



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2162149 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 14/71 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.03.31
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.11.06
(86)	Europeisk søknadsnr	08745615.8
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.04.11
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.03.17
(30)	Prioritet	2007.06.01, US, 941524 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	The Henry M. Jackson Foundation for the Advancement of Military Medicine, Inc., 6720-A Rockledge Drive, Suite 100, Bethesda, MD 20817, US-USA
(72)	Oppfinner	PEOPLES, George E., 120 Geneseo Road, San Antonio, Texas 78209, US-USA SATHIBALAN, Ponniah, 7008 Golden Seeds Row, Columbia, Maryland 21044, US-USA
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Vaksine for forebygningen av tilbakevendende brystkreft
(56)	Anførte publikasjoner	US-A1- 2005 202 035 US-A9- 2004 121 946 ALEXANDER STOJADINOVIC ET AL: "Quantification and Phenotypic Characterization of Circulating Tumor Cells for Monitoring Response to a Preventive HER2/neu Vaccine-Based Immunotherapy for Breast Cancer: A Pilot Study", ANNALS OF SURGICAL ONCOLOGY, SPRINGER-VERLAG, NE, vol. 14, no. 12, 29 September 2007 (2007-09-29), pages 3359-3368, XP019547521, ISSN: 1534-4681, DOI: 10.1245/S10434-007-9538-X BARRETT CIARA ET AL: "Amplification of the HER2 gene in breast cancers testing 2+ weak positive by HercepTest immunohistochemistry: false-positive or false-negative immunohistochemistry?", JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY JUN 2007, vol. 60, no. 6, June 2007 (2007-06), pages 690-693, ISSN: 0021-9746 DEHQANZADA ZIA A ET AL: "Assessing serum cytokine profiles in breast cancer patients receiving a HER2/neu vaccine using Luminex (R) technology", ONCOLOGY REPORTS, SPANDIDOS PUBLICATIONS, GR, vol. 17, no. 3, 1 March 2007 (2007-03-01), pages 687-394, XP009112817, ISSN: 1021-335X G. E. PEOPLES ET AL: "Combined Clinical Trial Results of a HER2/neu (E75) Vaccine for the Prevention of Recurrence in High-Risk Breast Cancer Patients: U.S. Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 14, no. 3, 1 February 2008 (2008-02-01), pages 797-803, XP55029043, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1448 HUEMAN MATTHEW T ET AL: "Clinical trial results of a HER2/neu peptide (E75) vaccine in preventing recurrence in node positive breast cancer patients.", PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 45, March

2004 (2004-03), page 325, XP9160008, & 95TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH; ORLANDO, FL, USA; MARCH 27 -31, 2004 ISSN: 0197-016X

KHOO S ET AL: "HER2/neu vaccines in breast cancer", WOMEN'S HEALTH, FUTURE MEDICINE, UK, vol. 2, no. 2, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 217-223, XP009160016, ISSN: 1745-5057, DOI: 10.2217/17455057.2.2.217

MENENDEZ J A ET AL: "Trastuzumab in combination with heregulin-activated Her-2 (erbB-2) triggers a receptor-enhanced chemosensitivity effect in the absence of Her-2 overexpression", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, US, vol. 24, no. 23, 10 August 2006 (2006-08-10), pages 3735-3746, XP002495702, ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2005.04.3489

MURRAY JAMES L ET AL: "Toxicity, immunogenicity, and induction of E75-specific tumor-lytic CTLs by HER-2 peptide E75 (369-377) combined with granulocyte macrophage colony-stimulating factor in HLA-A2+ patients with metastatic breast and ovarian cancer.", CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH NOV 2002 LNKD- PUBMED:12429628, vol. 8, no. 11, November 2002 (2002-11), pages 3407-3418, XP002677424, ISSN: 1078-0432

PEOPLES G E ET AL: "Combined clinical trial results of a HER2/neu (E75) vaccine for prevention of recurrence in high-risk breast cancer patients", BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT; 29TH ANNUAL SAN ANTONIO BREAST CANCER SYMPOSIUM; SAN ANTONIO, TX, USA, SPRINGER, NEW YORK, NY, vol. 100, no. supplement 1, 1 January 2006 (2006-01-01), page S6, XP009160015, ISSN: 0167-6806

PEOPLES GEORGE E ET AL: "Clinical trial results of a HER2/neu (E75) vaccine to prevent recurrence in high-risk breast cancer patients", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, US, vol. 23, no. 30, 20 October 2005 (2005-10-20), pages 7536-7545, XP002546156, ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2005.03.047 [retrieved on 2005-09-12]

TUBBS R R ET AL: "Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, US, vol. 19, no. 10, 15 May 2001 (2001-05-15), pages 2714-2721, XP002600920, ISSN: 0732-183X

Beskrivelse

KRYSSREFERANSE TIL RELATERTE SØKNADER

Søknaden krever prioritet fra US søknad nr. 60/941,524 innlevert 1. juni
5 2007.

OMRÅDE

Oppfinnelsen angår generelt området preventive og terapeutiske vaksiner.
Mer spesielt angår oppfinnelsen peptidvaksiner for behandling av brystkreft samt
10 forebygging av tilbakefall i pasienter med brystkreftremisjon.

BAKGRUNN

Brystkreft (BCa) er den vanligste kreftdiagnose hos kvinner og den andre
ledende årsak til kreftrelatert død blant kvinner (Ries LAG, et al., (eds), SEER Can-
15 cer Statistics Review, 1975-2003, National Cancer Institute, Bethesda, MD). Store
fremskritt i brystkreftbehandling over de siste 20 år har ført til en vesentlig forbed-
ring i hyppigheten av sykdomsfri overlevelse (DFS). For eksempel har behandling-
er som benytter antistoffer som er reaktive overfor tumor-relaterte antigener, blitt
brukt for å blokkere spesifikke cellulære prosesser for å forsinke sykdomsprogre-
20 sjon eller forhindre tilbakefall av sykdommen. På tross av de nylige fremskritt in-
nenfor brystkreftbehandling vil et stort antall pasienter til slutt dø fra tilbakevendt
sykdom. Således finner det et behov for behandlinger som forhindrer eller forsin-
ker eller hemmer utviklingen av tilbakevendende sykdom.

Vaksiner er en attraktiv modell for slike behandlinger og forebygginger
25 grunnet deres enkelhet ved administrasjon og på grunn av deres høye grad av suk-
sess som er observert for infeksjonssykdommer. Det grunnleggende konsept for
konstruksjon av en kreftvaksine er enkel i teorien. Utviklingen av effektive kreft-
vaksiner for faste svulster har imidlertid i praksis hatt begrenset suksess. For ek-
sempel observerte en gruppe som forsøkt å administrere en peptidvaksine rettet
30 mot metastatisk melanom, en objektiv responsgrad på kun 2,6% (Rosenberg SA et
al., (2004) Nat. Med. 10: 909-15).

Det finnes mange potensielle forklaringer for denne lave suksessgrad (Cam-
poli M et al., (2005) Cancer Treat. Res. 123: 61-88). For eksempel selv om et an-
tigen er spesifikt assosiert med en spesiell type tumorcelle, kan tumorcellene kun
35 uttrykke lave nivåer av antigenet eller det kan være lokalisert til et kryptisk sted
eller på annen måte være skjernet fra immundeteksjon. I tillegg endrer tumorer
ofte sin antigene profil ved å kvitte seg med antigener etter som de utvikler seg.
Dessuten medvirker det faktum at tumorceller kan uttrykke svært lave nivåer av

MHC-proteiner og andre ko-stimulatoriske proteiner som er nødvendige for å danne en immunrespons til den lave suksessgraden.

Ytterligere problemer som eksisterer for forsøk på vaksiner mot tumorer oppstår hos pasienter med kreft i langt fremskredne stadier. Slike pasienter har en tendens til å ha større primære or metastatiske tumorer, og velle i det indre av tumorene behøver ikke være tilgjengelige grunnet dårlig blodstrøm. Dette er konsistent med observasjonen at vaksinestrategier har hatt en tendens til å være mer suksessfulle for behandlingen av hematologiske sykdommer (Radford KJ et al., (2005) Pathology 37: 534-50) og Molldrem JJ (2006) Biol. Bone Marrow Transplant. 12: 13-8). I tillegg kan tumorer etter som de blir metastatiske, utvikle egenskapen å frigjøre immunosuppressive faktorer i sitt mikromiljø (Campoli, 2005; og Kortylewski M et al., (2005) Nature Med. 11: 1314-21). Metastatiske tumorer har også vært assosiert med en minskning i antallet perifere blodlymfocytter og dendrittisk celledysfunksjon (Gillanders WE et al., (2006) Breast Diseases: A Year Book and Quarterly 17: 26-8).

Selv om enkelte eller alle av disse faktorer kan medvirke til problemene ved utvikling av en effektiv forebyggende eller terapeutisk vaksine, er den underliggende utfordring at de fleste tumorantigener er selv-antigener eller har en høy grad av homologi med selv-antigener, og er således forventet å være utsatt for stringent immuntoleranse. Således er det klart at mange peptidbaserte kreftvaksiner, med eller uten immun-stimulerende adjunkter, kan være dømt til kun begrenset suksess i klinisk praksis grunnet lav immunogenisitet eller mangel på spesifisitet.

Brystkreft prototypevaksiner basert på enkle antigener har vært moderat suksessfulle til å indusere en målbar immunrespons i dyreforsøk og i kliniske forsøk med brystkreftpasienter. Den observerte immunrespons har imidlertid ikke blitt overført til klinisk signifikant beskyttende immunitet mot tilbakefall av sykdommen plassert i remisjon ved standard kirurgi og kjemoterapi. Således er nye vaksinetilnærminger nødvendige for ytterligere å forbedre tilbakefallsgrader og total overlevelse blant BCa-pasienter.

Foretrukne vaksineepitoper er slike som er eksponert eksklusivt eller i det minste ved økede nivåer av en neoplasme. HER2/neu er et proto-onkogen som uttrykkes i mange epiteliske sykdommer (Slamon DJ et al., (1989) Science 244: 707-12). Gen-amplifikasjon og overekspressjon av HER2/neu-proteinet er funnet i 20-25% av BCa og dets store tilstedeværelse er en indikator for dårlig prognose (Pritchard KI et al., (2006) N. Engl. J. Med. 354: 2102-11). HER2/neu har vært studert relativt inngående og flere immunogene peptider har blitt identifisert fra dette proteinet. Et slikt peptid er betegnet E75 og tilsvarer aminosyrer 369-377 av HER2/neu (SEQ ID NO: 1) (US Pat. Nr. 6,514,942).

Forsøk har blitt gjort for å utnytte E75 som en anti-kreft-vaksine, f.eks. som en enkel peptidvaksine kombinert med forskjellige immunoadjuvanter (Zaks TZ et al., (1998) Cancer Res. 58: 4902-8; Knutson KL et al., (2002) Clin. Cancer Res. 8: 1014-8 og Murray JL et al., (2002) Clin. Cancer Res. 8: 3407-18); tilført til to autologe dendrittceller og reinfusert (Brossart P et al., (2000) Blood 96: 3102-8 og Kono K. et al (2002) Clin. Cancer Res. 8: 3394-3400) eller innesluttet i større peptider som er i stand til å binde HLA klasse II molekyler for å rekruttere CD4 hjelper T-celler (Disis ML et al., (1999) Clin. Cancer Res. 5: 1289-97 og Disis ML et al., (2002) J. Clin. Oncol. 20: 2624-32). Hver tilnærming har stimulert en E75-spesifikk cytotoksisk T-celle-mediert immunrespons, men har ikke vist en klinisk signifikant terapeutisk eller beskyttende immunitet i kvinner med brystkreft i frem-

skredent stadium.

HER2/neu er et medlem av epidermal vekstfaktorreseptor-familien og koder for en 185-kd tyrosinkinase-reseptor som er involvert i regulering av cellevekst og proliferasjon. (Popescu NC, King CR, Kraus MH. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosome 17 to bands 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.) Overekspresjon og/eller amplifikasjon av HER2/neu blir funnet i 25-30% av invasive brystkrefttyper (BCa) og er assosiert med mer aggressive tumorer og et dårligere klinisk utfall. (Slamon DJ, Clark GM, Wong SG et al., Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. Science 1987; 235: 177-182; Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA et al., Studies of the HER2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 1989; 244: 707-12; Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H. Prognostic significance of HER2 oncoprotein expression in breast cancer: A 30-year follow-up. J. Clin. Oncol. 1992; 10: 1044-1048).

Bestemmelse av HER2/neu status blir utført i hovedsak via to tester, immunohistokjemi (IHC) og fluorescens in situ hybridisering (FISH). IHC påviser overekspresjon av HER2/neu-protein og blir rapportert i semi-kvantitativ skala på 0 til 3+ (0=negativ, 1+= lav ekspresjon, 2+ = middels og 3+ = overekspresjon). FISH påviser på den annen side amplifikasjon (for mange kopier) av HER2/neu-genet og blir uttrykt som et forhold mellom HER2/neu genkopier og kromosom 17 genkopier og tolkes som «over-ekspresjon» dersom FISH er $\geq 2,0$ kopier (Hicks DG, Tubbs RR. Assessments of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. Hum. Pathol. 2005; 36:250-261). Sammenfallingsgrad av IHC og FISH er omkring 90%. (Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H. et al., Specificity of Hercep test in determining HER2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Admin-

istration-approved scoring system. J. Clin. Oncol. 1999; 17: 1533-1541.) FISH er regnet som gullstandard som retrospektiv analyse viser er den en bedre predictor av trastuzumab (Tz) respons, den er mer objektiv og reproducerbar (Press MF, Slamon DJ, Flom KJ et al., Evaluation of the HER2/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 clinical 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).

Identifikasjon og opprenskning av HER2/neu som et proto-onkogen, har ført til oral humoral eller antistoff-basert immunoterapi for å innbefatte bruken av Tz (Herceptin®). Tz er et rekombinant, humanisert monoklonalt antistoff som binder det ekstracellulære juxtamembran-domene av HER2/neu-proteinet. (Plosker GL, Kearn 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 er indikert for HER2/neu overekspressjon (IHC 3⁺ eller FISH $\geq 2,0$) node-positive (NP) og metastatiske BCa-pasienter, (Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al., Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line 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. New Eng. J. Med. 2005; 353: 1659-1672) og viser svært begrenset aktivitet i pasienter med lav til middels HER2/neu-ekspressjon. (Herceptin (Trastuzumab) prescription produced insert. South San Francisco, CA: Genetech Inc; revidert september 2000.)

En annen form for immunoterapi som blir fulgt, er vaksinasjon og aktiv immunoterapi som sikter mot en cellulær immunrespons til epitoper på tumor-assosierte antigener (TAA) så som HER2/neu. HER2/neu er en kilde for flere immunogene peptider som kan stimulere immunsystemet til å gjenkjenne og drepe HER2/neu-uttrykkende kreftceller. (Fisk B, Blevins TL, Wharton JT, et al., Identification of immunodominant peptide of the HER2/neu proto-oncogene recognized by ovarian tumor-specific CTL lines. J. Exp. Med. 1995; 181: 2109-2117).

E75 (KIFGSLAFL, HER2/neu, 369-377) er en peptidsekvens i HER2/neu proto-onkogen-familien og er i bruk i kliniske forsøk som en anti-kreft-vaksine for å stimulere cytotoxiske T-lymfocytter (CTL) for å ødelegge kreftceller. (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 HER2/neu, HLA-A2 peptide, p369-377, results in short-lived peptide-specific immunity. Clin. Cancer Res. 8: 1014-1018, 2002; Murray JL, Gillogly ME, Przepiroka D, et al., Toxicity immunogenicity, and
 5 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 cancer and renal cell cancer induces immunological responses. Clin. Cancer
 10 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 a peptide-based vaccine. Clin. Cancer
 15 Res. 5: 1289-1297, 1999.

Målrettet passiv immunoterapi basert på HER2/neu proto-onkogenet har primært dreiet seg omkring bruken av Tz (Herceptin®). Tz er et rekombinant, humanisert monoklonalt antistoff som binder til det ekstracellulære juxtamembranedomene av HER2/neu-proteinet. Tz er godkjent av regulatoriske myndigheter og
 20 indikert til behandling av HER2/neu overuttrykkende (IHC 3+ eller FISH > 2,0) tumorer i metastatiske brystkreftpasienter og i adjuvant-setting for node-positive brystkreftpasienter. Tz har undergått flere kliniske forsøk og blir nå rutinemessig brukt til behandling av metastatiske pasienter og i adjuvantbehandlingen av høyrisiko brystkreftpasienter med overekspresjon av HER2/neu. Tz viser imidlertid
 25 begrenset aktivitet i pasienter med lav til middels HER2/neu-ekspresjon. Følgelig, basert på de tidligere resultater som blir observert med Tz, ville immunogene peptid-vaksiner som sikter mot HER2/neu, ikke være forventet å være effektive i kreftpasienter med lave til middels nivåer av HER2/neu tumorekspresjon.

Således er det et behov innen faget å utnytte det immunobeskyttende og terapeutiske potensiale av E75 for å fremstille vaksiner som gir brystkreftpasienter i
 30 klinisk remisjon pålitelig beskyttelse mot gjenopptreden av sykdommen.

OPPSUMMERING

Oppfinnelsen angår sammensetninger for anvendelse i fremgangsmåter for å
 35 indusere og opprettholde immunitet mot brystkrefttilbakevending i pasienter i klinisk brystkreft remisjon. Oppfinnelsen fremskaffer en sammensetning omfattende et farmasøytisk effektivt bæremiddel og et peptid som har aminosyresekvensen SEQ ID NO: 2 for anvendelse til indusering av beskyttende eller terapeutisk immu-

nitet mot brystkrefttilbakevending hos et individ, hvor individet har en immunokjemigrad (IHC) på 1+ eller 2+ for HER2/neu proteinekspresjon og en fluorescens in situ hybridiseringsgrad (FISH) på mindre enn $2,0 \pm 20\%$ for HER2/neu genekspresjon. Administrasjonen kan bli utført på enhver passende måte i faget så som inokulering eller injeksjon, og mer spesielt intradermal injeksjon, som kan utføres med en eller flere separate doser. Slike doser kan omfatte en lik konsentrasjon av peptidet og en immunoadjuvant, kan bli administrert i hovedsak samtidig og kan bli administrert ved et inokuleringssted eller i en avstand fra hverandre på overflaten av huden. Sammensetningen kan bli administrert omkring tre til seks ganger eller flere på en månedlig basis inntil den beskyttende immunitet er etablert. I enkelte aspekter omfatter sammensetningen ytterligere en adjuvant så som rekombinant human granulocyt makrofag-koloni-stimulerende faktor (GM-CSF).

I enkelte aspekter omfatter fremgangsmåtene ytterligere å administrere til individet en forsterkende vaksinedose som omfatter en effektiv mengde av en sammensetning omfattende et farmasøytisk effektivt bæremiddel og et peptid som har SEQ ID NO: 2. I enkelte aspekter omfatter forsterkersammensetningen ytterligere en adjuvant så som GM-CSF. Administrasjonen av en forsterker kan bli utført ved inokulasjon eller injeksjon og kan bli administrert hver sjette eller 12 måneder deretter.

Pasienten kan være ethvert pattedyr, og er fortrinnsvis et menneske. I visse aspekter er mennesket positivt for hovedhistokompatibilitet antigen blodtypebestemt som human leukocyttantigen A2 eller humant leukocyttantigen A3. I andre aspekter er mennesket positivt for ekspresjonen av påviselige nivåer av HER2/neu. Mennesket er en lav eller middels HER2/neu-uttrykker og har en immunohistokjemi (IHC) av grad 1+ eller 2+ og/eller en fluorescens in situ hybridiseringsgrad (FISH) på mindre enn 2,0.

Sammensetningene omfatter et farmasøytisk akseptabelt bæremiddel, en effektiv mengde av et peptid som har aminosyresekvensen SEQ ID NO: 2, en adjuvant så som granulocyt makrofag-koloni-stimulerende faktor og et optimalisert immuniseringsskjema. I enkelte spesielle aspekter innbefatter de foretrukne konsentrasjoner og skjemaer av vaksinesammensetningen: (1) 1 mg/ml peptid og 0,25 mg/ml adjuvant, (2) 0,5 mg/ml peptid og 0,25 mg/ml adjuvant, (3) 0,1 mg/ml peptid og 0,25 mg/ml adjuvant og (4) 0,5 mg/ml peptid og 0,125 mg/ml adjuvant, hver med månedlige inokuleringer i 6 påfølgende måneder fulgt av årlige forsterkerinokuleringer i 3 eller flere år.

