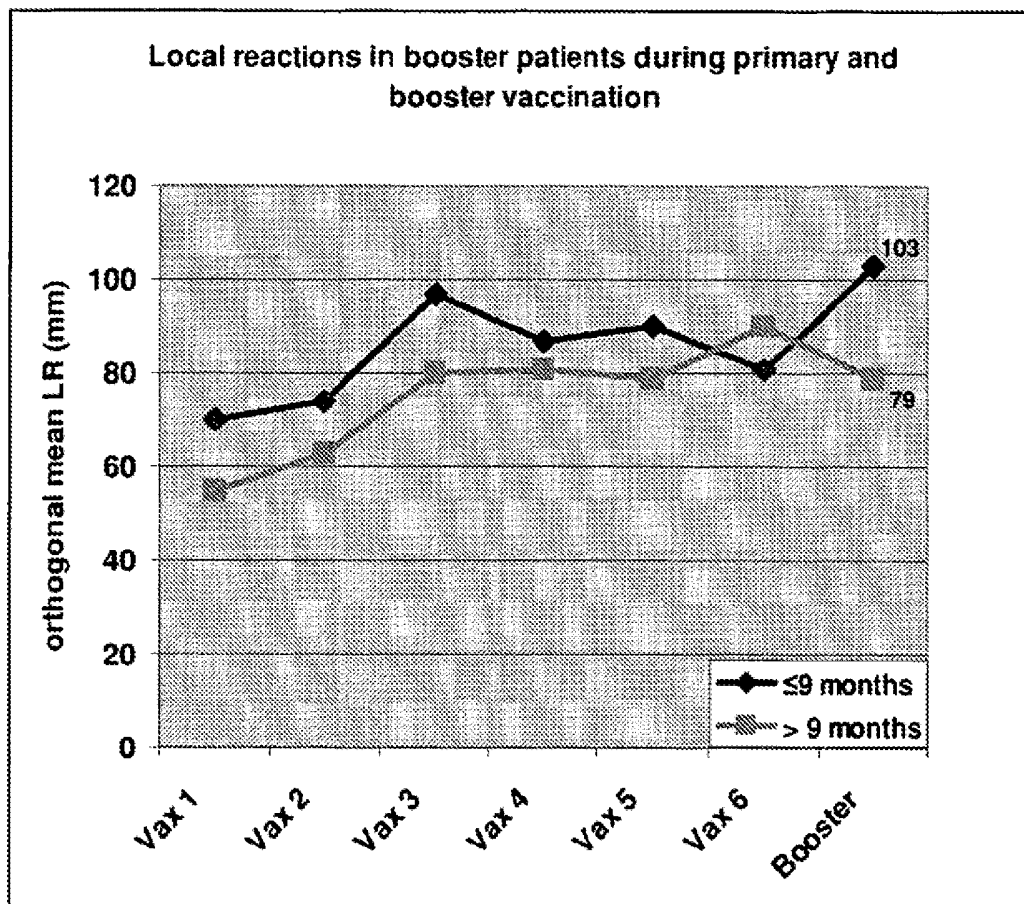


Figura 10

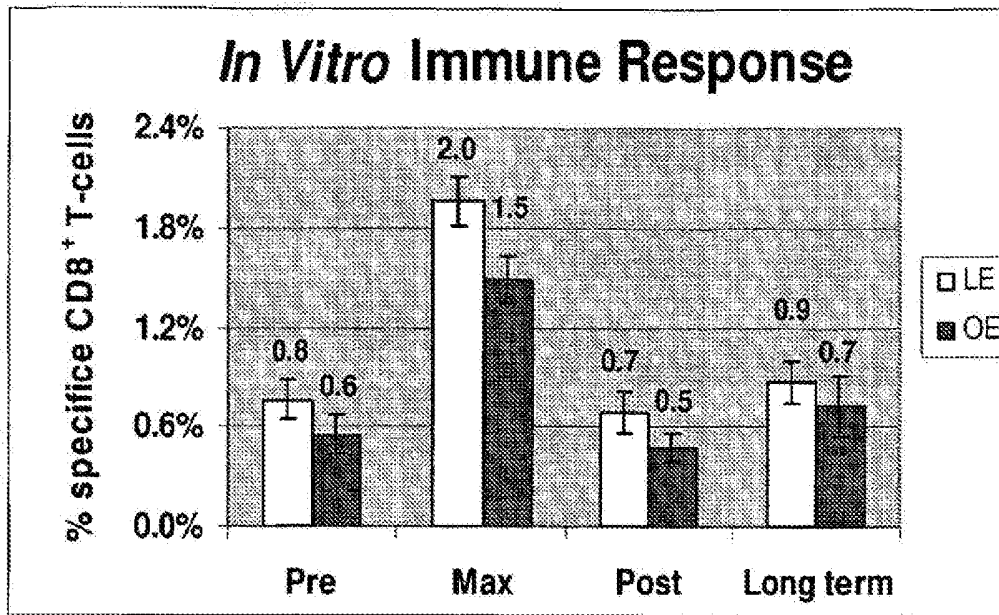


