

(11) Número de Publicação: **PT 1922335 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C07K 14/47** (2007.10) **A61K 39/00** (2007.10)

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

(22) Data de pedido: <b>2006.09.05</b>	(73) Titular(es): <b>IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH</b> <b>PAUL-EHRLICH-STR. 15 72076 TÜBINGEN DE</b>
(30) Prioridade(s): <b>2005.09.05 EP 05019254</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2008.05.21</b>	(72) Inventor(es): <b>JÖRN DENGJEL DE</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2009.12.09</b> <b>042/2010</b>	(74) Mandatário: <b>MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA</b> <b>AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA PT</b>

(54) Epígrafe: **PEPTÍDEOS ASSOCIADOS A TUMOR LIGANDO PROMISCUAMENTE ÀS  
MOLÉCULAS DO ANTIGÉNIO DE LEUCÓCITOS HUMANOS (HLA) DA CLASSE II**

(57) Resumo:

**RESUMO****Peptídeos associados a tumor ligando promiscuamente às moléculas do antígeno de leucócitos humanos (HLA) da classe II**

A presente invenção refere-se a métodos imunoterapêuticos e a moléculas e células a serem utilizadas nestes métodos. A presente invenção refere-se, particularmente, à imunoterapia do cancro. A presente invenção refere-se ainda aos epítomos de peptídeos de células T-helper associados ao tumor, individualmente ou em combinação com outros peptídeos associados ao tumor, que servem como ingredientes farmacêuticos activos das composições de vacina que estimulam as respostas imunológicas antitumorais. Em particular, a presente invenção refere-se a 49 novas sequências de peptídeos, derivadas das moléculas HLA de classe II de linhagens de células humanas de tumores, que poderão ser utilizadas em composições de vacinas para obter respostas imunológicas antitumorais.

## **DESCRIÇÃO**

### **Peptídeos associados a tumor ligando promiscuamente às moléculas do antígeno de leucócitos humanos (HLA) da classe II**

A presente invenção refere-se a métodos imunoterapêuticos e a moléculas e células a serem utilizadas nestes métodos. Em particular, a presente invenção refere-se à imunoterapia do cancro, em particular do cancro renal e do cancro do cólon. A presente invenção refere-se ainda aos epitopos de peptídeos de células T-helper associados ao tumor, individualmente ou em combinação com outros peptídeos associados ao tumor, que servem como ingredientes farmacêuticos activos das composições de vacina que estimulam as respostas imunológicas antitumorais. Em particular, a presente invenção refere-se a uma nova sequência de peptídeos, derivada das moléculas HLA de classe II de linhagens de células humanas de tumores, que poderá ser utilizada em composições de vacinas para obter respostas imunológicas antitumorais.

## **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

A estimulação de uma resposta imunológica depende da presença de antígenos reconhecidos como estranhos pelo sistema imunitário anfitrião. A descoberta da existência de antígenos associados ao tumor cria a possibilidade de utilizar um sistema imunitário anfitrião para intervir no crescimento do tumor. Vários mecanismos de utilização dos braços humoral e celular do sistema imunitário estão a ser actualmente explorados para imunoterapia do cancro.

Elementos específicos da resposta imunológica celular são capazes de reconhecer e destruir especificamente células tumorais. O isolamento de células T citotóxicas (CTL) de populações de células infiltradas no tumor ou do sangue periférico sugere que tais células desempenham uma função importante na defesa imunológica natural contra o cancro (Cheever et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 1993 690:101-112). As células TCD8<sup>+</sup>, em particular, que reconhecem as moléculas de classe I dos peptídeos associados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de geralmente 8 a 10 resíduos derivados de proteínas localizadas nos citossóis, desempenham uma função importante nesta resposta. As moléculas MHC dos seres humanos são também designadas por antígenos de leucócitos humanos (HLA).

Existem duas classes de moléculas MHC: As moléculas MHC I, que poderão ser encontradas na maioria das células com núcleos que apresentam peptídeos que resultam da clivagem proteolítica de proteínas endógenas e peptídeos maiores. As moléculas MHC II apenas podem ser encontradas em células profissionais apresentadoras de antígenos (APC) e apresentam peptídeos de proteínas exógenas que são absorvidas pelas APCs durante a endocitose e subsequentemente processadas. Os complexos de peptídeos e MHC I são reconhecidos por linfócitos T citotóxicos CD8+, complexos de peptídeos e MHC II sendo reconhecidos por células T-helper CD4+.

As células T-helper CD4+ desempenham um papel importante na regulação das funções efectoras de respostas de células T antitumorais e, por este motivo, a identificação dos epítomos de células T CD4+, derivados de antígenos associados ao tumor (TAA), pode ser de grande importância para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos com vista ao desencadeamento de respostas imunológicas antitumorais (Kobayashi, H., R. Omiya, M. Ruiz, E.

Huarte, P. Sarobe, J. J. Lasarte, M. Herraiz, B. Sangro, J. Prieto, F. Borrás-Cuesta, and E. Celis. 2002. Identification of an antigenic epitope for helper T lymphocytes from carcinoembryonic antigen. *Clin. Cancer Res.* 8:3219-3225., Gnjatic, S., D. Atanackovic, E. Jäger, M. Matsuo, A. Selvakumar, N.K. Altorki, R.G. Maki, B. Dupont, G. Ritter, Y.T. Chen, A. Knuth, and L.J. Old. 2003. Survey of naturally occurring CD4+ T-cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: Correlation with antibody responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 100(15):8862-7).

Foi comprovado em modelos animais mamíferos que, por exemplo, ratos, mesmo na ausência de células efectoras de linfócitos T citotóxicos (CTL) (isto é, linfócitos T CD8+), as células T CD4+ são suficientes para inibir a visualização de tumores através da inibição da angiogénese por secreção de interferon gama (IFN $\gamma$ ) (Qin, Z. and T. Blankenstein. 2000. CD4+ T-cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity.* 12:677-686). Além disso, foi comprovado que as células T CD4+, que reconhecem peptídeos a partir de antígenos associados ao tumor apresentados pelas moléculas HLA de classe II, podem contrariar a progressão do tumor através da indução de respostas de anticorpos (Ab) (Kennedy, R.C., M.H. Shearer, A.M. Watts, and R.K. Bright. 2003. CD4<sup>+</sup> T lymphocytes play a critical role in antibody production and tumor immunity against simian virus 40 large tumor antigen. *Cancer Res.* 63:1040-1045). Em contraste com os peptídeos associados ao tumor que se ligam às moléculas HLA de classe I, apenas um pequeno número de ligandos de classe II dos TAA foi descrito até ao momento ([www.cancerimmunity.org](http://www.cancerimmunity.org), [www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)). Uma vez que a expressão constitutiva das moléculas HLA de classe II está normalmente limitada às células do sistema imunitário (Mach, B., V. Steimle, E. Martinez-Soria, and W. Reith. 1996. Regulation of

MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* 14:301-331), a possibilidade de isolamento dos peptídeos de classe II, directamente a partir dos tumores primários, não foi considerada possível. Deste modo, foram descritas várias estratégias para antigénios-alvo na rota de processamento de classe II das células apresentadoras de antigénios (APCs), por exemplo, a incubação de APCs com o antigénio de interesse para permitir a sua absorção, processamento e apresentação (Chaux, P., V. Vantomme, V. Stroobant, K. Thielemans, J. Corthals, R. Luiten, A.M. Eggermont, T. Boon, and B.P. van der Bruggen. 1999. Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 189:767-778) ou a transfecção de células com genes ou minigenes que codificam o antigénio de interesse e fundidos na cadeia invariante, que é intermediária da translocação de antigénios para o processamento e junção dos compartimentos (MIIC) de MHC de classe II lisossomal.

De modo a que um peptídeo desencadeie (obtenha) uma resposta imunológica celular, este deverá ligar-se a uma molécula MHC. Este processo está dependente do alelo da molécula MHC e dos polimorfismos específicos da sequência de aminoácidos do peptídeo. Os peptídeos ligados a MHC de classe I são normalmente 8-10 resíduos em comprimento e contêm dois resíduos conservados ("âncora") na sua sequência que interagem com o sulco de ligação correspondente da molécula MHC.

Na ausência de uma inflamação, a expressão das moléculas MHC de classe II é principalmente restringida às células do sistema imunitário, especialmente as células apresentadoras de antigénios (APC) profissionais, por exemplo, monócitos, células derivadas de monócitos, macrófagos, células dendríticas.

Os antigénios que são reconhecidos pelos linfócitos T citotóxicos específicos do tumor, ou seja, pelos respectivos epítomos, podem ser moléculas derivadas de todas as classes de proteínas, tais como, enzimas, receptores, factores de transcrição, etc. Além disso, os antigénios associados ao tumor, por exemplo, também podem estar presentes apenas nas células tumorais, por exemplo, como produtos de genes que sofreram mutação, a partir de grelhas de leitura aberta alternativas (ORFs) ou a partir da ligação de proteínas (Vigneron N, Stroobant V, Chapiro J, Ooms A, Degiovanni G, Morel S, van der Bruggen P, Boon T, Van den Eynde BJ. An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. *Science*. 2004 Apr 23;304 (5670):587-90.). Outra classe importante de antigénios associados a tumores consiste nas estruturas específicas de tecido, tais como os antigénios CT ("cancer testis") expressos em diferentes tipos de tumores e no tecido saudável do testículo.

Foram identificados vários antigénios associados a tumores. Além disso, está a ser realizado muito trabalho de pesquisa para identificar outros antigénios associados a tumores. Alguns grupos de antigénios associados a tumores, também referidos na área como antigénios específicos de tumores, são específicos de tecidos. Os exemplos incluem, mas não se limitam a, tirosinase para melanoma, PSA e PSMA para *cross-overs* de cancro da próstata e de cromossomas, tal como, bcr/abl em linfomas. No entanto, muitos antigénios associados a tumores identificados ocorrem em vários tipos de tumores e alguns, tais como proteínas oncogénicas e/ou genes supressores de tumor (genes supressores de tumor são, por exemplo, revistos para cancro renal em Linehan WM, Walther MM, Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol*. 2003 Dec;170(6 Pt 1):2163-72) que provocam realmente o evento de transformação, ocorrem em quase todos os tipos de tumores. Por exemplo, as proteínas celulares normais que controlam o crescimento e

diferenciação celulares, tais como p53 (um exemplo de gene supressor do tumor), ras, c-met, myc, pRB, VHL e HER-2/neu, podem acumular mutações resultantes da regulação por excesso da expressão destes produtos de genes, tornando-os assim oncogênicos (McCartey et al. *Cancer Research* 1998 15:58 2601-5; Disis et al. *Ciba Found. Symp.* 1994 187:198-211). Estas proteínas mutantes podem ser alvo de uma resposta imunológica específica de um tumor em vários tipos de cancro.

De modo a que as proteínas sejam reconhecidas pelos linfócitos T citotóxicos como antígenos específicos de tumores e de modo a que sejam utilizadas em terapia, devem ser cumpridos determinados pré-requisitos. O antígeno deve ser expresso principalmente por células tumorais e não por tecidos saudáveis normais ou em quantidades muito pequenas. É ainda desejável que o respectivo antígeno esteja presente não apenas num tipo de tumor, mas também em elevadas concentrações (por exemplo, número de cópias por célula). É essencial a presença de epítomos na sequência de aminoácidos do antígeno, uma vez que tal peptídeo ("peptídeo imunogénico") que é derivado de um antígeno associado a um tumor desencadeia uma resposta *in vitro* ou *in vivo* de células T.

Até agora, foram descritas várias estratégias direccionadas aos antígenos na rota de processamento da classe II. É possível incubar células apresentadoras de antígenos (APCs) com o antígeno de interesse, de modo a que este seja absorvido e processado (Chaux, P., Vantomme, V., Stroobant, V., Thielemans, K., Corthals, J., Luiten, R., Eggermont, A. M., Boon, T. & van der, B. P. (1999) *J. Exp. Med.* **189**, 767-778). Outras estratégias utilizam proteínas de fusão que contêm sequências provenientes de lisossomas. Expressas nas APCs, estas proteínas de fusão direccionam os antígenos para o compartimento de processamento de classe II (Marks, M. S., Roche, P. A., van Donselaar, E., Woodruff, L., Peters, P. J. & Bonifacino, J. S. (1995) *J. Cell Biol.* **131**, 351-369, Rodriguez, F., Harkins, S., Redwine, J. M.,

de Pereda, J. M. & Whitton, J. L. (2001) *J. Virol.* **75**, 10421-10430).

As células T-helper desempenham um papel importante na regulação das funções efectoras de CTLs na imunidade antitumoral. Os epítomos das células T-helper que desencadeiam uma resposta das células T-helper do tipo TH1 suportam as funções efectoras das células T Killer CD8+, que incluem funções citotóxicas direccionadas contra as células tumorais que apresentam um peptídeo associado ao tumor/complexos MHC nas respectivas superfícies da célula. Deste modo, os epítomos de peptídeos de células T-helper associados ao tumor, individualmente ou em combinação com outros peptídeos associados ao tumor, podem servir como ingredientes farmacêuticos activos de composições de vacinas que estimulam as respostas imunológicas antitumorais.

A principal tarefa no desenvolvimento de uma vacina para um tumor é, portanto, identificar e caracterizar os novos antigénios associados ao tumor e os epítomos de T-helper imunogénicos derivados dos mesmos, que poderão ser reconhecidos pelos CTLs CD4+. Existe, portanto, um objecto da presente invenção que visa fornecer novas sequências de aminoácidos para esse peptídeo que possui a capacidade de se ligar a uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano de classe II.

SEQ ID No. 34082 de WO2001/57276 e SEQ ID No. 33178 de WO2001/57275 descrevem uma sequência de aminoácidos em sobreposição com os primeiros quinze aminoácidos da SEQ ID No. 42.

De acordo com a presente invenção, esse objecto é resolvido através de um peptídeo associado a tumor, que é a sequência de

acordo com a SEQ ID No. 42 da lista de sequências anexadas, nas quais o peptídeo possui a capacidade de se ligar a uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade humano (MHC) da classe II.

Na presente invenção, os inventores demonstram que é possível isolar e caracterizar os peptídeos, que ligam as moléculas HLA de classe II directamente a partir de tumores de mamíferos, preferencialmente tumores humanos, preferencialmente tumores sólidos, por exemplo, a partir de carcinomas de células renais e carcinomas do cólon. Os monócitos infiltrados expressaram moléculas MHC de classe II, bem como células tumorais e, além disso, as células tumorais revelaram uma regulação por excesso de vários produtos dos genes induzidos por citocinas ou quimoquinas, por exemplo, produtos do gene induzidos por interferon gama.

A presente invenção descreve os peptídeos provenientes dos antigénios associados à tumorigénese e a capacidade de se ligar suficientemente às moléculas HLA de classe II para desencadear uma resposta imunológica de leucócitos humanos, especialmente linfócitos, especialmente linfócitos T, especialmente linfócitos T CD4+, especialmente linfócitos T CD4+ intermediários de respostas imunológicas de tipo T<sub>H1</sub>. Os peptídeos provêm dos antigénios associados ao tumor, especialmente antigénios associados ao tumor com funções em, por exemplo, proteólise, angiogénese, crescimento celular, regulação do ciclo celular, divisão celular, regulação da transcrição, regulação da tradução, invasão dos tecidos, incluindo p. ex. peptídeos associados ao tumor a partir da metaloproteinase 7 de matriz (MMP7; SEQ. ID N.º 1) e a proteína de ligação 3 de factor de crescimento tipo insulina (IGFBP3; SEQ. ID N.º 25).

Na presente invenção, os inventores também fornecem provas conclusivas de que os peptídeos associados ao tumor, que se ligam de forma suficiente e promíscua às moléculas HLA de classe II, especialmente aos alelos de HLA de classe II geneticamente codificados pelos loci HLA DR do genoma humano, são capazes de obter respostas imunológicas mediadas por células T CD4+ humanas. As células T CD4+ foram isoladas a partir de sangue periférico humano, demonstrando que os referidos peptídeos são adequados para desencadear as respostas de células T do sistema imunitário humano face aos peptídeos seleccionados do peptidoma das células do tumor. Uma vez que os peptídeos podem ser quimicamente sintetizados e podem ser utilizados como ingredientes farmacêuticos activos de preparações farmacêuticas, os peptídeos fornecidos pela invenção dos inventores podem ser utilizados para imunoterapia, preferencialmente imunoterapia do cancro.

De modo a identificar os ligandos HLA de classe II dos TAA para o desenvolvimento da imunoterapia baseada em peptídeos, os inventores tentaram isolar os peptídeos que apresentaram HLA-DR directamente a partir de tumores sólidos dissecados, em particular, a partir de um carcinoma de células renais (RCC), capaz de expressar as moléculas de classe II (Gastl, G., T. Ebert, C.L. Finstad, J. Sheinfeld, A. Gomahr, W. Aulitzky, and N.H. Bander. 1996. Major histocompatibility complex class I and class II expression in renal cell carcinoma and modulation by interferon gamma. *J. Urol.* 155:361-367). Mesmo que a maioria das células tumorais seja negativa de classe II, os espectrómetros de massa de topo de gama deverão proporcionar a sensibilidade necessária para a identificação dos peptídeos de classe II de um número mínimo de células tumorais ou de leucócitos infiltrados que poderão apresentar de forma cruzada os TAA ou de células estromais no perímetro do tumor em crescimento.

Os motivos para se concentrar nos RCC, a fim de demonstrar provas técnicas do conceito, são os seguintes: Cerca de 150 000 pessoas em todo o mundo são diagnosticadas com RCC todos os anos, estando a doença associada a uma elevada taxa de mortalidade, resultando em aproximadamente 78 000 mortes por ano (Pavlovich, C.P. and L.S. Schmidt. 2004. Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma. *Nat. Rev. Cancer* 4:381-393). If metastases are diagnosed, the one-year survival rate decreases to approximately 60 % (Jemal, A., R.C. Tiwari, T. Murray, A. Ghafoor, A. Samuels, E. Ward, E.J. Feuer, and M.J. Thun. 2004. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J. Clin.* 54:8-29), reforçando a elevada necessidade médica não satisfeita neste sentido. Uma vez que o RCC parece ser um tumor imunogénico (Oliver RTD, Mehta A, Barnett MJ. A phase 2 study of surveillance in patients with metastatic renal cell carcinoma and assessment of response of such patients to therapy on progression. *Mol Biother.* 1988;1:14-20. Gleave M, Elhilali M, Frodet Y, et al. Interferon gamma-1b compared with placebo in metastatic renal cell carcinoma. *N Engl J Med.* 1998;338:1265), conforme indicado pela existência de CTL que reagem ao tumor e que estão infiltrados no tumor (Finke, J.H., P. Rayman, J. Alexander, M. Edinger, R.R. Tubbs, R. Connelly, E. Pontes, and R. Bukowski. 1990. Characterization of the cytolytic activity of CD4-positive and CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 50:2363-2370), clinical trials have been initiated to develop peptide-based anti-tumor vaccinations (Wierdecky J, Mueller M, Brossart P. Dendritic cell-based cancer immunotherapy targeting MUC-1. *Cancer Immunol Immunother.* 2005 Apr 28). No entanto, devido à falta de epítomos de células T-helper dos TAA, as vacinas definidas de forma molecular incluem normalmente o funcionamento dos peptídeos apenas como ligandos de classe I.

No trabalho científico que levou à presente invenção, os inventores foram capazes de isolar os ligandos de classe II a

partir de dez amostras de RCC, três carcinomas colo-rectais (CCA) e um carcinoma de célula de transição (TCC, carcinoma urotelial). Apenas os ligandos seleccionados dos TAA identificados nesta abordagem possuem a capacidade unificadora de

1. Provir dos antigénios com uma associação ao tumor conhecida;
2. Ligar-se ao alelo HLA-DR de classe II, HLA DRB1\*0101 e
3. Possuir características que os afastem da maioria dos ligandos HLA de classe II, cumprindo critérios relativos à respectiva sequência primária de aminoácidos, permitindo-lhes ligar-se de forma promiscua às moléculas HLA-DR a partir de, pelo menos, dois alelos diferentes.

Conforme exemplificado abaixo com um peptídeo MMP7 (SEQ. ID N.º 1), estes peptídeos associados ao tumor com ligações promiscuas HLA-DR foram reconhecidos por células T CD4+.

Um primeiro aspecto da invenção consiste de um peptídeo, que inclui uma sequência de acordo com a SEQ. ID N.º. 42 (números de acesso, consulte a tabela 1 anexada, abaixo).