KORT BESKRIVELSE AV TEKNIGNENE

De medfølgende tegningene, som er tatt med for å gi ytterligere forståelse av oppfinnelsen og er inkorporert i og utgjør en del av denne beskrivelsen, illustrerer aspekter av oppfinnelsen og virker sammen med beskrivelsen til å forklare prinsippene bak oppfinnelsen. I tegningene:

Figur 1 viser den maksimale lokale og systemiske toksisitet opplevd av pasienter vaksinert med E75. Lokal toksisitet (erytema og indurasjon på injeksjonsstedet) er en ønsket effekt som viser en respons på vaksinen. De vanligste grad 2 lokale toksisiteter var puritis eller ubehag som krever medisinerings. De vanligste systemiske toksisiteter var skjelettsmerter, influensa-liknende symptomer og tretthet (vanligvis assosiert med GM-CSF) og varte i <24 timer. De to grad 3 systemiske toksisiteter var angioødem på tungen (etter sjette inokulering) og skjelettsmerter.

Figur 2 viser Kaplan Meier sykdomsfri overlevelseskurver ved 20 måneder gjennomsnittlig oppfølging. For 171 innlagte pasienter var tilbakefallsgraden i den vaksinerte gruppen 5,6% i forhold til 14,2% i observasjonsgruppen ($P=0,04$) ved en midlere oppfølging på 20 måneder. De sykdomsfrie overlevelsesgrader i de vaksinerte og kontrollgruppene var henholdsvis 92,5% og 77%.

Figur 3A og 3B viser den vaksine-induserte E75 CTL-respons. (A) Vaksine-indusert E75-spesifikk CTL for alle pasienter. De gjennomsnittlige nivåer av CD8+E75-spesifikk CTL var vesentlig øket fra før-vaksinasjonsnivåer (0,39%, område 0-3,28% til et maksimalt nivå (1,8 område 0,4-12,2%, $P<0,0001$) og etter-vaksinasjonsnivået (0,70%, område 0,06-2,91%, $P=0,002$). Det var ingen forskjell mellom forvaksinenivåer og langtidsnivåer (seks måneder) av spesifikke CD8+ T-celler. (B) Vaksine-indusert E75-spesifikk CTL basert på for-eksisterende immunitet. Pasienter med og uten for-eksisterende immunitet viste identiske mønstre ved respons på E75-vaksinering med liknende midlere maksimale og ettervaksinasjonsnivåer oppnådd for begge. Imidlertid var det i pasientene uten for-eksisterende immunitet, en vesentlig økning i dimer-nivåer fra forvaksinasjon til seks måneder etter vaksine (0,13% [område 0-0,028%] mot 0,45% [0-2,68]. $P<0,0001$).

Figur 4A til 4D viser resultatene av forsinket type hypersensitivitetstest. (A) DTH for alle pasienter etter vaksinasjon. Kontroll $2,1\pm 0,5$ mm i forhold til peptid $14,0\pm 1,4$ mm, $P<0,0001$. (B) Før- og etter-vaksinasjon DTH for NN pasienter. Det var ingen forskjell i salinekontroll mot peptid før-vaksinering. Etter vaksinering var det en vesentlig økning i DTH-respons mot E75-peptid i forhold til ettervaksinekontroll ($P<0,001$) og i forhold til førvaksinering E75 DTH ($P<0,001$). (C) Ettervaksinering DTH ved forsøk. NP pasienter hadde vesentlig større DTH-responser enn NN-pasienter ($17,3\pm 2,4$ mm mot $10,9\pm 1,5$ mm, $P=0,02$). Dette kan vær

grunnet en forskjell i den midlere totale vaksinedose i NN-gruppen (2000 µg mot 4000 µg. $P < 0,0001$). (D) Etter-vaksinering DTH per dosegruppe. Pasienter som mottok <6000 µg E75 hadde vesentlig mindre DTH-responser i forhold til pasienter som mottok et totale på 6000 µg ($13,3 \pm 1,9$ mm mot $25,1 \pm 4,0$ mm, $P = 0,008$).

5 **Figur 5** viser nivåene av CD8⁺ T-celler i forsterker-pasienter. Pasienter som mottok en forsterkning 6 måneder etter primærvaksinasjonsserien hadde vesentlig høyere nivåer av CD8⁺ T-celler enn pasienter >6 måneder fra primærvaksinasjonsserien. Blant disse pasienter >6 måneder, viste de en ikke-signifikant minskning fra 0,7% til 0,44% fra sine egne nivåer ved 6 måneder etter primærvaksinering.

10 **Figur 6** viser gradert lokal og systemisk toksisitet. Størstedelen av pasientene opplevde grad 1 lokal toksisitet med kun 2 pasienter som opplevde grad 2 lokal toksisitet. Over halvdelene av pasientene hadde ingen systemisk toksisitet og det fantes ingen grad 2 eller 3 systemiske toksisiteter. De elleve pasienter som opplevde grad 1 systemisk inkludert (antall tilfeller): tretthet (4), hodepine (4),
15 myaliger (3), frysninger (2), feber (2), diaré (1), skjelettsmerte (1) og artralgi (1).

Figur 7 viser forsterkerresponsen i pasienter som mangler SRI viste en tendens mot et økende antall av antigen-spesifikke CD8⁺ T-celler.

20 **Figur 8** viser pasienter som oppviser økede IFN-γ-utskillende celler påvist med enzyk-tilknyttet immunoabsorbans. Totalt viste 91% av pasientene økede antigenspesifikke (funksjonelle) T-celler som målt med ELISPOT, med 50% som viste en definitiv økning (øket IFN-γ-utskillende celler på ≥ 50 av assayene).

Figur 9 viser lokale reaksjoner i forsterkerpasienter. Pasienter som mottok forsterkeren tidsmessig nærmere avslutningen av sin primære vaksineringsserie
25 (≤ 9 måneder, lyse kolonner) hadde vesentlig større LR enn de pasienter >9 måneder fra sin primære vaksineringsserie. De to gruppene hadde like LR mot slutten av primærserien (venstre side). Disse data antydte en additiv effekt av forsterkeren i pasienter som mottok forsterker først og en opprettholdelseeffekt for pasienter som mottok forsterkeren senere.

30 **Figur 10** viser den økende LR over forløpet av primærserien og illustrerer at de to gruppene var like i initiale serier og at den eneste forskjell er tid fra primærserien. Voks 6-tallet er forskjellig siste før LR tall vist i **Figur 7** fordi enkelte pasienter kun mottok 4 inokuleringer. De to grupper var statistisk identiske ved alle punkter bortsett fra vaksine 3 når ≤ 9 måneder-gruppen var større (97 mot 80,
35 $p = 0,04$).

Figur 11A til Figur 11D viser immunologiske (gjennomsnitt $\pm$ SE) og kliniske responser (absolutt opptreden og mortalitetsgrader) av pasienter innlagt i E75 Fase II forsøk av HER2/neu LE mot OE.

A. In vitro immunrespons – alle in vitro pre-maks % spesifikk CD8+ T-celler statistisk øket (LE $p < 0,001$, OE $p < 0,001$) og LE-pasienter hadde øket maksimal respons i forhold til OE-pasienter ($p = 0,04$).

B. In vivo immunrespons – alle inn vivo pre-post DTH statistisk øket (LE $p < 0,001$, OE $p = 0,02$).

C. Gjenopptredengrad – gjenopptredengrader var minsket i vaksinerte LE- og OE-pasienter, dog ikke statistisk signifikant.

D. Mortalitetsgrad – vaksinerte LE-pasienter hadde en tendens mot minskede mortalitetsgrader ($p = 0,08$).

Figur 12A til Figur 12D viser immunologiske (gjennomsnitt $\pm$ SE) og kliniske responser (absolutt gjenopptreden og mortalitetsgrader) av pasienter innlagt i E75 Fase II forsøk med HER2/neu IHC ekspresjonsnivåer (0, 1+, 2+, 3+).

A. In vitro immunrespons – alle in vitro pre-maks % spesifikke CD8+ T-celler statistisk øket mens kun HER2/neu 1+ pre-langtids tenderte mot signifikans ($p = 0,08$).

B. In vivo immunrespons – alle in vivo pre-post DTH statistisk øket (0 $p = 0,03$, 1+ $p = 0,02$, 2+ $p = 0,02$, 3+ $p = 0,05$).

C. Gjenopptredengrad – gjenopptredengrader var øket i alle vaksinerte IHC-nivåer, dog ikke statistisk signifikant.

D. Mortalitetsgrader – mortalitetsgrader sank i alle vaksinerte IHC-nivåer og var statistisk signifikante i HER2/neu IHC 1+ vaksinepasienter ($p = 0,04$).

Figur 13A og 13B viser Dimer Assay og DTH per ODG mot SDG. (A) En signifikant forskjell i ODG mot SDG ble observert i den gjennomsnittlige pre-vaksine CD8 + E75-spesifikke T-cellenivåer ($0,91 \pm 0,13\%$ mot $0,54 \pm 0,11\%$, $p = 0,03$). Ingen signifikant forskjell synes mellom de gjennomsnittlige maksimale CD8 + E75-spesifikke T-celle-nivåer. Den optimale dose viste en tendens mot en økning i gjennomsnittet av månedlig post-vaksinasjonsprosent av CD8 + E75-spesifikke T-celler ($0,87 \pm 0,10\%$ mot $0,67 \pm 0,05\%$, $p = 0,07$). Ingen forskjell observeres i de gjennomsnittlige langtids CD8 + E75-spesifikke T-celle-nivåer mellom grupper ved 6 måneder. (B) Ortogonalt gjennomsnitt DTH-respons (mm) mellom ODG mot SDG viste ingen forskjell fra kontroll-inokulum ($3,0 \pm 1,1$ mm mot $2,0 \pm 0,5$ mm). DTH-respons overfor peptidet var signifikant øket i ODG mot SDG ($21,5 \pm 2,5$ mm mot $11,3 \pm 1,3$ mm, $p = 0,00021$).

Figur 14 viser sammenligning av de kliniske gjenopptredengrader mellom SDG og ODG. Sammenlignet med SDG viste ODG en tendens mot gjenopptredengrader ($p = 0,27$), men en signifikant kortere midlere oppfølging. Imidlertid besto ODG av yngre pasienter med vesentlig mer aggressiv sykdom.

DETALJERT BESKRIVELSE

Forskjellige uttrykk som angår metodene og andre aspekter av foreliggende oppfinnelse blir brukt gjennom beskrivelsen og kravene. Slike uttrykk skal ha sin vanlige betydning innen faget med mindre noe annet er angitt. Andre spesielt definer-
 5 nerte uttrykk skal bli tolket på en måte som er konsistent med definisjonen gitt heri.

Uttrykket "forebygge" refererer enhver suksess eller tegn på suksess i forebyggingen av brystkreftgjenopptreden/tilbakefall i pasienter i klinisk remisjon som målt ved enhver objektiv eller subjektiv parameter innbefattende resultatene av en
 10 radiologisk eller fysisk undersøkelse.

"Effektiv mengde" eller "terapeutisk effektiv mengde" blir brukt om hverandre heri og refererer til en mengde av en forbindelse, materiale eller sammensetning som beskrevet heri som er effektiv til å oppnå et spesielt biologisk resultat så som, men ikke begrenset til biologiske resultater som er beskrevet eller eksemplifisert
 15 heri. Slike resultater kan innbefatte, men er ikke begrenset til forebyggingen av brystkreft og mer spesielt forebyggingen av tilbakevendende brystkreft, for eksempel forebyggingen av tilbakevending i et individ som bestemt på enhver måte som er egnet innen faget. Optimal terapeutisk mengde refererer til dosen, metoden og anvendelsen av forsterkere for å oppnå det beste terapeutiske resultat.

"Farmasøytisk akseptabel" refererer til de egenskaper og/eller substanser som er akseptable for pasienten fra et farmakologisk/toksikologisk synspunkt og til den fremstillende farmasøytisk kjemiker fra et fysisk/kjemisk synspunkt med hensyn til sammensetning, formulering, stabilitet, pasientakseptabilitet og biotilgjengelighet. "Farmasøytisk akseptabelt bæremiddel" refererer til et medium som ikke inter-
 20 fererer med effektiviteten av den biologiske aktivitet av den/de aktiv(e) bestanddel(er) og ikke er toksisk mot vertsorganismen som den/de blir administrert til.

"Beskyttende immunitet" eller "beskyttende immunrespons" betyr at individet danner en aktiv immunrespons mot en immunogen forbindelse eller mot et antigen så som brystkreftantigenene beskrevet og eksemplifisert heri, slik at ved etterfølgende eksponering til antigenet er individets immunsystem i stand til å sikte
 30 mot og ødelegge celler som uttrykker antigenet for derved å minske hyppigheten av morbiditet og mortalitet fra gjenopptreden av kreft i individet. Beskyttende immunitet i forbindelse med foreliggende oppfinnelse blir fortrinnsvis, men ikke utlukende, gitt av T-lymfocytter.

Uttrykket "omkring" som brukt heri når det refereres til en målbar verdi så som en mengde, en midlertidig varighet og liknende, er ment å omfatte variasjoner på $\pm 20\%$ eller $\pm 10\%$, mer fortrukket $\pm 5\%$, enda mer foretrukket $\pm 1\%$ og enda

mer foretrukket $\pm 0,1\%$ fra den angitte verdi, idet slike variasjoner er passende for å utføre de beskrevne metoder.

5 "Peptid" refererer til ethvert peptid omfattende to eller flere aminosyrer bundet til hverandre med peptidbindinger eller modifisert peptidbindinger dvs. peptidisoestere. Polypeptid refererer til både korte kjeder, vanligvis referert til som peptider, oilgopeptider eller oligomerer samt til lengre kjeder generelt referert til som proteiner. Polypeptider kan inneholde aminosyrer andre enn de 20 gen-kodete aminosyrer. Polypeptider innbefatter aminosyresekvenser som er modifisert enten ved naturlige prosesser så som post-translasjonell prosessering eller ved kjemiske
10 modifikasjonsteknikker som er velkjent innen faget. Slike modifikasjoner er godt beskrevet i grunnleggende tekster og i mer detaljerte monografier så vel som i voluminøs forskningslitteratur. Modifikasjoner kan opptre hvor som helst i et polypeptid innbefattende peptidstammen, aminosyre sidekjedene og amino eller karboksylendene. Det vil bli forstått den samme type modifikasjon kan være til stede i
15 samme eller varierende grad ved flere steder i et gitt polypeptid. Dessuten kan et gitt polypeptid inneholde mange typer modifikasjoner. Polypeptider kan være forgrenet som et resultat av generalisering og de kan være cykliske, med eller uten forgreninger. Cykliske forgrenede og forgrenede cykliske polypeptider kan stamme fra naturlige posttranslasjonelle prosesser eller kan bli laget med syntetiske meto-
20 der. Modifikasjoner innbefatter acetylering, acylering, ADP-ribosylering, amidering, kovalent binding av flavin, kovalent binding av en heme-enhet, kovalent binding av et nukleotid eller nukleotidderivat, kovalent binding av lipid eller lipidderivat, kovalent binding av fosfotidylinositol, kryssbinding, cyklisering, disulfidbindingsdannelse, demetylering, dannelse av kovalente kryssbindinger, dannelse av cystin, dannelse
25 av pyroglutamat, formylering, gamma-karboksylering, glykosylering, GPI forankringsdannelse, hydroksylering, jodinerings, metylering, myristoylering, oksydering, proteolytisk prosessering, fosforylering, prenylering, rasemisering, selenoylering, sulfatering, transfer-RNA-mediert addisjon a aminosyrer til proteiner så som arginylering og ubiquitinerings.

30 "Forsterker" refererer til en dose av et immunogen administrert til en pasient for å forsterke, forlenge eller opprettholde beskyttende immunitet og å overvinne ned-reguleringen av T-celle-responser mediert av regulatoriske T-celler.

"Fri for brystkreft" eller "sykdomsfri" eller NED (ingen tegn på sykdom) betyr at pasienten er i klinisk remisjon induert av behandling med den eksisterende
35 standard for behandlingsterapi. Med "remisjon" eller "klinisk remisjon", som blir brukt synonymt, er det ment at de kliniske tegn og symptomer på brystkreft har blitt vesentlig minsket eller har forsvunnet fullstendig basert på klinisk diagnose selv om kreftceller fremdeles kan eksistere i kroppen. Således er det påtenkt at

remisjon omfatter delvis og fullstendig remisjon. Tilstedeværelsen av gjenværende kreftceller kan bli mengdebestemt med assayer så som CTC (sirkulerende tumorceller) og kan vær forutsigende for tilbakefall.

5 "Tilbakefall" eller "gjenopptreden" eller "resurgens" blir brukt om hverandre heri og refererer til den radiografiske diagnose av tilbakevending eller tegn og symptomer på returnering av brystkreft etter en periode av bedring eller remisjon.

Brystkreft er et viktig helseproblem for kvinner verden over. Brystkreftvaksiner som har vært forsøkt frem til i dag, har hatt begrenset effektivitet, spesielt med hensyn til å forhindre tilbakefall i sykdomsfrie pasienter. I samsvar med for-
10 liggende oppfinnelse har det blitt bestemt at gjenopptreden av brystkreft i sykdomsfrie pasienter effektivt kan bli forhindret ved administrasjon til en pasient av et peptid av HER2/neu onkogenet, E75 (SEQ ID NO: 2) inder visse betingelser. Det har også uventet blitt bestemt at E75-peptidet er assosiert med MHC HLA-A2 og -A3 og kan således indusere beskyttende immunitet i pasienter som har HLA-A2 og
15 -A3 haplotypen.

Følgelig fremviser forliggende oppfinnelse vaksinesammensetninger for induksjon av beskyttende immunitet mot brystkrefttilbakefall. Oppfinnelsen fremviser også disse sammensetninger for anvendelse i fremgangsmåter for indusering og for opprettholdelse av immunitet mot brystkreft, og mer spesielt mot gjenopptredende brystkreft. I enkelte aspekter omfatter fremgangsmåtene å administrere til
20 et individ en effektiv mengde av en sammensetning omfattende et farmasøytisk effektivt bæremiddel og et polypeptid som har aminosyresekvensen SEQ ID NO: 2.

Individet kan være ethvert dyr, og er fortrinnsvis et pattedyr så som et menneske, mus, rotte, hamser, marsvin, kanin, katt, hund, ape, ku, hest, gris og
25 liknende. Mennesker er mest fortrukket. I sterkt foretrukne aspekter er menneskene positive for HLA-A2 eller HLA-A3 haplotypen. I andre foretrukne aspekter er menneskene positive for ekspresjonen av human HER2/neu. Menneskene har lav og/eller middels HER2/neu-uttrykkende tumorer.

Vaksinesammensetningene kan bli formulert som frysetørkede eller flytende preparater i henhold til enhver metode som er kjent innen faget. Ikke-begrensende
30 eksempler på flytende preparatform innbefatter oppløsninger, suspensjoner, sirup, oppslemminger og emulsjoner. Passende flytende bæremidler innbefatter ethvert egnet organisk eller uorganisk oppløsningsmiddel, f.eks. vann, alkohol, saline-oppløsning, bufret salineoppløsning, fysiologisk salineoppløsning, dekstrose-oppløsning, vann-propylen-glykol-oppløsninger og liknende, fortrinnsvis i steril
35 form.

Vaksinesammensetningene kan bli formulert i enten nøytrale eller saltformer. Farmasøytisk akseptable salter innbefatter syreaddisjonssaltene (dannet med

de frie aminogruppene av de aktive polypeptider) og som blir dannet med uorganiske syrer så som for eksempel salt- eller fosforsyrer eller organiske syrer så som eddik-, oksal-, tartar-, mandel- og liknende. Salter dannet fra frie karboksylgrupper kan også være avledet fra uorganiske baser så som for eksempel natrium-, kalium-, ammonium- eller jernhydroksyder, slike organiske baser som isopropylamin, trimetylamin, 2-etylaminoetanol, histidin, prokain og liknende.

Vaksinesammensetningene blir fortrinnsvis formulert for inokulering eller injeksjon i individet. For injeksjon kan vaksinesammensetningene ifølge oppfinnelsen bli formulert i vandige oppløsninger så som vann eller alkohol eller i fysiologisk kompatible buffere så som Hanks oppløsning, Ringers oppløsning eller fysiologisk salinebuffer. Oppløsningen kan inneholde formulatoriske midler så som suspenderende, conserverende, stabiliserende og/eller dispergerende midler. Injeksjonsformuleringer kan også bli fremstilt som fastformpreparater som er tiltenkt å bli konvertert, kort tid før bruk, til flytende form preparater som er egnet for injeksjon, for eksempel ved konstituering med en egnet vehikkel så som sterilt vann, salineoppløsning eller alkohol, før bruk.