Figura 11A

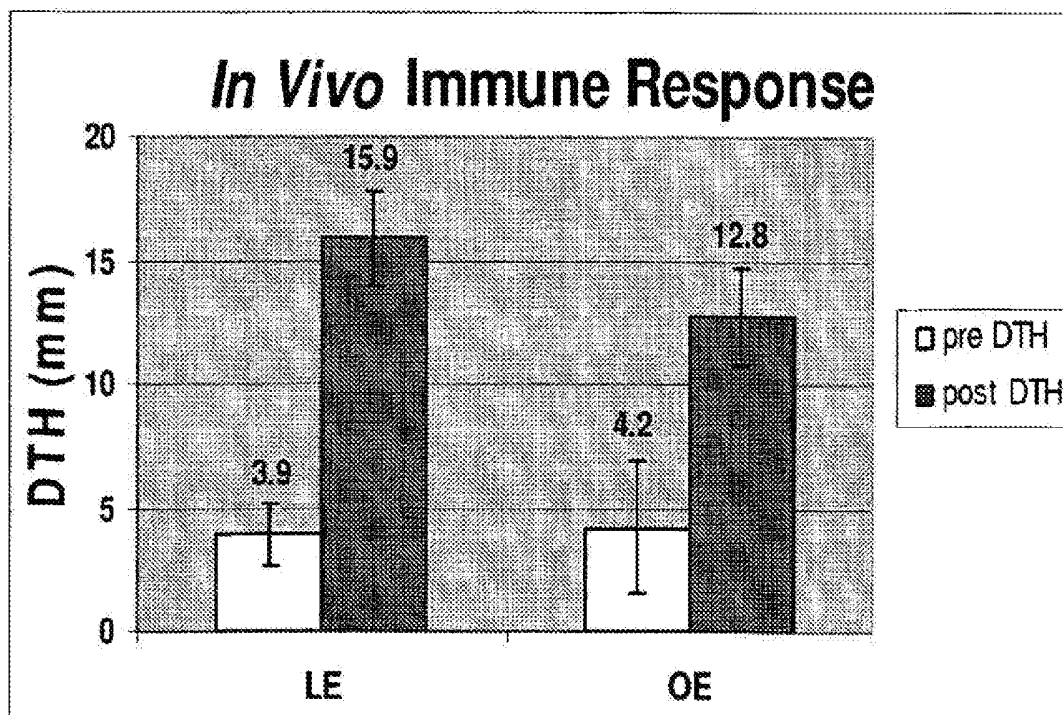


Figura 11B

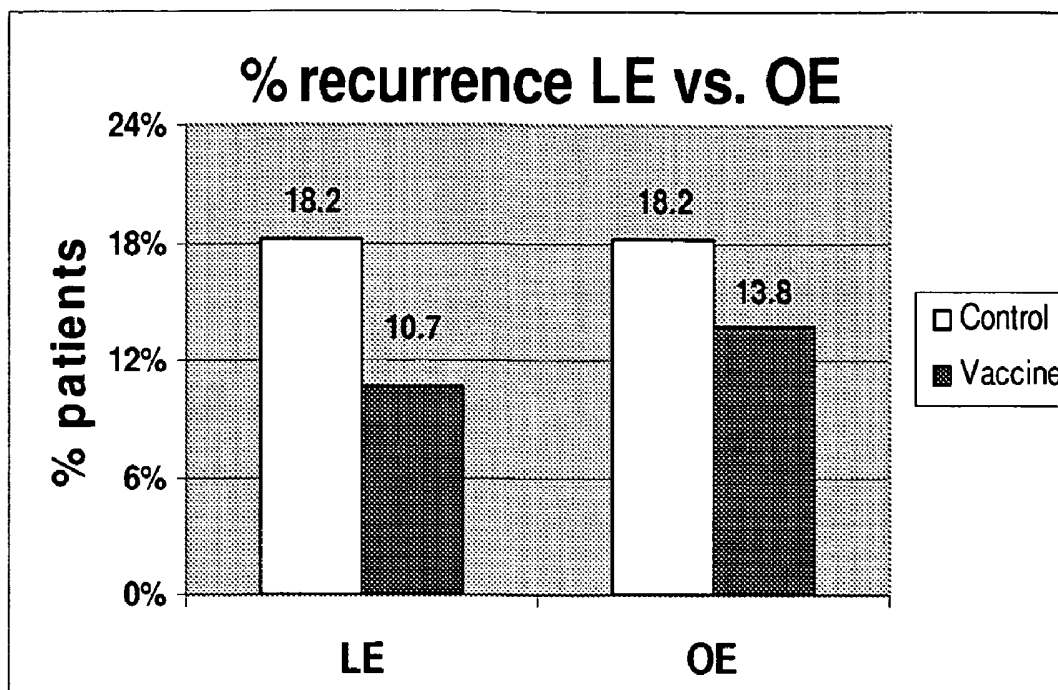