Conforme descrito em baixo, o peptídeo que forma a base da presente invenção foi identificado como tendo sido apresentado pelas células portadoras de MHC de classe II (RCC). Assim, este peptídeo em particular, bem como outros peptídeos que contêm a sequência (isto é, peptídeos derivados) irão obter uma resposta específica de células T, embora a dimensão dessa resposta possa variar de peptídeo para peptídeo. As diferenças, por exemplo, podem ser provocadas pelas mutações no referido peptídeo (ver abaixo). O versado na presente área está bem ciente dos métodos que podem ser aplicados, de modo a determinar a dimensão na qual a resposta será induzida por um peptídeo individual, em

particular, relativamente aos exemplos aqui descritos e à respectiva literatura.

De preferência, o peptídeo de acordo com a presente invenção consiste de uma sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ. ID N.º 42.

As cadeias laterais de um ou dois dos resíduos de aminoácidos podem ser alteradas (por exemplo, ao substituí-las pela cadeia lateral de outro resíduo de aminoácidos que ocorra naturalmente ou por qualquer outra cadeia lateral), de modo a que o peptídeo ainda seja capaz de se ligar a uma molécula HLA da mesma forma que um peptídeo que possui a mesma sequência de aminoácidos apresentada. Por exemplo, um peptídeo pode ser modificado de modo a que, pelo menos, mantenha, caso não melhore, a capacidade de interagir e de se ligar à molécula MHC adequada, tal como HLA-A, e de modo a que, pelo menos, mantenha, caso não melhore, a capacidade de criar CTL activados que possam reconhecer e eliminar células que expressem um polipeptídeo que contenha uma sequência de aminoácidos, conforme definido nos aspectos da invenção. Como derivado da base de dados e conforme descrito em seguida, determinadas posições de peptídeos de ligação HLA-A são tipicamente resíduos em âncora que formam uma sequência principal que se ajusta ao motivo de ligação do sulco de ligação HLA.

Esses resíduos de aminoácidos, que não são essenciais para interagir com o receptor de células T, podem ser modificados pela substituição de outros aminoácidos cuja incorporação não tem um efeito na reactividade das células T e não elimina a ligação a MHC relevante.

Além disso, é sabido que os peptídeos apresentados para MHC de classe II são compostos por uma "sequência de núcleo" com um determinado motivo de aminoácidos específico HLA e, opcionalmente, extensões N- e/ou C-terminal que não interfiram

com a função da sequência núcleo (isto é, sejam considerados irrelevantes para a interacção do peptídeo e da célula T). Este peptídeo pode ser utilizado directamente, de modo a carregar moléculas MHC de classe II ou a sequência pode ser clonada para os vectores de acordo com a descrição abaixo.

Se um peptídeo maior do que cerca de 12 resíduos de aminoácidos for utilizado directamente para se ligar a uma molécula MHC, é preferível que os resíduos que ladeiam a região de ligação HLA núcleo sejam aqueles que não afectam a capacidade de o peptídeo se ligar especificamente ao sulco de ligação da molécula MHC ou apresentar o peptídeo aos CTL.

Exemplos de peptídeos de ligandos, motivos, variantes MHC, bem como certos exemplos de extensões N- e/ou C-terminal podem ser, por exemplo, derivados da base de dados SYFPEITHI (Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics. 1999 Nov; 50(3-4):213-9.) em <http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/> e as referências tal como citadas no presente.

Como exemplos não limitadores, determinados peptídeos para HLA-DR na base de dados são K H K V Y A C E V T H Q G L S S derivados da cadeia Ig kappa 188-203 (Kovats et al. Eur J Immunol. 1997 Apr;27(4):1014-21); K V Q W K V D N A L Q S G N S derivados da cadeia Ig kappa 145-159 (Kovats et al. Eur J Immunol. 1997 Apr;27(4):1014-21), L P R L I A F T S E H S H F derivados de GAD65 270-283 (Endl et al. J Clin Invest. 1997 May 15;99(10):2405-15) ou F F R M V I S N P A A T H Q D I D F L I derivados de GAD65 556-575 (Endl et al. J Clin Invest. 1997 May 15;99(10):2405-15). Para além disso, os peptídeos também podem ser derivados de sequência de antigénios que sofreram mutação, tal como no caso de A T G F K Q S S K A L Q R P V A S derivados de proteína de fusão bcr-abl 210 kD (ten Bosch et al. Blood. 1996 Nov 1;88(9):3522-7), G Y K V L V L N P S V A A T derivados de HCV-1 NS3 28-41 Diepolder et al. J Virol.

1997 Aug;71(8):6011-9) ou **F R K Q N P D I V** I Q Y M D D L Y V G derivados de HIV-1 (HXB2) RT 326-345 (van der Burg et al. J Immunol. 1999 Jan 1;162(1):152-60). Todos os aminoácidos "âncora" (ver Friede et al., Biochim Biophys Acta. 1996 Jun 7;1316(2):85-101; Sette et al. J Immunol. 1993 Sep 15;151(6):3163-70.; Hammer et al. Cell. 1993 Jul 16;74(1):197-203., and Hammer et al. J Exp Med. 1995 May 1;181(5):1847-55. As examples for HLA-DR4) foram indicados a negrito, sendo as principais sequências putativas sublinhadas.

Por "peptídeos" os inventores incluem não apenas moléculas em que os resíduos de aminoácidos são ligados por ligações de peptídeo (-CO-NH-) mas também por moléculas em que a ligação de peptídeos é invertida. Esta peptidomimética retro-invertida pode ser efectuada utilizando métodos conhecidos na área, por exemplo, os descritos em Meziere et al (1997) J. Immunol. 159,3230-3237. Esta abordagem envolve a criação de pseudopeptídeos que contêm alterações que envolvam a estrutura e não a orientação de cadeias laterais. Meziere et al (1997) mostram que, pelo menos nas respostas de células T-helper e MHC de classe II, estes pseudopeptídeos são úteis. Os peptídeos retro-invertidos, que contêm ligações NH-CO em vez de ligações de peptídeos CO-NH, são muito mais resistentes à proteólise.

Tipicamente, o peptídeo da invenção pode, se expresso numa célula que apresente antigénio, ser processado de tal forma, que um fragmento seja produzido possibilitando a ligação a uma molécula MHC apropriada e pode ser apresentado por uma célula adequada e obter uma resposta de célula T adequada.

Em seguida poderá ser observado, que em algumas aplicações, o peptídeo da invenção pode ser usado directamente (ou seja, eles não são produzidos por uma expressão de polinucleótidos em células de um paciente ou em uma célula dada a um paciente).

O peptídeo da invenção é capaz de se ligar ao HLA-DR. E é particularmente preferido que o peptídeo se ligue selectivamente ao HLA-DRB1\*0101.

O peptídeo da invenção é particularmente útil nos métodos imunoterapêuticos para direccionar e eliminar células, que expressem de forma anormal polipeptídeos que formem a base da presente invenção de peptídeos. Uma vez que estes peptídeos específicos consistem nas sequências de aminoácidos indicadas que ligam HLA-DR, é preferível que sejam o peptídeo da invenção que ligue HLA-DR e quando assim ligue o complexo de peptídeo HLA-DR, quando presente na superfície de uma célula que apresente um antigénio adequado, sendo capaz de obter a produção de CTL que reconhecem uma célula que expresse de forma anormal um polipeptídeo que compreenda a sequência de aminoácidos indicada.

Por "expresso de forma anormal" inclui-se o significado de o polipeptídeo ser sobre-expresso em comparação com os níveis normais de expressão ou de o gene ser silencioso no tecido de onde o tumor é derivado, mas no tumor ser expresso. Por "sobre-expresso" pretendemos significar que o polipeptídeo está presente a um nível pelo menos 1,2 x do presente no tecido normal; preferivelmente pelo menos 2 x e mais preferivelmente pelo menos 5 x ou 10 x o nível presente no tecido normal.

Os peptídeos (pelo menos os contidos nas ligações de peptídeos entre resíduos de aminoácidos) podem ser sintetizados pelo modo poliamida Fmoc de síntese de peptídeo de fase sólida tal como revelado por Lu et al (1981) J. Org. Chem. 46,3433 e referências no presente. A protecção temporária do grupo N-amino é proporcionada pelo grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc). Uma clivagem repetitiva deste grupo de protecção base altamente

lável é efectuada utilizando 20 % piperidina em N, N-dimetilformamida. As funcionalidades de cadeia lateral podem ser protegidas como os seus éteres de butila (no caso da serina, treonina e tirosina), éteres de butila (no caso de ácido glutâmico e ácido aspártico), derivado de butiloxicarbonil (no caso de lisina e histidina), derivado de tritil (no caso de cisteína) e derivado de 4-metóxi-2,3,6-trimetilbenzenesulfonyl (no caso de arginina). Quando a glutamina ou asparagina forem resíduos C-terminal, é feita a utilização do grupo 4,4'-dimetoxibenzidril para protecção das funcionalidades amido da cadeia lateral. O apoio de fase sólida é baseado num polímero polidimetil-acrilamida constituído a partir dos três monómeros dimetilacrilamida (monómero principal), bisacriloleileno diamina (reticulador) e éster metil acrilato de sarcosina (agente de funcionalização). O agente ligado clivável peptídico-a-resina utilizado é o ácido lábil derivado de ácido 4-hidroximetil-fenoxiacético. Todos os derivados de aminoácidos são adicionados como seus derivados de anidrido simétricos pré-formados, com excepção da asparagina e glutamina, que são adicionadas utilizando um procedimento de acoplamento reverso mediado N, N-diciclohexil-carbodiimida/1hidroxibenzotriazole. Todos os acoplamentos e reacções de desprotecção são monitorizados utilizando procedimentos de teste ninhidrina, ácido trissulfónico, trinitrobenzeno ou isotina. Após conclusão da síntese, os peptídeos são clivados do suporte de resina com remoção concomitante dos grupos de protecção de cadeia lateral através do tratamento com 95 % de ácido trifluoroacético contendo uma mistura sequestrante de 50 %. Os sequestradores comumente utilizados são o etanditiol, fenol, anisol e água, dependendo da escolha exacta dos aminoácidos constituintes do peptídeo sintetizado. Também é possível uma combinação de metodologias de fase sólida e fase de solução para a síntese de peptídeos (ver, por exemplo, Bruckdorfer T, Marder O, Albericio F. From production of peptides in milligram amounts for research to

multi-tons quantities for drugs of the future. *Curr Pharm Biotechnol.* 2004 Feb;5(1):29-43 e as referências citadas no presente).

O ácido trifluoroacético é removido por evaporação em vácuo, com a subsequente trituração com éter dietil proporcionando o peptídeo bruto. Quaisquer sequestradores presentes são removidos por um processo de simples extracção que em liofilização da fase aquosa proporciona o peptídeo bruto de sequestradores. Os reagentes de síntese de peptídeo estão normalmente disponíveis na Calbiochem-Novabiochem (UK) Ltd, Nottingham NG7 2QJ, RU.

A purificação pode ser efectuada por qualquer pessoa ou por uma combinação de técnicas como a cromatografia de exclusão de dimensão, cromatografia de troca de iões, cromatografia de interacção hidrofóbica e (normalmente) cromatografia líquida de elevado desempenho de fase revertida utilizando a separação de gradiente acetonitril/água.

A análise de peptídeos pode ser realizada utilizando cromatografia de camada fina, cromatografia líquida de elevado desempenho de fase revertida, análise de aminoácidos depois de hidrólise de ácido e por análise espectral de massa de rápido bombardeamento de átomos (FAB), bem como análise espectral de massa MALDI e ESI-Q-TOF.

Um outro aspecto da invenção proporciona um ácido nucleico (p. ex., polinucleótido) codificando um peptídeo da invenção. O polinucleótido pode ser DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA ou combinações deste e pode ou não conter intrões desde que codifique o peptídeo. É claro que apenas se aplica a peptídeos que contêm resíduos de aminoácidos que ocorrem naturalmente ligados através de ligações de peptídeos que ocorrem naturalmente, codificáveis por um polinucleótido. Um outro aspecto da invenção proporciona

um vector de expressão capaz de expressar um polipeptídeo de acordo com a invenção.

Foi desenvolvida uma variedade de métodos para ligar de forma operativa polinucleótidos, especialmente DNA, a vectores através, por exemplo, de termos coesivos complementares. Por exemplo, podem ser adicionados tractos homopolímeros complementares ao segmento DNA a inserir no vector DNA. O vector e segmento DNA são então unidos por ligações de hidrogénio entre as caudas homopolímeras complementares para formar moléculas DNA recombinantes.

As ligações sintéticas contendo um ou mais locais de restrição proporcionam um método alternativo de ligação do segmento DNA a vectores. O segmento DNA, gerado por digestão de restrição endonuclease, tal como anteriormente descrito, é tratado por bacteriófago T4 de DNA polimerase ou DNA polimerase I E. coli, enzimas que removem protuberâncias, termos isolados 3' com as respectivas actividades 3'-5'-exonucleóticas e preenchendo 3'-pontas suspensas com as suas actividades de polimerização.

A combinação destas actividades gera, portanto, segmentos DNA de pontas embotadas. Os segmentos de pontas embotadas são, então, incubados com um grande excesso molar de moléculas de ligação na presença de uma enzima capaz de catalisar a ligação das moléculas DNA de pontas embotadas, como o bacteriófago T4 de DNA ligase. Desta forma, os produtos da reacção são segmentos DNA que transportam sequências de ligação polímeras nas suas pontas. Estes segmentos DNA são, então, clivados com a enzima de restrição apropriada e ligados a um vector de expressão que foi clivado com uma enzima que produz termos compatíveis com os do segmento DNA.

As ligações sintéticas que contêm uma variedade de locais de restrição endonuclease estão comercialmente disponíveis a partir de um número de fontes que inclui a International Biotechnologies Inc, New Haven, CN, EUA.

Uma forma desejável de modificar a codificação DNA codificando o polipeptídeo da invenção é utilizar a reacção de cadeia polimerase, tal como revelado por Saiki et al (1988) Science 239,487-491. Este método pode ser utilizado para introdução de DNA num vector adequado, por exemplo, concebendo locais de restrição adequados ou pode ser utilizado para alterar o DNA de outras formas úteis, como é conhecido na área. Neste método o DNA a ser enzimaticamente amplificado é ladeado por dois iniciadores específicos que se tornam incorporados no DNA amplificado. Os referidos iniciadores específicos podem conter locais de reconhecimento endonuclease de restrição que podem ser utilizados para clonagem em vectores de expressão utilizando métodos conhecidos na área.

O DNA (ou no caso de vectores retrovirais, RNA) é, desta forma, expresso num hospedeiro adequado para produzir um polipeptídeo da invenção. Desta forma, o DNA que codifica o polipeptídeo que constitui o composto da invenção pode ser utilizado de acordo com as técnicas conhecidas, adequadamente modificado face aos presentes ensinamentos para construção de um vector de expressão que é, então, utilizado para transformar uma célula hospedeira apropriada para expressão e produção do polipeptídeo da invenção. Essas técnicas incluem as reveladas nos N.º de Patente dos EUA 4,440,859 publicada a 3 de Abril de 1984 pela Rutter et al, 4,530,901 publicada a 23 de Julho de 1985 pela Weissman, 4,582,800 publicada a 15 de Abril de 1986 pela Crawl, 4,677,063 publicada a 30 de Junho de 1987 pela Mark et al, 4,678,751 publicada a 7 de Julho de 1987 pela Goeddel, 4,704,362 publicada a 3 de Novembro de 1987 pela Itakura et al, 4,710,463 publicada a 1 de Dezembro de 1987 pela Murray, 4,757,006 publicada a 12 de

Julho de 1988 pela Toole, Jr. et al, 4,766,075 publicada a 23 de Agosto de 1988 pela Goeddel et al e 4,810,648 publicada a 7 de Março de 1989 pela Stalker.

O DNA (ou no caso dos vectores retrovirais, RNA) que codifica o polipeptídeo constitui o composto da invenção pode ser ligado a uma vasta variedade de outras sequências de DNA para introdução num hospedeiro apropriado. O parceiro DNA irá depender da natureza do hospedeiro, da forma de introdução do DNA no hospedeiro e de se a manutenção ou integração episomal é desejada.

Geralmente, o DNA é inserido num vector de expressão, tal como um plasmida, na orientação devida e estrutura de leitura correcta para expressão. Se necessário, o DNA pode ser ligado às sequências de nucleótido apropriadas de controlo regulatório transcricional e translacional reconhecidas pelo hospedeiro desejado, embora esses controlos estejam geralmente disponíveis no vector de expressão. O vector é, então, introduzido no hospedeiro através de técnicas padrão. Geralmente, nem todos os hospedeiros são transformados pelo vector. Por isso, será necessário seleccionar as células hospedeiras transformadas. Uma técnica de selecção envolve a incorporação no vector de expressão de uma sequência DNA, com quaisquer elementos de controlo necessários, que codifica um traço seleccionável na célula transformada, como uma resistência antibiótica.

Alternativamente, o gene desse traço seleccionável pode ser outro vector, utilizado para co-transformar a célula hospedeira desejada.

As células hospedeiras transformadas pelo DNA recombinante da invenção são, então, cultivadas num espaço de tempo suficiente e sob condições apropriadas reconhecidas pelos conhecedores na

área da visualização dos ensinamentos divulgados no presente, permitindo a expressão do polipeptídeo que pode ser, então, recuperado.

Muitos sistemas de expressão são conhecidos, incluindo bactérias (por exemplo *E. coli* e *Bacillus subtilis*), leveduras (por exemplo *Saccharomyces cerevisiae*), fungos filamentosos (por exemplo *Aspergillus*), células de plantas, células de animais e células de insectos. Preferivelmente, o sistema pode ser RCC ou células Awells.

Um promotor é um elemento de controlo de expressão formado por uma sequência DNA que permite a ocorrência de transcrição e de polimerase RNA de ligação. As sequências de promotor compatíveis com hospedeiros exemplarmente bacterianos são tipicamente fornecidas em vectores plasmida que contêm locais de restrição convenientes para inserção de um segmento DNA da presente invenção. Os plasmidas de vector tipicamente procariótico são pUC18, pUC19, pBR322 e pBR329 disponíveis na Biorad Laboratories, (Richmond, CA, EUA) e pTrc99A e pKK223-3 disponíveis na Pharmacia, Piscataway, NJ, EUA.

Um plasmida de vector de célula tipicamente mamífero, o pSVL, está disponível na Pharmacia, Piscataway, NJ, EUA. Este vector utiliza o último promotor SV40 para orientar a expressão de genes clonados, sendo o mais elevado nível de expressão encontrado nas células de produção de antigénio T, como as células COS-1. Um exemplo de um vector induzido de expressão mamífera é o pMSG, também disponível na Pharmacia. Este vector utiliza o promotor induzido por glucocorticóide de repetição terminal longa do vírus do tumor mamário do rato para orientar a expressão do gene clonado. Os vectores plasmida de levedura úteis são pRS403-406 e pRS413-416 e estão geralmente disponíveis na Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EUA. Os

plasmidas pRS403, pRS404, pRS405 e pRS406 são plasmidas integrativos de leveduras (YIps) e incorporam os marcadores de levedura seleccionáveis HIS3, TRP1, LEU2 e URA3. Os plasmidas pRS413-416 são plasmidas centrómero de levedura (Ycps). Outros vectores e sistemas de expressão são bem conhecidos na área da utilização com uma variedade de células hospedeiras.

A presente invenção também se relaciona com uma célula hospedeira transformada com a construção de um vector polinucleótido da presente invenção. A célula hospedeira pode ser procariótica ou eucariótica. As células bacterianas podem ser preferidas às células hospedeiras procarióticas em determinadas circunstâncias e têm tipicamente uma estirpe de E. Coli, como por exemplo, a E. coli com estirpe DH5, disponível na Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EUA e RR1 disponível na American Type Culture Collection (ATCC) of Rockville, MD, EUA (No ATCC 31343). As células hospedeiras eucarióticas preferidas incluem as células de levedura, insectos e mamíferos, preferivelmente células vertebradas como as linhagens de células de rim e fibroblásticas humanas ou de macacos, ratazanas, ratos. As células hospedeiras de levedura incluem YPH499, YPH500 e YPH501 normalmente disponíveis na Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EUA. As células hospedeiras mamíferas preferidas incluem células de ovário de hamster chinês (CHO) disponíveis na ATCC como CCL61, células NIH/3T3 de embrião de rato suíço NIH disponíveis na ATCC como CRL 1658, células COS-1 derivadas de rim de macaco disponíveis na ATCC como CRL 1650 e células 293 que são células de rim embrionárias humanas. As células de insectos preferidas são células Sf9 que podem ser transfectadas com vectores de expressão baculovírus.