Vaksinesammensetningene kan også bli formulert i vedvarende frigjørings-vehikler eller depotpreparater. Slike langtidsformuleringer kan bli administrert ved inokulering eller implantasjon (f.eks. subkutan eller intramuskulært) eller ved injeksjon. Således kan vaksineformuleringene f.eks. bli formulert med passende polymere eller hydrofobe materialer (f.eks. som en emulsjon i en akseptabel olje) eller ionebytterresiner eller som dårlig oppløselige derivater, f.eks. som et dårlig oppløselig salt. Liposomer og emulsjoner er velkjente eksempler på avleveringsvehikler som er egnet for anvendelse som bæremidler.

Vaksinesammensetningene kan omfatte midler som forsterker den beskyttende effektivitet av vaksinen så som adjuvanter. Adjuvanter innbefatter enhver forbindelse eller forbindelser som virker til å øke en beskyttende immunrespons mot E75 peptidantigenet for derved å redusere mengden av antigen som er nødvendig i vaksinen og/eller administrasjonsfrekvensen som er nødvendig for å gi en beskyttende immunrespons. Adjuvanter kan for eksempel innbefatte emulgatorer, muramyl dipeptider, avridin, vandige adjuvanter så som aluminiumhydroksyd, chitosan-baserte adjuvanter og enhver av de forskjellige saponiner, oljer og andre substanser som er kjent innen faget så som Amphigen, LPS, bakterielle cellevegg-ekstrakter, bakterielt DNA, CpG-sekvenser, syntetiske oligonukleotider samt kombinasjoner derav (Schijns et al (2000) Curr. Opin. Immunol. 12: 456), *Mycobacteriophlei* (*M. phlei*) cellevegg ekstrakt (MCWE) (US patent nr. 4.744.984), *M. phlei* DNA (M-DNA) og M-DNA-*M. phlei* celleveggkompleks (MCC). Forbindelser som kan virke som emulgatorer innbefatter naturlige og syntetiske emulgerende midler så

vel som anioniske, kationiske og ikke-ioniske forbindelser. Blant de syntetiske forbindelser innbefatter anioniske emulgerende midler f.eks. kalium-, natrium- og ammoniumsalter av laurin- og oleinsyre, kalsium-, magnesium- og aluminiumsalter av fettsyrer og organisk sulfonater så som natriumlaurylsulfat. Syntetiske kationiske midler innbefatter f.eks. cetyltrylammoniumbromid, mens syntetiske ikke-ioniske midler er eksemplifisert ved glyserylestere (f.eks. glyserylmonostearat), polyoksyetylenglykol-estere og -etere og sorbitan fettsyreestere (f.eks. sorbitan-monopalmitat) samt deres polyoksytylen-derivater (f.eks. polyoksyetylsorbitan-monopalmitat). Naturlige emulgeringsmidler innbefatter akasia, gelatin, lechitin og kolesterol.

Andre egnede adjuvanter kan bli dannet med en oljekomponent så som en enkel olje, en blanding av oljer, en vann-i-olje-emulsjon eller en olje-i-vann-emulsjon. Oljen kan være en mineralolje, en vegetabilsk olje eller en animalsk olje. Mineraloljer er flytende hydrokarboner oppnådd fra petrolatum via en destillasteknikk og blir også referert til innen faget som flytende parafin, flytende petrolatum eller hvit mineralolje. Passende animalske oljer innbefatter for eksempel torskeleverolje, skrei-olje, menhadenolje, appelsinskallolje og haileverolje, hvorav alle er tilgjengelige kommersielt. Passende vegetabiliske oljer innbefatter f.eks. canola-olje, mandelolje, bomullsfrøolje, maisolje, olivenolje, peanøttolje, solsikkeolje, sesamfrøolje, soyabønneolje og liknende. Freundts fullstendig adjuvant (FCA) og Freundts ufullstendige adjuvant (FIA) er to vanlige adjuvanter som blir vanlig brukt i vaksinepreparater og er også egnet for anvendelse i foreliggende oppfinnelse. Både FCA og FIA er vann-i-mineralolje-emulsjoner, men FCA inneholder også en avlivet *Mycobacterium* sp.

Immunomodulatoriske cytokiner kan også bli brukt i vaksinesammensetningene for å øke vaksineeffektiviteten, f.eks. som en adjuvant. Ikke-begrensende eksempler på slike cytokiner innbefatter interferon alfa (IFN- α), interleukin-2 (IL-2) og granulocyt makrofag-kolonistimulerende faktor (GM-CSF) eller kombinasjoner derav. GM-CSF er sterkt foretrukket.

Vaksinesammensetninger omfattende E75 peptidantigener og videre omfattende adjuvanter, kan bli fremstilt ved å bruke teknikker som er velkjente for fagpersonen innbefattende, men ikke begrenset til blanding, ultralydbehandling og mikrofluidering. Adjuvanten kan omfatte fra omkring 10% til omkring 50% (v/v) av vaksinesammensetningen, mer foretrukket omkring 20% til omkring 40% (v/v) og mer foretrukket omkring 20% til omkring 30% (v/v) eller ethvert heltall innenfor disse områder. Omkring 25% (v/v) er sterkt foretrukket.

Administrasjon av vaksinesammensetningene kan være ved infusjon eller injeksjon (f.eks. intravenøst, intramuskulært, intrakutant, subkutant, intratekalt,

intraduodenalt, intraperitonealt og liknende). Vaksinesammensetningene kan også bli administrert intranasalt, vaginalt, rektalt, oralt eller transdermalt. Dessuten kan vaksinesammensetninger bli administrert med «nåle-frie» avleveringssystemer.

Fortrinnsvis blir sammensetningene administrert ved intradermal injeksjon. Administrasjon kan foregå ved veiledning fra lege eller legeassistent.

Injeksjonene kan bli delt i flere injeksjoner med slike delte inokulasjoner administrert fortrinnsvis i hovedsak samtidig. Når administrert som en delt inokulasjon, blir dosen av immunogenet fortrinnsvis, men ikke nødvendigvis, fordelt likt i hver separate injeksjon. Dersom en adjuvant er til stede i vaksinesammensetningen blir dosen av adjuvanten fortrinnsvis, men ikke nødvendigvis, fordelt likt i hver enkelt injeksjon. De separate injeksjoner for den delte inokulasjon blir fortrinnsvis administrert i hovedsak proksimalt til hverandre på pasientens kropp. I et annet foretrukket aspekt blir injeksjonene administrert minst omkring 1 cm fra hverandre på kroppen. I enkelte foretrukne aspekter blir injeksjonene administrert minst omkring 2,5 cm fra hverandre på kroppen. I sterkt foretrukne aspekter blir injeksjonene administrert minst omkring 5 cm fra hverandre på kroppen. I enkelte aspekter blir injeksjonene administrert minst omkring 10 cm fra hverandre på kroppen, f.eks. minst omkring 12,5, 15, 17,5, 20 eller fler cm fra hverandre på kroppen. Primære immuniseringsinjeksjoner og forsterkerinjeksjoner kan bli administrert som en delt inokulasjon som beskrevet og eksemplifisert heri.

Forskjellige alternative farmasøytiske avleveringssystemer kan bli benyttet. Ikke-begrensede eksempler på slike systemer innbefatter liposomer og emulsjoner. Visse organiske oppløsningsmidler så som dimetylsylfokosyd kan også bli benyttet. Dessuten kan vaksinesammensetningene bli avlevert ved å bruke et vedvarende frigjøringsystem så som semipermeable matriser av faste polymerer inneholdende det terapeutiske middel. De forskjellige vedvarende frigjørende materialer som er tilgjengelige er velkjente for fagpersonen. Vedvarende frigjøringskapsler kan, avhengig av sin kjemiske natur, frigjøre vaksinesammensetningene over et intervall på flere dager til flere uker til flere måneder.

For å forhindre tilbakefall av brystkreft i en pasient som er i brystkreftremisjon, blir en terapeutisk effektiv mengde av vaksinesammensetningen administrert til individet. En terapeutisk effektiv mengde vil gi en klinisk signifikant økning i antallet av E75-spesifikke cytotoksiske T-lymfocytter (CD8⁺) i pasientene så vel som en klinisk signifikant økning i den cytotoksiske T-lymfocytt-respons mot antigenet, som målt på enhver måte som er egnet innen faget. I pasienten vil i det hele tatt en terapeutisk effektiv mengde av vaksinesammensetningen ødelegge gjenværende mikroskopisk sykdom og vesentlig redusere eller fjerne risikoen for tilbakevending av brystkreft i pasienten.

Den effektive mengde av vaksinesammensetningen kan være avhengig av ethvert antall av variabler innbefattende uten begrensning type, art, størrelse, høyde, vekt, alder, total helse hos pasienten, typen formulering, måten eller typen administrasjon eller tilstedeværelse eller fravær av risikofaktorer som vesentlig

5 øker sannsynligheten for at brystkreften vil opptre på nytt hos pasienten. Slike risikofaktorer innbefatter, men er ikke begrenset til typen av kirurgi, status av lymfeknuter og antallet positive, størrelsen av tumoren, den histologiske graden av tumoren, tilstedeværelse/fravær av hormonreseptorer (østrogen og progesteronreseptorer), HER2/neu-ekspresjon, lymfovaskular invasjon og genetisk predisposisjon (BRCA 1 og 2). I enkelte foretrukne aspekter er den effektive mengde av-

10 hengig av hvorvidt pasienten er lymfeknutepositiv eller lymfeknutenegativ, og dersom pasienten er lymfeknutepositiv, antallet og utstrekningen av de positive knuter. I alle tilfeller kan den passende effektive mengde bli rutinemessig bestemt av fagpersonen ved å bruke rutinemessige optimaliseringsteknikker og den fagmessige

15 og informerte vurdering fra fagpersonen samt andre faktorer som er tydelige for fagpersonen innen faget. Foretrukket vil en terapeutisk effektiv dose av vaksinesammensetningen beskrevet heri gi den terapeutisk preventive fordel uten å forårsake vesentlig toksisitet i individet.

Toksisitet og terapeutisk effektivitet av vaksinesammensetningene kan bli

20 bestemt med standard farmasøytiske prosedyrer i cellekulturer eller forsøksdyr, f.eks. for å bestemme LD50 (dødelig dose for 50% av populasjonen) og ED50 (dosen som er terapeutisk effektiv i 50% av populasjonen). Doseforholdet mellom toksiske og terapeutiske effekter er den terapeutiske indeks og den kan bli uttrykt som forholdet LD50/ED50. Vaksinesammensetninger som oppviser store terapeutiske indikasjoner er foretrukket. Data oppnådd fra celledyrkningsassays and dyrestudier kan bli brukt til å formulere et doseområde for anvendelse i pasienter. Dosen av slike vaksinesammensetninger ligger fortrinnsvis innen et område av sirkulerende konsentrasjoner som innbefatter en ED50-verdi med liten eller ingen toksisitet. Dosen kan variere innenfor dette området avhengig av doseformen og administrasjonsruten som benyttes.

25

30

Toksisitetsinformasjon kan bli brukt for å bestemme mer nøyaktig anvendelige doser i et spesielt individ så som et menneske. Den behandlende legen kan avslutte, forstyrre eller justere administrasjonen på bakgrunn av toksisitet eller av organsvikt, og kan justere behandlingen etter hva som er nødvendig dersom den

35 kliniske respons ikke er tilstrekkelig, for å forbedre responsen. Størrelsen av en administrert dose i forebyggingen av tilbakevendende brystkreft vil variere med alvorligheten av pasientens tilstand, relativ risiko for tilbakefall eller administra-

sjonsruten, blant andre faktorer. Alvorligheten av pasientens tilstand kan f.eks. bli delvis vurdert med standard prognostiske evalueringsmetoder.

Vaksinesammensetningene kan bli administrert til en pasient på ethvert skjema som er egnet for å innbefatte og/eller opprettholde beskyttende immunitet mot tilbakevending av brystkreft, og mer spesielt å indusere og/eller opprettholde en cytotoksisk T-lymfocyttespons mot E75 (SEQ ID NO: 2). For eksempel kan pasienter bli administrert en vaksinesammensetning som en primærimmunisering som beskrevet og eksemplifisert heri, fulgt av administrasjon av en forsterker for å forsterke og/eller opprettholde den beskyttende immunitet.

I enkelte aspekter kan pasienter bli administrert vaksinesammensetningene 1, 2 eller 3 ganger ekstra per måned. En gang per måned i seks påfølgende måneder er foretrukket for å etablere den beskyttende immunrespons, spesielt med hensyn til det primære immuniseringsskjema. I enkelte aspekter kan forsterkere bli administrert i jevne intervaller så som hver 6 eller flere måneder etter fullføring av det primære immuniseringsskjema. Administrasjon av forsterkeren er foretrukket hver 6. måned. Forsterkere kan også bli administrert etter behov.

Vaksineadministrasjonsskjemaet innbefattet primær immunisering og forsterkeradministrasjon, kan fortsette så lenge som nødvendig for pasienten, f.eks. i løpet av flere år til over levetiden til pasienten. I enkelte aspekter innbefatter vaksineskjemaet mer hyppig administrasjon ved starten av vaksineregimet og innbefatter mindre hyppig administrasjon (f.eks. forsterkere) over tid for å opprettholde den beskyttende immuniteten.

Vaksinen kan bli administrert ved lavere doser ved starten av vaksineregimet med høyere doser administrert over tid. Vaksinene kan også bli administrert ved høyere dosert ved starten av vaksineregimet, med lavere doser over tid. Hyppigheten av primærvaksine- og forsterkeradministrasjon og dosen av E75 kan bli spesialtilpasset og/eller justert for å tilfredsstille de spesielle behovene hos den enkelte pasient som bestemt av den administrerende lege i henhold til enhver passende metode innen faget.

I enkelte aspekter omfatter vaksinesammensetningene innbefattende sammensetninger for administrasjon som en forsterker, fra omkring 0,1 mg til omkring 10 mg av E75-peptid. I enkelte foretrukne aspekter omfatter sammensetningene omkring 0,5 mg av E75. I enkelte foretrukne aspekter omfatter sammensetningene omkring 2 mg av E75. I enkelte foretrukne aspekter omfatter sammensetningene omkring 1 mg av E75.

I enkelte foretrukne aspekter omfatter vaksinesammensetningene omfattende E75, innbefattende sammensetninger for administrasjon som en forsterker, ytterligere GM-CSF. Slike sammensetninger omfatter fortrinnsvis fra omkring 0,01

mg til omkring 0,5 mg GM-CSF. I enkelte foretrukne aspekter omfatter sammensetningene omkring 0,125 mg av GM-CSF. I enkelte foretrukne aspekter omfatter sammensetningene omkring 0,25 mg av GM-CSF..

I enkelte spesielt foretrukne aspekter omfatter vaksinesammensetningene 1 mg av E75-peptid og fra 0,125 til 0,250 mg av GM-CSF i et totalt volum på 1 ml og blir administrert månedlig som en delt inokulasjon på 0,5 ml hver administrert med injeksjoner som er omkring 5 cm fra hverandre på pasientens kropp, og administrert samtidig eller blandet. Administrasjonsskjemaet er fortrinnsvis månedlig i seks måneder. Etter en periode på omkring 48 timer kan injeksjonsstedet bli undersøkt for lokal reaksjon av erytema og indurasjon. Dersom reaksjonene på begge steder er konfluente og området med lokal indurasjon måler >100 mm (eller pasienten opplever noen som helst >grad 2 systemisk toksisitet), så kan dosen av GM-CSF bli redusert f.eks. med halvparten, selv om det er ment at peptiddosen forblir den samme. Dersom pasienten oppviser en kraftig reaksjon på etterfølgende doser, så kan ytterligere reduksjon av GM-CSF inntreffe, f.eks. reduksjon med halvdelen. Dersom pasienten ikke reagerer med en kraftig reaksjon, så kan pasienten fortsette med den høyere GM-CSF-dosen. I enkelte aspekter blir administrasjonsskjemaet og doseringen av forsterkeren bestemt på liknende måte med forsterkere som starter med administrasjon av vaksinesammensetninger omfattende 1 mg av E75 og 0,25 mg MG-CSF administrert hver sjette måned etter avslutningen av primærimmuniseringsvaksineskjemaet.

De følgende eksemplervise aspekter av spesielle eksempler for å utføre foreliggende oppfinnelse blir gitt for illustratoriske formål alene og er ikke ment å begrense omfanget av foreliggende oppfinnelse på noen måte.

EKSEMPEL 1

Pasientutvelgelse

De node-positive (NP) og node-negative (NN) forsøk var godkjent av det lokale Institutional Review Boards og utført ved Walter Reed Army Medical Center, Washington, DC og the Joyce Murtha Breast Care Center, Windber, PA under en investigatorisk ny medikamentapplikasjon (BB-IND#9187). Alle pasienter hadde histologisk bekreftet brystkreft (BCa) og avsluttet en standard kirurgibehandling, kjemoterapi og strålingsterapi (etter behov) før innrulling. Pasienter på hormonbehandling ble fortsatt på sine spesifikke regimer. Etter passende rådgiving og godkjenning ble BCa-pasienter lagt inn til det passende forsøk (NP eller NN) og så HLA typebestemt siden E75 binder i hovedsak til HLA-A2 funnet i omtrent 40-50% av den generelle populasjon. HLA-A2⁺-pasienter ble vaksinert og HLA-A2-pasienter ble observert prospektivt for klinisk tilbakefall. HLA-A3⁺-pasienter ble innrullert i et

parallelt forsøk med A2-pasientene og behandlet med det aktive doseskjema på tiden for innleggelse. Før vaksinering ble pasienter hudtestet med en rekke av minneantigener (kuma, tetanus og Candida). Pasienter ble regnet som immunkompetente dersom de nådde (<5 mm) til >2 antigener.

- 5 Et totale på 186 pasienter ble innrullert i både E75 vaksineforsøk (NP=95, NN=91) som var sykdomsfrie etter standard behandling, men hadde en høy risiko for tilbakevending. Etter HLA-A2⁺ og senere HLA-A3⁺, ble pasienter (n=101) vaksinert (49 NP og 52 NN; 90 HLA-A2⁺ og 11 HLA-A3⁺). Alle andre pasienter (n=85) ble skrevet inn til observasjon. Fem vaksine- og fire observasjons-pasienter trakk
- 10 seg fra studien, selv om ingen var grunnet toksisitet. Følgelig var 96 vaksinerte pasienter og 81 observasjonspasienter tilgjengelige for analyse. Demografiske og prognostiske faktorer fra begge grupper er presentert i **Tabell 1**.

Tabell 1. Demografiske og prognostiske faktorer for vaksinerte og observerte pasienter

	Vaksinerte HLA-A2⁺, A3⁺ (n=96)[†]	Observerte HLA-A2⁺, A3⁺ (n=81)[‡]	P
Midlere alder, år	58,9	55,1	0,33
Område, år	32-80	34-87	
Rase			
Hvit, %	89,6	81,5	0,12
Annen, %	10,4	18,5	
Tumorstørrelse			
T1 %	69,8	60,5	0,20
T2-T4, %	30,2	39,5	0,20
Histologisk grad			
I-II, %	64,5	59,5	0,50
III, %	35,5	40,5	0,50
Node-positiv, %	46,9	56,8	0,19
Midlere+noder (NP alene)	2,0	2,5	
Område	1-25	1-15	0,17
HER2/neu IHC 3+ eller FISH +, %	25,8	28,4	0,32
Hormonreseptor-negativ, %	31,6	17,3	0,03
XRT, %	71,9	80,2	0,20
Kjemoprevensjon, %	65,6	78,8	0,05
Adjuvant Herceptin, %	5,2	3,7	0,60

[†]101 pasienter innrullert til vaksinearm, 2 byttet til observasjon, 1 trakk seg fra adjuvant trastuzumab, 1 grunnet en sterk urelatert sykdom og 1 pasient av personlige grunner.

[‡]85 pasienter innrullert til observasjonsarm, 2 tapt til oppfølging og 4 trakk seg for søkers MHC II peptidvaksineforsøk. To pasienter ble tatt fra vaksinearmen.

De to grupper var ekvivalente i de fleste prognostiske kategorier. Imidlertid var fler vaksinerte pasienter hormonreseptor-negative og følgelig var færre pasienter i vaksinegruppen på adjuvant hormon-terapi. Ved å se på de individuelle forsøkene hadde flere vaksinerte pasienter i NN-forsøket sammenlignet med kontroller HER2/neu overuttrykkende tumorer (25,0% mot 7,1%, P<0,05) og færre mottok adjuvant radioterapi (64,7% mot 85,7%, P<0,05).