Figura 11C

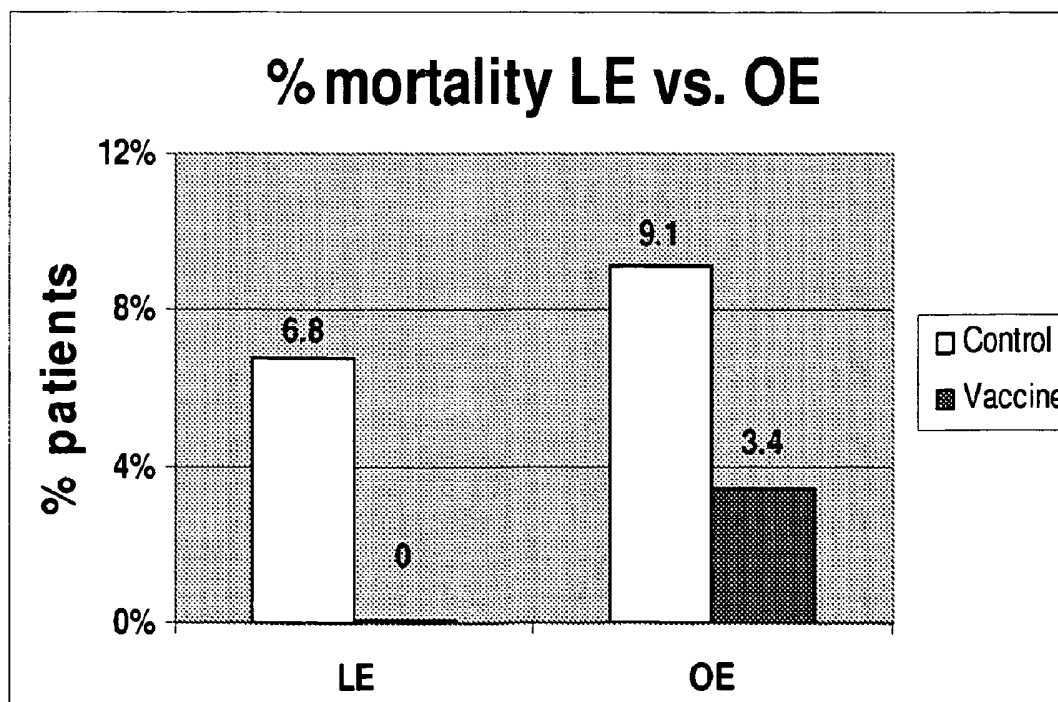


Figura 11D