A transformação de células hospedeiras apropriadas com construção DNA da presente invenção é obtida através de métodos reconhecidos que dependem tipicamente do tipo de vector utilizado. No que respeita à transformação de células

procarióticas, consulte, por exemplo, Cohen et al (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 69,2110 e Sambrook et al (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. A transformação de células de levedura é descrita em Sherman et al (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY. O método de Beggs (1978) Nature 275,104-109 também é útil. No que respeita a células vertebradas, os reagentes úteis na transfecção dessas células, por exemplo, formulações de fosfato de cálcio e DEAE-dextrano ou lipossoma, estão disponíveis na Stratagene Cloning Systems, or Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EUA. A electroporação também é útil na transformação e/ou transfecção de células e é conhecida na área por transformar a célula de levedura, células bacterianas, células de insectos e células de vertebrados.

De forma bem sucedida, as células transformadas, isto é, células que contêm uma construção DNA da presente invenção, podem ser identificadas por técnicas reconhecidas. Por exemplo, células resultantes da introdução de uma expressão de construção da presente invenção podem ser criadas para produzir o peptídeo da invenção. As células podem ser colhidas e lisadas e o seu conteúdo de DNA examinado quanto à presença de DNA utilizando um método como o descrito por Southern (1975) J. Mol. Biol. 98,503 ou Berent et al (1985) Biotech. 3,208. Alternativamente, a presença de proteína no sobrenadante pode ser detectada utilizando anticorpos, tal como abaixo descrito.

Para além de analisar directamente a presença de DNA recombinante, a transformação bem sucedida pode ser confirmada através de reconhecidos métodos imunológicos quando o DNA recombinante for capaz de dirigir a expressão da proteína. Por exemplo, células transformadas com sucesso com um vector de expressão produzem proteínas que apresentam antigenicidade adequada. Amostras de

células suspeitas de serem transformadas são colhidas e analisadas quanto à proteína utilizando anticorpos adequados. Desta forma, para além das próprias células hospedeiras transformadas, a presente invenção também contempla uma cultura dessas células, preferivelmente uma cultura monoclonal (clonalmente homogénea) ou uma cultura derivada de uma cultura monoclonal, num meio de nutriente.

Será apreciado que determinadas células hospedeiras da invenção sejam úteis na preparação dos peptídeos da invenção, por exemplo, células bacterianas, de levedura e de insectos. No entanto, outras células hospedeiras podem ser úteis em determinados métodos terapêuticos. Por exemplo, as células que apresentem antigénio, como as células dendríticas, podem ser utilizadas de forma útil para expressar os peptídeos da invenção de forma que possam ser carregadas nas moléculas MHC apropriadas.

Um outro aspecto da invenção fornece um método de produção de um peptídeo para injeção intravenosa (i.v.), injeção subcutânea (s.c.), injeção intradérmica (i.d.), injeção intraperitoneal (i.p.), injeção intramuscular (i.m.). As formas preferidas de injeção de peptídeo são s.c., i.d., i.p., i.m. e i.v. As formas preferidas de injeção de DNA são i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. Podem ser administradas doses de 1 a 500 mg de peptídeo ou DNA.

Um outro aspecto da invenção relaciona o uso de um peptídeo associado a tumor de acordo com a invenção, um ácido nucleico de acordo com a invenção ou um vector de expressão de acordo com a invenção na medicina.

Um outro aspecto da invenção fornece um método de eliminação de células-alvo num paciente cujas células-alvo expressem de forma anormal um polipeptídeo que compreenda uma sequência de aminoácido da invenção, compreendendo o método de administração

ao paciente de uma quantidade efectiva de um peptídeo de acordo com a invenção ou uma quantidade efectiva de um polinucleótido ou um vector de expressão que codifique um referido peptídeo, sendo a quantidade do referido peptídeo ou uma quantidade do referido polinucleótido ou um vector de expressão efectivo para provocar uma resposta imunológica de célula anti-alvo no referido paciente. A célula-alvo é tipicamente uma célula tumoral ou cancerígena.

O peptídeo ou o ácido nucleico codificador de peptídeos constitui um tumor ou uma vacina para o cancro. Pode ser administrado directamente no paciente, no órgão afectado ou sistemicamente ou aplicado *ex vivo* às células que derivam do paciente ou de uma linhagem de célula humana que são subsequentemente administradas ao paciente ou utilizadas *in vitro* para seleccionar uma subpopulação de células imunológicas derivadas do paciente, que, em seguida, são re-administradas no mesmo. Se o ácido nucleico for administrado às células *in vitro*, este pode ser útil para as células serem transfectadas de forma a co-expressarem citocinas estimuladoras de resposta imunológica, como a interleucina 2. O peptídeo pode ser substancialmente puro ou combinado com adjuvantes estimuladores de resposta imunológica, como o Detox ou utilizado em combinação com citocinas estimulatórias de resposta imunológica ou ser administrado através de um sistema adequado como, por exemplo, lipossomas. O peptídeo também pode ser conjugado com um transportador adequado como KLH ou mannan (ver WO 95/18145 e Longenecker et al (1993) Ann. NY Acad. Sci. 690,276-291). O peptídeo também pode ser direccionado ou ser uma proteína de fusão ou uma molécula híbrida. Espera-se que os peptídeos cuja sequência é fornecida na presente invenção estimulem CTL CD4. Contudo, a estimulação é mais eficaz com a ajuda de células T CD4+. Assim, os parceiros ou secções de fusão de uma molécula híbrida fornecem adequadamente epítomos que estimulam as células

T CD4+. Os epítomos estimuladores de CD4+ são bem conhecidos na área e incluem os que se encontram identificados no toxóide tetânico. O polinucleótido pode ser substancialmente puro ou estar contido num vector ou sistema de administração adequado.

Os vectores e sistemas de administração adequados incluem o viral, tais como sistemas baseados em adenovírus, vírus vaccinia, retrovírus, vírus da herpes, vírus adeno-associado ou vírus híbridos que contenham elementos de mais de um vírus. Os sistemas de administração não virais incluem lipídios catiónicos e polímeros catiónicos, tal como bem conhecidos na área da administração de DNA. A administração física, como por exemplo, através do método "gene-gun" também pode ser utilizada.

Apropriadamente, qualquer ácido nucleico administrado ao paciente é estéril e isento de pirogénio. O DNA despido pode ser administrado por via intramuscular, intradérmica ou subcutânea. Os peptídeos podem ser administrados por via intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea (ver também acima o método de produção de um peptídeo). Preferencialmente, os peptídeos como componentes farmacêuticos activos são administrados em conjunto com um adjuvante como, por exemplo, o IL-2, o IL-12, o GM-CSF, o adjuvante incompleto de Freund, o adjuvante completo de Freund ou as formulações lipossomais. Os adjuvantes de maior preferência podem ser encontrados em, por exemplo, Brinkman JA, Fausch SC, Weber JS, Kast WM. Peptide-based vaccines for cancer immunotherapy. Expert Opin Biol Ther. 2004 Feb;4(2):181-98.

Os resultados de vacinação nas respostas de CTL estimulados por células que apresentam antigénios profissionais; uma vez que os CTL são preparados, estes podem ser uma vantagem no aumento da expressão de MHC nas células tumorais.

Também pode ser útil direccionar a vacina para populações de células específicas, por exemplo, células que apresentem antigénios, quer através de injeção, utilizando vectores de direccionamento e sistemas de administração ou purificação selectiva de uma determinada população de células do paciente e a administração *ex vivo* de peptídeos ou ácido nucleico (por exemplo, as células dendríticas podem ser classificadas como descrito em Zhou et al (1995) *Blood* 86,3295-3301; Roth et al (1996) *Scand. J. Immunology* 43,646-651). Por exemplo, os vectores de direccionamento podem incluir um promotor específico de tumor ou de tecido que dirige a expressão do antigénio num local adequado.

Um outro aspecto da invenção proporciona, portanto, uma vacina eficaz contra o cancro ou células tumorais ou cancerígenas, incluindo uma quantidade eficaz de um peptídeo de acordo com a invenção ou incluindo um ácido nucleico que codifica esse peptídeo. Também é preferível que a vacina seja uma vacina de ácido nucleico. Sabe-se que a inoculação com uma vacina de ácido nucleico, como uma vacina de DNA, que codifica um polipeptídeo leva a uma resposta de célula T. É ainda preferível uma vacina que inclua um peptídeo ou peptídeos (sintético(s)) (isto é, quer sozinho ou em combinações de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, 11 ou ainda mais peptídeos, ver também mais abaixo).

Convenientemente, a vacina de ácido nucleico pode incluir qualquer meio de administração de ácido nucleico adequado. O ácido nucleico, preferivelmente DNA, pode estar despido (isto é, substancialmente sem outros componentes a serem administrados) ou pode ser administrado num lipossoma ou como parte de um sistema de administração de vector viral.

Acredita-se que a absorção do ácido nucleico e a expressão do polipeptídeo codificado pelas células dendríticas pode ser o mecanismo de preparação da resposta imunológica; contudo as

células dendríticas não podem ser transfectadas sendo, ainda assim, importantes uma vez que detectam os peptídeos expressos a partir das células transfectadas no tecido.

É preferível que a vacina, como a vacina de DNA, seja administrada no músculo. Também é preferível que a vacina seja administrada na pele. A vacina de ácido nucleico pode ser administrada sem adjuvantes. A vacina de ácido nucleico também pode ser administrada com um adjuvante como BCG ou alúmen. Outros adjuvantes adequados incluem um estímulo de QS21 de Aquila (Aquila Biotech, Worcester, MA, EUA) derivado de saponina, extractos micobacterianos e mímicos de parede celular bacteriana sintética e adjuvantes de propriedade como Detox da Ribi. Quil A, outro adjuvante derivado de saponina, também pode ser utilizado (Superfos, Dinamarca). É preferível que a vacina de ácido nucleico seja administrada sem adjuvantes. Outros adjuvantes como os de Freud também podem ser úteis. Também pode ser útil fornecer o peptídeo conjugado com KLH, de preferência também com um adjuvante.

A terapia de imunização do cancro mediada por polinucleótidos é descrita em Conry et al (1996) *Seminars in Oncology* 23,135-147; Condon et al (1996) *Nature Medicine* 2,1122-1127; Gong et al (1997) *Nature Medicine* 3,558-561; Zhai et al (1996) *J. Immunol.* 156,700-710; Graham et al (1996) *Int J. Cancer* 65,664-670; and Burchell et al (1996) pp 309-313 em: *Breast Cancer, Advances in biology and therapeutics*, Calvo et al (eds), John Libbey Eurotext, todos incorporados no presente para referência na respectiva integralidade.

Um outro aspecto da presente invenção proporciona a utilização de um peptídeo de acordo com a invenção, de um vector polinucleótido ou de expressão que codifica um peptídeo semelhante, na produção de um medicamento para eliminar células-

alvo num paciente cujas células-alvo expressam de forma anormal um polipeptídeo que inclui uma sequência de aminoácidos da invenção.

Um outro aspecto da invenção presente proporciona a utilização de um peptídeo de acordo com a invenção, ou de um vector polinucleótido ou de expressão que codifica esse peptídeo, para a produção de um medicamento para indução de uma resposta imunológica face a células de tumores sólidos cujas células expressam uma molécula MHC de classe II humana na respectiva superfície e apresentam um polipeptídeo que inclui uma sequência de aminoácidos da invenção. Foi surpreendentemente descoberto, no contexto da presente invenção, que as células tumorais de tumores sólidos, ao contrário das células saudáveis do mesmo tecido, expressam a molécula HLA de classe II humana na respectiva superfície.

Um outro aspecto da invenção proporciona um método para a produção de linfócitos T citotóxicos activados (CTL) *in vivo* ou *in vitro*, o método inclui o contacto *in vitro* CTL com moléculas MHC humanas de classe II carregadas com antigénio na superfície de uma célula que apresente antigénio adequado durante um período de tempo suficiente para activar, através de uma forma específica de antigénio, de CTL mencionados em que o antigénio é um peptídeo de acordo com a invenção.

Adequadamente, os CTL são compostos por células helper CD4+, preferencialmente de tipo TH1. As moléculas MHC de classe II podem ser expressas na superfície de qualquer célula adequada e é preferível que a célula não expresse naturalmente moléculas MHC de classe II (em que a célula é transfectada para expressar uma molécula desse tipo) ou, caso o faça, seja imperfeita nas rotas de processamento de antigénio ou que apresentem antigénio. Desta forma, é possibilitado à célula expressar a molécula MHC

de classe II a ser preparada substancial e completamente com um determinado antigénio de peptídeo antes de activar os CTL.

A célula que apresente um antigénio (ou célula estimuladora) normalmente tem uma molécula MHC de classe II na sua superfície e, preferencialmente, é substancialmente incapaz de carregar por si mesma uma molécula MHC de classe II com o antigénio seleccionado. Como é descrito mais pormenorizadamente em baixo, a molécula MHC de classe II pode ser carregada imediatamente com o antigénio seleccionado *in vitro*.

Preferencialmente, a célula mamífera não tem ou apresenta um nível reduzido ou tem uma função reduzida do transportador de peptídeos TAP. As células adequadas que não têm um transportador de peptídeo TAP incluem células T2, RMA-S e *Drosophila*. TAP é o transportador associado com processamento de antigénio.

A linhagem de células T2 humana deficiente de carregamento de peptídeos humanos está disponível a partir da American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EUA no Catálogo N.º CRL 1992; a linhagem 2 Schneider de linhagem de célula *Drosophila* está disponível a partir da ATCC no Catálogo N.º CRL 19863; a linhagem de células RMA-S de rato está descrita em Karre e Ljunggren (1985) *J. Exp. Med.* 162,1745.

A célula hospedeira convenientemente mencionada antes da transfecção expressa substancialmente a inexistência de quaisquer moléculas MHC de classe I. Também é preferível se a célula estimuladora expressar uma molécula importante para co-estimulação de célula T, como B7.1, B7.2, ICAM-1 e LFA 3.

As sequências ácidas nucleicas de numerosas moléculas MHC de classe II e de outras moléculas co-estimuladoras estão

publicamente disponíveis a partir das bases de dados GenBank e EMBL.

Numa outra modalidade, as combinações de moléculas HLA também podem ser utilizadas, tais como, por exemplo, moléculas MHC de classe II como descrito nas tabelas A e B incorporadas no presente. A utilização de vacinas poliepítopos recombinantes para a administração de múltiplos epítopos CD8<sup>+</sup> CTL como descrito em Thomson et al (1996) J. Immunol. 157, 822-826 e WO 96/03144, ambos incorporados no presente para referência. Relativamente à presente invenção, poderá ser desejável incluir numa única vacina um peptídeo (ou ácido nucleico de codificação de peptídeo) em que o peptídeo inclui, por qualquer ordem, uma sequência de aminoácidos da presente invenção e outro epítipo de estimulação de células T CD8<sup>+</sup>. Uma vacina deste tipo seria particularmente útil no tratamento de cancros. Este tipo de vacinas "bead-on-a-string" são tipicamente vacinas de DNA. O desencadeamento simultâneo de uma resposta imunológica dependente de MHC de classe II juntamente com uma resposta imunológica dependente de MHC de classe I tem a vantagem de conduzir a uma reacção de células T de tipo TH<sub>1</sub> local de células T CD4<sup>+</sup>, em que as células T CD8<sup>+</sup> dependentes de MHC de classe I são suportadas.

Podem ser utilizados vários outros métodos para criação de CTL *in vitro*. Por exemplo, os métodos descritos em Peoples et al (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92,432-436 e Kawakami et al (1992) J. Immunol. 148,638643 utilizam linfócitos autólogos de infiltração de tumor na criação de CTL. Plebanski et al (1995) Eur. J. Immunol. 25,1783-1787 utiliza linfócitos autólogos do sangue periférico (PLBs) na preparação de CTL. Jochmus et al (1997) J. Gen. Virol. 78,1689-1695 descreve a produção de CTL autólogos por utilização de células dendríticas por impulsos com peptídeos ou polipeptídeos, ou através de infecção com vírus recombinante. Hill et al (1995) J. Exp. Med. 181,2221-2228 e

Jerome et al (1993) J. Immunol. 151,1654-1662 utilizam células B na produção de CTL autólogos. Para além disso, os macrófagos pulsados com peptídeos ou polipeptídeos ou infectados com vírus recombinante podem ser utilizados na preparação de CTL autólogos. S. Walter et al. (Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Buhning HJ, Rammensee HG, Stevanovic S. Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. J Immunol. 2003 Nov 15;171(10):4974-8) descreve a preparação *in vitro* de células T utilizando células que apresentem antígeno artificial, uma forma também adequada para gerar células T contra o peptídeo de escolha.

As células alogénicas também podem ser utilizadas na preparação de CTL e este método é descrito detalhadamente no WO 97/26328. Por exemplo, para além das células Drosophila e T2, podem ser utilizadas outras células nos antígenos apresentados como células CHO, células de insectos infectados com baculovírus, bactérias, levedura, células-alvo infectadas com vacina. Para além disso, podem ser utilizados vírus de plantas (ver, por exemplo, Porta et al (1994) Virologia 202, 449-955 que descreve o desenvolvimento de vírus do mosaico do feijão-frade como um sistema de elevada submissão para a apresentação de peptídeos estrangeiros.

Os CTL activados, que estão direccionados contra o peptídeo da invenção, são úteis durante a terapia. Por conseguinte, um outro aspecto da invenção proporciona CTL activados passíveis de serem obtidos através dos métodos precedentes da invenção.

Um outro aspecto da invenção proporciona CTLs activados que reconhecem selectivamente uma célula que expressa de forma anormal um polipeptídeo que inclua uma sequência de aminoácidos da invenção. Preferencialmente, os CTL reconhecem a célula

mencionada interagindo com o complexo HLA/peptídeo (por exemplo, ligação). Os CTL são úteis num método de eliminação de células-alvo num paciente cujas células-alvo expressam de forma anormal um polipeptídeo que inclui uma sequência de aminoácidos da invenção em que é administrado ao paciente um número eficaz de CTL activados. Os CTL administrados ao paciente podem derivar do paciente e ser activados como descrito em baixo (isto é, são CTL autólogos). Em alternativa, os CTL não são do paciente mas de outro indivíduo. Claro que é preferível que o indivíduo seja saudável. Por "indivíduo saudável" os inventores entendem que o indivíduo está normalmente de boa saúde, que tem um sistema imunitário competente e, preferencialmente, não sofre de qualquer doença que possa ser rapidamente examinada e detectada.

Os CTL activados expressam um receptor de célula T (TCR) envolvido no reconhecimento de células que expressam o polipeptídeo anormal. É útil no caso do cDNA que codifica o TCR ter sido clonado a partir dos CTL activados e transferido para outros CTL para expressão.

*In vivo*, as células-alvo para os CTL CD4+ de acordo com a invenção presente podem ser células do tumor (que expressam algumas vezes MHC de classe II) e/ou células estromais que circundam o tumor (células tumorais) (que também exprimem algumas vezes MHC de classe II).