Under forsøkene ble det bestemt at E75 kunne bli brukt i HLA-A3⁺-pasienter basert på bindingsaffinitetsdata oppnådd fra to vanlig brukte HLA-peptid bindings-algoritmer: BIMAS (SEQ ID NO: 3) og SYFPEITHI (SEQ ID NO: 4). I tillegg viste pre-klinisk evaluering at E75-stimulerte HLA-A3⁺ CTL kunne lysere HLA-

5 A3⁺HER2/neu-uttrykkende kreftceller (ikke vist).

Selv om det ikke var noen forskjell i den totale status av HLA-A3 subsettet i forhold til HLA-A2 subsettet (54,5% mot 45,9%, P=0,59) tenderte de til å ha mindre tumorer (90,9%T1 mot 65,7%, P=0,08), var mindre sannsynlig å ha hormonelt insensitive tumorer (18,2% mot 29,6%, P=0,4) og hadde mindre HER2/neu overuttrykkende tumorer (0% mot 31,5%, P=0,028).

10

EKSEMPEL 2

Vaksinasjon og klinisk protokoll

E75-peptidet ble fremstilt kommersielt ved god fremstillingspraksisgrad av NeoMPS, Inc. (San Diego, CA). Peptidrenhet (>95%) ble bekreftet med høyeffekt væskechromatografi og massespektrometri, og aminosyreinnholdet med bestemt med aminosyreanalyse. Sterilitet og generell sikkerhetstesting var utført av produsent. Frysetørket peptid ble rekonstituert i steril saline ved 100 µg, 500 µg eller 1000 µg i 0,5 ml. Ved tiden for administrasjon ble peptidet tint og blandet med GM-CSF (Berlex, Seattle, WA) i 0,5 ml og 1,0 ml inokuleringen ble delt og gitt intradermalt ved to steder 5 cm fra hverandre. Alle inokuleringer ble gitt i samme ekstremitet.

15

20

Vaksinasjonsserier. NP-forsøket ble utformet som et to-trinns sikkerhetsforsøk med økende doser av peptid i det initiale stadium og endringer av skjemaet i det siste stadium. Detaljer av vaksineserien har blitt publisert tidligere (Peoples GE et al., (2005) J. Clin. Oncol. 23: 7536-45). Kort angitt ble 3-6 pasienter (HLA-A2⁺ eller HLA-A3⁺) hver tildelt for å motta fire eller seks månedlige injeksjoner på 100 µg, 500 µg eller 1000 µg av E75 (henholdsvis 100,6, 500,4, 500,6, 1000,4 og 1000,6) (**Tabell 2**). Grupper ble til slutt utvidet for å bestemme og bekrefte optimal dosering av NP-pasienter som står for det store antallet pasienter i de siste dosegruppene.

25

30

Tabell 2. NP og NN forsøksutforminger

Pasientgruppe	Ant. pasien- ter HLA-A2⁺ (A3⁺)	Peptiddose[†] (µg)	GM-CSF do- se[†] (µg)	Måneder vaksiner[‡]
<i>Node-positiv</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-negativ</i>				
500.125.3	10	500	125	0, 1, 5
500.125.4	10	500	125	0, 1, 2, 5
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
Totalt	85 (11)			

[†]Peptid ble suspendert i 0,5 ml steril saline og kombinert med GM-CSF og steril saline til et sluttvolum på 1,0 ml per inokulering.

5 [‡]Vaksiner ble administrert hver 3-4 uker.

*En pasient tilegnet 100.6-gruppen trakk seg og ingen erstatning i denne dosegruppen ble tilegnet.

10 NN-forsøket ble utformet for videre å bestemme optimal biologisk dose ved å variere dosen av GM-CSF og endre inokulerings-skjemaet. Pasienter med ikke-HER2/neu-uttrykkende tumorer ble innrullert i dette forsøket for å bestemme egnetheten av vaksinerings av en antatt antigen-negativ vertsorganisme. Ti pasienter ble tilegnet til hver dosegruppe for å motta tre, fire eller seks månedlige injeksjoner over fem måneder (**Tabell 2**).

15 *Perifer blod mononukleær celle (PBMC) isolering og dyrkning.* Blod ble tatt før hver vaksinasjon og ved en (post-vaksine) og seks (langtids) etter vaksineseri-avslutning. 50 ml blod ble trukket og PBMC ble vasket og resuspendert i dyrkningsmedium og brukt som en kilde for lymfocytter.

20 *Toksisitet.* Pasienter ble observert en time etter vaksinerings for umiddelbar hypersensitivitet og returnert 48-72 timer senere for å få sine injeksjonssteder målt og spurt om toksisiteter. Toksisiteter ble gradert ut fra NCI COMmon Terminology Criteria for Adverse Events, v3.0 og rapportert på en skala fra 0-5. Progresjon fra en dosegruppe til neste inntraff kun dersom ingen vesentlig toksisitet inntraff i den

nedre dosegruppe. Pasient-spesifikke resultater ble rapportert basert på maksimal lokal og systemisk toksisitet som oppsto i løpet av serien.

Lokale og systemiske toksisiteter var milde og alle pasienter fullførte vaksineserien. Lokale toksisiteter var grad 1 (81%) og grad 2 (19%). Systemisk toksisitet var minimal: grad 0 (12%), grad 1 (71%), grad 2 (14%) og grad 3 (2%) (**Figur 1**) med ingen grad 4 eller grad 5 systemiske toksisiteter observert. Siden observerte toksisiteter er konsistente med GM-CSF, ble en 50% dosereduksjon i GM-CSF satt i gang i tilfelle av vesentlige lokale eller systemiske reaksjoner (18,7 % av pasientene).

Toksisitetsprofiler var de samme i A3-pasienter som sine A2 motstykker: maksimal lokal toksisitetsgrad 1 (82%) og grad 2 (18%) for begge grupper. Maksimal systemisk toksisitet (A3 mot A2): grad 0 (0% mot 15%), grad 1 (92% mot 68%), grad 2 (8% mot 14%) og grad 3 (0% mot 2%; $p=0,4$). Lokale responser hos A3-pasienter var identiske med A2-pasientene innen de respektive dosegrupper. Således var det ingen forskjeller i toksisitetsprofilene blant HLA-A3⁺-pasienter i forhold til HLA-A2⁺-pasientene og de lokale reaksjonene var like kraftige. Grad 2 lokal toksisitet var 20% i forhold til 18%, noe som antyder lik in vivo immunogenisitet.

Kliniske tilbakefall. Alle pasienter ble observert for klinisk tilbakefall per standard behandlingssenterutvelgelse som diktert av pasientens hovedkreftlege. En pasient blir regnet som tilbakefallende dersom biopsi-bevist eller om behandlet for gjenopptreden av den primære onkologigruppe.

Per protokollutforming ble primæranalyse initiert ved 18 måneder midlere oppfølging. Ved avslutning av denne analysen hadde 171 pasienter blitt lagt inn og gjenopptredensgraden i den vaksinerte gruppen var 5,6% sammenlignet med 14,2% i observasjonsgruppen ($P=0,04$) ved en midlere oppfølging ved 20 måneder. De sykdomsfrie overlevelsesgrader i den vaksinerte og kontrollgruppene var henholdsvis 92,5% og 77% (**Figur 2**). Det var fire dødsfall i den observerte gruppen (total overlevelse [OS] 95,1%) sammenlignet med kun ett dødsfall i den vaksinerte gruppen (OS 99%, $P=0,1$).

Oppfølging av begge forsøk ble utvidet til fem år til tross for synkende immunitet og mangel på forsterkerinokulering i protokollutformingen. En oppdatert analyse dokumenterte ytterligere opptreden i begge grupper innbefattende en sen opptreden i vaksinegruppen ved 58 måneder. Ved en midlere oppfølging på 26 måneder ble 186 pasienter innrullert og tilbakefallsgraden var 8,3% i vaksinegruppen i forhold til 14,8% i observasjonsgruppen ($P=0,15$). Det fantes en forskjellig fordeling av tilbakefall blant disse pasientene. Kun ben-tilbakefall utgjorde 50% av

tilfellene i kontrollpasientene (6/12) og 0% av de vaksinerte tilbakefallspasientene ($P=0,04$).

Blant HLA A3⁺-pasientene var tilbakefallsgraden lik HLA-A2⁺-pasientene (9,1% mot 8,2%).

- 5 *Statistisk analyse.* Tilbakefallsgrader ble sammenlignet mellom grupper ved å bruke overlevelsesanalyse med Kaplan-Meier-metoden, og andelen av individer som hadde tilbakefall sammenlignet med å bruke log-basert analyse. P-verdier for klinisk-patologiske faktorer ble regnet ut ved å bruke Wilcoxo, Fishers eksakt-test eller χ^2 ettersom hva som er passende. P-verdier for sammenligning av pre-
10 vaksinerings og post-vaksinasjon dimer-nivåer ble regnet ut ved å bruke Wilcoxon og for DTH ved å bruke Students t-test.

EKSEMPEL 3

HLA-A2: Immunoglobulin Dimer Assay

- 15 Tilstedeværelsen av CD8⁺ E75-spesifikke celler i ferskt isolert PBMC fra pasienter ble direkte undersøkt ved å bruke et dimer-assay. Kort angitt ble HLA-A2:immunoglobulin (Ig) dimer (PharMingen, San Diego, CA) tilsatt E75 eller kontrollpeptid (E37, folatbindende protein (25-33) RIAWARTEL (SEQ ID NO: 5)) ved å inkubere 1 µg dimer med et overskudd (5 µg) av peptid og 0,5 µg av β2-
20 mikroglobulin (Sigma, St. Louis, MO) ved 37°C over natten og så lagret ved 4°C inntil brukt. PBMC ble vasket og så resuspendert i PharMingen Stain Buffer (PharMingen) og tilsatt ved 5×10^5 celler/rør i 5 ml rundbunnete polystyrenrør (Becton Dickinson, Mountain View, CA) og farget med de tilsatte dimerer og antistoff. I hver pasient ble nivået av CD8⁺ E75-spesifikke celler bestemt som reaksjon på hver
25 suksessive vaksinasjon og alle post-inokuleringsmålinger ble jevnet ut som gjennomsnitt for hver pasient og sammenlignet med dere pre-inokulasjonsnivåer.

- E75-spesifikke CTL ble undersøkt i fersk in vivo PBMC med dimerassayet før hver vaksinasjon og ved en (etter vaksinasjon) og seks måneder (langtids). Dimerassayet hadde på forhånd blitt vist å korrelere med funksjonelle immunassayer
30 (cytotoksitet og cytokin-sekresjon) (Peoples GE et al., (2005) J. Clin. Oncol. 23: 7536-45). Et mønster av økende CD8⁺ E75-spesifikke CTL ble observert i løpet av vaksineserien, som kom til en topp og sank til et platå ved avslutning.

- De kumulative dimer-responser for alle pasienter er vist i **Figur 3A**. Det var en statistisk signifikant økning i de midlere CD8⁺ E75-spesifikke celler fra pre-
35 vaksine til post-vaksinasjon og til toppnivåer. Langtidsnivåer var ikke forskjellige fra pre-vaksinasjonsnivåene. Kun 48,3% av pasientene opprettholdt vesentlig gjenværende immunitet (definert som dimer >0,5) seks måneder etter vaksinasjon.

For-eksisterende immunitet mot E75 (definert som dimer $>0,3$) ble funnet i 42,7% av pasientene (**Figur 3B**). Det samme mønsteret av dimer-respons ble observert uavhengig av initiale dimer-nivåer. Imidlertid hadde pasienter som manglet pre-eksisterende immunitet, en signifikant økning i sine langtids dimer-nivåer.

5

EKSEMPEL 4

Forsinket type hypersensitivitet

I begge forsøk ble en DTH-reaksjon undersøkt med 100 μg av E75 i 0,5 ml av normal saline (uten GM-CSF) og 0,5 ml normal saline som en volumkontroll en måned etter avslutning av vaksineserien som tidligere beskrevet (Peoples GE et al., (2005) J. Clin. Oncol. 23: 7536-45). DTH-reaksjonen ble målt i to dimensjoner ved 48-72 timer ved å bruke den følsomme kulepenn-metoden og angitt som det ortogonale gjennomsnitt og sammenlignet med kontrollen. I NN-forsøket ble DTH også utført før vaksinasjon.

15 *In vivo immunrespons.* For å måle vaksinens in vivo effektivitet ble en post-vaksine DTH målt en måned etter vaksineserieavslutning med 100 μg av E75 injisert intradermalt med en saline volumkontroll. Blant alle vaksinerte pasienter hadde 74% en positiv post-vaksine DTH med en gjennomsnittlig indurasjon mot E75 på $14 \pm 1,4$ mm i forhold til kontroll $2,1 \pm 0,5$ mm ($P < 0,0001$) (**Figur 4A**).

20 NN-pasienter hadde en pre-vaksine DTH så vel som post-vaksine DTH (**Figur 4B**). Før vaksinasjon var det ingen forskjell i DTH mellom E75 og kontroll. Etter vaksinasjon var DTH-responsen mot E75 statistisk større enn kontrollen og E75 DTH var vesentlig forskjellig etter vaksine i forhold til før vaksine ($10,9 \pm 1,5$ mm mot $2,8 \pm 0,8$ mm, $P < 0,0001$).

25 NP-pasienter hadde en større post-vaksinasjon E75 DTH-respons enn NN-pasienter (**Figur 4C**); en forskjell som trolig var grunnet at NN-pasientene totalt mottok mye lavere mengder av E75. Ved å se på DTH-responser som en funksjon av dose, hadde de pasienter som mottok 6000 μg av E75 en signifikant større DTH-reaksjon enn de pasienter som mottok <6000 μg av peptid ($25,1 \pm 4,0$ mm mot $13,3 \pm 1,9$ mm, $P = 0,008$) (**Figur 4D**).

30

HLA-A3⁺-pasientene hadde sammenlignbare post-vaksinasjon DTH mot HLA-A2⁺ ($10,5 \pm 2,7$ mm mot $15,1 \pm 1,9$ mm, $P = 0,38$).

EKSEMPEL 5

35

HLA-A3⁺ ELISPOT ASSAY

Vaksine-responser for HLA-A3⁺-pasienter ble også undersøkt med E75-spesifikk interferon- γ ELISPOT. Med ELISPOT oppviste A3-pasientene et område på 0-30 flekker/ 10^6 celler ved grunnlinje som økte til et område på 3-448 flekker/ 10^6

celler etter vaksinasjon, $p=0,04$. Svært viktig er det at kliniske repetisjoner var den samme i begge grupper (A3, 9,1% mot A2, 8,2%) og i forhold til 14,8% i kontrollgruppen.

5 EKSEMPEL 6

Brystkreft vaksineforsterker

Pasienter. NP- og NN-forsøkene var godkjent av det lokale Institutional Review Boards og utført ved Walter Reed Army Medical Center (WRAMC), Washington DC og Joyce Murtha Breast Care Center, Windber, PA. De kliniske forsøkene ble
10 utført under en investigatorisk ny medikament-applikasjon (BB-IND #9187) godkjent av the Food and Drug Administration. Alle pasienter hadde histologisk bekref-
tet brystkreft, hadde fullført standard behandling, var sykdomsfrie og immunkom-
petente ved innregistreringstidspunktet. HLA-A2⁺- og HLA-A3⁺-pasienter ble vaksi-
nert med varierende doser av E75 og GM-CSF og i varierende skjemaer over en
15 seks måneders periode som angitt i Eksemplene ovenfor. Pasienter ble gitt en
valgfri forsterkerdose av E75 (1 µg) + GM-CSF (0,250 mg) dersom de var minst
seks måneder fra avslutning av sin primære vaksineserie.

25 pasienter mottok en forsterkervaksinasjon (**Tabell 3**). Like over halvde-
len (56%) hadde NP brystkreft. Den midlere tiden fra før vaksinasjon var 12 må-
20 neder (område 6-24 måneder). Pasienter ble evaluert som enten tidlig forsterker
(EB)-pasienter dersom de mottok forsterkeren 6 måneder etter primærserien eller
sene forsterkerpasienter (LB) dersom de var >6 måneder fra primærserien.

Tabell 3. Pasient-demografier	
	Pasienter (n=25)
Alder, gjennomsnitt (år)	56 (område 31-76)
≥T2	28%
Node-positive	56%
Grad 3	32%
ER-PR-	28%
HER2/neu overekspresjon	20%
Tid fra primær standardbehandling (mos)	33 (9-200)
Tid fra primær vaksineserie (mos)	12 (6-24)

25 Gjenværende E75-spesifikk immunitet sank over tid som målt med HLA-A2-IgG dimer. Det midlere nivået av CD8⁺ T-celler i EB-gruppen (n=6) var 1,4% (0,61-3,43%-område) i forhold til LB-gruppen (n=13)(0,44%, 0-2,67%, $p=0,02$). For LB-pasientene var deres midlere dimer-nivå 6 måneder etter den initiale serie

0,70% (0,19%-1,55%). Dette var ikke statistisk forskjellig fra EB-pasientenes 6 måneder dimer-nivåer (**Figur 5**).

Forsterkervaksine. E75-peptidet ble fremstilt kommersielt ved god produksjonspraksisgrad av NeoMPS (San Diego, CA). Peptidrenhet ble bekreftet med høy-effekt væskechromatografi og massespektrometri, og aminosyreinnholdet ble bestemt med aminosyreanalyse. Peptidet ble renset til mer enn 95%. Sterilitet og generell sikkerhetstesting var utført av forhandler. Frysetørket peptid ble rekonstituert i steril saline ved en konsentrasjon på 1000 µg i 0,5 ml. Peptidet ble blandet med GM-CSF (Berlex, Seattle, WA) i 0,5 ml og den 1,0 ml store inokulasjon ble delt og gitt intradermalt ved to steder 5 cm fra hverandre. Forsterkervaksinasjon ble gitt i samme ekstremitet som primærserien.

Toksisitet. Pasienter ble observert 1 time etter vaksinasjon for umiddelbare hypersensitivitetsreaksjoner. Toksisiteter ble gradert med NCI Common Toxicity Criteria for Adverse Events, v3.0 og angitt på en skala fra 0 til 5. Pasienter som tidligere hadde hatt vesentlig (grad 2 eller 3) lokale eller systemiske toksisiteter, mottok en redusert dose av GM-CSF på 0,125 mg.

Forsterkerdosen ble svært godt tolerert (**Figur 6**) med i hovedsak grad 1 lokal toksisitet (en ønsket effekt). Over halvdelen av pasientene hadde ingen systemiske plager. Det var ingen grad 3 eller 4 toksisiteter. Kun 1 pasient (4%) hadde en høyere grad toksisitet i løpet av forsterkeren enn under primærserien (grad 2 lokal inflammasjon).

Perifer Blod Mononuklær Celleisolasjon og Kulturer. Blod ble trukket før forsterkervaksinasjon og 3 til 4 uker etter forsterkeradministrasjon for å isolere perifer mononukleære blodceller i Vacutainer CPT-rør og brukt som en kilde for lymfocytter.

HLA-A2: Immunoglobulin Dimer-Assay. Tilstedeværelsen av CD8⁺ E75-spesifikke celler i ferskt isolerte PBMC fra pasienter ble undersøkt direkte ved å bruke dimer-assayet beskrevet i Eksempel 3 ovenfor. Kort angitt ble HLA-A2:immunoglobulin (Ig) dimer (Pharmingen, San Diego, CA) tilsatt E75 eller kontrollpeptid (folatbindende protein peptid -E37 (25-33) RIAWARTEL (SEQ ID NO: 5)) ved å inkubere 1 µg av dimer med et overskudd (5 µg) av peptid og 0,5 µg av β2-mikroglobulin (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) ved 37°C over natten og lagret ved 4°C inntil brukt. PBMC ble vasket og re-suspendert i PharMingen Stain Buffer (Pharmingen, San Diego, CA) og ble tilsatt ved 5x10⁵ celler/100 µl/rør i 5 ml rundbunnete polystyrenrør (Becton Dickinson, Mountain View, CA) og farget med de påsatte dimerer og antistoff. I hver HLA-A2⁺-pasient ble nivået av CD8⁺ E75-spesifikke celler bestemt før og etter vaksineforsterker.

Antigenspesifikke CD8⁺ T-celler ble mengdebestemt før og 3-4 uker etter forsterkervaksinasjon. Vesentlig gjenværende immunitet (SRI, definert som antigenspesifikke CD8⁺ T-celler $\geq 0,5\%$) var signifikant forskjellig i de to gruppene ved 100% (6/6) i EB-pasientene i forhold til 30,8% (4/13) av LB-pasientene ($p=0,01$). Blant disse pasientene som mangler SRI ($n=8$), var det en tendens mot økte E75-spesifikke CD8⁺ T-celler (**Figur 7**) fra 0,43% (0-0,49%) til 0,87% (0-2,3%; $p=0,08$).