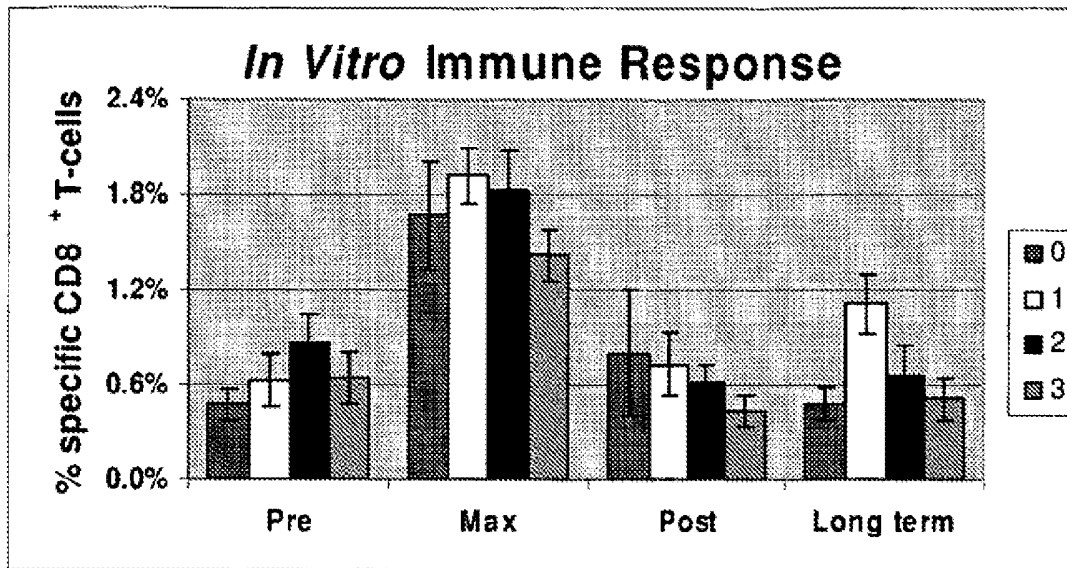


Figura 12A

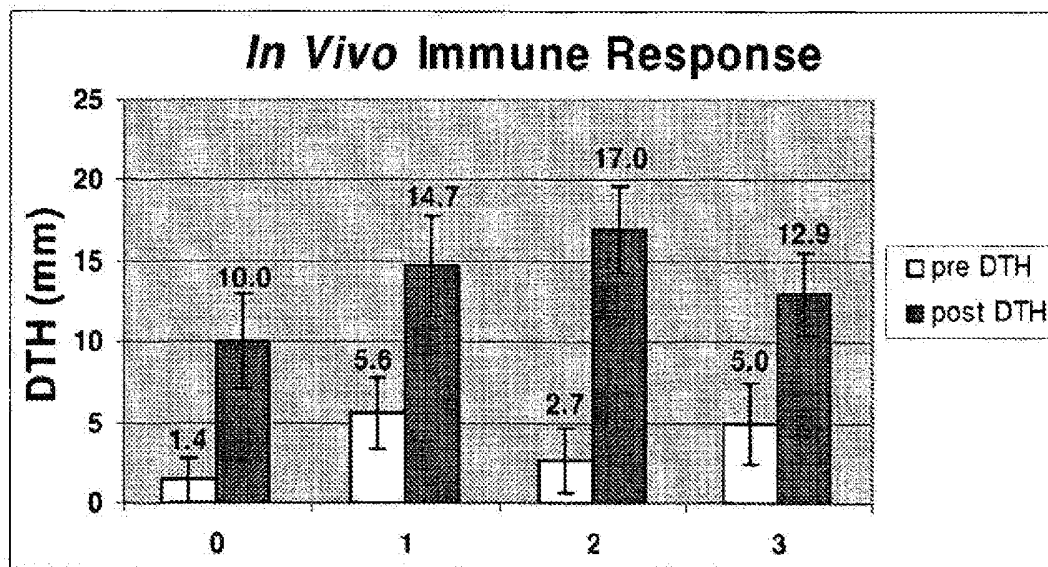