Os TCRs de clones CTL da invenção específica para o peptídeo da invenção são clonados. A utilização de TCR em clones de CTL é determinada através de (i) anticorpos monoclonais específicos de região variável TCR (ii) RT PCR com iniciadores específicos para famílias de genes Va e Vp. É preparada uma biblioteca cDNA a partir de poli-A mRNA extraído de clones de CTL. São utilizados os iniciadores específicos da porção C-terminal do TCR  $\alpha$  e as cadeias P e para a porção N-terminal dos segmentos Va e P

identificados. O cDNA completo para o TCR  $\alpha$  e cadeia  $\epsilon$  é amplificado por uma polimerase DNA de alta fidelidade e os produtos amplificados são clonados para um vector de clonagem adequado. Os genes de cadeia  $\alpha$  e  $\epsilon$  podem ser reunidos numa única cadeia TCR pelo método descrito por Chung et al (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12654-12658. Nesta construção de cadeia única, o segmento VaJ é seguido pelo segmento V DJ, seguido do segmento Cp, seguido do segmento transmembrano e citoplasmático da cadeia CD3. Esta única cadeia TCR é, em seguida, introduzida num vector de expressão retroviral (pode ser utilizado um painel de vectores tendo em consideração a respectiva capacidade para infectar linfócitos T CD8<sup>+</sup> humanos desenvolvidos e para mediar a expressão de genes. o sistema de vector retroviral Kat é umas das possibilidades preferidas (ver Finer et al (1994) Blood 83,43). São utilizados retrovírus de elevada titragem anfotrófica para infectar linfócitos T purificados CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup> T isolados do sangue periférico de pacientes com tumor (segundo um protocolo publicado por Roberts et al (1994) Blood 84,2878-2889, incorporado no presente para referência). Os anticorpos anti-CD3 são utilizados para desencadear uma proliferação de células CD8<sup>+</sup> T purificadas, que facilitam a integração retroviral e a expressão estável de uma única cadeia de TCRs. A eficiência de transdução retroviral é determinada pela coloração das células T CD8<sup>+</sup> infectadas com anticorpos específicos para o TCR de cadeia única. A análise in vitro de células T CD8<sup>+</sup> convertidas estabelece o mesmo nível de eliminação específico de tumor como demonstrado pelo clone CTL de alo restrito a partir do qual as cadeias TCR foram clonadas. As populações de células T CD8<sup>+</sup> convertidas com a especificidade esperadas podem ser utilizadas para imunoterapia adoptiva dos pacientes com tumor. Os pacientes podem ser tratados com CTL entre  $10^8$  a  $10^{11}$  autólogos e convertidos. Analogamente às células CD8<sup>+</sup>, podem ser criadas células T-helper CD4<sup>+</sup> convertidas com construções relacionadas.

Outros sistemas adequados de introdução de genes nos CTL são descritos em Moritz et al (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4318-4322. Eshhar et al (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 720-724 e Hwu et al (1993) J. Exp. Med. 178, 361-366 também descrevem a transfecção dos CTL. Assim, um outro aspecto da invenção proporciona um TCR que reconhece uma célula que expressa de forma anormal um polipeptídeo incluindo uma sequência de aminoácidos da invenção, sendo o TCR obtido através de CTL activados.

Contudo, é preferível que os vectores de expressão sejam aqueles que estão disponíveis para expressar o TCR numa próxima transfecção de CTL.

Também foi descrito um método de eliminação de células-alvo num paciente cujas células-alvo expressam de forma anormal um polipeptídeo incluindo uma sequência de aminoácidos da invenção, o método inclui os passos de (1) obtenção de CTL do paciente; (2) introdução nas células mencionadas de um polinucleótido que codifica um TCR, e de (3) introdução no paciente das células produzidas no passo (2).

Também foi descrito um método de eliminação de células-alvo num paciente cujas células-alvo expressam de forma anormal um polipeptídeo, incluindo uma sequência de aminoácidos como definida no primeiro, segundo ou terceiro aspecto da invenção, o método inclui os passos de (1) obtenção de células que apresentam antigénios, como as células dendríticas, do paciente mencionado; (2) contacto com as referidas células que apresentam os antigénios com um peptídeo como definido no primeiro, segundo ou terceiro aspecto da invenção ou com um polinucleótido que

codifica um peptídeo, *ex vivo*; e (3) reintrodução no paciente das assim designadas células que apresentam antigénios.

Preferencialmente, as células que apresentam antigénios são as células dendríticas. Adequadamente, as células dendríticas são células dendríticas pulsadas com um peptídeo antigénico. O peptídeo antigénico pode ser qualquer peptídeo antigénico adequável que origina uma resposta apropriada das células T. A terapia de células T que utilizam células dendríticas autólogas pulsadas com peptídeos a partir de um antigénio associado a um tumor está revelada em (1996) *The Prostate* 29,371-380 and Tjua et al (1997) *The Prostate* 32, 272-278.

Numa outra modalidade, as células que apresentem antigénios, tais como células dendríticas, são contactadas com um polinucleótido que codifica um peptídeo da invenção. O polinucleótido pode ser qualquer polinucleótido adequado e é preferível que seja capaz de converter as células dendríticas resultando, desta forma, na apresentação de um peptídeo e indução de imunidade.

Convenientemente, o polinucleótido pode ser compreendido num vírus ou polinucleótido viral. Por exemplo, as células dendríticas de conversão de adenovírus têm sido apresentadas para induzir imunidade antitumoral específica de antigénio em relação a MUC1 (ver Gong et al (1997) *Gene Ther.* 4,1023-1028). Da mesma forma, podem ser utilizados sistemas com base em adenovírus (ver, por exemplo, Wan et al (1997) *Hum. Gene Ther.* 8, 1355-1363); podem ser utilizados sistemas retrovirais (Specht et al (1997) *J. Exp. Med.* 186, 1213-1221 and Szabolcs et al (1997) *J. Exp. Med.* 186, 1177-1182). A transferência de partículas mediadas de sangue para células dendríticas também pode ser utilizada (Tuting et al (1997) *Eur. J. Immunol.* 27, 2702-2707) e RNA também pode ser utilizado (Ashley et al (1997) *J. Exp. Med.* 186, 1177-1182).

Será apreciado que, relativamente aos métodos de eliminação de células-alvo num paciente, é particularmente preferível que as células-alvo sejam células cancerígenas, preferencialmente células renais ou de cancro do cólon.

É particularmente preferido que os pacientes - que são tratados através destes métodos - tenham o haplotipo HLA-DR. Por conseguinte, numa modalidade preferida, o haplotipo HLA do paciente é determinado previamente ao tratamento. O haplotipo de HLA pode ser realizado, utilizando qualquer método adequável; tais métodos são bem conhecidos na área.

A invenção inclui, particularmente, a utilização de um peptídeo da invenção (ou os polinucleótidos que os codificam) para vacinação activa *in vivo*; para manipulação de células dendríticas autólogas *in vitro* seguidas de introdução das células dendríticas manipuladas *in vivo* para activar respostas dos CTL; para activar CTL autólogos *in vitro* seguido de terapia adoptiva (isto é, os CTL manipulados são introduzidos no paciente); e para activar os CTL de dadores saudáveis (correspondentes MHC ou não) *in vitro* seguido de terapia adoptiva.

Numa modalidade preferida, as vacinas da presente invenção são administradas num hospedeiro individualmente ou em combinação com outra terapia de cancro para inibir ou suprimir a formação de tumores.

A vacina de peptídeos pode ser administrada sem adjuvantes. A vacina de peptídeos também pode ser administrada com um adjuvante como BCG ou alúmen. Outros adjuvantes adequados incluem um estímulo de QS21 de Aquila (Aquila Biotech, Worcester, MA, EUA) derivado de saponina, extractos micobacterianos e mímicos de parede celular bacteriana sintética e adjuvantes de

propriedade como Detox da Ribí. Quil A, outro adjuvante derivado de saponina, também pode ser utilizado (Superfos, Dinamarca). Também podem ser úteis outros adjuvantes como os oligonucleotídeos CpG, RNA estabilizados, Imiquimod (comercialmente disponíveis sob o nome Aldara™ da 3M Pharma, EUA), adjuvante de Freund incompleto (comercialmente disponível como Montanide ISA-51 da Seppic S.A., Paris, França), formulações lipossomais ou GM-CSF. Também pode ser útil fornecer o peptídeo conjugado com KLH, de preferência também com um adjuvante.

Na tabela 1 anexada, os peptídeos são listados e identificados. Além disso, na tabela são designadas as proteínas a partir das quais o peptídeo é derivado e a respectiva posição do peptídeo na respectiva proteína. Além disso, são fornecidos os respectivos números de acesso ao Genbank do "Centro nacional de informação biotecnológica" do Instituto nacional de saúde (ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Noutra modalidade preferida, o peptídeo é usado para coloração de leucócitos, em particular de linfócitos T. Este tipo de utilização possui vantagens em particular caso seja comprovado que numa população CTL estão presentes CTLs específicos que são direccionados contra um peptídeo. Além disso, o peptídeo pode ser utilizado como marcador para determinar a progressão de uma terapia numa doença ou distúrbio tumoral.

Noutra modalidade preferida, o peptídeo é usado para a produção de anticorpos. Os anticorpos policlonais podem ser obtidos de forma padrão por imunização de animais através da injeção do peptídeo e subsequente purificação da globulina imunológica. Os anticorpos monoclonais podem ser produzidos de acordo com os protocolos padrão, conforme descrito, por exemplo, em *Methods Enzymol.* (1986), 121, *Hybridoma technology and monoclonal antibodies*.

A invenção num outro aspecto refere-se a uma composição farmacêutica que contém um ou mais dos peptídeos mencionados de acordo com a invenção. Esta composição é usada para administração parenteral, tal como a administração subcutânea, intradérmica, intramuscular ou oral. Para tal, os peptídeos são dissolvidos ou suspensos num transportador farmacêuticamente aceitável, de preferência aquoso. Além disso, a composição pode conter excipientes, tais como tampões, agentes de ligação, agentes blastogénicos, diluentes, aromatizantes, lubrificantes, etc. Os peptídeos também podem ser administrados juntamente com substâncias estimulantes imunológicas, tais como citocinas. Pode encontrar uma extensa lista de excipientes, que pode ser usada nesta composição, em, por exemplo, A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª ed., 2000, American Pharmaceutical Association e imprensa farmacêutica. A composição pode ser usada para prevenção, profilaxia e/ou terapia de doenças tumorais.

A preparação farmacêutica que contém o peptídeo da presente invenção e que inclui a SEQ. ID N.º 42 é administrada a um paciente que sofre de uma doença tumoral associada ao respectivo peptídeo ou antigénio. Através deste procedimento, pode ser desencadeada uma resposta imunológica específica de CTL.

Além disso, uma combinação de dois ou vários peptídeos pode ser usada como vacina conforme o divulgado aqui, em combinação directa ou no mesmo regime de tratamento. Além disso, podem ser usadas combinações com outros peptídeos, por exemplo, peptídeos específicos MHC de classe II. A pessoa versada na técnica poderá seleccionar as combinações preferidas de peptídeos imunogénicos através da realização de testes, por exemplo, à criação de células T *in vitro* e respectiva eficácia e presença geral, à proliferação, afinidade e expansão de determinadas células T para determinados peptídeos e à funcionalidade das células T, por exemplo,

analisando a produção de IFN- $\gamma$  (ver também exemplos em baixo), IL-12 ou perforina. Geralmente, os peptídeos mais eficientes são então combinados como uma vacina para a finalidade descrita em cima.

Uma vacina adequada irá conter 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 peptídeos diferentes, de preferência 4, 5, 6 ou 7 peptídeos diferentes, e com mais preferência 6 peptídeos diferentes.

Finalmente, a vacina pode ser dependente do tipo específico de cancro que o paciente a ser tratado está a sofrer, assim como do estado da doenças, os tipos de tratamento anteriores, o estado imunitário do paciente e, claro, o haplotipo HLA do paciente.

Foi demonstrado que os 80 aminoácidos de Li de N-terminal são suficientes para direccionar as proteínas para a rota de processamento da classe II (Sanderson, S., Frauwirth, K. & Shastri, N. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 7217-7221, Wang, R. F., Wang, X., Atwood, A. C., Topalian, S. L. & Rosenberg, S. A. (1999) *Science* **284**, 1351-1354).

A identificação dos epítomos de células T-helper dos antigénios associados ao tumor permanece uma tarefa importante na imunoterapia antitumoral. Aqui os inventores apresentam um método geralmente aplicável e os peptídeos que derivaram de análises diferenciais de peptídeos efectuadas por MS para identificar ligandos MHC de classe II de antigénios associados ao tumor, naturalmente processados e apresentados. Esta abordagem combina pela primeira vez um passo de transfecção das APC com um vector que efectua a codificação para uma proteína de fusão entre a cadeia Ii e o Ag de interesse, a purificação dos peptídeos com ligação aos HLA e a identificação por MS dos peptídeos derivados do Ag apresentados pelo transfectante

através da comparação com células não transfectadas. Além disso, os inventores podem validar o método ao apresentarem as células T induzidas contra o peptídeo identificado, reconhece especialmente transfectantes que expressam em demasia o AG da mesma origem. Apesar dos peptídeos identificados ainda terem de ser testados quanto à sua imunogenicidade *in vivo*, a nossa abordagem conduz à caracterização exacta dos ligandos MHC de classe II naturalmente processados. Assim, os inventores evitam testar, quer os peptídeos sobrepostos sintéticos dos antigénios associados ao tumor, quer a extensa variedade de peptídeos seleccionados pela predição dos epítomos, que é menos precisa quando comparada com a predição dos epítomos classe I. Em oposição aos árduos ensaios de células T, que podem conduzir à identificação de epítomos crípticos de células T incapazes de induzir a activação *in vivo* de células T (Anderton, S. M., Viner, N. J., Matharu, P., Lowrey, P. A. & Wraith, D. C. (2002) *Nat. Immunol.* **3**, 175-181), o estudo pode ser direccionado para os poucos peptídeos que são encontrados, de modo a serem apresentados. Além disso, a utilização deste método não é necessário para produzir o Ag recombinante ou para controlar as linhagens de células de tumores de expressão do Ag, de modo a provar que os peptídeos são naturalmente processados.

Os inventores utilizaram o N-terminal de Ii para direccionar os tumores associados a antigénios, para o compartimento de processamento de classe II de células B transformadas por EBV. Para alcançar isto, os inventores construíram um vector versátil com o qual podemos expressar qualquer antigénio, como uma proteína de fusão com Ii e a qual nos ajuda a determinar o nível de expressão da proteína nas células transfectadas por análise Western blot. Já foi demonstrado que o N-terminal de Ii é suficiente para direccionar proteínas para o compartimento de processamento de classe II. Mas até agora, isto só foi descrito num modelo que utilizava ovalbumina (Sanderson, S., Frauwirth, K.

& Shastri, N. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 7217-7221), de modo a identificar o Ag desconhecido, utilizando bibliotecas de cDNA da codificação de proteínas de fusão (Wang, R. F., Wang, X., Atwood, A. C., Topalian, S. L. & Rosenberg, S. A. (1999) *Science* **284**, 1351-1354) ou para confirmar a especificidade dos clones das células T conhecidas (Chaux, P., Vantomme, V., Stroobant, V., Thielemans, K., Corthals, J., Luiten, R., Eggermont, A. M., Boon, T. & van der, B. P. (1999) *J. Exp. Med.* **189**, 767-778). Segundo o conhecimento dos inventores este método nunca havia sido utilizado para identificar peptídeos de ligação de MHC de classe II de antigénios associados a tumores conhecidos, naturalmente apresentados. A análise diferencial de ligandos classe II de células transfectadas e não transfectadas por MALDI-MS e a caracterização adicional de peptídeos expressos de forma diferente pelos resultados ESI-MS num método objectivo para identificação de ligandos de classe II de antigénios de interesse. A transfecção de células com proteínas de fusão de queratina 18 provou que o método dos inventores é geralmente aplicável a antigénios de interesse, mais uma vez, os inventores foram capazes de descrever um peptídeo existente em HLA-DR a partir de um transgene modelo, a queratina 18.

A identificação dos epítomos de células T-helper dos TAA permanece uma tarefa importante na imunoterapia antitumoral. Até ao momento, foram aplicadas várias estratégias para identificação de peptídeos TAA de classe II, variando desde a incubação de APCs com o antigénio de interesse para permitir a sua absorção e processamento (Chaux, P., V. Vantomme, V. Stroobant, K. Thielemans, J. Corthals, R. Luiten, A.M. Eggermont, T. Boon, and B.P. van der Bruggen. 1999. Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 189:767-778), a várias estratégias de transfecção com proteínas de fusão (Dengjel, J., P. Decker, O. Schoor, F.

Altenberend, T. Weinschenk, H.G. Rammensee, and S. Stevanovic. 2004. Identification of a naturally processed cyclin D1 T-helper epitope by a novel combination of HLA class II targeting and differential mass spectrometry. *Eur.J.Immunol.* 34:3644-3651).

Todos estes métodos são demorados e, muitas vezes, permanece a dúvida, se os ligandos dos HLA são realmente apresentados *in vivo* pelo tecido humano. Os inventores podem mostrar pela primeira vez, que é possível isolar ligandos HLA de classe II directamente a partir de tumores sólidos dissecados, identificando, assim, os peptídeos que são apresentados pelos tumores e pelo tecido *in vivo* circundante, que podem, deste modo, ser reconhecidos pelas células T ao conterem o receptor da célula T adequado e o qual expressa simultaneamente o ligando CD4 co-estimulador na superfície da célula respectiva. Entre o funcionamento das proteínas como uma fonte de ligandos HLA de classe II processados de forma endógena, foram identificadas muitas proteínas de manutenção (housekeeping) e relevantes a nível imunitário. Contudo, os peptídeos dos TAA também podem ser detectados, conduzindo a uma abordagem objectiva de modo a identificar ligandos *in vivo* TAA de classe II relevantes.

Os inventores identificaram três ligandos responsáveis por uma sequência central do IGFBP3 e de um ligando de MMP7. Os inventores descobriram que estas proteínas se encontravam sobre-expressas em carcinomas de células renais, para além disso, foram descritas como associadas a tumores (Miyamoto, S., K. Yano, S. Sugimoto, G. Ishii, T. Hasebe, Y. Endoh, K. Kodama, M. Goya, T. Chiba, and A. Ochiai. 2004. Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3. *Cancer Res.* 64:665-671; Sumi, T., T. Nakatani, H. Yoshida, Y. Hyun, T. Yasui, Y. Matsumoto, E. Nakagawa, K. Sugimura, H. Kawashima, and O. Ishiko. 2003. Expression of matrix metalloproteinases 7 and 2 in human renal cell carcinoma.

*Oncol. Rep.* 10:567-570; Cheung, C.W., D.A. Vesey, D.L. Nicol, and D.W. Johnson. 2004. The roles of IGF-I and IGFBP-3 in the regulation of proximal tubule, and renal cell carcinoma cell proliferation. *Kidney Int.* 65:1272-1279). Estes peptídeos ligam-se promiscuamente a moléculas HLA de classe II e conseguem activar células T, CD4+ de diferentes dadores saudáveis. Assim, a abordagem dos inventores será útil na identificação de novos candidatos de peptídeos TAA de classe II para utilização em protocolos de vacinação clínica.

Também foi descrito um método de eliminação de células-alvo num paciente, as quais expressam um polipeptídeo que inclui uma sequência de aminoácidos como referido neste documento, o método engloba a administração no paciente de uma quantidade eficaz de um peptídeo ou de um ácido nucleico ou de um vector de expressão de acordo com a presente invenção, onde a quantidade do peptídeo ou do ácido nucleico ou do vector de expressão mencionados é eficaz no sentido de provocar no referido paciente uma resposta imunológica da célula anti-alvo.

Também foi descrito um método de eliminação de células-alvo num paciente, cujas células-alvo expressam um polipeptídeo que inclui uma sequência de aminoácidos fornecida de acordo com a presente invenção, o método engloba a administração de um número eficaz de linfócitos T citotóxicos (CTL) como definido em conformidade com a presente invenção.

Também foi descrito um método de eliminação de células-alvo num paciente, as quais expressam um polipeptídeo que inclui uma sequência de aminoácidos fornecida em conformidade com a presente invenção, o método engloba os passos (1) a obtenção de linfócitos T citotóxicos (CTL) do paciente; (2) a introdução nas células referidas de um ácido nucleico codificando um receptor de células T (TCR), ou uma molécula que tenha a mesma função, como definido

em concordância com a presente invenção; e (3) a introdução no paciente das células produzidas no passo (2).

As células-alvo são, de preferência, células cancerígenas. Mais concretamente, diga-se que o cancro é leucemia ou um linfoma que expressa o polipeptídeo que contém uma sequência de aminoácidos fornecida de acordo com a presente invenção.