Enzym-tilknyttet immunospot-assay. IFN- γ -produserende celler ble påvist ved å bruke BD ELISPOT-settet enten umiddelbart (ex vivo) eller etter 7 dagers inkubering med peptider. Fersk PBMC ble platet inn i ELISPOT-platen ved en konsentrasjon på 5×10^5 celler (ex vivo) eller 1×10^5 (7. dag) per brønn i medium inneholdende IL-7 (ex vivo) eller i medium med og uten IL-7 (7. dag). Celler ble stimulert i 16 timer (ex vivo) eller 7 dager ved nærvær eller fravær av peptider (E37, FluM, E75, GP2, HER2/neu 1 μg eller 5 μg). Ytterligere inkuberings-15 dagers-brønnene inkluderte kombinasjon av E75+HER2/neu 1 μg eller 5 μg . Et totale på 16 assayer ble utført på hver blodprøve forutsatt at tilstrekkelig celler var tilgjengelige. Ved slutten av inkuberingen ble platene fremkalt i henhold til forhandlers instruksjoner. Et biotinyleret antistoff ble tilsatt og platene ble inkubert over natten ved 4°C. Etter inkubering ble platene vasket, Avidin-HRP-oppløsning-20 ble tilsatt over 1 time og flekker fremkalt ved å bruke AEC substratoppløsning. Flekker ble talt opp ved å bruke Immunospot Serie 2 analysator og ImmunoSpot programvare.

Alle pasienter hadde IFN- γ -produserende celler mengdebestemt før og etter forsterkervaksinasjon i opp til 16 forskjellige assays avhengig av tilgjengeligheten på PBMC fra en enkel blodtapping. Toogtyve pasienter hadde minst et par pre- og post-forsterker ELISPOT-assay (midlere 10 assays per pasient, område 1-14). Blant disse pasienter var det totalt 255 pre-forsterker-assays hvorav 54,5% viste påviselig IFN- γ -produksjon. Blant 194 parede assays (pre- og post-forsterker-prøver fra samme pasient foretatt med samme peptidkonsentrasjon), 78 (40,2%) viste økte IFN- γ -produserende celler med forsterker. Totalt viste 20/22 (91%) av pasientene økte IFN- γ -produserende celler i minst ett assay og 11 (50%) vist økte IFN- γ -produserende celler i minst 5% av assayene. Resultater er vist i **Figur 8**.

Lokale reaksjoner. Lokale reaksjoner (LR) ble målt som en in vivo funksjonell responsmåling. LR ble målt 48-72 timer etter vaksinasjon og målt i to retninger og rapportert som en ortogonal middelvei $\pm$ SE ved å bruke den følsomme kulettup-metoden. LR ble sammenlignet med pasientens egne tidligere LR for å bestemme respons på forsterker.

Pasienter som mottok forsterker ≤ 9 måneder ($n=12$) fra sin primærserie, hadde vesentlig større LR (103 ± 7 mm) enn pasienter >9 måneder ($n=13$) fra primærserien (79 ± 4 mm, $p=0,01$). Det var ingen forskjell i de to gruppene når de ble sammenlignet ved slutten av primærserien (≤ 9 måneder 81 ± 5 mm; >9 måneder 85 ± 8 mm, $p=0,73$). Resultater er vist i **Figur 9** og **10**.

Statistisk analyse. HLA IgG dimer-verdier er angitt som middelerverdier og P-verdier ble regnet ut ved å bruke Wilcoxon-testen. For proporsjonsmessige sammenligninger ble Fishers nøyaktige test brukt. Sammenligning av lokale reaksjoner ble foretatt med paret eller uparet Students t-test, ut fra hva som var egnet.

EKSEMPEL 7

HER2/neu (E75) Peptidvaksinerespons per HER2/neu epresjonsnivå

Kliniske forsøk ble utført med HER2/neu E75-peptidvaksinen i node-positive og node-negative BCa-pasienter. Disse pasienter består av alle nivåer av HER2/neu-ekspresjon. Bestemmelse av Her2/neu-status blir utført i hovedsak via to tester, immunohistokjemi (IHC) og fluorescens in situ hybridisering (FISH). IHC påviser overekspresjon av HER2/neu-protein og blir angitt på en semi-kvantitativ skala på 0 til 3+ (0=negativ, 1+=lav ekspresjon, 2+=middels og 3+= overekspresjon). FISH påviser på den annen side amplifikasjon (ekstra kopier) av HER2/neu-genet og blir uttrykt som et forhold mellom HER2/neu til kromosom 17 og tolkes som overekspresjon dersom FISH er $>2,0$ kopier.

Opptredensgrad av IHC og FISH er omtrent 90%.

Materialer og metoder:

En subsettanalyse ble utført av 163 BCa-pasienter registrert i søkers fase II E75 vaksineforsøk basert på nivå av HER2/neu-ekspresjon. Pasienter ble undersøkt som lavuttrykkende (LE=IHC 1+, 2+ og FISH > 0 men $< 2,0$) mot overuttrykkende (OE=IHC 3+ og/eller FISH $>2,0$ og med IHC-status (0, 1+, 2+, 3+). Analyse ble utført på standard klinokopatologiske faktorer, immunologisk respons på vaksinen (in vivo DTH-reaksjoner og in vitro HLA-A2:IgG dimerassay) samt kliniske responser (absolutt tilbakevending og mortalitetsgrader).

Pasientkarakteristika og kliniske protokoller: E75 NP- og NN-forsøkene var godkjent av Institutional Review Boards og utført ved Walter Reed Army Medical Center, Washington, DC og the Joyce Murtha Breast Care Center, Windber, PA under investigatorisk ny medikamentapplikasjon (BB-IND#9187). Alle pasienter hadde histologisk bekreftet BCa og hadde gjort ferdig et standard forløp av kirurgi, kjemoterapi og stråling (ettersom nødvendig) før innrulling. Pasienter på hormonbehandling ble fortsatt på sine regimer. Etter passende konsultering og godta-

kelse ble BCa-pasienter innrullert til der passende forsøk (NP eller NN) og HLA ty-
pebestemt siden E75 binder primært til HLA-A2 funnet i omkring 40-50% av den
generelle befolkning. HLA-A2+-pasienter ble vaksinert og HLA-A2-pasienter ble ob-
servert prospektivt for klinisk tilbakefall. Etterfølgende ble HLA-A3+-pasienter vak-
sinert. Før vaksinasjon ble pasienter hudtestet med et panel av hukommelsesanti-
gener (Mantoux test). Pasienter ble regnet som immunkompetente dersom de rea-
gerte (>5 mm) på >2 antigener.

Vaksine: E75-peptidet var fremstilt kommersielt med god produksjonsprak-
sisgrad av NeoMPS, Inc. (San Diego, CA). Peptidrenheten (>95%) ble verifisert
med høyeffekt væskechromatografi og massespektrometri. Sterilitet og generell
sikkerhetstesting var utført av produsenten. Frysetørket peptid ble rekonstituert i
0,5 ml steril saline ved 100 mcg, 500 mcg eller 1000 mcg. Peptidet ble blandet
med GM-CSF (Berlex, Seattle, WA) i 0,5 ml. 1,0 inokuleringen ble delt og gitt
intradermalt ved to steder 5 cm fra hverandre på samme ekstremitet.

Vaksineringsserier: NP-forsøket ble utformet som et to-trinns sikkerhetsfor-
søk med økende doser av peptid i det initiale stadium og endring av skjemaet i det
siste stadium. Detaljer angående vaksineserien har blitt publisert tidligere. Kort
angitt ble 3-6 pasienter tilegnet for å motta fire eller seks månedlige injeksjoner på
100 mcg, 500 mcg eller 1000 mcg av E75-peptid (henholdsvis 100:6, 500:4,
500:6, 1000:4 og 1000:6). Grupper ble til slutt utvidet for å bestemme og bekrefte
optimal dosering i NP-pasienter, noe som forklarer det større antall pasienter i de
senere dosegrupper.

NN-forsøket ble utformet for ytterligere å bestemme optimal biologisk dose
ved å variere dosen av GM-CSF og endre inokulasjonsskjemaet. Tolv pasienter
med HER2/neu IHC 0 tumorer ble innrullert i dette forsøket for å bestemme mulig-
heten for å vaksinere en antakelig antigen-naiv vert. Ti pasienter ble tilegnet til
hver dosegruppe med konstant E75-peptid på 500 mcg for å motta tre, fire eller
seks månedlige injeksjoner med varierende GM-CSF-doser (125 mcg eller 250
mcg).

Toksisitet: Pasienter ble observert en time etter vaksinering for umiddelbar
hypersensitivitet og returnert 48-72 timer senere for å få sine injeksjonssteder målt
og spurt om toksisiteter. Toksisiteter ble gradert med NCI Common Terminology
Criteria for Adverse Events v3.0 (angitt på en 0-5-skala). Progresjon fra en dose-
gruppe til neste inntraff kun dersom ingen vesentlig toksisitet opptrådte i den lave-
re dosegruppe. Pasient-spesifikke resultater er angitt basert på maksimal lokal og
systemisk toksisitet som oppsto i løpet av serien.

Perifer Blod Mononukleær Celle (PBMC) Isolasjon og Kulturer: Blod ble truk-
ket før hver vaksinasjon og ved en (etter vaksinering) og seks måneder (langtids)

etter vaksineserieavslutning. 50 ml blod ble tappet og PBMC isolert. PBMC ble vasket og resuspendert i dyrkningsmedium og brukt som en kilde for lymfocytter som tidligere beskrevet.

HLA-A2:Immunoglobulin Dimer-assay: Tilstedeværelsen av CD8+ E75-spesifikke celler i ferskt isolerte PBMC fra pasienter ble undersøkt direkte ved å bruke dimer-assayet som beskrevet tidligere. Kort angitt ble HLA-A2 immunoglobulin (Ig) dimer (PharMingen, San Diego, CA) tilsatt E75 eller kontrollpeptid (E37, folatbindende protein (25-33) RIAWARTEL (SEQ ID NO: 5)) ved å inkubere 1 mcg dimer med et overskudd (5 mcg) av peptid og 0,5 mcg av β 2-mikroglobulin (Sigma, St. Louis, MO) ved 37°C over natten og lagret ved 4°C inntil brukt. PBMC ble vasket og resuspendert i PharMingen Stain Buffer (PharMingen) og tilsatt ved 5×10^5 celler/100 μ l/rør i 5ml rundbunnete polystyrenrør (Becton Dickinson, Mountain View, CA) og farget med de påsatte dimerer og antistoff. I hver pasient ble nivået av CD8+ E75-spesifikke celler bestemt som svar på hver suksessive vaksinerings og gjennomsnittlig post-inokulasjonsnivåer ble sammenlignet med sine pre-inokulasjonsnivåer.

Forsinket type hypersensitivitet (DTH): I begge forsøk ble en DTH-reaksjon undersøkt med 100 mcg av E75-peptid i 0,5 ml normal saline (uten GM-CSF) og 0,5 ml normal saline som en volumkontroll en måned etter avslutning av vaksineserien som beskrevet tidligere. DTH-reaksjonen ble målt i to dimensjoner ved 48-72 timer ved å bruke den følsomme kulepennmetoden og rapportert som den ortogonale middelverdi og sammenlignet med kontroll. I NN-forsøket ble DTH også utført før vaksinasjon.

Kliniske tilbakefall: Alle pasienter ble observert for kliniske tilbakefall per behandlingsstandard for kreftovervåkning som diktert av pasientens hoved kreftlege. En pasient ble regnet som å ha tilbakefall dersom den er biopsibevist eller om den er behandlet for tilbakefall av hovedonkologigruppen.

Statistisk analyse: Tilbakefallsgrader ble sammenlignet mellom gruppene ved å bruke overlevelsesanalyse ved Kaplan-Meier-metoden, og andelen av individer som hadde tilbakefall sammenlignet ved å bruke log-rangert analyse. P-verdier for kliniko-patologiske faktorer ble regnet ut ved å bruke Wilcoxon, Fishers nøyaktige test eller χ^2 ifølge hva som er passende. P-verdier pre- og post-vaksine dimer-nivåer og DTH ble regnet ut ved å bruke paret eller uparet to-delt Students t-test.

35 Resultater

LE (kontroll=44, vaksine=56) mot OE-pasienter (kontroll = 22, vaksine = 29) og IHC-status kontroll- og vaksinegrupper (henholdsvis 0 = 5 mot 7, 1+ 15 mot 25, 2+ 24 mot 26, 3+ 13 mot 19) ble undersøkt. Både LE mot OE og alle IHC

status vaksinerte grupper reagerte immunologisk, men LE-pasienter og mer nøyaktig IHC +1-pasienter, hadde øket langtids in vitro immunrespons (henholdsvis $p = 0,04$ og $p = 0,08$). I tillegg trenderte LE-pasienter mot, og IHC +1-pasienter hadde minsket mortalitet i forhold til sine kontrollgrupper (henholdsvis $p = 0,08$ og $p = 0,04$).

Pasienter: 186 pasienter ble innrullert i E75 vaksinstudien: 9 trakk seg (4 kontrollpasienter og 5 vaksinerte pasienter – ingen trakk seg grunnet toksisitet), noe som resulterte i 177 som fullførte forsøkene. Alle kontroll (C) og vaksinerte (V) pasienter i NP-forsøket (C = 46, V = 45, totalt = 91 pasienter) hadde IHC, FISH eller begge tester utført. I NN-forsøket (C = 35, V = 51, totalt = 86 pasienter) hadde 12 pasienter HER2/neu IHC 0 tumorer (C = 5, V = 7). Også i NN-forsøket undergikk 14 pasienter (C = 7, V = 7) tumorer ikke IHC eller FISH – disse 14 pasienter har blitt utelukket fra subseett-analyse, følgelig var 163 pasienter tilgjengelige for analyse.

LE mot OE subseett-analyse:

Pasienter per ekspresjon: Subseett-analyse ble utført som sammenlignet LE (IHC 1+ - 2+ eller FISH >0 og <2,0) mot OE (IHC 3+ eller FISH >2,0). Sekstiseks pasienter i kontrollgruppen fikk IHC eller FISH utført (LE = 44, OE = 22). Et totale på 85 pasienter i E75 vaksinegruppen fikk IHC eller FISH utført (LE = 56, OE = 29). Et sammenlignbart antall C- og V-pasienter var i LE- (henholdsvis 67% mot 66%) og OE-gruppene (henholdsvis 33% mot 34%).

Demografier, prognostiske faktorer og behandlingsprofiler av LE- mot OE-pasienter er vist i **Tabell 4**. Med hensyn til LE-pasienter ble det ikke funnet noen statistiske forskjeller mellom C- og V-pasienter. Med OE-pasienter var et statistisk større antall av V-pasienter hormonreseptor-negative enn i C-gruppen ($p = 0,02$) (**Tabell 4**).

Tabell 4. Demografier, prognostiske faktorer og behandlingsprofiler av pasienter innrullert i E75 fase II forsøk med LE mot OE

	LE Kontroll (n=44)	LE vaksine (n=56)	P	OE kontroll (n=22)	OE vaksine (n=29)	P
Midlere alder, år	55	56		50	52	
Område, år	31-82	27-77	0,7	32-75	37-68	0,1
Rase						
- Hvit, %	86,4%	89,3%	0,8	72,7%	86,2%	0,3
- Annen, %	13,6%	10,7%	0,8	27,3%	13,8%	0,3
Tumor-størrelse						
- T2-T4, %	38,6%	33,9%	0,7	31,8%	34,5%	0,9
Histologisk grad						
- Grad III, %	27,2%	30,4%	0,8	63,6%	62,1%	0,9
Node positiv (NP), %	54,5	58,9%	0,7	90,1%	55,2%	0,06
Hormon-reseptor, %	15,9%	19,6%	0,8	27,3%	62,1%	0,02*
Kjemoterapi, %	72,7%	75,0%	0,8	86,4%	96,6%	0,3
XRT, %	84,1%	75,0%	0,3	72,7%	75,9%	NS
Hormon-terapi, %	81,8%	76,8%	0,6	63,6%	41,4%	0,2
Herceptin, %	0,2%	0,2%	NS	9,1%	24,1%	0,3

* Statistisk signifikant forskjell

5 *Immunologisk respons per ekspresjon:* E75-vaksinen var i stand til å frem-s
skaffe en in vitro immunrespons i både LE- og OE-pasientene. Signifikante øk-
ninger fra pre-vaksine til maks E75-spesifikke CD8+ T-celler ble funnet i begge
grupper (LE p<0,001, OE p<0,001). LE-pasienter hadde statistisk høyere maksi-
mum immunrespons i forhold til OE-pasienter (p=0,04) (**Figur 11A**).

10 Både LE- og OE-pasienter var i stand til å frembringe en in vivo immunre-
spons som ålt via DTH pre- og post-vaksine. Signifikant pre-post DTH-økninger ble
funnet i begge kategorier (LE p<0,001, OE p=0,02) (**Figur 11B**). Selv om LE post-
DTH er større enn OE post-DTH (henholdsvis 15,9±1,9 mm mot 12,8±2,0 mm), det
er ingen statistisk signifikans (p=0,5). Totalt synes E75-vaksinen mer immunolo-
15 gisk aktiv i LE-pasienter.

Klinisk respons per ekspresjon: Klinisk respons, vurdert via tilbakefall og
mortalitet, er angitt i **Figurer 11C** og **11D**. Alle V-pasienter (LE=10,7% mot
OE=13,8%) syntes å ha minskete tilbakefallsgrader i forhold til C-pasienter (LE &
OE = 18,2%), men disse tallene var ikke statistisk signifikante. Viktigere er det at

det fantes en tendens mot minsket mortalitet i V-pasientene, mest overbevisende observert i LE-pasientene (C=6,8% mot V=0,0%, $p=0,08$).

IHC status subsett-analyse:

5 *Pasienter per IHC-status:* C-gruppen hadde 57 pasienters patologiprøver og
 undergikk IHC (0=5, 1+=15, 2+=24, 3+=13). E75 V-gruppen hadde 77 pasien-
 ters patologi og undergikk IHC (0=7, 1+=25, 2+=26, 3+=19). En sammenlignbar
 prosentdel av C- og V-pasienter var i hver IHC-gruppe (0 C=8,8% mot V=9,1%;
 1+ C=26,3% mot V=32,5%, 2+ C=42,1% mot V=33,8%, 3+ C=22,8% mot
 V=24,7%).

10 Demografier, prognostiske faktorer og behandlingsprofiler per IHC-status er
 presentert i **Tabell 5**. Det fantes ingen signifikant forskjell i prognostiske faktorer
 for IHC-statusgrupper. IHC 1+-pasienter hadde en større prosentdel av T2-T4-
 tumorer i C-gruppen i forhold til V-gruppen (66,7% mot 30,8%, $p=0,05$). IHC 3+-
 pasientene var alle NP og 42,1% av V-pasientene var NP ($p=0,003$).

Tabell 5. Demografier, prognostiske faktorer og behandlingsprofiler av pasienter innrullert i E75 fase II-forsøket med HER2/neu ekspresjonsnivå

	0 Kontroll (n=5)	0 Vaksine (n=7)	1 ⁺ Kontroll (n=15)	1 ⁺ Vaksine (n=25)	p	2 ⁺ Kontroll (n=24)	2 ⁺ Vaksine (n=26)	3 ⁺ Kontroll (n=13)	3 ⁺ Vaksine (n=19)	p
Midlere alder, år	50	60	54	54		50	57	49	51	
Område, år	38-74	31-74	44-82	42-71	0,4	31-75	27-77	31-74	37-62	0,2
Rase										
- Hvit, %	100,0%	71,4%	73,3%	84,0%	0,4	87,5%	92,3%	61,5%	89,5%	0,1
- Annen, %	0,0%	28,6%	26,7%	16,0%	NS	12,5%	7,7%	40,5%	10,5%	NS
Tumor-størrelse										
- T2-T4, %	40,0%	14,3%	66,7%	28,0%	0,05*	29,2%	46,2%	38,5%	36,8%	0,8
Histologisk grad										
- Grad III, %	20,0%	14,3%	33,3%	36,0%	0,7	37,5%	38,5%	61,5%	57,9%	0,8
Node positiv (NP), %	0,0%	0,0%	80,0%	60,0%	0,3	79,2%	80,0%	100,0%	42,1%	0,003*
Hormon-reseptor, %	20,0%	14,3%	13,3%	28,0%	0,4	16,7%	11,5%	38,5%	63,2%	0,2
Kjemoterapi, %	80,0%	42,9%	80,0%	76,0%	0,9	87,5%	96,2%	92,3%	94,7%	0,6
XRT, %	100,0%	42,9%	66,3%	76,0%	0,7	87,5%	96,2%	69,2%	94,7%	0,1
Hormon-terapi, %	80,0%	85,7%	80,0%	72,0%	0,9	79,2%	73,1%	53,8%	73,7%	0,3
Herceptin, %	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	NS	8,3%	7,7%	7,7%	10,5%	0,7

* Statistisk signifikant forskjell

Immunologisk respons per IHC-status: E75-vaksinen var i stand til å frem-skatte en in vitro immunrespons i alle IHC-kategorier. Alle IHC-grupper (0, 1+, 2+, 3+) reagerte på vaksinen som vist ved vesentlig økning fra pre-vaksine til maks E75-spesifikke CD8+ T-celler)0 $p=0,007$, 1+ $p<0,001$, 2+ $p=0,004$, 3+ $p=0,002$).