Figura 12B

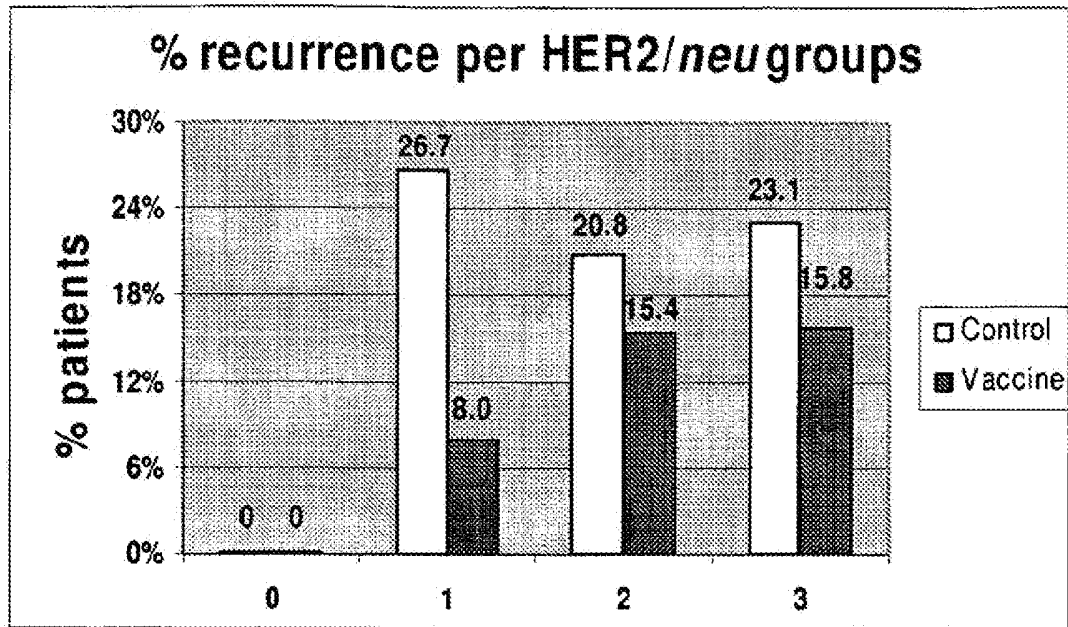


Figura 12C

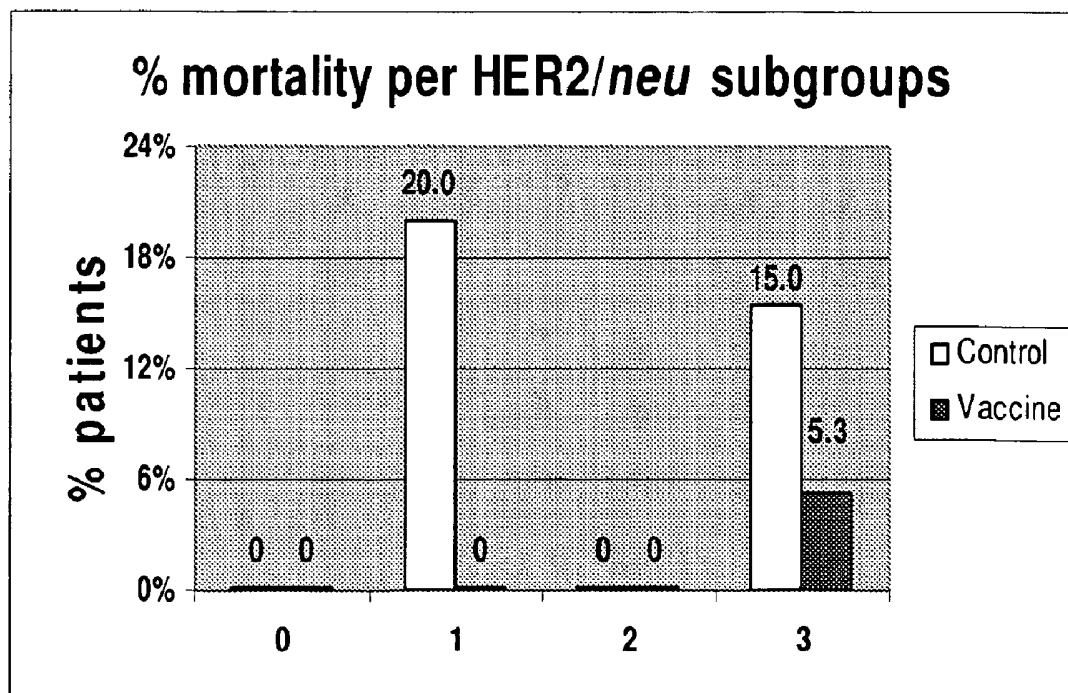