Foi surpreendentemente descoberto, no contexto da presente invenção, que as células tumorais de tumores sólidos, ao contrário das células saudáveis do mesmo tecido, expressam a molécula HLA de classe II humana na respectiva superfície. Este facto foi descrito apenas uma vez por Brasanac et al (Brasanac D, Markovic-Lipkovski J, Hadzi-Djokic J, Muller GA, Muller CA. Immunohistochemical analysis of HLA class II antigens and tumor infiltrating mononuclear cells in renal cell carcinoma: correlation with clinical and histopathological data. Neoplasma. 1999;46(3):173-8.), onde as secções de crióstato de 37 carcinomas de células renais (RCC) -- 25 tipos de células claras, 10 granulares e 2 cromofóbicas--foram estudadas através do método de imunoperoxidase indirecto aplicando-se anticorpos monoclonais (MoAb) a antigénios HLA-DR, -DP e -DQ para análise de antigénios HLA de classe II e anti-CD14, -CD3, -CD4 e -CD8 MoAb para células mononucleares de infiltração tumoral (TIM). O número de células positivas foi estimado semiquantitativamente e os resultados da investigação imunohistoquímica foram correlacionados com as características clínicas (idade e sexo do paciente, dimensão do tumor e estágio TNM) e histopatológicas (citologia, histologia, grau) de RCC. Todos os RCC expressaram antigénios HLA-DR, 92 % -DQ e 73 % -DP com um nível de expressão na hierarquia DR>-DQ>-DP, mas não pôde ser estabelecida qualquer correlação estatisticamente importante com nenhum dos parâmetros clínicos e histopatológicos analisados. Os monócitos eram mais abundantes do que os linfócitos T e as células T CD4+ eram em

maior número do que as CD8+, considerando que os tumores com predominância de linfócitos T e um número aproximadamente igual de células T CD4+ e CD8+ tiveram um diâmetro médio maior. A activação inadequada de linfócitos T por células tumorais (apesar da capacidade de apresentação de antigénios) pode ser a razão para a associação de parâmetros que indica um comportamento mais agressivo do tumor com uma expressão anormal do antigénio HLA de classe II em RCC.

A invenção será agora descrita mais pormenorizadamente através da referência às seguintes figuras, lista de sequências e exemplos. Os exemplos seguintes têm objectivos meramente ilustrativos, não havendo a intenção de limitar a invenção.

As SEQ. ID N.º 1 até à SEQ ID N.º 49 mostram sequências de peptídeos dos epítomos de células T, contendo peptídeos que são apresentados pela MHC de classe II.

As SEQ. ID N.º 50 até à SEQ. ID N.º 79 mostram sequências de peptídeos da tabela 3.

A figura 1 apresenta a expressão das moléculas HLA de classe II nos RCC de três pacientes. Enquanto que no tumor do paciente RCC132 as células positivas dos HLA se encontravam preferencialmente na margem (A,B), os padrões de expressão de HLA de classe II dos tumores dos pacientes RCC190 e RCC211 tinham um desenvolvimento mais uniforme (C,E,G) revelando uma estrutura mais papilária. A visualização dos macrófagos CD68+ (B,D,F) em secções de tecido em série ilustra uma relação regional próxima das células imunológicas e mononucleares de infiltração do tumor e os HLA II que apresentam células tumorais. A incubação com IgG de rato em vez de anticorpos específicos revelou consistentemente resultados de coloração negativa (H). A letra T assinala o tumor.

A figura 2 apresenta uma análise FACS de células T CD4+ para IGFBP3<sub>169-181</sub>, MMP7<sub>247-262</sub> e CCND1<sub>198-212</sub>. São apresentados dot blots representativos de coloração intracelular IFN $\gamma$  em oposição às CD4-FITC.

A figura 3 apresenta uma ilustração esquemática de células T CD4+ produtoras de IFN $\gamma$  específico de antigénios detectadas em cada dador e para cada um dos peptídeos. É apresentada a percentagem de células T CD4+ produtoras de IFN $\gamma$  para cada um dos dadores e peptídeos utilizados para estimulação. As células foram incubadas em placas de 96 cavidades - 7 cavidades por dador e por peptídeo. Os valores da caixa são os valores considerados positivos: a percentagem de células T CD4+ produtoras de IFN $\gamma$  foi mais de duas vezes superior quando comparada com o controlo negativo sem o peptídeo. Percentagens de células T CD4+ produtoras de IFN $\gamma$  após a estimulação com peptídeos irrelevantes correlacionados com valores após a estimulação sem peptídeos, com a excepção do dador 1 após a 3<sup>a</sup> estimulação com IGFBP3<sub>169-181</sub>. Contudo, este efeito deixou de ser observado após a 4<sup>a</sup> estimulação.

A figura 4 apresenta a expressão de moléculas HLA de classe II no CCA165 (adenocarcinoma do cólon moderadamente diferente). Na lâmina própria de áreas com mucosa colónica normal (quadro c e lado esquerdo do quadro a, assinalados com asterisco) são tipicamente observados alguns macrófagos positivos de HLA de classe II, mas as células epiteliais foram consistentemente negativas quanto à expressão de HLA de classe II. Contudo, nas células epiteliais de diferentes áreas do tumor foi verificada uma expressão acentuada de HLA II como indicado no lado direito do quadro a e no quadro b e d.

As figuras 5a e 5b apresentam a identificação da sequência de peptídeos, de peptídeos eluídos das moléculas HLA de classe II isoladas do tecido tumoral humano primário pela espectroscopia da massa. Figura 5a: os fragmentos derivaram da fragmentação do ligando de HLA de classe II naturalmente processados e apresentados a partir do MMP7 correspondendo à sequência de peptídeos com a SEQ. ID N.º 1 (SQDDIKGIQKLYGKRS). Os fragmentos anotados são representados na tabela 5. Figura 5b: Os fragmentos derivaram da fragmentação de peptídeos sintéticos existindo a sequência de peptídeos de SEQ. ID N.º. 1. As fragmentações de ambos os peptídeos sintéticos e naturalmente processados produzem padrões de fragmentação equivalentes e permitem a dedução e confirmação da sequência de aminoácidos primários da sequência de peptídeos descaracterizados anteriormente (SEQ. ID N.º 1) do ligando de HLA de classe II do MMP7 humano.



Tabela 1 (continuação)

19.	N L R F L A T T P N S L	FN1	NP_997640	1908-1919	26	SEQ. ID-N.º	19
20.	S N T D L V P A P A V R I L T P E	GDF15	NP_004855	76-92	25	SEQ. ID-N.º	20
21.	A E I L E L A G N A A R D N	H2AFJ	NP_808760	61-74	32	SEQ. ID-N.º	21
22.	V K E P V A V L K A N R V W G A L	HEXB	NP_000512	153-169	32	SEQ. ID-N.º	22
23.	T A E I L E L A G N A A R D N K	HIST3H2A	NP_254280	60-75	32	SEQ. ID-N.º	23
24.	H P L H S K I I I I K K G H A K	IGFBP3	NP_000589	166-181	25	SEQ. ID-N.º	24
25.	H S K I I I I K K G H A K D S Q	IGFBP3	NP_000589	169-184	28	SEQ. ID-N.º	25
26.	R P K H T R I S E L K A E A V K K D	IGFBP5	NP_000590	138-155	32	SEQ. ID-N.º	26
27.	G P E D N V V I I Y L S R A G N P E	ISLR	NP_005536	380-397	26	SEQ. ID-N.º	27
28.	S R P V I N I Q K T I T V T P N	ITGA6	NP_000201	464-479	32	SEQ. ID-N.º	28
29.	L D L S F N Q I A R L P S G L P V	LUM	NP_002336	189-205	30	SEQ. ID-N.º	29
30.	K L P S V E G L H A I V V S D R	MAP2K1IP1	NP_068805	12-27	32	SEQ. ID-N.º	30
31.	D T S T L E M M H A P R C G	MMP12	NP_002417	80-93	23	SEQ. ID-N.º	31
32.	D Q N T I E T M R K P R C G N P D	MMP2	NP_004521	90-106	20	SEQ. ID-N.º	32
33.	N P G E Y R V T A H A E G Y T P S	AEBP1	NP_001120	947-963	20	SEQ. ID-N.º	33
34.	L D F L K A V D T N R A S V G	PLXDC2	NP_116201	69-83	29	SEQ. ID-N.º	34
35.	H G N Q I A T N G V V H V I D R	POSTN	NP_006466	213-228	23	SEQ. ID-N.º	35
36.	R A I E A L H G H E L R P G	RBM14	NP_006319	50-63	32	SEQ. ID-N.º	36
37.	D P G V L D R M M K K L D T N S D	S100A11	NP_005611	56-72	25	SEQ. ID-N.º	37
38.	N E E E I R A N V A V V S G A P	SDCBP	NP_001007069	56-71	26	SEQ. ID-N.º	38
39.	P A I L S E A S A P I P H	SDCBP	NP_001007068	29-41	24	SEQ. ID-N.º	39
40.	K V I Q A Q T A F S A N P A	SDCBP	NP_001007070	14-27	30	SEQ. ID-N.º	40
41.	N G A Y K A I P V A Q D L N A P S	SPP1	NP_000573	185-201	19	SEQ. ID-N.º	41

Tabela 1 (continuação)

42.	T N G <b>V</b> V H <b>V</b> I T N V <b>L</b> Q P P A	TGFBI	NP_000349	621-636	29	SEQ. ID-N.º	42
43.	T T T Q <b>L</b> Y T D R T E <b>K</b> L R P E	TGFBI	NP_000349	116-131	23	SEQ. ID-N.º	43
44.	G <b>K</b> <b>K</b> E Y <b>L</b> I <b>A</b> G <b>K</b> <b>A</b> E G D G	TIMP2	NP_003246	106-120	25	SEQ. ID-N.º	44
45.	M G E <b>I</b> A <b>S</b> F D <b>K</b> A K L K K T	TMSB10	NP_066926	6-20	20	SEQ. ID-N.º	45
46.	M A E <b>I</b> E <b>K</b> <b>F</b> D <b>K</b> S <b>K</b> L K K	TMSB4Y	NP_004193	6-19	19	SEQ. ID-N.º	46
47.	V V <b>S</b> <b>I</b> E <b>Q</b> <b>K</b> T E G <b>A</b> E K K	YWHAZ	NP_003397	61-75	22	SEQ. ID-N.º	47
48.	H S <b>K</b> <b>I</b> <b>I</b> <b>I</b> <b>I</b> <b>K</b> <b>K</b> G H <b>A</b> K	IGFBP3	NP_000589	169-181	25	SEQ. ID-N.º	48
49.	N P P <b>S</b> M V <b>A</b> A G <b>S</b> V V A A V	CCND1	NP_444284	198-212	24	SEQ. ID-N.º	49

## **Exemplos**

### Material e Métodos

Imunohistologia das MHC de classe II: os tumores foram fixados numa solução formaldeído a 4 % com solução tampão fosfato, embebidos em parafina, corados com hematoxilina e eosina e examinados através de microscopia de luz. O diagnóstico do RCC foi realizado de acordo com o processo das investigações histopatológicas e imunohistológicas (Fleming, S. and M. O'Donnell. 2000. Surgical pathology of renal epithelial neoplasms: recent advances and current status. *Histopathology* 36:195-202).

Para a detecção imunohistológica das moléculas MHC de classe II ou das moléculas CD68, respectivamente, 5 secções de tecido embebidas em parafina  $\mu\text{m}$  foram previamente tratadas em solução tampão de citrato 10 mM, pH 6, seguido de incubação ou com um murino anti-HLA-DR cadeia alpha mAb (clone TAL.1B5, 1:50) ou CD68 Ab (Clone PGM1, 1:50) (DAKO, Hamburgo, Alemanha) ou murino IgG1 (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , BD Biosciences Pharmingen, São Diego, USA) e visualizados utilizando o kit de detecção iView DAB Ventana (Nexes System, Ventana Medical Systems, Illkirch, França). As secções de tecido foram contra coradas com hematoxilina e, finalmente, embebidas em Entellan.

A análise molecular e da elução dos peptídeos com ligação aos HLA: as amostras de tumor congeladas foram processadas, tal como anteriormente descrito (Weinschenk, T., C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K.H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic, and H.G. Rammensee. 2002. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* 62:5818-5827) e os peptídeos foram isolados de acordo com os protocolos

normais (Dengjel, J., H.G. Rammensee, and S. Stevanovic. 2005. Glycan side chains on naturally presented MHC class II ligands. *J. Mass Spectrom.* 40:100-104) using the HLA-DR specific mAb L243 (Lampson, L.A. and R. Levy. 1980. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J. Immunol.* 125:293-299).

As misturas de peptídeos naturais foram analisadas por um sistema HPLC Ultimate de fase reversa (Dionex, Amesterdão, Holanda) ligado a um espectrômetro de massa Q-TOF I (Waters, Eschborn, Alemanha) ou por um sistema HPLC CapLC de fase reversa ligado a um Q-TOF Ultima API (Waters), tal como anteriormente descrito (Lemmel, C., S. Weik, U. Eberle, J. Dengjel, T. Kratt, H.D. Becker, H.G. Rammensee, and S. Stevanovic. 2004. Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling. *Nat.Biotechnol.* 22:450-454). Os espectros de fragmentos foram analisados manualmente e automaticamente.

Análise de expressão de genes por *microarrays* oligonucleotídeos de alta densidade: O isolamento do RNA do tumor e dos espécimes de rins normais autólogos bem como a análise de expressão de genes por *microarrays* de oligonucleotídeos Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) were performed as described previously (Krüger, T., O. Schoor, C. Lemmel, B. Kraemer, C. Reichle, J. Dengjel, T. Weinschenk, M. Müller, J. Hennenlotter, A. Stenzl, H.G. Rammensee, and S. Stevanovic. 2004. Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother*). Os dados foram analisados com o software GCOS (Affymetrix). As comparações em par entre o tumor e os rins normais autólogos foram calculadas utilizando-se o respectivo arranjo normal como linha de partida. Não estavam disponíveis dados de arranjo de rins normais autólogos para RCC149 e RCC211. Deste modo, o RNA do rim humano

saudável partilhado foi obtido comercialmente (Clontech, Heidelberg, Alemanha) e utilizado como linha de partida para estes tumores.

**Maturação de DCs:** Os DCs foram preparados utilizando sangue de dadores saudáveis. Resumidamente, os PBMCs foram isolados utilizando uma centrifugação de gradiente padrão (Meio de Separação de Linfócito, Laboratórios PAA, GmbH, Pasching, Áustria) e cultivadas a uma densidade de  $7 \times 10^6$  células/ml num suporte de X-Vivo 15. Após 2 horas a  $37^\circ\text{C}$ , as células não aderentes foram removidas e os monócitos aderentes cultivados durante 6 dias num suporte X-Vivo com 100 ng/ml GM-CSF e 40 ng/ml IL-4 (AL-ImmunoTools, Friesoythe, Alemanha). No dia 7, os DCs imaturos foram activados com 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (R&D Systems, Wiesbaden, Alemanha) e 20  $\mu\text{g/ml}$  poli(IC) (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha) durante 3 dias.

**Geração de células T CD4+ específicas de antigénio.**  $10^6$  PBMCs por cavidade foram estimulados com  $2 \times 10^5$  DCs autólogos pulsados por peptídeo (5  $\mu\text{g/ml}$ s). As células foram incubadas em placas de 96 cavidades (7 cavidades por dador e por peptídeo) com suporte de célula T: RPMI 1640 adicionado na presença de 10 ng/ml IL-12 (Promocell, Heidelberg, Alemanha). Após 3 a 4 dias de co-incubação a  $37^\circ\text{C}$ , foi adicionado meio fresco com 80 U/ml IL-2 (Proleukin, Chiron Corporation, Emeryville, CA, USA) e 5 ng/ml IL-7 (Promocell). As reestimulações foram realizadas com PBMCs e peptídeos todos os 6 a 8 dias.

**Coloração IFN $\gamma$  intracelular** Após 3 e 4 dias por estimulação, os PBMCs foram descongelados, lavados duas vezes com suporte X-Vivo 15, voltados a ser suspensos a  $10^7$  células/ml em suporte de células T e cultivados durante a noite. No dia seguinte, os PBMCs, pulsados com peptídeos 5  $\mu\text{g/ml}$ , foram incubados com células efectoras numa relação de 1:1 durante 6 h. Golgi-Stop

(Becton Dickinson, Heidelberg, Alemanha) foi adicionado para as últimas 4 horas de incubação.

As células foram analisadas utilizando um kit Cytofix/Cytoperm Plus (Becton Dickinson) e CD4-FITC- (Immunotools), IFN $\gamma$ -PE- e anticorpos SK1 CD8-PerCP clone (Becton Dickinson). Para controlos negativos, células de sete cavidades foram adicionadas e incubadas com peptídeo irrelevante ou sem peptídeo, respectivamente. Foi utilizada estimulação com PMA/Ionomicina para controlo positivo. As células foram analisadas num FACSCalibur de três cores (Becton Dickinson).

## **Exemplos**

### Expressão de HLA de classe II por RCC

Sob condições normais e não inflamatórias, as moléculas HLA de classe II só devem ser expressas por células do sistema hematopoiético e pelo epitélio tímico (Mach, B., V. Steimle, E. Martinez-Soria, and W. Reith. 1996. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu.Rev.Immunol.* 14:301-331). A situação altera-se durante a inflamação. A expressão de HLA de classe II pode ser induzida na maioria dos tipos de células e de tecidos por IFN $\gamma$  (Leib und Gut-Landmann, S., J. M. Waldburger, M. Krawczyk, L. A. Otten, T. Suter, A. Fontana, H. Acha-Orbea, and W. Reith. 2004. Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur.J.Immunol.* 34:1513-1525). Como a incidência de RCC é frequentemente acompanhada por casos de inflamação (Blay, J. Y., J. F. Rossi, J. Wijdenes, C. Menetrier-Caux, S. Schemann, S. Negrier, T. Philip, and M. Favrot. 1997. Role of interleukin-6 in the paraneoplastic inflammatory syndrome associated with renal-cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 72:424-430; Elsässer-Beile, U., M. Rindsfuser, T. Grussenmeyer, W. Schultze-Seemann, and U. Wetterauer. 2000.

Enhanced expression of IFN-gamma mRNA in CD4(+) or CD8(+) tumour-infiltrating lymphocytes compared to peripheral lymphocytes in patients with renal cell cancer. *Br. J. Cancer* 83:637-641), as moléculas de classe II são, na verdade, expressas na proximidade dos tumores ou por estes, tal como tem sido referido.

#### A coloração imunohistoquímica de moléculas HLA de classe II

Os inventores analisaram a expressão de HLA classe II de dez espécimes de RCC, incluindo células claras histológicas e carcinomas renais papilares por coloração imunohistoquímica e descobriram que todas as amostras investigadas revelaram células tumorais positivas de classe II. Como exemplificado na figura 1A, foi frequentemente detectada na margem do tumor uma expressão pronunciada de HLA de classe II. Nestas áreas os inventores observaram uma correlação espacial próxima entre células tumorais HLA+ e células imunológicas de infiltração tumoral, tal como ilustrado pela visualização dos macrófagos CD68+ numa secção de tecido em série (figura 1B). No RCC que revela uma arquitectura mais papilária, a expressão de moléculas HLA de classe II foi mais uniformemente distribuída pelo tumor (figura 1 C, E, G). A comparação dos padrões de coloração de HLA de classe II e CD68 imunohistoquímicos em secções de tecido em série demonstram claramente que, para além de macrófagos, as células tumorais também expressam HLA de classe II (figura 1C,D e E,F). Foi demonstrado que as células CD4+ T<sub>H1</sub> produtoras de IFN $\gamma$ , bem como células Natural Killer (NK) se infiltram no RCC (Cozar, J.M., J. Canton, M. Tallada, A. Concha, T. Cabrera, F. Garrido, and O.F. Ruiz-Cabello. 2005. Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4 T lymphocytes in human renal carcinomas. *Cancer Immunol. Immunother*). Uma vez que as células tumorais positivas de classe II foram descobertas predominantemente em partes externas dos tumores dissecados, pode-se especular que os leucócitos atraídos pelo tumor produzem

IFN $\gamma$  que age nas redondezas das células malignas. A expressão anormal de moléculas HLA de classe II no tecido neoplástico não está restrita ao RCC, também pode ser detectada no TCC e no CCA. A figura 4 apresenta a coloração imunohistoquímica de tecido de amostra de um adenocarcinoma de cólon humano.