5 Kun IHC 1+-pasienter tenderte mot signifikant pre til langtids økning i E75-spesifikke CD8+ T-celler ($p=0,08$) (**Figur 12A**).

I tillegg var alle pasienter i stand til å fremskatte en in vivo immunrespons som målt via DTH pre- og post-vaksine. Signifikante pre-post DTH-økninger ble funnet i alle IHC-kategorier (0 $p=0,03$, 1+ $p=0,02$, 2+ $p=0,02$, 3+ $p=0,005$). To-
10 talt, uavhengig av HER2/neu-ekspresjon som målt med IHC, var vaksinen immuno-logisk effektiv, men synes å være mest effektiv i IHC 1+-pasientene (**Figur 12B**).

Klinisk respons per IHC-status: Klinisk respons, vurdert ved tilbakefall og mortalitet, er gitt i **Figur 12C** og **12D**. I alle IHC-kategorier (bortsett fra IHC 0 hvor ingen pasienter hadde tilbakefall) fantes det minskete tilbakefallsgrader når C-
15 og V-pasienter sammenlignes, selv om antallene ikke oppnår statistisk signifikans. Viktigere er det at det fantes en vesentlig minskning i mortalitet i IHC 1+-pasienter, C=20% og V=0% mortalitet ($p=0,04$).

I det tidligere fase II forsøk resulterte administrasjon av E75-vaksinen i minskete tilbakefallsgrader og en tendens mot minskede mortalitetsgrader ved 20
20 måneder, men disse forskjeller tapte signifikans ettersom immunitet forsvant uten bruk av forsterkere. Det ble vist at pasienter med alle nivåer av HER2/neu-ekspresjon reagerte immunologisk på vaksinen, men at LE- (og spesielt IHC 1+) pasienter hadde kraftigere immunologiske reaksjoner og fikk den største kliniske fordelene med minsket mortalitet. Det ble også vist at antigen-naive pasienter også
25 reagerte immunologisk på vaksinen.

Når områder blir brukt heri for fysiske egenskaper så som molekylvekt eller kjemiske egenskaper så som kjemiske formler, er alle kombinasjoner og under-kombinasjoner av områder som er spesifikke aspekter deri, men å være innbefat-tet.

30 Selv om den foregående oppfinnelse har blitt detaljert beskrevet som illus-trasjon og eksempel for formål med klarhet og forståelse, vil det lett være tydelig for den vanlige fagpersonen i lys av beskrivelsen av foreliggende oppfinnelse, at visse endringer og modifikasjoner kan bli gjort i denne uten å fravike fra omfanget av de medfølgende krav.

35

Sekvensopplisting

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

MKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFL-
 QDIQEVQGYVLI AHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGA
 5 SPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSR
 ACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTV CAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPK
 10 HSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEG RYTFGASCVTACPYNYLST
 DVGSC TLVCPLHNQEVT AEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVR AVTSANI QEF
 15 AGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSL PDL
 SVFQNLQVIRGRILHNGAYS LTLQGLGISWLGLRSLRELGSG LALIH HNTHL CFVHTV
 20 PWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGP GP TQCVNCSQFLRGQ
 ECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFC
 25 VARCP SGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSI
 ISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQM
 30 RILKETELRKVKVLGSGAFGT VYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDE
 AYVMAGVGSPYVSRL LGICLTSTVQLVTQLMPYGC LLDHVREN RGR LGSQDLLN WCMQ
 IAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKVP I
 35 KWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQP
 PICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFREL VSEFSRMARDPQRFVVIQNE DLGPASPLDS
 40 TFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLT
 LGLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPTHDPSP LQRYSEDPTV
 45 PLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSPG
 KNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPQGGAAPQPHPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPP
 50 STFKGTPTAENPEYLG LDVPV

SEQ ID NO:2 (E75 peptide)

55 KIFGSLAFL

SEQ ID NO:3

BIMAS

SEQ ID NO:4

SYFPEITHI

5 SEQ ID NO:5

RIAWARTEL

SEQUENCE LISTING

10

<110> Henry M. Jackson Foundation for the Advancement of Military Medicine, Inc.
Peoples, George E.
15 Ponniah, Sathibalan

<120> VACCINE FOR THE PREVENTION OF BREAST CANCER RELAPSE

20

<130> HMJF-0009

<150> US 60/941,524

<151> 2007-06-01

25

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

30

<210> 1

<211> 1225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

35

<220>

<223> Synthetic construct

40

<400> 1

45

50

55

Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu
 1 5 10 15
 5 Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu
 20 25 30
 10 Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln
 35 40 45
 15 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
 20 Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr
 85 90 95
 25 Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu
 100 105 110
 30 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

35

40

45

50

55

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

	Trp	Pro	Asp	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Gln	Val	
	385					390					395					400	
5	Ile	Arg	Gly	Arg	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	
					405					410					415		
10	Gly	Leu	Gly	Ile	Ser	Trp	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	
				420					425					430			
15	Ser	Gly	Leu	Ala	Leu	Ile	His	His	Asn	Thr	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	
			435					440					445				
20	Thr	Val	Pro	Trp	Asp	Gln	Leu	Phe	Arg	Asn	Pro	His	Gln	Ala	Leu	Leu	
	450						455					460					
25	His	Thr	Ala	Asn	Arg	Pro	Glu	Asp	Glu	Cys	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Ala	
	465					470					475					480	
30	Cys	His	Gln	Leu	Cys	Ala	Arg	Gly	His	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Thr	
					485					490					495		
35	Gln	Cys	Val	Asn	Cys	Ser	Gln	Phe	Leu	Arg	Gly	Gln	Glu	Cys	Val	Glu	
				500					505					510			
40	Glu	Cys	Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Pro	Arg	Glu	Tyr	Val	Asn	Ala	Arg	
			515					520					525				
45	His	Cys	Leu	Pro	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Gln	Pro	Gln	Asn	Gly	Ser	Val	
	530						535					540					
50	Thr	Cys	Phe	Gly	Pro	Glu	Ala	Asp	Gln	Cys	Val	Ala	Cys	Ala	His	Tyr	
	545					550					555					560	
55	Lys	Asp	Pro	Pro	Phe	Cys	Val	Ala	Arg	Cys	Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Pro	
					565					570					575		
60	Asp	Leu	Ser	Tyr	Met	Pro	Ile	Trp	Lys	Phe	Pro	Asp	Glu	Glu	Gly	Ala	
				580					585					590			
65	Cys	Gln	Pro	Cys	Pro	Ile	Asn	Cys	Thr	His	Ser	Cys	Val	Asp	Leu	Asp	
			595					600					605				
70	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
5	Phe	Gly	Ile	Leu	Ile	Lys	Arg	Arg	Gln	Gln	Lys	Ile	Arg	Lys	Tyr	Thr		645	650	655
10	Met	Arg	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Thr	Glu	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Thr	Pro		660	665	670
15	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
20	Tyr	Lys	Gly	Ile	Trp	Ile	Pro	Asp	Gly	Glu	Asn	Val	Lys	Ile	Pro	Val		705	710	715
25	Ala	Ile	Lys	Val	Leu	Arg	Glu	Asn	Thr	Ser	Pro	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu		725	730	735
30	Ile	Leu	Asp	Glu	Ala	Tyr	Val	Met	Ala	Gly	Val	Gly	Ser	Pro	Tyr	Val		740	745	750
35	Ser	Arg	Leu	Leu	Gly	Ile	Cys	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Leu	Val	Thr		755	760	765
40	Gln	Leu	Met	Pro	Tyr	Gly	Cys	Leu	Leu	Asp	His	Val	Arg	Glu	Asn	Arg		770	775	780
45	Gly	Arg	Leu	Gly	Ser	Gln	Asp	Leu	Leu	Asn	Trp	Cys	Met	Gln	Ile	Ala		785	790	795
	Lys	Gly	Met	Ser	Tyr	Leu	Glu	Asp	Val	Arg	Leu	Val	His	Arg	Asp	Leu		805	810	815
50	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
55	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
5	Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile	
		885 890 895
10	Pro Ala Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro	
		900 905 910
15	Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys	
		915 920 925
20	Trp Met Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser	
		930 935 940
25	Glu Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln	
		945 950 955 960
30	Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg	
		965 970 975
35	Ser Leu Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu	
		980 985 990
40	Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly	
		995 1000 1005
45	Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg	
		1010 1015 1020
50	Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu	
		1025 1030 1035
55	Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser	
		1040 1045 1050
60	Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu	
		1055 1060 1065
65	Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser	
		1070 1075 1080
70	Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val	
		1085 1090 1095
75	Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro	

	1100		1105		1110
5	Asp Val 1115	Arg Pro Gln Pro	Pro 1120	Ser Pro Arg Glu	Gly Pro Leu Pro 1125
10	Ala Ala 1130	Arg Pro Ala Gly	Ala 1135	Thr Leu Glu Arg	Pro Lys Thr Leu 1140
15	Ser Pro 1145	Gly Lys Asn Gly	Val 1150	Val Lys Asp Val	Phe Ala Phe Gly 1155
20	Gly Ala 1160	Val Glu Asn Pro	Glu 1165	Tyr Leu Thr Pro	Gln Gly Gly Ala 1170
25	Ala Pro 1175	Gln Pro His Pro	Pro 1180	Pro Ala Phe Ser	Pro Ala Phe Asp 1185
30	Asn Leu 1190	Tyr Tyr Trp Asp	Gln 1195	Asp Pro Pro Glu	Arg Gly Ala Pro 1200
35	Pro Ser 1205	Thr Phe Lys Gly	Thr 1210	Pro Thr Ala Glu	Asn Pro Glu Tyr 1215
40	Leu Gly 1220	Leu Asp Val Pro	Val 1225		
45		Lys Ile Phe Gly	Ser Leu Ala Phe Leu		
		1	5		
50		<210> 3			
		<211> 5			
		<212> PRT			
		<213> Artificial Sequence			
		<220>			
		<223> Synthetic construct			
55		<400> 3			
		Asx Ile Met Ala Ser			
		1	5		

45

5
<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic construct

10
<400> 4

Ser Tyr Phe Pro Glu Ile Thr His Ile
1 5

15
<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20
<220>
<223> Synthetic construct

<400> 5

25
Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu
1 5

Patentkrav

1. Sammensetning omfattende et farmasøytisk effektivt bæremiddel og et peptid som har aminosyresekvensen SEQ ID NO: 2 for anvendelse ved induksjon
5 av beskyttende eller terapeutisk immunitet mot tilbakefall av brystkreft i et individ, hvor individet har en immunokjemigrad (IHC) på 1+ eller 2+ for HER2/neu-proteinekspresjon og en fluorescens in situ hybridiseringsgrad (FISH) på mindre enn $2,0 \pm 20\%$ for HER2/neu genekspressjon.
2. Sammensetning ifølge krav 1, hvor sammensetningen er formulert til
10 å bli administrert månedlig ved inokulering eller injeksjon, fortrinnsvis ved intradermal injeksjon inntil beskyttende immunitet er etablert.
3. Sammensetning ifølge krav 2, hvor sammensetningen er formulert til å bli administrert som tre til seks månedlige injeksjoner, og fortrinnsvis som seks månedlige injeksjoner.
- 15 4. Sammensetning ifølge ethvert av kravene 1 til 3, hvor sammensetningen er formulert til å bli administrert med en vaksineforsterkersammensetning, hvor vaksineforsterkersammensetningen omfatter et farmasøytisk effektivt bæremiddel og et peptid med aminosyresekvensen SEQ ID NO: 2.
5. Sammensetning ifølge ethvert av kravene 1 til 4, hvor forsterkersammensetningen er formulert til å bli administrert ved inokulering eller injeksjon,
20 fortrinnsvis ved intradermal injeksjon.
6. Sammensetning ifølge ethvert av kravene 1 til 5, hvor sammensetningen er formulert for inokulering eller injeksjon i en eller flere oppdelte doser og/eller forsterkersammensetningen er formulert for inokulering eller injeksjon i en
25 eller flere separate doser.
7. Sammensetning ifølge krav 6, hvor to doser av sammensetningen og/eller to doser av forsterkersammensetningen inneholder like konsentrasjoner av peptidet.
8. Sammensetning ifølge krav 6 eller 7, hvor inokulasjons- eller injeksjonsstedene på kroppen ligger minst 5 cm fra hverandre.
- 30 9. Sammensetning ifølge ethvert av kravene 4 til 8, hvor forsterkersammensetningen er formulert til å bli administrert hver sjette til 12 måned, fortrinnsvis hver sjette måned etter primærimmuniseringsskjemaet er fullført.
10. Sammensetning ifølge ethvert av kravene 1 til 9, hvor individet er et
35 menneske.
11. Sammensetning ifølge krav 10, hvor mennesket uttrykker humant leukocytt antigen A2 eller humant leukocyttantigen A3.

12. Sammensetning ifølge ethvert av kravene 1 til 11, hvor individet er i fullstendig klinisk remisjon etter diagnose av node-positiv eller node-negativ brystkreft, eller hvor individet er i delvis remisjon for brystkreft.

13. Sammensetning ifølge ethvert av kravene 1 til 12, hvor sammensetningen ytterligere omfatter en adjuvant, fortrinnsvis hvor adjuvanten er rekombinant human granulocyt makrofag koloni-stimulerende faktor.

14. Sammensetning ifølge ethvert av kravene 4 til 13, hvor vaksineforsterkersammensetningen ytterligere omfatter en adjuvant, fortrinnsvis hvor adjuvanten er rekombinant human granulocyt makrofag koloni-stimulerende faktor.

15. Sammensetning ifølge ethvert av kravene 1 til 14, hvor sammensetningen induserer en cytotoksisk T-lymfocyttespons mot peptidet som har aminosyresekvensen SEQ ID NO: 2.

16. Sammensetning ifølge ethvert av kravene 10 til 15, hvor mennesket hadde node-positiv brystkreft eller hvor mennesket hadde node-negativ brystkreft.

17. Sammensetning ifølge ethvert av kravene 1 til 16, hvor sammensetningen omfatter

(i) 0,1 mg til 10 mg av peptidet, fortrinnsvis 0,1, 0,5 eller 1 mg av peptidet, og

(ii) 0,01 til 0,5 mg av human granulocyt makrofag koloni-stimulerende faktor (GM-CSF) som en adjuvant, fortrinnsvis 0,25 eller 0,125 mg av GM.-CSF.

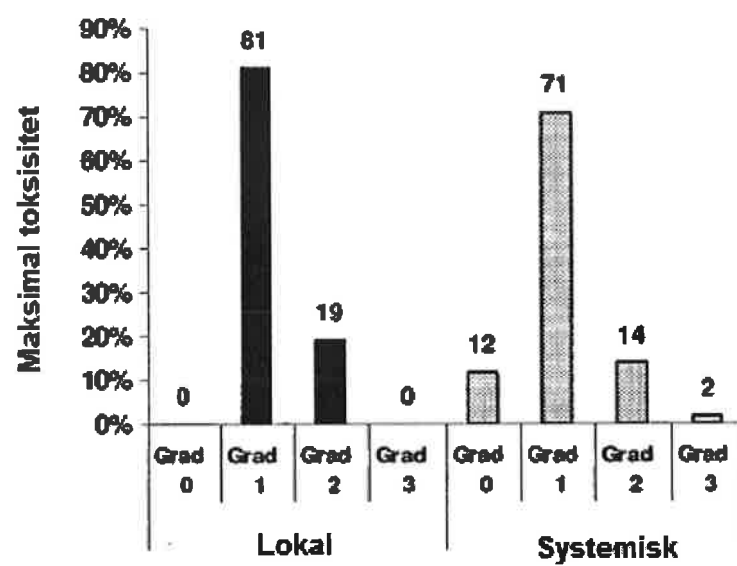
18. Sammensetning ifølge krav 1 for anvendelse i et menneske som har en immunohistokjemigrad (IHC) på 1+ eller 2+ for HER2/neu proteinekspressjon og en fluorescens in situ hybridiseringsgrad (FISH) på mindre enn $2,0 \pm 20\%$ for HER2/neu genekspressjon, hvor sammensetningen omfatter

(i) en vaksinesammensetning omfattende 1 mg av peptidet med aminosyresekvens SEQ ID NO: 2 og 0,125 eller 0,250 mg av human granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor (GM-CSF) som en adjuvant, hvor vaksinesammensetningen er formulert for administrasjon som tre til seks månedlige injeksjoner, fortrinnsvis som intradermale injeksjoner, og

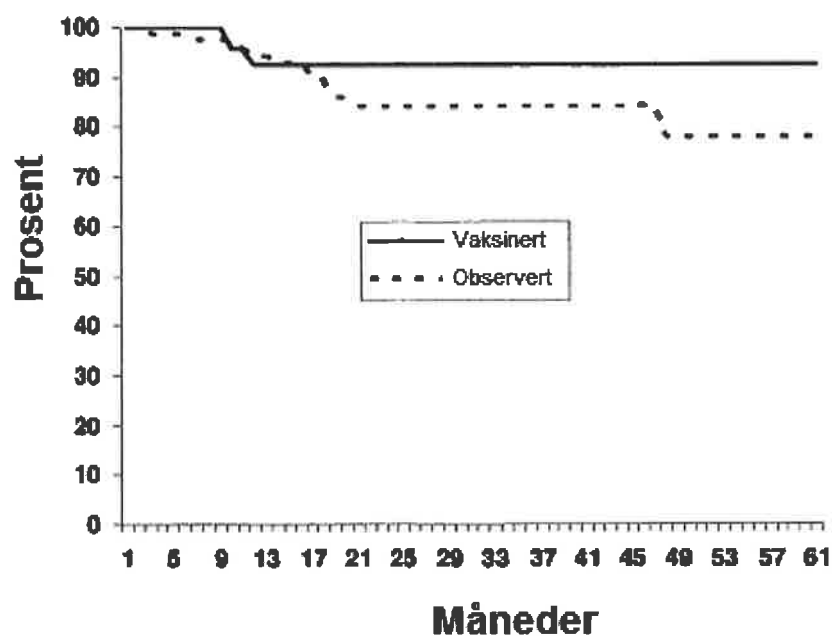
(ii) en vaksineforsterkersammensetning omfattende 1 mg av peptidet med SEQ ID NO: 2 og 0,250 mg av human granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor (GM-CSF) som en adjuvant, hvor vaksineforsterkersammensetningen er formulert for administrasjon ved injeksjon, fortrinnsvis intradermal injeksjon hver sjette måned etter primærimmuniseringsskjemaet er fullført.

19. Sammensetning ifølge ethvert av kravene 1 til 18, hvor individet har en immunohistokjemigrad (IHC) på 1+ for HER2/neu proteinekspressjon.