Figura 12D

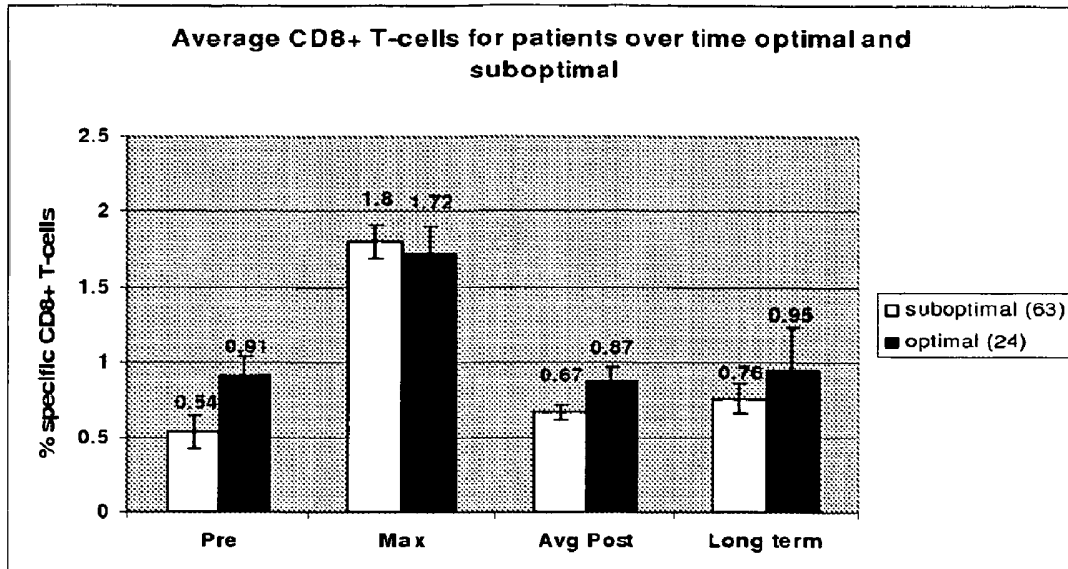


Figura 13A