#### Análise de expressão de IFN $\gamma$ e de transcritos de genes induzidos por IFN $\gamma$

Adicionalmente, os inventores investigaram a expressão de HLA de classe II através da análise comparativa de expressão de genes utilizando *microarrays* de oligonucleotídeos. Com esta técnica, os inventores puderam aceder à expressão global de HLA de classe II nos tumores dissecados, independentemente dos tipos de célula expressos. Os inventores analisaram expressões diferentes em quatro tumores, RCC149, RCC180, RCC190 e RCC211, em comparação com o rim de referência normal. Nos quatro tumores, os genes que codificam moléculas de HLA de classe II foram sobre-expressos (tabela 2). Uma razão possível para esta situação poderá ser uma expressão induzida por IFN $\gamma$  e, por esta razão, os inventores procuraram outros genes conhecidos pelo facto de serem submetidos a uma regulação por excesso por interferons (Kolchanov, N.A., E.V. Ignatieva, E.A. Ananko, O.A. Podkolodnaya, I.L. Stepanenko, T.I. Merkulova, M.A. Pozdnyakov, N.L. Podkolodny, A.N. Naumochkin, and A.G. Romashchenko. 2002. Transcription Regulatory Regions Database (TRRD): its status in 2002. *Nucleic Acids Res.* 30:312-317). Curiosamente, um número considerável destes genes foi encontrado sobre-expresso em uma ou mais amostras de tumores. A tabela 2 apresenta genes induzíveis por interferon que foram regulados por excesso e reproduzíveis em todas as quatro amostras, de acordo com as descobertas prévias dos inventores (Weinschenk, T., C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K.H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic, and

H.G. Rammensee. 2002. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* 62:5818-5827). Entre eles encontram-se as LMP2, LMP7 e MECL1 - proteínas que são substituídas por subunidades constitutivas das grandes holoenzimas proteolíticas que se encontram no citossol, o proteassoma, para formar o imunoproteassoma. A substituição de subunidades proteolíticas do proteassoma normalmente expressas contra subunidades induzíveis de IFN $\gamma$  é um processo inconfundível num ambiente rico em interferon. Adicionalmente, o IFN $\gamma$  foi avaliado directamente por PCR quantitativo em tempo real (RT) (TaqMan). Os tumores apresentados na tabela 2 mostram uma sobre-expressão de 5 a 60 vezes de mRNA IFN $\gamma$  quando comparados com as amostras de RNA normais autólogas do mesmo dador (dados não indicados). Assim, os resultados dos inventores indicam que o IFN $\gamma$  pode desempenhar um papel importante no RCC e pode ser a razão da expressão abundante de classe II.

**Tabela 2: expressão de mRNA dos genes induzidos por interferon.**

A expressão em amostras de tumores foi comparada com um rim normal autólogo (RCC180, RCC190) ou com um rim saudável transplantado (RCC149, RCC211). Todos os genes apresentaram um "aumento" no algoritmo de chamada de mudança do software GCOS dos quatro tumores e foram descritos como induzidos por interferon.

Gene Símbolo	Introduzir ID do gene	Denominação do gene	-incluir sobre-expressão do tumor vs. normal			
			RCC149	RCC180	RCC190	RCC211
HLA-DPA1	3113	complexo principal de histocompatibilidade, classe II, alfa DP 1	3,5	3,7	4,9	13,9
HLA-DPB1	3115	complexo principal de histocompatibilidade, classe II, beta DP 1	2,6	2,5	2,8	14,9
HLA-DQB1	3119	complexo principal de histocompatibilidade, classe II, beta DQ 1	4,3	4,0	6,5	5,3

HLA-DRB1	3123	complexo principal de histocompatibilidade, classe II, beta DR 1	1,2	1,9	2,8	4,3
CXCL10	3627	quimoquina (motivo C-X-C) ligando 10	1.1	3.2	10.6	24.3
FCGR1A	2209	Fragmento Fc de IgG, Ia de alta afinidade, receptor para (CD64)	6,5	2,6	12,1	29,9
IFI16	3428	interferon, proteína 16 induzível por gama	8,6	3,0	4,3	11,3
IFI44	10561	proteína 44 induzida por interferon	2,8	1,4	2,5	2,8
OAS1	4938	2',5'-oligoadenilato sintetase 1, 40/46kDa	3,5	2,3	2,6	5,3
PSMB8	5696	subunidade proteassoma, tipo beta, 8 (LMP7)	2,6	4,3	6,1	6,5
PSMB9	5698	subunidade proteassoma, tipo beta, 9 (LMP2)	4,3	7,5	6,5	16,0
PSMB10	5699	subunidade proteassoma, tipo beta, 10 (MECL1)	3,2	2,5	5,3	13,0
SP100	6672	antígeno nuclear Sp100	4,0	1,1	1,5	2,8
TAP1	6890	transportador 1, ATP-cassete de ligação, subfamília B (MDR/TAP)	2,5	2,8	6,5	8,0
VCAM1	7412	molécula 1 adesão célula vascular	5,7	5,3	3,2	12,1

#### Ligandos HLA-DR isolados do tecido cancerígeno

De acordo com os dados publicamente disponíveis, a ligação dos peptídeos através das moléculas HLA de classe II expressa no tecido tumoral sólido ainda não foi, até agora, isolada ou identificada por outros. Os inventores analisaram dez RCC diferentes, três CCA e um TCC e conseguiram isolar ligandos HLA-DR de todas as amostras, atingindo um total de 453 peptídeos (dados não apresentados). As sequências de peptídeos foram determinadas pelo acoplamento de separação cromatográfica e pela análise espectrométrica da massa tandem (LC-MS/MS), tal como anteriormente descrito (Weinschenk, T., C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K.H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic, and H.G. Rammensee. 2002. Integrated functional genomics approach for the design of

patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* 62:5818-582; Schirle M, Keilholz W, Weber B, Gouttefangeas C, Dumrese T, Becker HD, Stevanovic S, Rammensee HG. Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T-cell-independent approach. *Eur J Immunol.* 2000; 30(8):2216-25). Um exemplo da nova sequência de peptídeos através de LC-MS/MS é apresentado na fig. 5a e 5b. As sequências primárias de aminoácidos deduzidas da colisão de fragmentos anotadas na fig. 5a e 5b são incluídas na tabela 5. As amostras tumorais diferem nos seus genótipos HLA, em peso e número total de ligandos HLA identificados. A tabela 3 apresenta uma lista representativa de peptídeos e proteínas de fonte correspondentes identificadas a partir de uma amostra exemplar tumoral, RCC190. Os peptídeos foram isolados das moléculas HLA de classe II de células, tal como anteriormente descrito (Dengjel, J., P. Decker, O. Schoor, F. Altenberend, T. Weinschenk, H.G. Rammensee, and S. Stevanovic. 2004. Identification of a naturally processed cyclin D1 T-helper epitope by a novel combination of HLA class II targeting and differential mass spectrometry. *Eur.J.Immunol.* 34:3644-3651).

**Tabela 3: Lista de exemplos de ligandos HLA-DR isolados de RCC190.**

São apresentadas as principais sequências de ligandos HLA-DR isolados de RCC190 (HLA-DRB1\*11, DRB1\*15, DRB3, DRB5).

Gene Símbolo	Introduzir ID do gene	Sequência de peptídeos (SEQ. ID N.º)	Denominação do gene
ACTG1	71	WISKQEYDESGPSIVHRKCF (SEQ. ID N.º 50)	actina, propeptídeo gama 1
ALB	213	LKKYLYEIIARRHP (SEQ. ID N.º 51)	precursor da albumina
ALB	213	TLVEVSRNLGKVG (SEQ. ID N.º 52)	precursor da albumina
ALB	213	TPTLVEVSRNLGKVGS (SEQ. ID N.º 53)	precursor da albumina

APOA2	336	EKSKEQLTPLIKKAGTELVNF (SEQ. ID N.º 54)	precursor apolipoproteína A-II
APOB	338	YPKSLHMYANRLLDHR (SEQ. ID N.º 55)	precursor B apolipoproteína
C1R	715	EPYYKMQTRAGSRE (SEQ. ID N.º 56)	componente 1 do complemento, subcomponente r
C4B	721	APPSGGPGFLSIERPDSRPP (SEQ. ID N.º 57)	componente 4B do complemento da pro-proteína
C4BPA	722	FGPIYNYKDTIVFK (SEQ. ID N.º 58)	componente 4 do complemento da proteína de ligação, alfa
CALR	811	SPDPSIYAYDNF (SEQ. ID N.º 59)	precursor da calreticulina
CALR	811	EPPVIQNPEYKGEWKPRQIDNPD (SEQ. ID N.º 60)	precursor da calreticulina
CFL1	1072	GVIKVFNDMKVRK (SEQ. ID N.º 61)	cofilina 1 (não-músculo)
CPE	1363	APGYLAITKKVAVPY (SEQ. ID N.º 62)	precursor E carboxipeptidase
FCGBP	8857	ASVDLKN TGREEFLTA (SEQ. ID N.º 63)	Fragmento Fc da proteína de ligação IgG
FCN1	2219	GNHQFAKYKSFKVADE (SEQ. ID N.º 64)	precursor 1 ficolin
FTL	2512	VSHFFRELAEEKREG (SEQ. ID N.º 65)	ferritina, polipeptídeo leve
FTL	2512	TPDAMKAAMALEKK (SEQ. ID N.º 66)	ferritina, polipeptídeo leve
GAPD	2597	FVMGVNHEKYDN (SEQ. ID N.º 67)	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GAPD	2597	TGVFTTMEKAGAH (SEQ. ID N.º 68)	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GAPD	2597	ISWYDNEFGYSNRVVDLMAHMASKE (SEQ. ID N.º 69)	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HIST1H1C	3006	GTGASGSFKLNKKAASGEAKPK (SEQ. ID N.º 70)	família histona H1, membro 2
HLA-DQB1	3119	DVGVYRAVTPQGRPD (SEQ. ID N.º 71)	complexo principal de histocompatibilidade, classe II, precursor DQ beta 1
HLA-DRB1	3123	DVGEFRAVTELGRPD (SEQ. ID N.º 72)	complexo principal de histocompatibilidade, classe II, precursor DR beta 1

IGFBP3	3486	HPLHSKIIIIKKGHAK (SEQ. ID N.º 73)	proteína de ligação 3 do factor de crescimento tipo insulina
KNG1	3827	DKDLFKAVDAALKK (SEQ. ID N.º 74)	cininogénio 1
NPC2	10577	KDKTYSYLNKLPVK (SEQ. ID N.º 75)	Doença de Niemann-Pick, precursor tipo C2
S100A8	6279	VIKMGVAAHKKSHEESHKE (SEQ. ID N.º 76)	proteína A8 de ligação- cálcio S100
SERPINA1	5265	MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK (SEQ. ID N.º 77)	inibidor da proteinase de serina (ou cisteína), clado A (antiproteinase alfa-1, antitripsina), membro 1
SOD1	6647	GPHFNPLSRKHGGPK (SEQ. ID N.º 78)	superóxido dismutase 1, solúvel
TF	7018	DPQTFYYAVAVVKKDS (SEQ. ID N.º 79)	transferrina

---

Não há nenhuma correlação entre o peso do tumor e o número de ligandos HLA identificados. As proteínas de fonte peptídica podem ser divididas em dois grupos. Por um lado, foram encontrados ligandos que deverão ser apresentados pelos leucócitos, tais como peptídeos a partir de componentes de complementos, por exemplo, proteína alfa de ligação C3, C4A, C4 e outras proteínas relacionadas com funções específicas de células do sistema imunitário, por exemplo, CD14 e fragmento Fc da proteína de ligação IgG. Por outro lado, os inventores conseguiram revelar a natureza e as características de peptídeos previamente desconhecidos apresentados pelas células tumorais dos TAA sobre-expressos, por exemplo de vimentina, metaloproteinase 7 de matriz, alfa 1 do factor 1 de alongamento da tradução de eucariótico e nicotinamida N-metiltransferase. Esta observação está de acordo com os dados imunohistoquímicos (figuras 1 e 4) e demonstra que as células tumorais positivas HLA de classe II e os leucócitos de infiltração estiveram presentes em amostras analisadas e que os peptídeos eluídos provêm de antigénios sobre-expressos nestes tipos de células distintas.

Para identificar os peptídeos dos TAA, os inventores compararam as proteínas de fonte para os ligandos individuais com genes sobre-expressos detectados por análise *microarray* de tumores (Weinschenk, T., C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K.H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic, and H.G. Rammensee. 2002. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* 62:5818-5827; Krüger, T., O. Schoor, C. Lemmel, B. Kraemer, C. Reichle, J. Dengjel, T. Weinschenk, M. Müller, J. Hennenlotter, A. Stenzl, H.G. Rammensee, and S. Stevanovic. 2004. Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. *Cancer Immunol.Immunother*). Os inventores identificaram um peptídeo a partir da proteína 3 de ligação de factor de crescimento tipo insulina, IGFBP3<sub>166-181</sub>, em RCC190. Para além disso, foram encontradas em TCC108 duas variantes deste peptídeo, IGFBP3<sub>169-181</sub> e IGFBP3<sub>169-184</sub>, que contêm o mesmo motivo de núcleo de sequência necessário e suficiente para permitir uma ligação com HLA-DRB1\*0101 (para referência, ver a tabela 1). A partir do mesmo tumor, um peptídeo de metaloproteinase 7 de matriz, MMP7<sub>247-262</sub> pode ser isolado (tabela 1). Ao nível de mRNA, o MMP7 foi sobre-expresso em 13 e IGFBP3 em 22 de 23 RCC analisados (dados não apresentados). No total, das 453 sequências peptídicas inicialmente identificadas (não apresentadas), os antígenos subjacentes para 49 peptídeos (SEQ. ID N.ºs 1 - 49) foram identificados como associados ao tumor, seja através de experiências dos inventores (dados incluídos neste documento) ou por outros (Miyamoto, S., K. Yano, S. Sugimoto, G. Ishii, T. Hasebe, Y. Endoh, K. Kodama, M. Goya, T. Chiba, and A. Ochiai. 2004. Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3. *Cancer Res.* 64:665-671; Sumi, T., T. Nakatani, H.

Yoshida, Y. Hyun, T. Yasui, Y. Matsumoto, E. Nakagawa, K. Sugimura, H. Kawashima, and O. Ishiko. 2003. Expression of matrix metalloproteinases 7 and 2 in human renal cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 10:567-570; Cheung, C.W., D.A. Vesey, D.L. Nicol, and D.W. Johnson. 2004. The roles of IGF-I and IGFBP-3 in the regulation of proximal tubule, and renal cell carcinoma cell proliferation. *Kidney Int.* 65:1272-1279; Hao, X., B. Sun, L. Hu, H. Lahdesmaki, V. Dunmire, Y. Feng, S.W. Zhang, H. Wang, C. Wu, H. Wang, G.N. Fuller, W.F. Symmans, I. Shmulevich, and W. Zhang. 2004. Differential gene and protein expression in primary breast malignancies and their lymph node metastases as revealed by combined cDNA microarray and tissue microarray analysis. *Cancer* 100:1110-1122; Helmke, B.M., M. Polychronidis, A. Benner, M. Thome, J. Arribas, and M. Deichmann. 2004. Melanoma metastasis is associated with enhanced expression of the syntenin gene. *Oncol. Rep.* 12:221-228; Hofmann, H.S., G. Hansen, G. Richter, C. Taege, A. Simm, R.E. Silber, and S. Burdach. 2005. Matrix metalloproteinase-12 expression correlates with local recurrence and metastatic disease in non-small cell lung cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 11:1086-1092; Kamai, T., T. Yamanishi, H. Shirataki, K. Takagi, H. Asami, Y. Ito, and K. Yoshida. 2004. Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. *Clin. Cancer Res.* 10:4799-4805; Koninger, J., N.A. Giese, F.F. di Mola, P. Berberat, T. Giese, I. Esposito, M.G. Bachem, M.W. Buchler, and H. Friess. 2004. Overexpressed decorin in pancreatic cancer: potential tumor growth inhibition and attenuation of chemotherapeutic action. *Clin. Cancer Res.* 10:4776-4783; Mori, M., H. Shimada, Y. Gunji, H. Matsubara, H. Hayashi, Y. Nimura, M. Kato, M. Takiguchi, T. Ochiai, and N. Seki. 2004. S100A11 gene identified by in-house cDNA microarray as an accurate predictor of lymph node metastases of gastric cancer. *Oncol. Rep.* 11:1287-1293; Nagler, D.K., S. Kruger, A. Kellner, E. Ziomek, R. Menard, P. Buhtz, M. Krams, A. Roessner, and U. Kellner. 2004. Up-

regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* 60:109-119; Nanda, A., P. Buckhaults, S. Seaman, N. Agrawal, P. Boutin, S. Shankara, M. Nacht, B. Teicher, J. Stampfl, S. Singh, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, and C.B. St. 2004. Identification of a binding partner for the endothelial cell surface proteins TEM7 and TEM7R. *Cancer Res.* 64:8507-8511; Patel, I.S., P. Madan, S. Getsios, M.A. Bertrand, and C.D. MacCalman. 2003. Cadherin switching in ovarian cancer progression. *Int. J. Cancer* 106:172-177; Santelli, G., D. Califano, G. Chiappetta, M.T. Vento, P.C. Bartoli, F. Zullo, F. Trapasso, G. Viglietto, and A. Fusco. 1999. Thymosin beta-10 gene overexpression is a general event in human carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 155:799-804; Schneider, D., J. Kleeff, P.O. Berberat, Z. Zhu, M. Korc, H. Friess, and M.W. Buchler. 2002. Induction and expression of betaig-h3 in pancreatic cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1588:1-6; Welsh, J.B., L.M. Sapinoso, S.G. Kern, D.A. Brown, T. Liu, A.R. Bauskin, R.L. Ward, N.J. Hawkins, D.I. Quinn, P.J. Russell, R.L. Sutherland, S.N. Breit, C.A. Moskaluk, H.F. Frierson, Jr., and G.M. Hampton. 2003. Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:3410-3415; Xie, D., J.S. Sham, W.F. Zeng, L.H. Che, M. Zhang, H.X. Wu, H.L. Lin, J.M. Wen, S.H. Lau, L.Hu, and X.Y. Guan. 2005. Oncogenic role of clusterin overexpression in multistage colorectal tumorigenesis and progression. *World J. Gastroenterol.* 11:3285-3289). A análise exemplar do potencial imunostimulador de peptídeos de ligação com alelos HLA-DR comuns revela a existência de células T CD4+ específicas de antígenos face a IGFBP3<sub>169-181</sub> e MMP7<sub>247-262</sub>:

A ligação promíscua da SEQ. ID N.º 1 exemplar a vários alelos HLA-DR pode ser revelada através de vários métodos independentes: os ligandos de determinadas moléculas MHC/HLA transportam aminoácidos relacionados com químicos em determinadas posições

da respectiva sequência primária que permitem a definição de um motivo peptídico para cada alelo MHC/HLA (Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*. 1991; 351(6324):290-6). SYFPEITHI utiliza matrizes de motivo deduzidas a partir de motivos refinados baseados exclusivamente em análise de ligando natural por degradação de Edman e espectrometria de massa tandem. Estas matrizes permitem a predição dos peptídeos a partir de uma sequência de proteínas indicada em moléculas MHC de classe I ou II (Rotzschke O, Falk K, Stevanovic S, Jung G, Walden P, Rammensee HG. Exact prediction of a natural T-cell epitope. *Eur J Immunol*. 1991; 21(11):2891-4).

Ao aplicar os princípios das predições realizadas pelo algoritmo SYFPEITHI (Rammensee, H.G., J. Bachmann, and S. Stevanovic. 1997. *MHC Ligands and Peptide Motifs*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany; Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 1999; 50(3-4):213-9) à sequência peptídica exemplar mencionada (SEQ. ID N.º 1), foi classificada a ligação da SEQ ID N.º 1 a vários alelos HLA-DR comuns (ver a tabela 7). O algoritmo foi utilizado com sucesso para prever epítomos de classe I e classe II de vários antigénios, por exemplo, a partir do TAA TRP2 humano (predição de um ligando HLA de classe I) (34) e SSX2 (predição de um ligando HLA de classe II) (Neumann F, Wagner C, Stevanovic S, Kubuschok B, Schormann C, Mischo A, Ertan K, Schmidt W, Pfreundschuh M. Identification of an HLA-DR-restricted peptide epitope with a promiscuous binding pattern derived from the cancer testis antigen HOM-MEL-40/SSX2. *Int J Cancer*. 2004; 112(4):661-8). O limite de resultado de 18 ou superior para ligação significativa foi definido tendo em conta a análise de resultados de ligação para ligandos de peptídeos HLA-DR de ligação promíscua publicados anteriormente. A ligação promíscua é definida como ligação de um

peptídeo com uma boa força de ligação, como indicado por um resultado de 18 no teste SYFPEITHI ou superior em dois ou mais alelos HLA-DR comuns diferentes. Os alelos HLA DR mais comuns estão representados na tabela 7. Os loci de HLA-A e HLA-DR estão em combinações de submissão de desequilíbrio em ligação de HLA-A2 e HLA-DRs específicos favorecidos relativamente a outros. Os genótipos HLA-DR dos tumores de fonte HLA-DRB1\*11 e DRB1\*15 foram analisados e confirmados como sendo DRB1\*11 e DRB1\*15 em ambos os casos. Os resíduos de aminoácidos âncora preferidos para os alelos HLA de classe II mais comuns (DRB1\*0101, DRB1\*0301, DRB1\*0401, DRB1\*0701, DRB1\*1101 e DRB1\*1501) estão representados na tabela 4. Por exemplo, o alelo HLA de classe II DRB1\*0301 liga preferencialmente peptídeos no respectivo sulco de ligação que apresenta resíduos de aminoácidos específicos nas posições 1, 4, 6 e 9 no final do N-terminal a C-terminal da sequência núcleo de qualquer peptídeo determinado. Especificamente, DRB1\*0301 exibe uma boa ligação, se a sequência núcleo de um peptídeo tiver um resíduo Glutamato (D) na posição 4, assim como L, I, F, M ou V na posição 1, assim como K, R, E, Q ou N na posição 6, assim como Y, L ou F na posição 9.