1 / 17

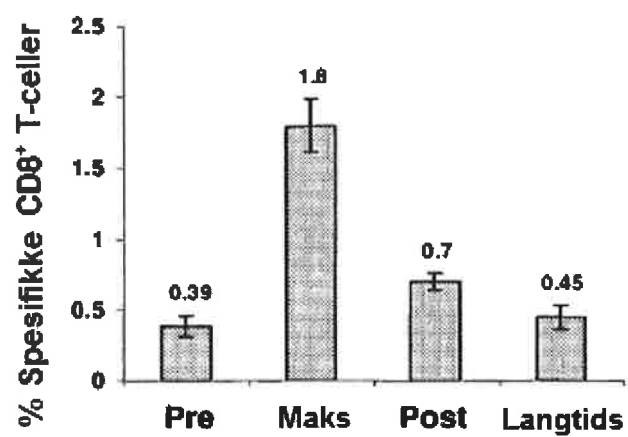
**Figur 1**

2 / 17

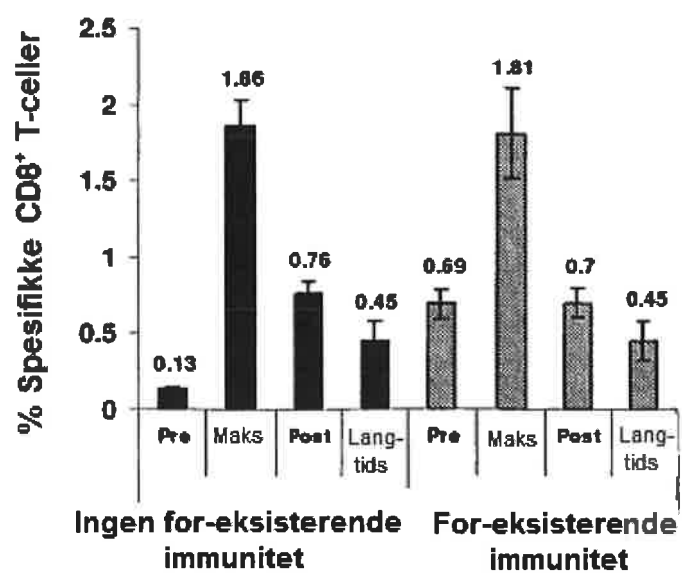


Figur 2

3 / 17

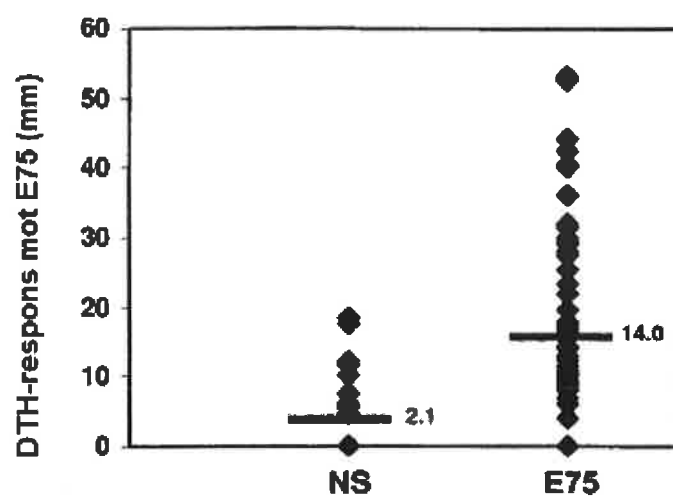


Figur 3A

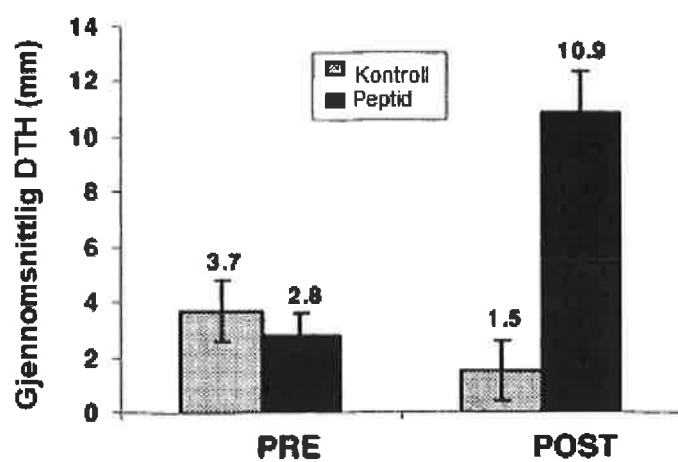


Figur 3B

4 / 17

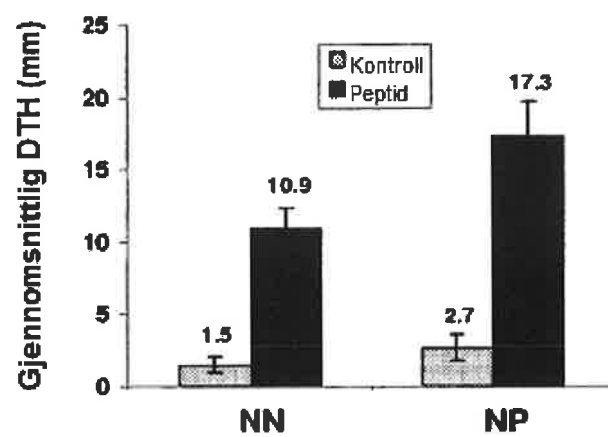


Figur 4A

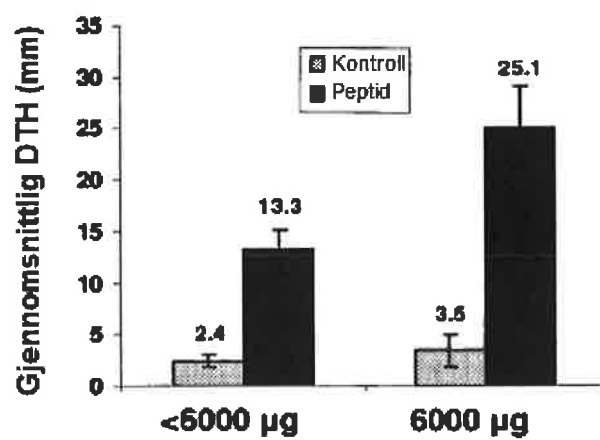


Figur 4B

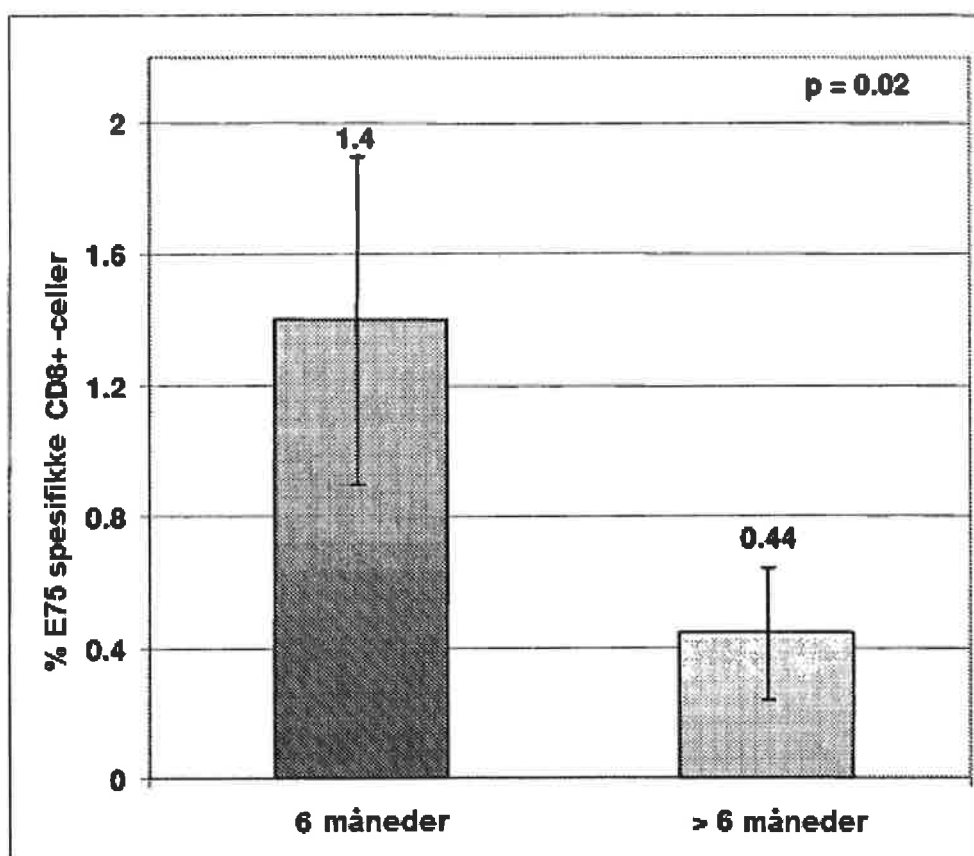
5 / 17



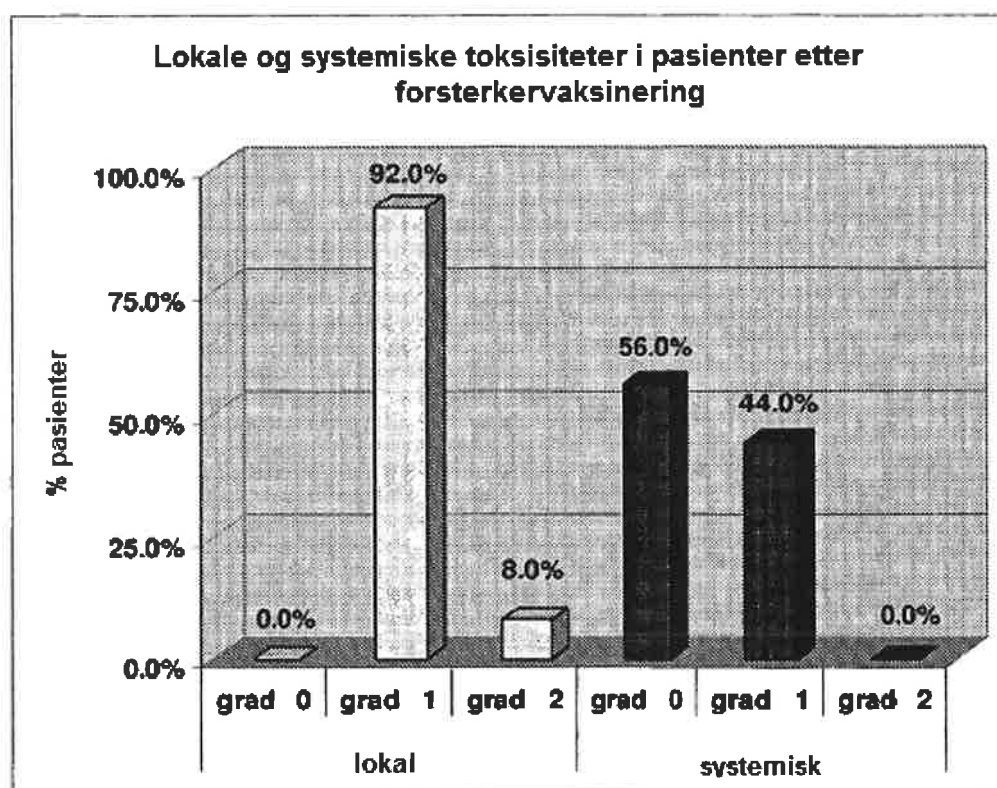
Figur 4C

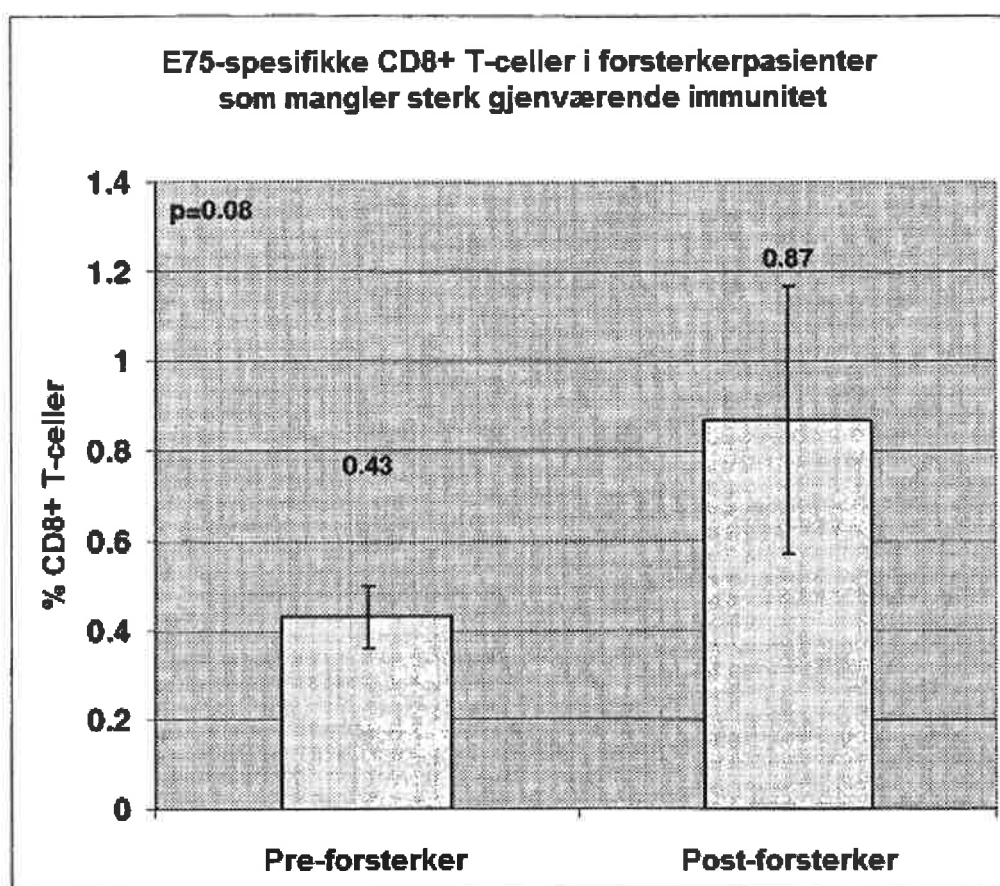


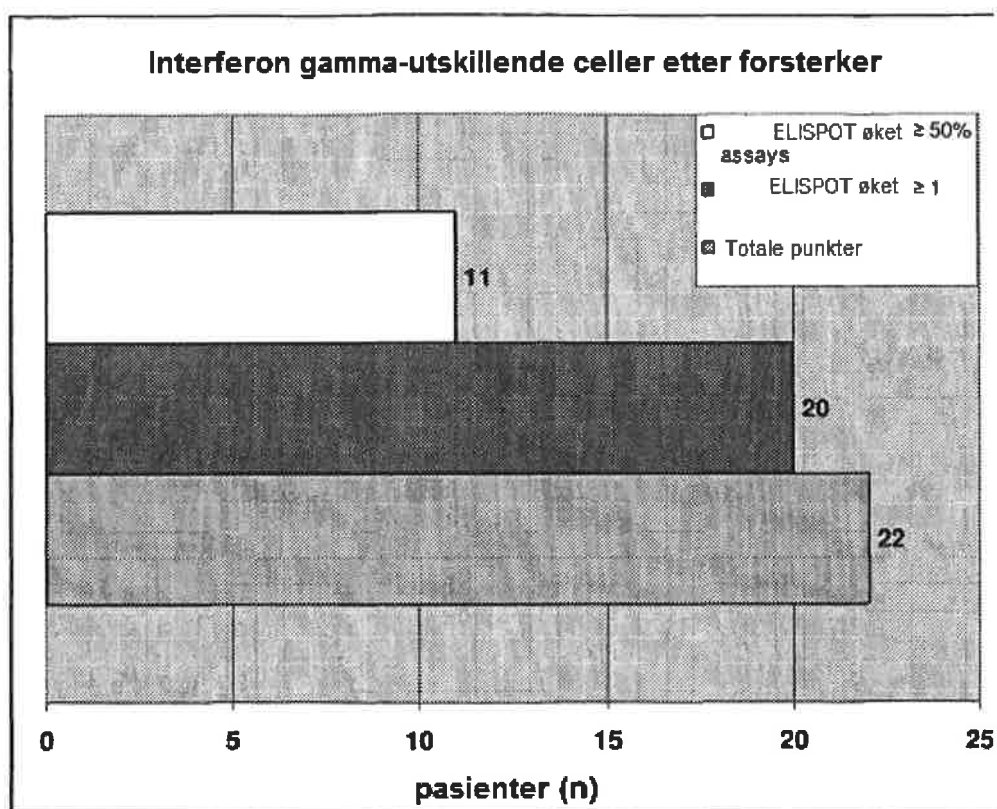
Figur 4D

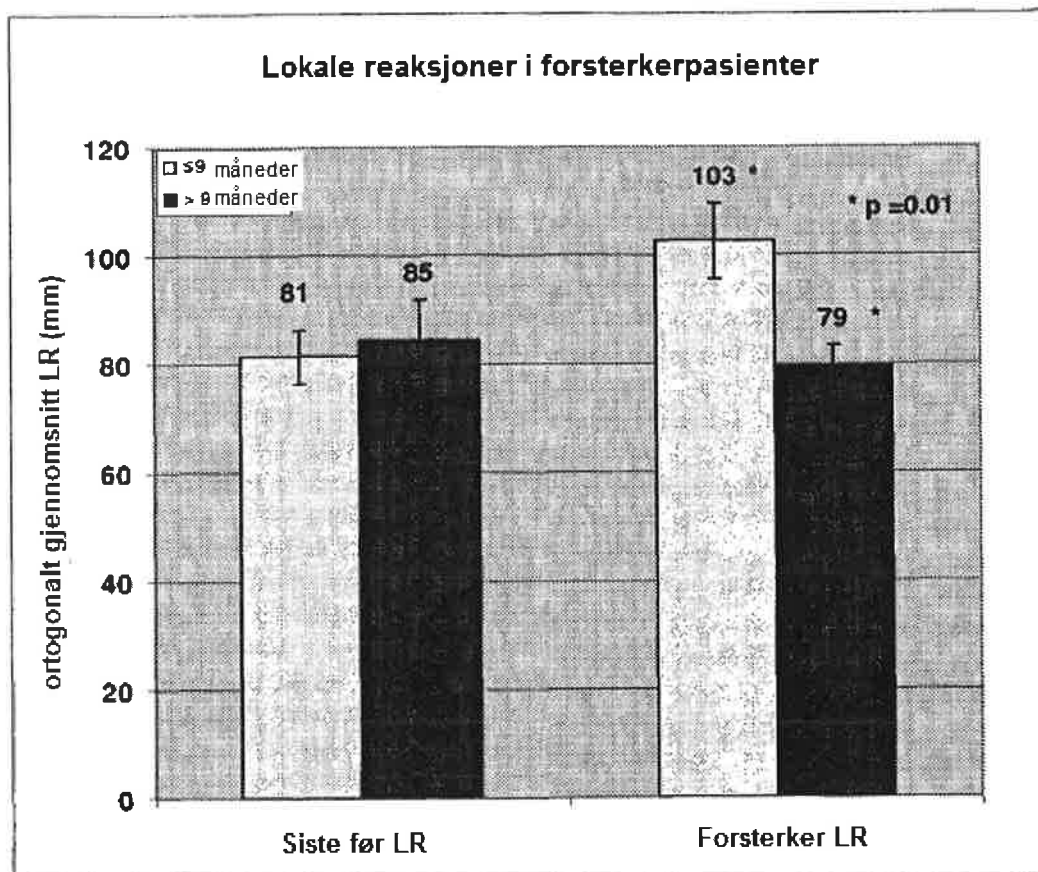


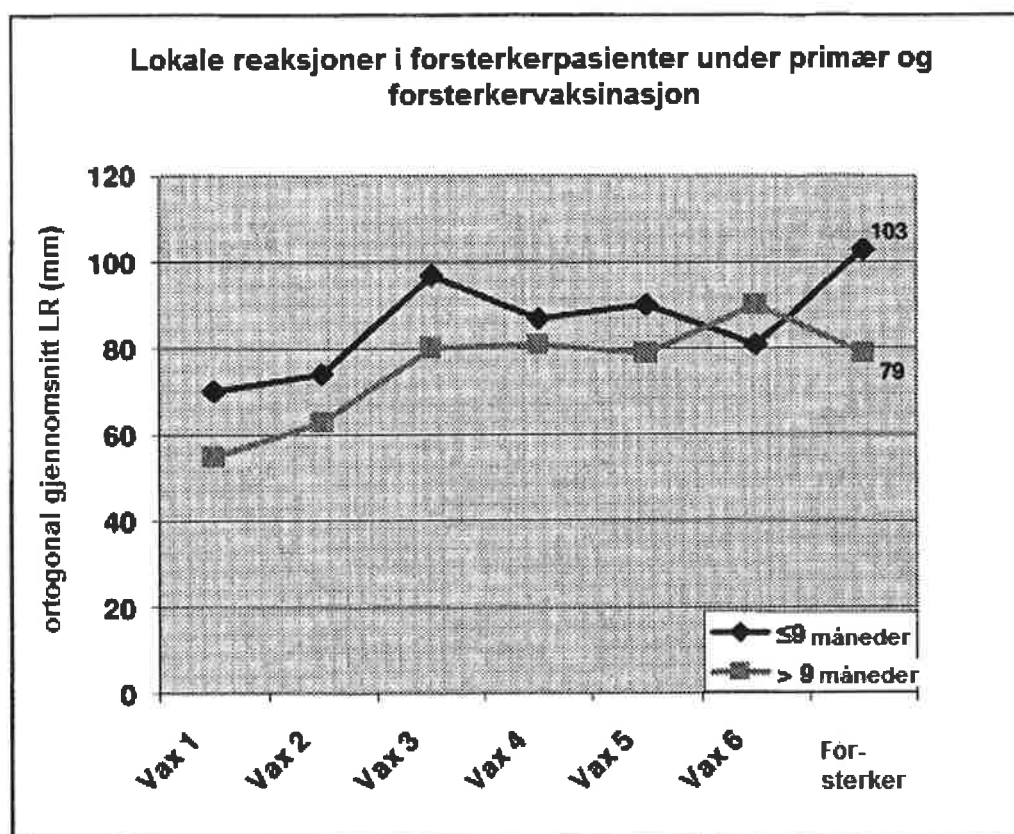
Figur 5