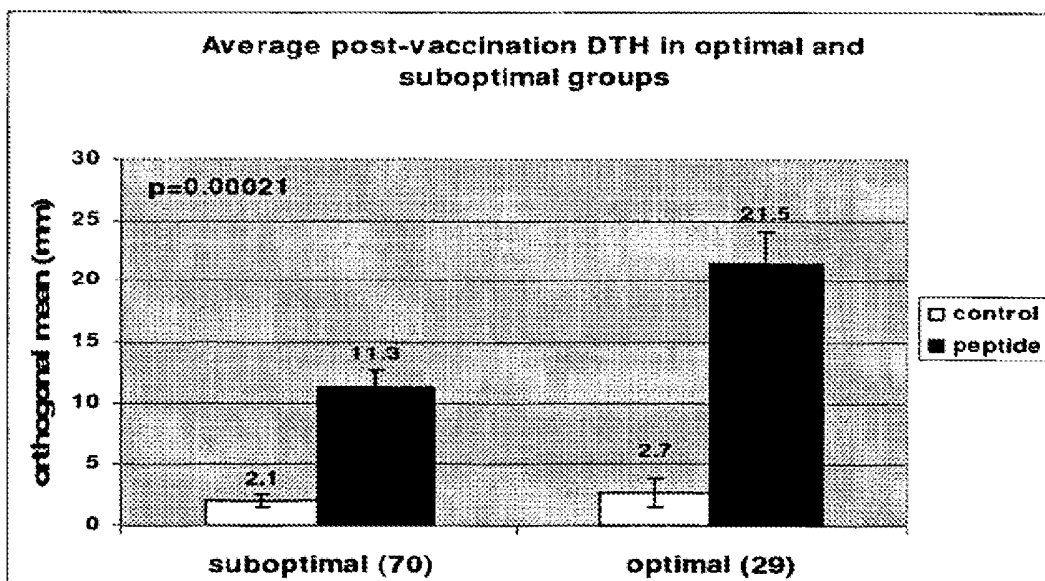


Figura 13B

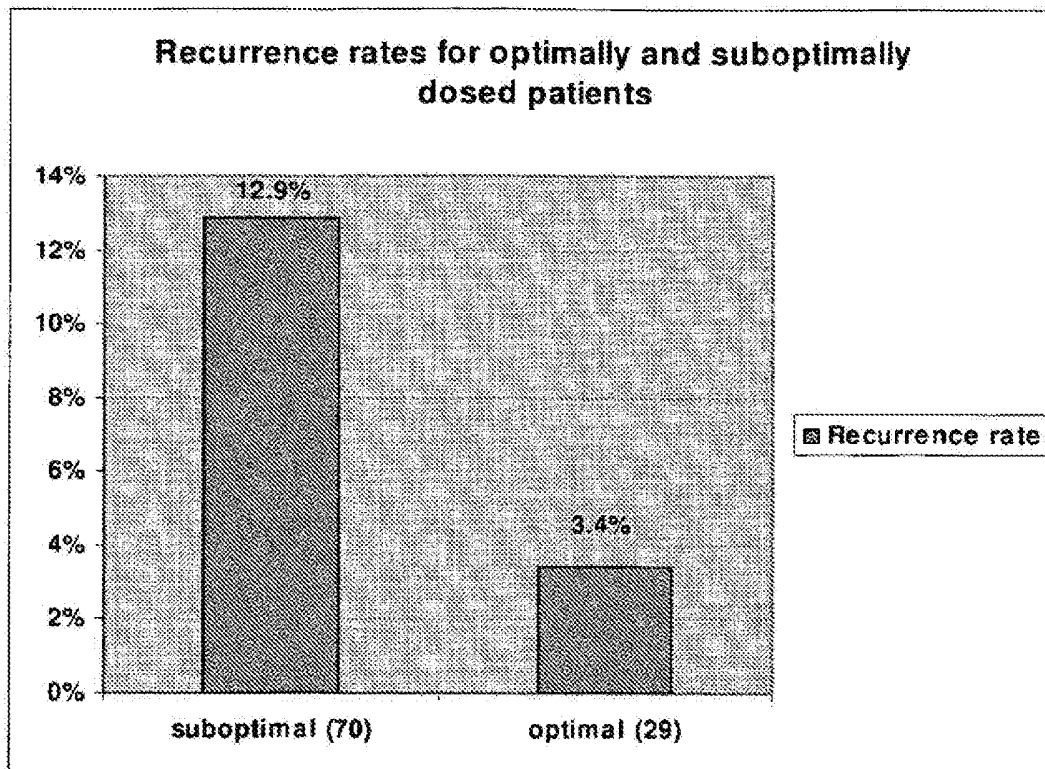


Figura 14