**Tabela 4: Motivos peptídeos de alelos HLA-DR comuns.**

Estão representados aminoácidos âncora num código de letra de código nos bolsos de ligação correspondentes.

Alelo HLA	Posição														
	-	-	-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	+	+	+
	3	2	1										1	2	3
DRB1*0101				Y			L		A			L			
				V			A		G			I			
				L			I		S			A			
				I			V		T			V			
				F			M		C			N			
				A			N		P			F			
				M			Q					Y			

	W			
DRB1*0301	L	D	K	Y
	I		R	L
	F		E	F
	M		Q	
	V		N	
DRB1*0401	F	P	N	D
	Y	W	S	E
	W	I	T	H
	I	L	Q	K
	L	V	H	N
	V	A	R	Q
	M	D	R	R
		E	S	S
			T	T
			Y	Y
			A	A
			C	C
			I	I
			L	L
			M	M
			V	V
DRB1*0701	F	D	N	V
	Y	E	S	I
	W	H	T	L
	I	K		Y
	L	N		F
	V	Q		
		R		
		S		
		T		
		Y		
DRB1*1101	W	L	R	A
	Y	I	K	G
	F	V	H	S
		M		P

A  
F  
Y

DRB1*1501	L	F	I
	V	Y	L
	I	I	V
			M
			F

---

Os resultados a partir de análise *in silico* baseada em algoritmos de computador para a predição de interacção entre moléculas HLA e sequências peptídicas disponibilizados através da página [www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de) indicam que o peptídeo MMP7<sub>247-262</sub> SEQ. ID N.º 1 apresenta uma ligação promiscua com vários alelos HLA-DR. De acordo com resultados da análise preditiva, o peptídeo com SEQ. ID N.º 1 recebe uma classificação de ligação alta para interacção com DRB1\*1101, DRB1\*1501, DRB1\*0401, DRB1\*0301 e DRB1\*0101 (Tabela 7). Os alelos HLA-DR analisados neste teste para interacção com a sequência de aminoácidos peptídeos/força de ligação cobrem pelo menos 69,6 % da população caucasiana HLA-A2 positivo (Mori M, Beatty PG, Graves M, Boucher KM, Milford EL. HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry. Transplantation. 1997; 64(7):1017-27). Dado que não existem dados de frequência disponíveis para HLA-DR15, o alelo não foi considerado para cálculo da cobertura resultante da população caucasiana HLA-A2 positivo. Por conseguinte, será altamente provável que com a SEQ. ID No. 1, a cobertura da população seja superior a 69,6 %, indicando que o peptídeo apresenta uma excelente perspectiva para servir de candidato ao desenvolvimento de preparações farmacêuticas na maior parte dos pacientes com cancro.

No entanto, a aplicação de algoritmos de predição conduz apenas a resultados conclusivos, se os resultados de análise *in silico* forem combinados com confirmação experimental para ligação promíscua, como apresentado anteriormente por outros, que não conseguiram demonstrar quaisquer respostas imunológicas desencadeadas por sequências peptídicas previstas como bons aglutinantes (Bohm CM, Hanski ML, Stefanovic S, Rammensee HG, Stein H, Taylor-Papadimitriou J, Riecken EO, Hanski C. Identification of HLA-A2-restricted epitopes of the tumor-associated antigen MUC2 recognized by human cytotoxic T-cells. *Int J Cancer*. 1998; 75(5):688-93). A predição de artefactos, como no caso mencionado anteriormente, não pode ser suprimida, uma vez que os algoritmos utilizados para predição não consideram que uma sequência peptídica não é necessariamente gerada numa situação *in vivo* (dentro de célula vivas). A confirmação experimental pode ser obtida através da recolha de dados *in vitro* de testes biológicos, por exemplo, demonstrando a presença ou falta de imunogenicidade de um peptídeo. Daí que, para uma confirmação experimental de uma ligação promíscua de SEQ. ID N.º 1 foram obtidos através de recolha esses dados *in vitro*. Para testar os peptídeos relativamente à respectiva capacidade imunoestimuladora através de experiências preparatória de células T *in vitro*, foram utilizadas as variantes mais curtas ("sequência central") dos peptídeos IGFBP3, IGFBP3<sub>169-181</sub> e do peptídeo MMP7, MMP7<sub>247-262</sub>.

Para gerar células T CD4+ específicas de antigénios e para testar os peptídeos quanto a ligação promíscua, os PBMCs de 4 dadores saudáveis com alelos HLA-DR diferentes (Figura 2), um deles com DRB1\*1101, foram estimulados através de DCs autólogos pulsados por peptídeo. Além disso, o peptídeo CCND1<sub>198-212</sub>, um conhecido epítipo de célula T (Dengjel, J., P. Decker, O. Schoor, F. Altenberend, T. Weinschenk, H.G. Rammensee, and S. Stevanovic. 2004. Identification of a naturally processed cyclin D1 T-helper

epitope by a novel combination of HLA class II targeting and differential mass spectrometry. *Eur. J. Immunol.* 34:3644-3651), foi utilizado como controlo positivo. Como um sistema de leitura para a geração de células T CD4+ específicas de antígeno, os níveis de IFN $\gamma$  foram acedidos pela citometria de fluxo. As células T foram analisadas após a terceira e quarta estimulação semanal por coloração intracelular IFN $\gamma$  juntamente com coloração CD4-FITC e CD8-PerCP para determinar a percentagem de células com produção de IFN $\gamma$  em subpopulações de célula T específica. Em todas as experiências, as estimulações com peptídeos irrelevantes e sem peptídeos foram realizadas como controlos negativos. A resposta IFN $\gamma$  foi considerada como positiva se a percentagem de células T CD4+ produtoras de IFN $\gamma$  tiver sido duas vezes superior quando comparada com controlos negativos (Horton, H., N. Russell, E. Moore, I. Frank, R. Baydo, C. Havenar-Daughton, D. Lee, M. Deers, M. Hudgens, K. Weinhold, and M.J. Mc Elrath. 2004. Correlation between interferon- gamma secretion and cytotoxicity, in virus-specific memory T-cells. *J. Infect. Dis.* 190:1692-1696).

Em três dos quatro dadores, os inventores conseguiram gerar células T CD4+ específicas para ambos os peptídeos (Figura 2). As respostas de célula T não puderam ser observadas no dador 4 após qualquer estimulação. No dador 1, foram detectadas 0,05 % a 0,1 % (Figura 3) de células T CD4+ produtoras de IFN $\gamma$  na totalidade das sete tentativas de estimulação após a terceira estimulação com o peptídeo IGFBP3<sub>169-181</sub>. Estas células T foram expandidas na maior parte dos casos por uma estimulação adicional de 0,09 % a 0,13 %. As células T CD4+ produtoras de IFN $\gamma$  específicas para o peptídeo IGFBP3<sub>169-181</sub> foram igualmente observadas no dador 2 e dador 3, com frequências máximas de 0,05 % e 0,07 % em células T CD4+ produtoras de IFN $\gamma$ .

Os dadores 1, 2 e 3 também apresentaram células CD4<sup>+</sup> reativas ao peptídeo MMP7<sub>247-262</sub>. As maiores frequências de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN $\gamma$  específicas para o peptídeo MMP7 foram encontradas, respectivamente, nos dadores 1 e 2. Os dadores 1, 2 e 3 mostraram respostas IFN $\gamma$  ao peptídeo CCND1<sub>198-212</sub>, que já tinham sido descritas como epítipo de célula T MHC de classe II restrito (Dengjel, J., P. Decker, O. Schoor, F. Altenberend, T. Weinschenk, H.G. Rammensee, and S. Stevanovic. 2004. Identification of a naturally processed cyclin D1 T-helper epitope by a novel combination of HLA class II targeting and differential mass spectrometry. *Eur. J. Immunol.* 34:3644-3651).

Por conseguinte, os peptídeos IGFBP3, MMP7 e CCND1 são aglutinantes promíscuos HLA de classe II capazes de obter respostas em células T CD4<sup>+</sup> em três de quatro dadores saudáveis com alelos HLA DR diferentes. Se os alelos HLA dos dois pacientes com tumores dos quais derivaram os peptídeos IGFBP3 e MMP7 forem comparados com os alelos dos quatro dadores saudáveis, é óbvio que os peptídeos são apresentados por HLA-DRB1\*01, HLA-DRB1\*04 e HLA-DRB1\*11. Os três tipos de alótipos HLA DR têm um resíduo aminoácido glicina na posição 86 e um resíduo ácido aspártico na posição 57 das cadeias  $\beta$ , respectivamente (ver [www.anthonynolan.com/HIG](http://www.anthonynolan.com/HIG)). Por conseguinte, têm características de ligação muito similares para os bolsos de ligação P1 e P9 (Rammensee, H.G., J. Bachmann, and S. Stevanovic. 1997. MHC Ligands and Peptide Motifs. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany). Para o peptídeo CCND1<sub>198-212</sub>, um epítipo de célula T conhecido como HLA-DRB1\*0401 e HLA-DRB1\*0408 (Dengjel, J., P. Decker, O. Schoor, F. Altenberend, T. Weinschenk, H.G. Rammensee, and S. Stevanovic. 2004. Identification of a naturally processed cyclin D1 T-helper epitope by a novel combination of HLA class II targeting and differential mass spectrometry. *Eur. J. Immunol.* 34:3644-3651), confirma-se o mesmo. O dador 4 apresenta HLA-DRB1\*0318 e HLA-DRB1\*1401, alelos com motivos peptídeos que

diferem na sequência de aminoácido primária das cadeias beta a partir do supramencionado. Este facto pode explicar porque não é possível obter respostas da célula T face aos dois peptídeos que utilizam células deste dador.

Curiosamente, as células T killer CD8+ produtoras de IFN $\gamma$  foram detectadas em dois dadores após estimulações com os três peptídeos, principalmente no dador 3, mas num menor número no dador 1 (dados não apresentados).

**Tabela 5:**

<b>Fragmento</b>	<b>Massa [M+H]<sup>+</sup></b>	<b>Sequência de aminoácidos</b>
b2	216,1	SQ
y4	447,3	GKRS
y6	723,4	LYGKRS
y7	851,5	KLYGKRS
y8	979,6	QKLYGKRS
y9	1092,6	IQKLYGKRS
y10	1149,7	GIQKLYGKRS
y11	1277,8	KGIQKLYGKRS
y12	1390,8	IKGIQKLYGKRS
y13	1505,9	DIKGIQKLYGKRS
y14	1620,9	DDIKGIQKLYGKRS
R	129,1	immonium R

**Tabela 6:**

<b>Haplotipo</b>		<b>Frequência</b>
<b>HLA-A</b>	<b>HLA-DR</b>	<b>[%]</b>
2	1	8,8
2	2	14,9
2	3	6,1
2	4	21,3
2	5	1,2
2	6	15,2
2	7	13,0
2	8	4,2
2	9	1,2

2	10	1,4
2	11	8,7
2	12	2,6
2	n.a.	1,4

**Tabela 6:** Frequências haplotipo da população caucasiana norte-americana. São indicados os haplotipos serológicos. "n.a." significa não atribuído.

**Tabela 7:** Resultados de ligação da SEQ. ID N.º 1 para alelos HLA-DR comuns

São indicados os resultados de ligação da SEQ. ID N.º 1 e SEQ. ID N.º 25 SYFPEITHI para os alelos HLA-DRB1 mais comuns em populações caucasianas. As frequências dos haplotipos serológicos correspondentes de caucasianos HLA-A2 positivos são apresentadas em parêntesis. Considera-se que os peptídeos têm uma ligação suficientemente boa com uma molécula HLA de classe II, se o resultado for igual ou superior a 18.

Antigénio	Alelo DRB1*					
	0101 (8,8 %)	0301 (6,1 %)	0401 (21,3 %)	0701 (13,0 %)	1101 (8,7 %)	1501 (n.a. %)
SEQ. ID N.º 1	35	18	20	14	26	20
SEQ. ID N.º 25	28	28	20	18	26	18

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Immatics biotechnologies GmbH

<120> Peptídeos associados a tumor ligando promiscuamente às moléculas do antígeno de leucócitos humanos (HLA) da classe II

<130> FB19802PT

<160> 79

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asn Pro Gly Glu Tyr Arg Val Thr Ala His Ala Glu Gly Tyr Thr Pro  
1                   5                   10                   15

Ser

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asn Lys Gln Lys Pro Ile Thr Pro Glu Thr Ala Glu Lys Leu Ala Arg  
1                   5                   10                   15

Asp

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Asp Pro Ser Thr Ile Glu Lys Leu Ala Lys Asn Lys Gln Lys Pro  
1                   5                   10                   15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asn Pro Leu Lys Ile Phe Pro Ser Lys Arg Ile Leu Arg Arg His  
 1 5 10 15

<210> 5  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Thr Gly Trp Leu Leu Leu Asn Lys Pro Leu Asp Arg  
 1 5 10

<210> 6  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Asn Glu Leu Gln Glu Met Ser Asn Gln Gly Ser Lys  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Ala Gly Leu Leu Ser Thr Tyr Arg Ala Phe Leu Ser Ser His  
 1 5 10 15

<210> 8  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Pro Ser Leu Arg Pro Lys Asp Tyr Glu Val Asp Ala Thr Leu Lys  
 1 5 10 15

Ser Leu Asn Asn Gln  
 20

<210> 9  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Gly Pro Val Asp Glu Val Arg Glu Leu Gln Lys Ala Ile Gly Ala Val

1                    5                    10                    15

Pro

<210> 10  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Ile Asn His Val Val Ser Val Ala Gly Trp Gly Ile Ser Asp Gly  
 1                    5                    10                    15

<210> 11  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Val Pro Asp Asp Arg Asp Phe Glu Pro Ser Leu Gly Pro Val Cys Pro  
 1                    5                    10                    15

Phe Arg

<210> 12  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Leu Pro Gln Ser Ile Val Tyr Lys Tyr Met Ser Ile Arg Ser Asp Arg  
 1                    5                    10                    15

Ser Val Pro Ser  
                   20

<210> 13  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Ile Val His Arg Tyr Met Thr Ile Thr Ser Glu Arg Ser Val Pro Ala  
 1                    5                    10                    15

<210> 14  
 <211> 13

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Lys Asn Gly Phe Val Val Leu Lys Gly Arg Pro Cys Lys  
 1 5 10

<210> 15  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro  
 1 5 10 15

<210> 16  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Gly Ala Thr Tyr Asn Ile Ile Val Glu Ala Leu Lys Asp Gln  
 1 5 10

<210> 17  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro  
 1 5 10 15

<210> 18  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Ile Pro Gly His Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Lys Gly Leu Lys Pro Gly  
 1 5 10 15

<210> 19  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu

1                    5                    10

<210> 20  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Ser Asn Thr Asp Leu Val Pro Ala Pro Ala Val Arg Ile Leu Thr Pro  
 1                    5                    10                    15

Glu

<210> 21  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Ala Glu Ile Leu Glu Leu Ala Gly Asn Ala Ala Arg Asp Asn  
 1                    5                    10

<210> 22  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Val Lys Glu Pro Val Ala Val Leu Lys Ala Asn Arg Val Trp Gly Ala  
 1                    5                    10                    15

Leu

<210> 23  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Thr Ala Glu Ile Leu Glu Leu Ala Gly Asn Ala Ala Arg Asp Asn Lys  
 1                    5                    10                    15

<210> 24  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 24

His Pro Leu His Ser Lys Ile Ile Ile Ile Lys Lys Gly His Ala Lys  
 1                   5                   10                   15

<210> 25  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 25

His Ser Lys Ile Ile Ile Ile Lys Lys Gly His Ala Lys Asp Ser Gln  
 1                   5                   10                   15

<210> 26  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 26

Arg Pro Lys His Thr Arg Ile Ser Glu Leu Lys Ala Glu Ala Val Lys  
 1                   5                   10                   15

Lys Asp

<210> 27  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 27

Gly Pro Glu Asp Asn Val Val Ile Ile Tyr Leu Ser Arg Ala Gly Asn  
 1                   5                   10                   15

Pro Glu

<210> 28  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 28

Ser Arg Pro Val Ile Asn Ile Gln Lys Thr Ile Thr Val Thr Pro Asn  
 1                   5                   10                   15

<210> 29  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Leu Asp Leu Ser Phe Asn Gln Ile Ala Arg Leu Pro Ser Gly Leu Pro  
 1 5 10 15

Val

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Lys Leu Pro Ser Val Glu Gly Leu His Ala Ile Val Val Ser Asp Arg  
 1 5 10 15

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Asp Thr Ser Thr Leu Glu Met Met His Ala Pro Arg Cys Gly  
 1 5 10

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Asp Gln Asn Thr Ile Glu Thr Met Arg Lys Pro Arg Cys Gly Asn Pro  
 1 5 10 15

Asp

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Ser Gln Asp Asp Ile Lys Gly Ile Gln Lys Leu Tyr Gly Lys Arg Ser  
 1 5 10 15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 34

Leu Asp Phe Leu Lys Ala Val Asp Thr Asn Arg Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

<210> 35  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 35

His Gly Asn Gln Ile Ala Thr Asn Gly Val Val His Val Ile Asp Arg  
 1 5 10 15

<210> 36  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 36

Arg Ala Ile Glu Ala Leu His Gly His Glu Leu Arg Pro Gly  
 1 5 10

<210> 37  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 37

Asp Pro Gly Val Leu Asp Arg Met Met Lys Lys Leu Asp Thr Asn Ser  
 1 5 10 15

Asp

<210> 38  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 38

Asn Glu Glu Glu Ile Arg Ala Asn Val Ala Val Val Ser Gly Ala Pro  
 1 5 10 15

<210> 39  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 39

Pro Ala Ile Leu Ser Glu Ala Ser Ala Pro Ile Pro His  
1 5 10

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Lys Val Ile Gln Ala Gln Thr Ala Phe Ser Ala Asn Pro Ala  
1 5 10

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Asn Gly Ala Tyr Lys Ala Ile Pro Val Ala Gln Asp Leu Asn Ala Pro  
1 5 10 15

Ser

<210> 42

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Thr Asn Gly Val Val His Val Ile Thr Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala  
1 5 10 15

<210> 43

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Thr Thr Thr Gln Leu Tyr Thr Asp Arg Thr Glu Lys Leu Arg Pro Glu  
1 5 10 15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Gly Lys Lys Glu Tyr Leu Ile Ala Gly Lys Ala Glu Gly Asp Gly  
 1 5 10 15

<210> 45  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 45

Met Gly Glu Ile Ala Ser Phe Asp Lys Ala Lys Leu Lys Lys Thr  
 1 5 10 15

<210> 46  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 46

Met Ala Glu Ile Glu Lys Phe Asp Lys Ser Lys Leu Lys Lys  
 1 5 10

<210> 47  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 47

Val Val Ser Ser Ile Glu Gln Lys Thr Glu Gly Ala Glu Lys Lys  
 1 5 10 15

<210> 48  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 48

His Ser Lys Ile Ile Ile Ile Lys Lys Gly His Ala Lys  
 1 5 10

<210> 49  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 49

Asn Pro Pro Ser Met Val Ala Ala Gly Ser Val Val Ala Ala Val  
 1 5 10 15

<210> 50

<211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 50

Trp Ile Ser Lys Gln Glu Tyr Asp Glu Ser Gly Pro Ser Ile Val His  
 1 5 10 15

Arg Lys Cys Phe  
 20

<210> 51  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 51

Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro  
 1 5 10

<210> 52  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 52

Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly  
 1 5 10

<210> 53  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 53

Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser  
 1 5 10 15

<210> 54  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 54

Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro Leu Ile Lys Lys Ala Gly Thr  
 1 5 10 15