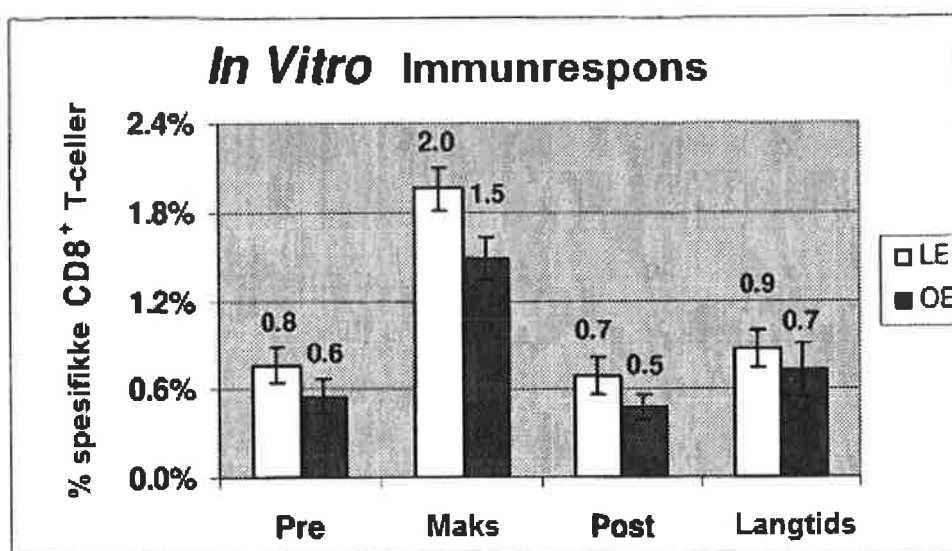
**Figur 6**

**Figur 7**

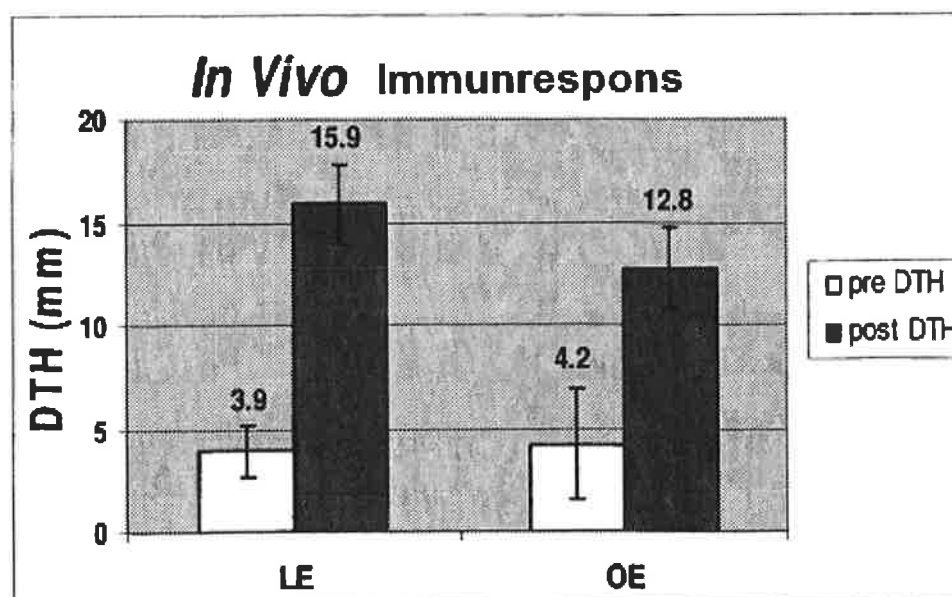
**Figur 8**

**Figur 9**

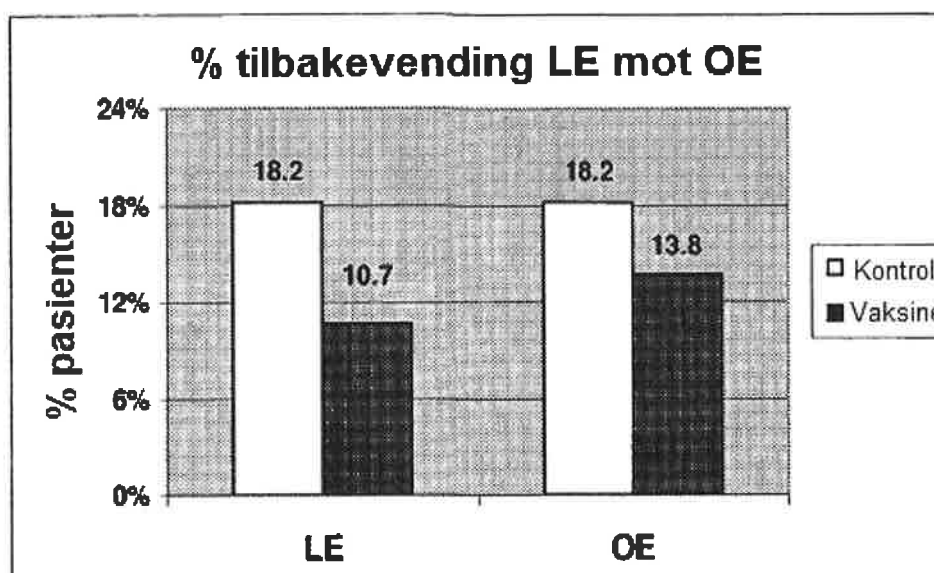
**Figur 10**



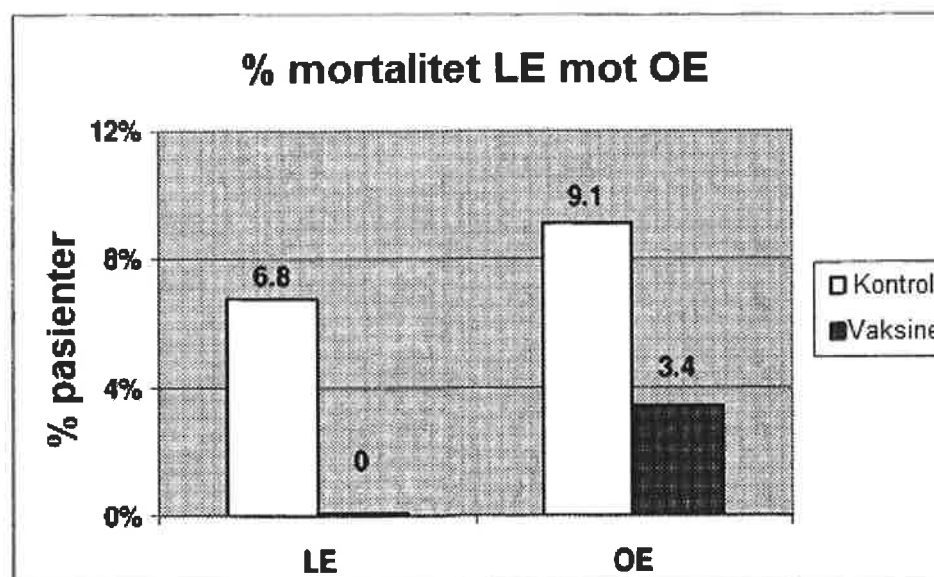
Figur 11A



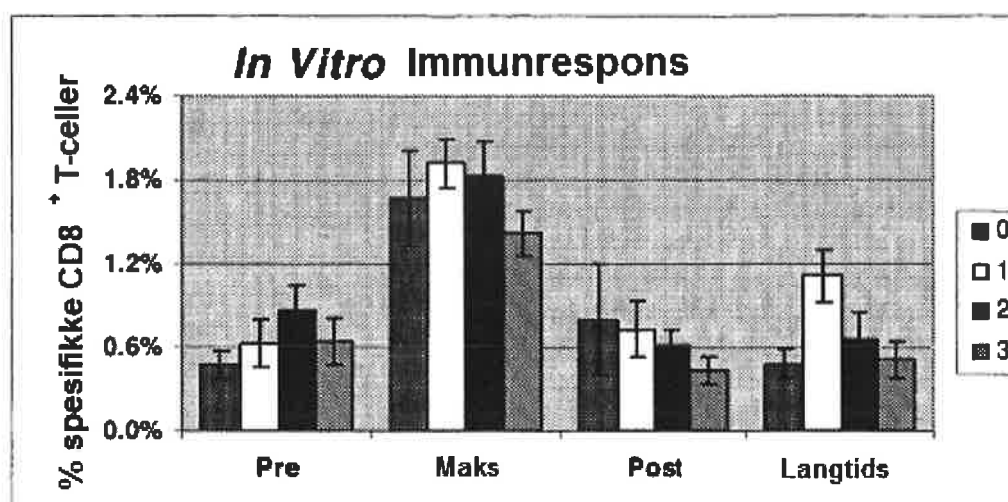
Figur 11B



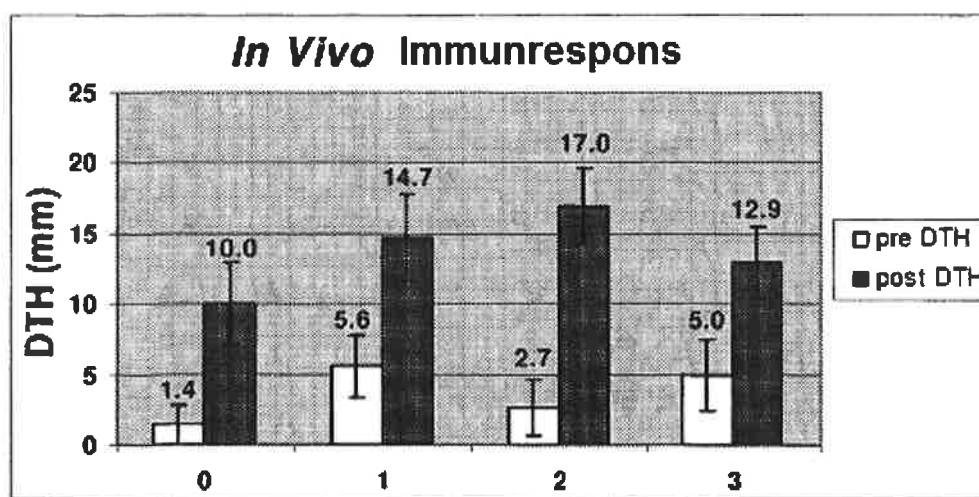
Figur 11C



Figur 11D

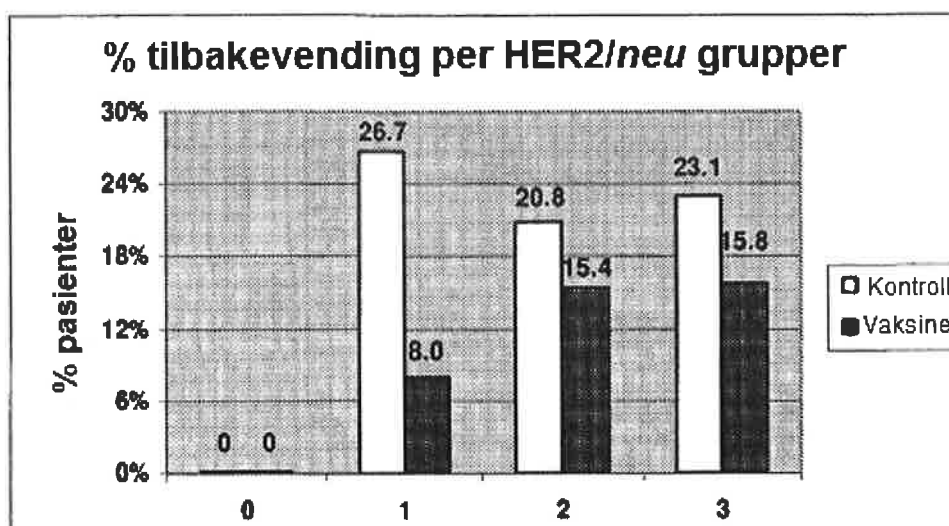


Figur 12A

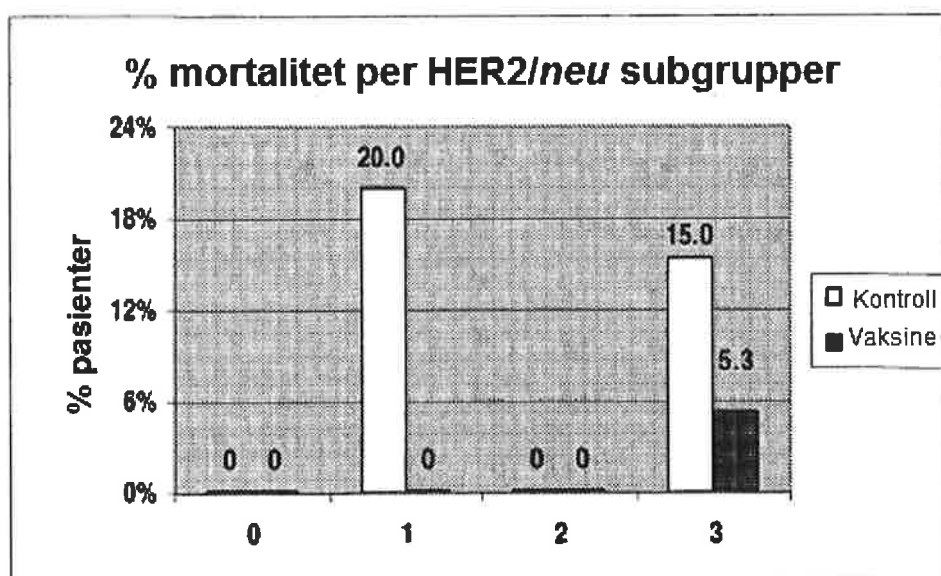


Figur 12B

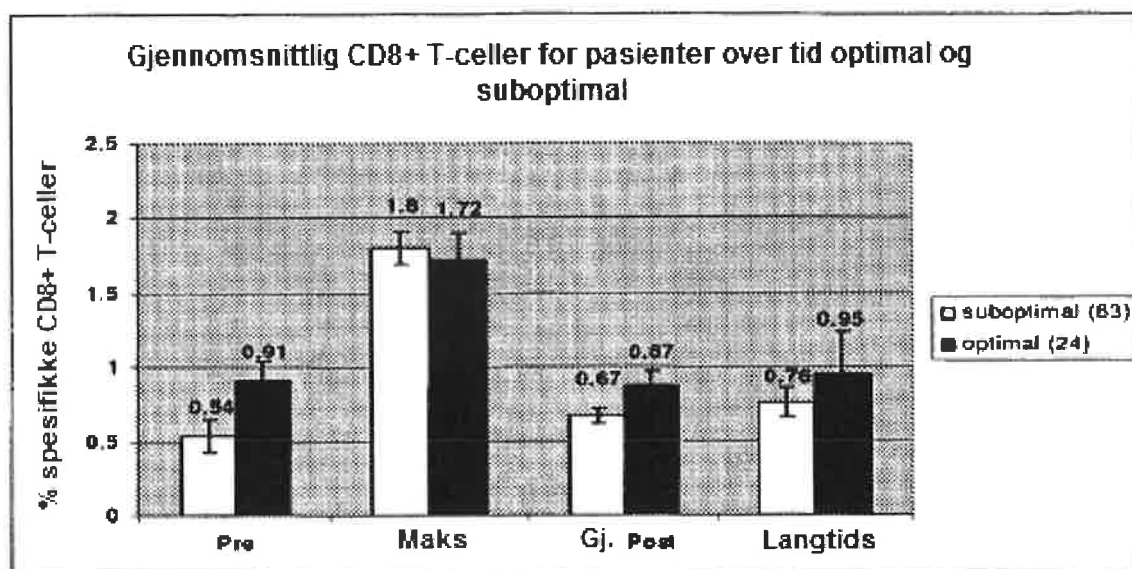
15 / 17



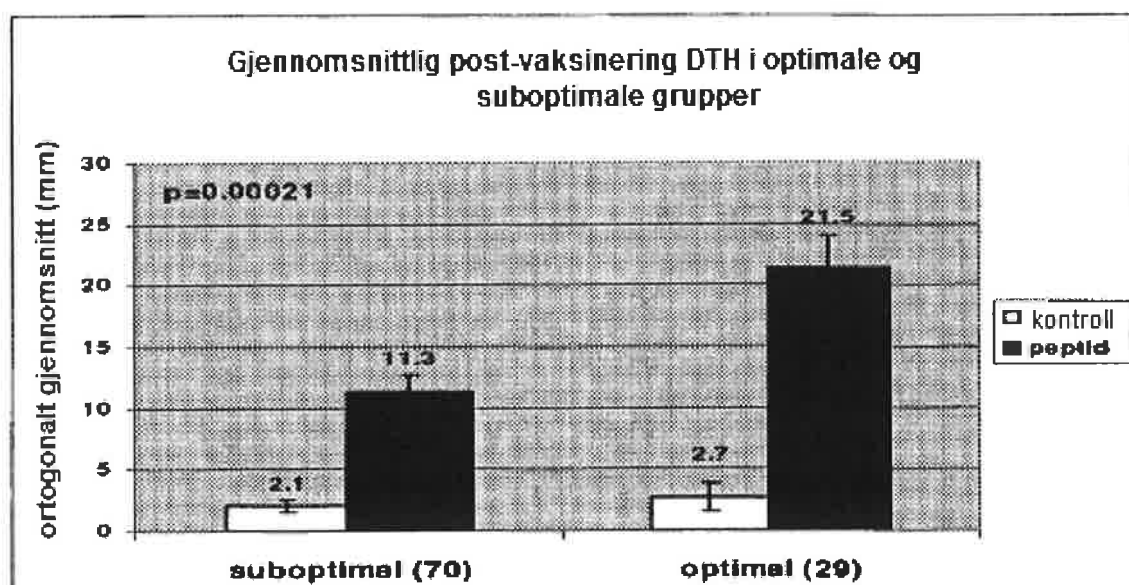
Figur 12C



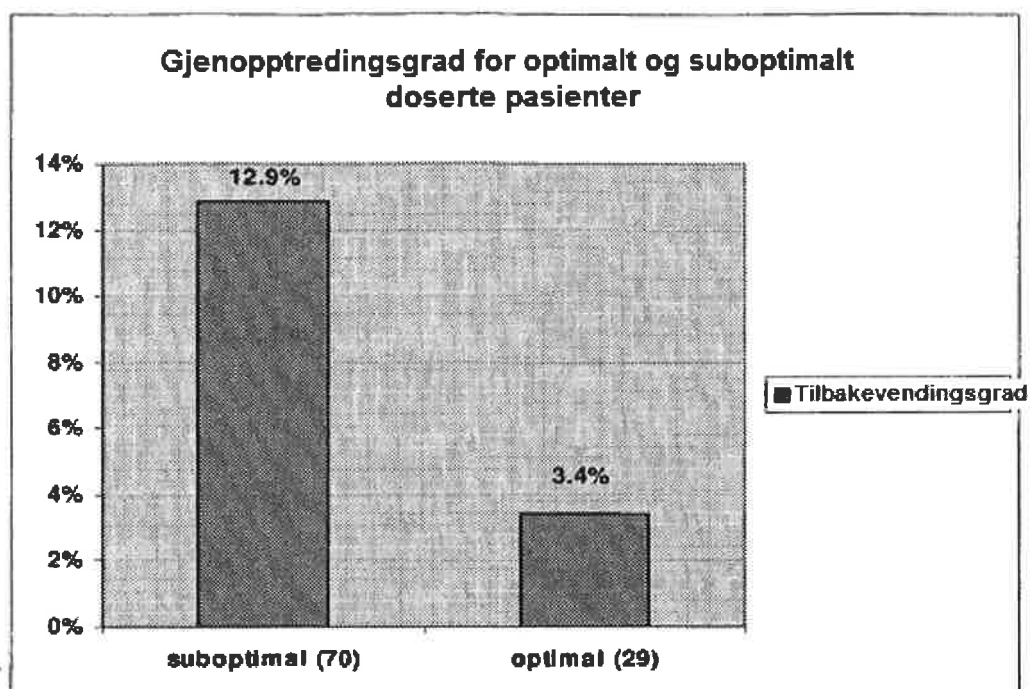
Figur 12D



Figur 13A



Figur 13B

**Figur 14**