Glu Leu Val Asn Phe  
 20

<210> 55  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 55

Tyr Pro Lys Ser Leu His Met Tyr Ala Asn Arg Leu Leu Asp His Arg  
 1 5 10 15

<210> 56  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 56

Glu Pro Tyr Tyr Lys Met Gln Thr Arg Ala Gly Ser Arg Glu  
 1 5 10

<210> 57  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 57

Ala Pro Pro Ser Gly Gly Pro Gly Phe Leu Ser Ile Glu Arg Pro Asp  
 1 5 10 15

Ser Arg Pro Pro  
 20

<210> 58  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 58

Phe Gly Pro Ile Tyr Asn Tyr Lys Asp Thr Ile Val Phe Lys  
 1 5 10

<210> 59  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 59

Ser Pro Asp Pro Ser Ile Tyr Ala Tyr Asp Asn Phe  
 1 5 10

<210> 60

<211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 60

Glu Pro Pro Val Ile Gln Asn Pro Glu Tyr Lys Gly Glu Trp Lys Pro  
 1 5 10 15

Arg Gln Ile Asp Asn Pro Asp  
 20

<210> 61  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 61

Gly Val Ile Lys Val Phe Asn Asp Met Lys Val Arg Lys  
 1 5 10

<210> 62  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 62

Ala Pro Gly Tyr Leu Ala Ile Thr Lys Lys Val Ala Val Pro Tyr  
 1 5 10 15

<210> 63  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 63

Ala Ser Val Asp Leu Lys Asn Thr Gly Arg Glu Glu Phe Leu Thr Ala  
 1 5 10 15

<210> 64  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 64

Gly Asn His Gln Phe Ala Lys Tyr Lys Ser Phe Lys Val Ala Asp Glu  
 1 5 10 15

<210> 65  
 <211> 15  
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Val Ser His Phe Phe Arg Glu Leu Ala Glu Glu Lys Arg Glu Gly  
 1 5 10 15

<210> 66

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Thr Pro Asp Ala Met Lys Ala Ala Met Ala Leu Glu Lys Lys  
 1 5 10

<210> 67

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Phe Val Met Gly Val Asn His Glu Lys Tyr Asp Asn  
 1 5 10

<210> 68

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Thr Gly Val Phe Thr Thr Met Glu Lys Ala Gly Ala His  
 1 5 10

<210> 69

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Ile Ser Trp Tyr Asp Asn Glu Phe Gly Tyr Ser Asn Arg Val Val Asp  
 1 5 10 15

Leu Met Ala His Met Ala Ser Lys Glu  
 20 25

<210> 70

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 70

Gly Thr Gly Ala Ser Gly Ser Phe Lys Leu Asn Lys Lys Ala Ala Ser  
 1 5 10 15

Gly Glu Ala Lys Pro Lys  
 20

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 71

Asp Val Gly Val Tyr Arg Ala Val Thr Pro Gln Gly Arg Pro Asp  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 72

Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg Pro Asp  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 73

His Pro Leu His Ser Lys Ile Ile Ile Ile Lys Lys Gly His Ala Lys  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 74

Asp Lys Asp Leu Phe Lys Ala Val Asp Ala Ala Leu Lys Lys  
 1 5 10

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 75

Lys Asp Lys Thr Tyr Ser Tyr Leu Asn Lys Leu Pro Val Lys  
 1 5 10

<210> 76  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 76

Val Ile Lys Met Gly Val Ala Ala His Lys Lys Ser His Glu Glu Ser  
 1 5 10 15

His Lys Glu

<210> 77  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 77

Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val  
 1 5 10 15

Asn Pro Thr Gln Lys  
 20

<210> 78  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 78

Gly Pro His Phe Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys  
 1 5 10 15

<210> 79  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 79

Asp Pro Gln Thr Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser  
 1 5 10 15

Lisboa, 24/02/2010

### **Reivindicações**

1. Um tumor associado a peptídeo constituído por uma sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ ID No. 42.
2. Um peptídeo associado a tumor constituído por uma sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ ID No. 42, na qual um ou dois dos resíduos de aminoácidos são alterados através da substituição da cadeia lateral das mesmas com a cadeia lateral de outro de resíduo de aminoácidos de origem natural, de tal forma que o peptídeo ainda é capaz de ligar-se a uma molécula de HLA da mesma forma como dito peptídeo de acordo com a SEQ ID No. 42.
3. O peptídeo associado a tumor de acordo com a Reivindicação 1 ou 2, onde o peptídeos citados incluem ligações não peptídicas.
4. Um ácido nucleico, que consiste de uma sequência que codifica um peptídeo de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 3.
5. O ácido nucleico de acordo com a Reivindicação 4, que é DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA ou combinações dos mesmos.
6. Um vector de expressão capaz de expressar um ácido nucleico de acordo com a Reivindicação 4 ou 5.
7. Uma célula hospedeira compreendendo um ácido nucleico de acordo com a Reivindicação 4 ou 5, ou um vector de expressão de acordo com a Reivindicação 6, onde a dita célula hospedeira não é uma célula-tronco humana embrionária.

8. Um método de produzir um peptídeo associado a tumor de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 ou 2, o método compreendendo o cultivo da célula hospedeira acordo com a Reivindicação 7 e o isolamento dos peptídeos da célula hospedeira ou do seu meio de cultura.
9. Uma composição farmacêutica compreendendo um peptídeo associado a tumor de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 3, um ácido nucleico de acordo com a Reivindicação 4 ou 5, ou um vector de expressão de acordo com a Reivindicação 6 e um portador farmacêuticamente aceitável, de preferência sob a forma de uma vacina contra o cancro, opcionalmente compreendendo pelo menos um adjuvante apropriado.
10. Um peptídeo associado a tumor de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 3, um ácido nucleico de acordo com a Reivindicação 4 ou 5, ou um vector de expressão de acordo com a Reivindicação 6 para uso na medicina.
11. Uso de um peptídeo associado a tumor de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 3 ou um ácido nucleico de acordo com a Reivindicação 4 ou 5, ou um vector de expressão de acordo com a Reivindicação 6 no fabrico de um medicamento para matar as células cancerígenas, sendo que as células cancerígenas expressam aberrantemente um polipeptídeo composto por uma sequência de aminoácidos conforme o apresentado em qualquer uma das Reivindicações 1 ou 2.
12. Uso de um peptídeo associado a tumor de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 3 ou um ácido nucleico de acordo com a Reivindicação 4 ou 5, ou um vector de expressão de acordo com a Reivindicação 6 no fabrico de um medicamento para induzir uma resposta imune, mais particularmente uma

resposta imune mediada por células T contra as células de tumores sólidos, cujas células expressam uma molécula humana de MHC da classe II em sua superfície e apresentam um polipeptídeo composto por uma sequência de aminoácidos conforme o contido em uma das Reivindicações 1 ou 2.

13. Um método *in vitro* para a produção de linfócitos T citotóxicos (CTL), o método compreendendo o contacto CTL *in vitro* com moléculas humanas MHC da classe II carregadas com antigénio expressas na superfície de uma célula adequada que apresenta antigénio por um período de tempo suficiente para activar os ditos CTL de maneira antigénica específica, na qual o dito antigénio é um peptídeo de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 ou 2.
14. O método de acordo com a Reivindicação 13, onde o antigénio é carregado para moléculas MHC da classe II expressas na superfície de um antigénio adequado apresentador de células entrando em contacto com uma quantidade suficiente de antigénios com uma célula apresentadora de antigénios.
15. O método de acordo com a Reivindicação 13, onde a célula que apresenta antigénio compreende um vector de expressão de acordo com a Reivindicação 6.
16. Linfócitos T citotóxicos (CTL) activados, produzidos pelo método de acordo com qualquer uma das Reivindicações 13 a 15, que reconhecem selectivamente uma célula que expressa aberrantemente um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos conforme o citado em qualquer uma das Reivindicações 1 ou 2.
17. Um receptor de células T (TCR), que reconhece uma célula que expressa aberrantemente um polipeptídeo compreendendo uma

sequência de aminoácidos conforme o citado em qualquer uma das Reivindicações 1 ou 2, sendo que o TCR é específico para os peptídeos de qualquer uma das Reivindicações 1 ou 2 e obtido através dos linfócitos T citotóxicos (CTL) da Reivindicação 16.

18. Um ácido nucleico que codifica um receptor de células T (TCR) de acordo com a Reivindicação 17 ou um vector de expressão capazes de expressar o dito receptor de células T (TCR).
19. Uso de linfócitos T citotóxicos conforme o definido na Reivindicação 16 no fabrico de um medicamento para matar células de cancro em um paciente, no qual as células cancerígenas aberrantemente expressam um polipeptídeo composto por uma sequência de aminoácidos dada em qualquer um das Reivindicações 1 ou 2.

Lisboa, 24/02/2010

Figura 1:

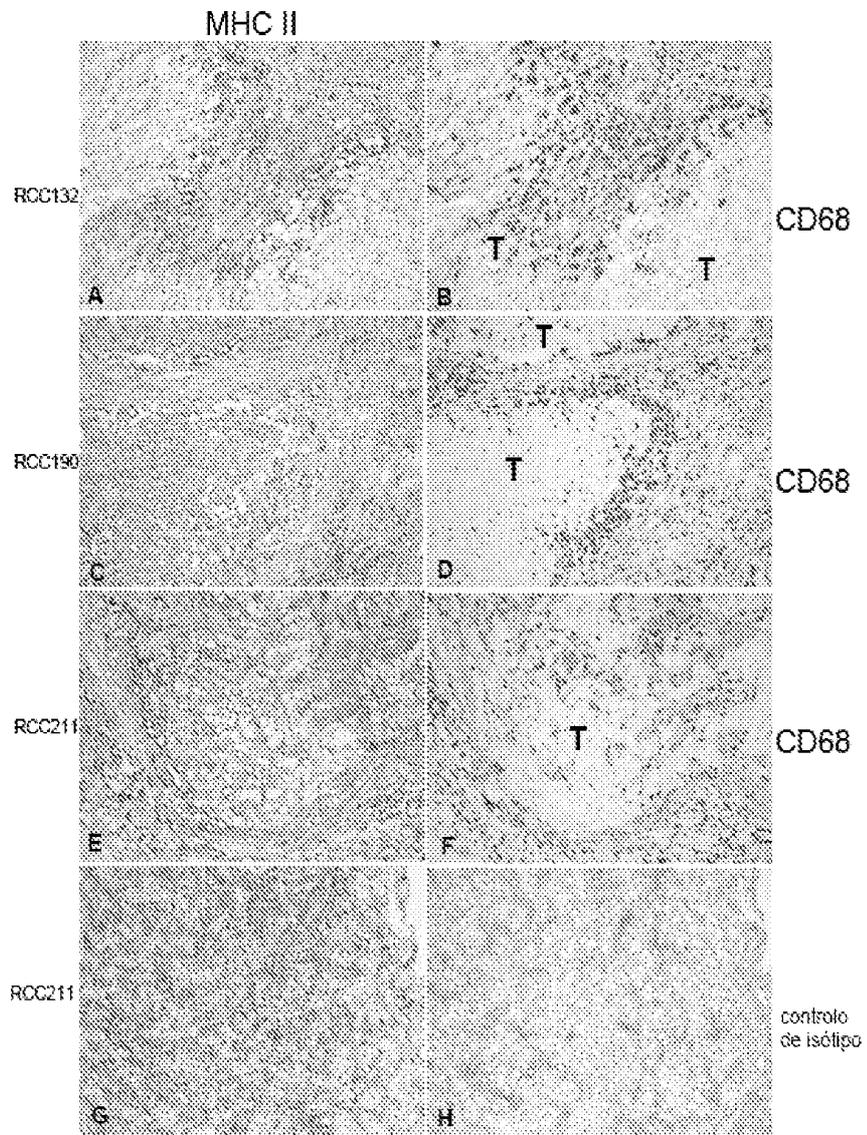


Figura 2:

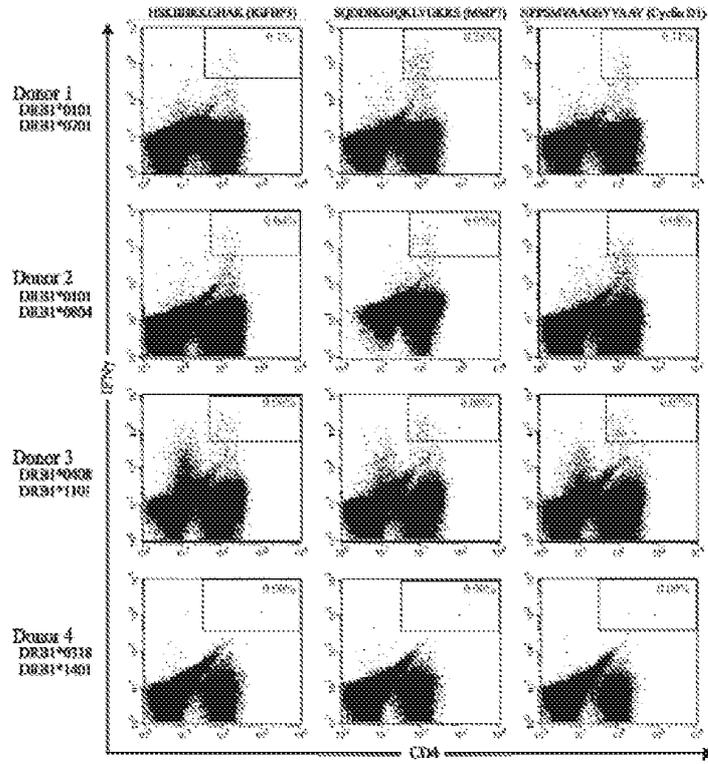


Figura 3:

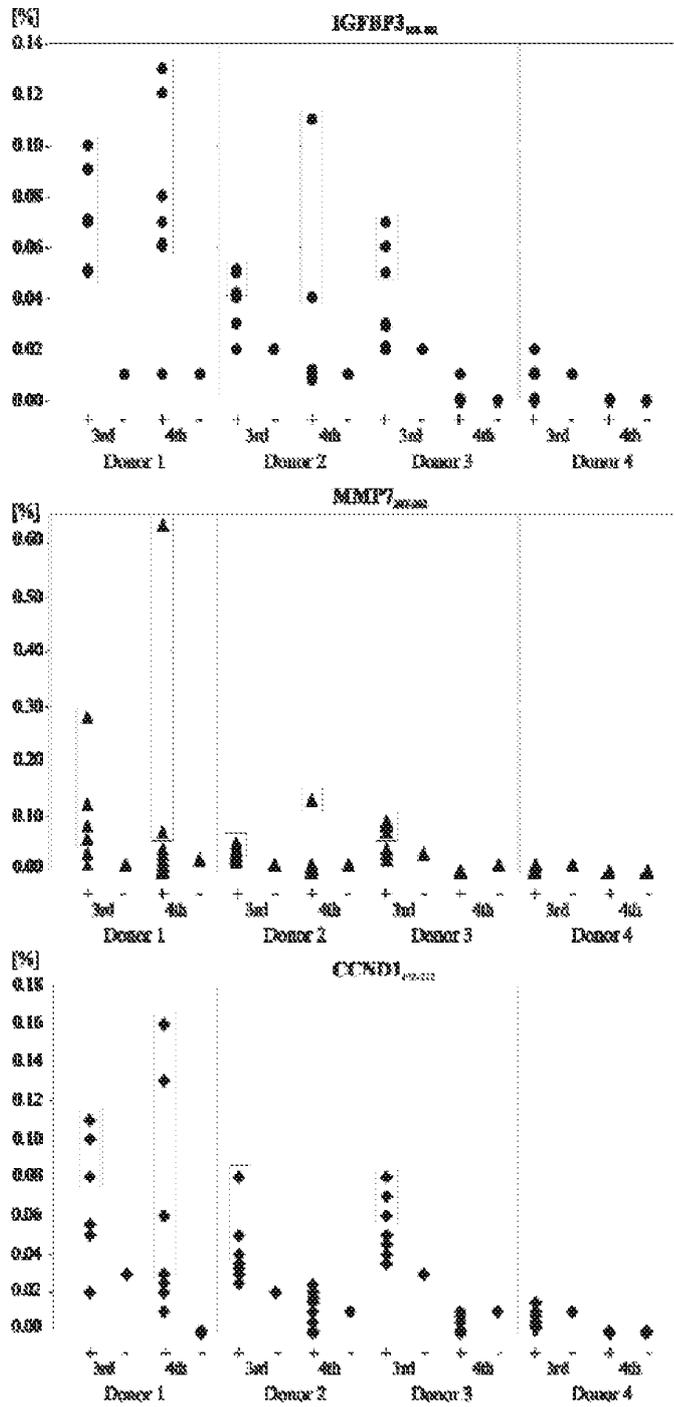


Figura 4:

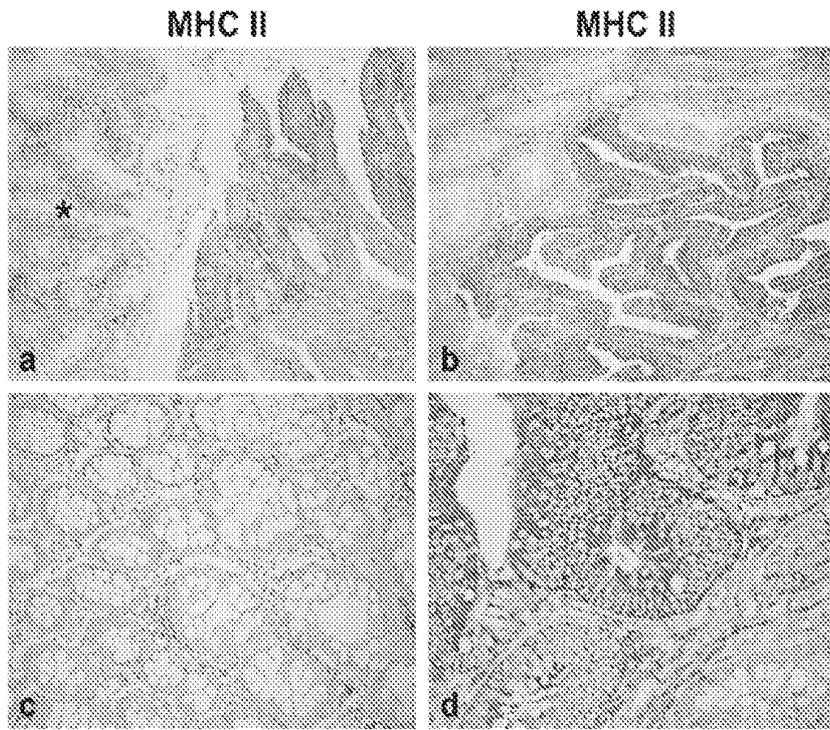


Figura 5a:

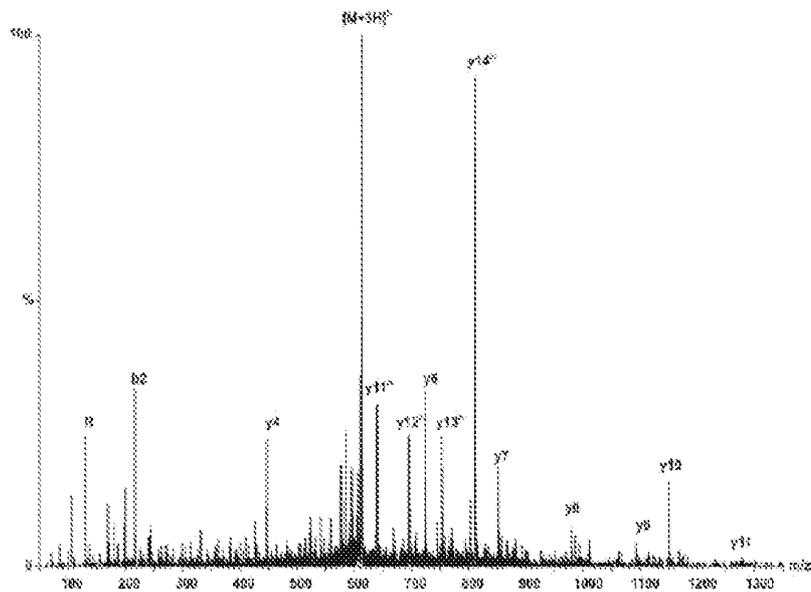


Figura 5b:

