

C12N 15/12 (2011.01) **C12N 15/27** (2011.01)
C12N 15/55 (2011.01) **C12N 15/62** (2011.01)
C12N 9/16 (2011.01) **C12N 5/07** (2011.01)
C07K 14/535 (2011.01) **C07K 14/71** (2011.01)
C07K 19/00 (2011.01) **A61K 39/00** (2011.01)

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

(22) Data de pedido: **2001.03.30**

(30) Prioridade(s): **2000.03.30 US 193504 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2003.01.08**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.04.27**
120/2011

(73) Titular(es):

DENDREON CORPORATION
3005 1ST AVENUE SEATTLE, WA 98121 US

(72) Inventor(es):

REINER LAUS US
DAMIR VIDOVIC US
THOMAS GRADDIS US

(74) Mandatário:

JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA IMUNOTERAPIA BASEADA EM CÉLULAS DENDRÍTICAS**

(57) Resumo:

SÃO DESCRITAS PROTEÍNAS DE FUSÃO IMUNOESTIMULADORAS E MÉTODOS PARA GERAR RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS PROTECTORAS INDUZIDAS POR DC E MEDIADAS POR CÉLULAS T IN VITRO E IN VIVO. AS PROTEÍNAS DE FUSÃO IMUNOESTIMULADORAS INCLUEM UMA COMPONENTE DE ANTIGÉNIO POLIPEPTÍDICO E UMA COMPONENTE IMUNOESTIMULADORA DERIVADA DO DOMÍNIO INTRACELULAR DA PROTEÍNA HER-2. TAMBÉM SE DESCREVEM COMPOSIÇÕES IMUNOESTIMULADORAS INCLUINDO CÉLULAS DENDRÍTICAS PULSADAS COM UMA DESSAS PROTEÍNAS DE FUSÃO IMUNOESTIMULADORAS, E MÉTODOS PARA IMUNOTERAPIA UTILIZANDO AS COMPOSIÇÕES.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA IMUNOTERAPIA BASEADA EM CÉLULAS DENDRÍTICAS"

A invenção presente diz respeito a uma proteína de fusão imunoestimuladora de HER-2 incluindo uma sequência de antígeno polipeptídico ou proteico e uma sequência componente seleccionada de entre o conjunto constituído por HER500 (SEQ ID NO:1), HER500• hGM-CSF (SEQ ID NO:2), HER500* (SEQ ID NO:3) e HER500*• rGM-CSF (SEQ ID NO:4), em que a proteína de fusão imunoestimuladora referida seja eficaz para gerar uma resposta imunológica eficaz induzida por DC e mediada por células T, contra o antígeno polipeptídico; a células dendríticas tratadas com uma composição destas e a métodos de imunoterapia utilizando a proteína de fusão.

O gene HER-2/*erbB-2* (também denominado *neu*) codifica para uma glicoproteína transmembranar de *Mr* 185.000 (p185) possuindo uma actividade intrínseca como tirosina quinase (Akiyama *et al.*, 1986, *Science* 232: 1644) e apresentando uma homologia extensiva em relação ao receptor do factor de crescimento epidérmico (EGF) (Coussens *et al.*, 1985, *Science* **230**: 1132).

Diversas linhas de dados sugerem a existência de uma ligação entre a amplificação da HER-2 e a transformação

neoplásica. A amplificação e a sobre-expressão do proto-oncogene HER-2 ocorria em cancros da mama e do ovário humanos e correlacionava-se tanto com prognósticos reservados como com diminuição da sobrevivência de pacientes (Slamon *et al.*, 1987, *Science* **235**: 177; Slamon *et al.*, 1989, *Science* **244**: 707).

Em sistemas experimentais, os linfócitos T citotóxicos específicos dos antígenos tumorais (CTL) são o mecanismo imunológico mais poderoso para a eliminação de tumores. (Greenberg, 1991, *Adv. Immunol.* **49**: 281). Portanto, os antígenos específicos para tumores (Ag) reconhecidos pelos CTL têm probabilidade de funcionar como Ag de rejeição tumoral, capazes de induzir imunidade protectora *in vivo*.

Os CTL reconhecem moléculas de classe I contendo fragmentos peptídicos de proteínas intracelulares que foram transportados para o retículo endoplasmático antes da sua transferência para a molécula de MHC (Germain, 1995, *Ann. NY Acad. Sci.* **754**: 114; Heemels & Ploegh, 1995, *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 463), enquanto a grande parte dos péptidos complexados de classe II apresentados às células T são produtos de degradação de proteínas exógenas ou da superfície celular que entram no caminho biossintético das moléculas de classe II por endocitose e uma fusão subsequente com lisossomas (Cresswell, 1994, *Annu. Rev. Immunol.* **12**: 259). Os CTL são induzidos quando uma proteína entra no caminho de processamento de antígenos do complexo

principal de histocompatibilidade de classe I ("MHC I" ou "classe I"). Para entrar neste caminho, a proteína tem que estar presente no citossol de uma célula que apresenta um antigénio (APC). Ela é aí degradada a péptidos que são então transportados para o retículo endoplásmico, aonde se associam com moléculas de HLA da classe I. Estes péptidos são então apresentados em conjunto com as moléculas da classe I sobre a superfície celular e podem servir como um indutor e alvo dos CTL específicos restritos a antigénios de classe I (Rothbard *et al.*, 1987, Nature **326**: 881).

A iniciação de uma resposta imunológica expande e activa linfócitos "nêscios", isto é, aqueles que não tenham anteriormente visto um determinado imunogénio, de tal modo que eles se tornam em células "efectivadoras" que respondem activamente. Cada célula néscia tem potencial para ver um e só um epítopo antigénico, uma situação análoga à de uma chave que entra numa fechadura. Só aquelas células que reconhecem o seu epítopo cognato se tornam em células efectivadoras.

As células T podem ser do tipo "ajudantes" ou do tipo "citotóxicas". As células T ajudantes segregam factores de crescimento para células linfóides, que estimulam a activação e a função de células B e T. As células T citotóxicas reconhecem e matam, quer directa, quer indirectamente, as células que expressam um determinado antigénio. Tal como as células B, cada célula T tem receptores específicos para um, e apenas um, epítopo

antigénico. Os receptores das células T reconhecem fragmentos de proteínas que estão apresentados sobre a superfície celular pelos complexos principais de histocompatibilidade (MHC). A indução *in vivo* dos CTL tem tipicamente sido levada a cabo por imunização com vírus ou células vivos (Tanaka, et al., J. Immunol., (1991), **147**, 3646-52, Wang, et al., J. Immunol., (1995), 4685-4692). Uma característica das DC, subconjunto potente das APC, é a sua capacidade para despoletar respostas *in vivo* dos linfócitos T néscios citotóxicos CD8⁺ (CTL), a seguir a serem pulsadas com antigénio (Ridge et al. 1998 Nature **393**: 474).

Além da sua forma imatura (e repouso ou precursora), as DC existem em dois estados maduros: activadas e superactivadas. As DC activadas conseguem estimular as célula T ajudantes CD4⁺, mas não as células T citotóxicas CD8⁺ (CTL), enquanto as DC superactivadas possuem a capacidade de estimular as CTL CD8⁺.

Embora as células tumorais possam expressar antigénios proteicos que são reconhecidos como estranhos pelo sujeito, e a vigilância imunológica possa limitar o crescimento e a dispersão de alguns tipos de tumores, o sistema imunológico nem sempre protege um sujeito contra cancros letais humanos. Esses tumores podem ultrapassar o sistema imunológico devido a um crescimento e a uma dispersão rápidos e/ou as células de tumor podem escapar da destruição imunológica. Incluem-se nos mecanismos propostos para esse tipo de evasão, sem que eles se limitem a estes,

(1) uma regulação em baixa dos antígeno de Classe I do MHC à superfície das células tumorais resultando em pouca ou nenhuma complexação de antígenos peptídicos tumorais processados com as MHC de Classe I MHC, tal como é necessário para que sejam reconhecidas pelos linfócitos T citotóxicos (CTL), (2) uma falta de activação das CTL devida a pouca ou nenhuma expressão das moléculas de MHC de Classe II pelas células de tumor, de tal modo que elas não conseguem activar directamente as células T ajudantes CD4+ específicas contra o tumor (que produzem sinais provavelmente necessários para a actividade das CTL), (3) uma falta de co-estimulação de marcadores da superfície celular que proporcionam sinais secundários para a activação das células T ajudantes CD4+, e (4) factores produzidos pelas células de tumor, que suprimem respostas contra o tumor, tais como o ligando faz (Abbas, A.K. *et al.*, Editores, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, 3ª edição, W.B. Saunders Co., 394-405, 1997).

É portanto desejável proporcionar um meio para originar respostas das CTL contra proteínas específicas dos tumores. Podem induzir-se as CTL quer *in vivo*, com vacinas, ou podem gerar-se *in vitro*, e depois re-infundir-se no organismo portador do tumor.

O WO 97/24438 descreve um complexo polipeptídico imunoestimulador constituído por um antígeno peptídico tal como HER-2 e por uma proteína de ligação de células dendríticas tal como a GM-CSF, e a sua utilização na

terapia do cancro.

A invenção diz respeito a uma proteína de fusão imunoestimuladora HER-2, incluindo:

uma componente, sequência polipeptídica ou proteica de um antigénio, e uma sequência componente seleccionada de entre o conjunto constituído por HER500 (SEQ ID NO: 1), HER500.hGM-CSF (SEQ ID NO: 2), HER500* (SEQ ID NO: 3) e HER500*.rGM-CSF (SEQ ID NO: 4), em que a referida proteína de fusão imunoestimuladora seja eficaz para originar uma resposta imunológica celular à sequência componente, polipeptídica ou proteica, da proteína de fusão.

Num aspecto, a componente de sequência do domínio intracelular de HER-2 da proteína de fusão imunoestimuladora apresenta a sequência apresentada como SEQ. ID. NO: 25.

Noutro aspecto, a componente polipeptídica ou proteica está associada com células de tumores.

Em geral, a proteína de fusão imunoestimuladora é produzida por translação de uma sequência codificadora contínua de ácidos nucleicos. No entanto, a proteína de fusão também pode ser produzida por acoplamento químico.

Numa concretização preferida, a componente polipeptídica ou proteica da proteína de fusão é a sequência do domínio extracelular distal de membrana madura HER-2 apresentada como SEQ. ID. NO: 23.

A invenção proporciona uma composição de uma proteína de fusão imunoestimuladora que consegue uma resposta imunológica mediada por células T, induzida em células dendríticas.

Num aspecto, a composição de proteína de fusão imunoestimuladora inclui a proteína de fusão imunoestimuladora tal como se descreveu acima, bem como células dendríticas superactivadas por exposição *in vitro* a uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção.

A invenção também proporciona um método *in vitro* para a produção de DC superactivadas, expondo as DC a uma proteína de fusão imunoestimuladora, de um modo que seja eficaz para resultar numa resposta imunológica celular à componente de sequência polipeptídica ou proteica da proteína de fusão.

A invenção também proporciona uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção, para utilização na imunoterapia de cancros primários ou de metástases que estejam associados a um antigénio específico. Obtêm-se as DC de um doador humano, exposto a uma proteína de fusão

imunoestimuladora da invenção de um modo e durante um período que sejam eficazes resultando em DC superactivadas carregadas com antígenos. Estas últimas são então destinadas a serem administradas a um sujeito que tenha um cancro associado à expressão da componente polipeptídica ou proteica da proteína de fusão imunoestimuladora, resultando num crescimento imunoterapêutico de respostas inibidoras do crescimento contra o tumor, quer um cancro primário, quer as metástases. Nestes casos, a administração destas DC superactivadas pode ser levada a cabo em combinação com a administração de uma proteína de fusão imunoestimuladora ao paciente.

Noutra técnica relacionada, a invenção proporciona a utilização da proteína de fusão imunoestimuladora da invenção ou de DC superactivadas tal como se descreveram acima, para tratar um cancro quando o cancro esteja associado à expressão de um antígeno específico. Deste modo, deve administrar-se a proteína de fusão imunoestimuladora da invenção a um paciente ao qual se diagnosticou um cancro, de um modo eficaz para resultar numa resposta imunológica à componente com sequência polipeptídica ou proteica da proteína de fusão.

Numa concretização exemplificativa destes aspectos da invenção, o cancro é o carcinoma da mama, o cancro do ovário ou o cancro do cólon, e a componente antigénica polipeptídica ou proteica da proteína de fusão imunoestimuladora é a sequência com domínio extracelular da

membrana distal HER-2 madura apresentada como SEQ. ID. NO: 23.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 mostra a resposta do hibridoma celular de células T CD8⁺ dependente do MHC de classe I de murganhos que segregam interleuquina-2 (IL-2), B3Z [específico para o péptido imunodominante SIINFEKL (Jameson *et al.*, 1993, J. Exp. Med. **177**: 1541) derivado da "OVA" da ovalbumina de frango], a diversos antigénios (Ag) apresentados por células dendríticas (DC) superactivadas singénicas. CPM refere-se a contagens por minuto; cpm refere-se a uma diferença entre o valor absoluto de cpm para um determinado grupo em teste e o valor de cpm de fundo, obtido na ausência do Ag solúvel (na experiência que se descreve adiante, este último era de 9.581). A composição dos diversos antigénios é indicada na figura e descrita adiante.

A Figura 2A mostra os resultados de uma experiência dirigida ao efeito de uma imunização prévia com DC superactivadas pulsadas com Ag, sobre a sobrevivência de murganhos, até 42 dias depois de serem provocados com células de tumor, utilizando

"Nenhum" (quadrados abertos), "HER300*• rGM-CSF" (triângulos a cheio) e HER500*• orGM-CSF (círculos abertos), antigénio imunizante.

A Figure 2B mostra resultados de outra experiência dirigida ao efeito de uma imunização prévia com DC superactivadas pulsadas com Ag, sobre a sobrevivência de murganhos, até 77 dias depois de serem provocados com células de tumor, utilizando "Nenhum" (círculos a aberto, 7 murganhos), "HER500*" (quadrados a aberto, 7 murganhos), HER500*• rGM-CSF (triângulos a cheio, 8 murganhos), "HER500" (círculos a cheio, 7 murganhos), e HER500•hGM-CSF (losangos a cheio, 7 murganhos), antigénios imunizantes.

A Figura 3 mostra os resultados de uma experiência dirigida ao efeito de uma imunização após a infecção, com DC superactivadas pulsadas com Ag sobre a sobrevivência de murganhos (10/grupo) até 63 dias após injeção de células de tumor, utilizando "Nenhum" (quadrados a cheio), "HER500*• rGM-CSF" (triângulos a cheio), HER500 (losangos a cheio), e "HER500• hGM-CSF" (círculos abertos) antigénios imunizantes.

Descrição Pormenorizada da Invenção

I. Definições

A não ser aonde se indicar algo em contrário, os termos adiante têm os significados seguintes:

Tal como se utiliza neste documento, "apresentação de antígenos proteicos solúveis no contexto das moléculas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC I)" significa o antígeno proteico solúvel ou os seus fragmentos, são apresentados em conjunto com moléculas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade à superfície da célula e podem servir como indutor e como alvo de CTL de classe I restringidos a antígenos.

Tal como se utiliza neste documento, o termo "pulsar" significa expor APC a antígeno durante um período de tempo suficiente para promover a apresentação do antígeno referido à superfície da APC.

Tal como se utiliza neste documento, o termo "células que apresentam antígenos modificados " (APC modificadas) ou "células dendríticas modificadas" (DC modificadas) refere-se a uma população de APC ou de DC, respectivamente, que foi tratada (pulsada) *ex vivo* de um modo eficaz para resultar numa maior capacidade de apresentar antígeno no contexto da Classe I do MHC em

relação a APC ou a DC que não tenham sido modificadas daquele modo.

O termo "mais eficientemente", quando utilizado neste documento em relação às apresentações de antigénios proteicos solúveis, significa pelo menos um aumento para o dobro do valor da resposta detectável das células T, após apresentação de um antigénio proteico solúvel pelas APC. Por exemplo, isto significa que se detecta um aumento de pelo menos para o dobro da intensidade da resposta da resposta das células T após apresentação a um determinado antigénio de um número determinado de APC, em relação à intensidade da resposta das células T obtida quando é apresentado um antigénio ou diferente pelo mesmo número de APC nas mesmas condições de cultura e a uma concentração equimolar de Ag.

Tal como se utiliza neste documento, "células que apresentam antigénios" (APC) são quaisquer células que, depois de serem pulsadas com Ag, conseguem activar linfócitos T.

Tal como se utiliza neste documento, "células dendríticas", ou "DC", são o subconjunto mais potente de APC, que são tipicamente células grandes envoltas por um véu que quando são cultivadas *in vitro* apresentam prolongamentos.

Tal como se utiliza neste documento, "DC activadas" são DC maduras que conseguem estimular células T ajudantes CD4⁺, mas não células T citotóxicas CD8⁺ (CTL).

Tal como se utiliza neste documento, "DC superactivadas" são DC maduras que conseguem estimular células T citotóxicas CD8⁺ (CTL).

Tal como se utiliza neste documento, o termo "aloestimulador" significa capaz de estimular células T alogénicas devido a diferenças entre as moléculas do MHC expressas à superfície celular.

Um "antigénio" ou "Ag" refere-se a uma substância que reage por si só ou no contexto de moléculas do MHC, com os produtos de uma resposta imunológica (por exemplo, anticorpos, células T receptoras) que foram estimulados por um imunogénio específico. Incluem-se portanto nos antigénios os imunogénios específicos que originam a resposta (por exemplo, péptidos antigénicos, proteínas ou polissacáridos), bem como as entidades contendo ou expressando os imunogénios específicos (*por exemplo*, vírus, bactérias, etc.).

Tal como se utiliza neste documento, "imunogénio" refere-se a uma substância que é capaz de estimular ou de induzir um anticorpo humoral e/ou uma resposta imunológica mediada por células.

"DC carregadas com Ag", incluem DC e diversos tipos de PBMC, incluindo APC profissionais e monócitos/macrófagos, que tenham sido expostas a um antígeno ou tenham sido activadas pelo Ag. As DC podem tornar-se carregadas com Ag *in vitro*, por exemplo, por cultura *ex vivo* na presença de um Ag tumoral, ou *in vivo*, por exposição a um antígeno de um tumor.

Tal como se utiliza neste documento, o termo "célula dendrítica superactivada" refere-se a DC ou a precursores de DC precursores que tenham sido tratadas *ex vivo* de uma tal forma que apresentem uma maior capacidade de apresentar antígenos no contexto da classe I de MHC, em relação às DC não tratadas.

Tal como se utilizam neste documento, os termos "composição de proteína de fusão imunoestimuladora" e "composição de proteína de fusão antigénica", podem ser utilizados de um modo intercambiável e referem-se a uma proteína de fusão da invenção que inclua uma sequência componente antigénica e uma componente do domínio intracelular de HER-2 por si só e/ou DC que tenham sido expostas a uma tal proteína de fusão, tal como se descreve melhor adiante.

Tal como se utiliza neste documento, "OVA" refere-se a ovalbumina nativa; "*" refere-se ao péptido imunodominante derivado de OVA, SIINFEKL; "HER500" refere-se à proteína de fusão recombinante HER-2 constituída por

uma metade da sua porção extracelular fundida a 1/4 da sua parte intracelular; "HER500*" à proteína de fusão recombinante humana feita a partir de HER500 e do péptido imunodominante derivado de OVA, SIINFEKL inserido entre as suas componentes extracelular e intracelular; "HER500*• rGM-CSF" refere-se à proteína de fusão recombinante constituída por HER500* e factor estimulante de colónias de granulócitos/macrófagos de rato (GM-CSF); "HER500• hGM-CSF" refere-se à proteína de fusão recombinante constituída por HER500 e GM-CSF humano; e "HER300*• rGM-CSF" refere-se à proteína de fusão recombinante humana HER-2 constituída por metade da sua porção extracelular fundida ao péptido imunodominante derivado de OVA, SIINFEKL, e a GM-CSF de rato, tal como se resume adiante.

Por "resposta mediata por células T protectoras" pretende significar-se a actividade de células T que leva a um abrandamento ou a uma diminuição do crescimento das células cancerosas ou de um tumor sólido, ou a uma diminuição do número total de células cancerosas ou do peso total de tumor.

Por célula "de cancro ou tumor" significa-se uma célula que exhibe uma perda do controlo do crescimento e forma clones inusitadamente grandes de células. As células cancerosas ou tumorais em geral perderam a inibição de contacto e podem ser invasivas e/ou têm a capacidade de se metastatizar.

"Antigénios tumorais" refere-se a Ag associados a um tipo específico de cancro ou de tumor, incluindo Ag associado ao tumor e Ag específico para o tumor. Na Secção IIA adiante proporcionam-se exemplos de antigénios tumorais.

Tal como se utiliza neste documento, o termo "resultado terapêutico melhorado" em relação a um paciente canceroso, refere-se a um abrandamento ou a uma diminuição do crescimento das células cancerosas ou de um tumor sólido, ou a uma diminuição do número total de células cancerosas ou do peso total do tumor.

Tal como se utiliza neste documento, o termo "melhorar o resultado terapêutico", em relação a um sujeito ao qual foi diagnosticado ser portador de uma doença infecciosa, refere-se a um abrandamento ou a uma diminuição do crescimento do agente infeccioso que a provoca no sujeito e/ou a uma diminuição de, ou uma eliminação de, sintomas detectáveis tipicamente associados à doença infecciosa específica.

II. Resposta Imunológica a Antigénios Peptídicos Solúveis

Em sistemas experimentais, os linfócitos T citotóxicos específicos para os antigénios tumorais (CTL) são o mecanismo imunológico mais potente para a eliminação de tumores. Podem induzir-se os CTL quer *in vivo* com

vacinas, quer gerá-los *in vitro* e depois voltar a infundi-los no organismo portador do tumor. A indução de CTL *in vivo* é tipicamente levada a cabo por imunização com vírus ou células, vivos (Tanaka, *et al.*, J. Immunol., (1991), **147**, 3646-52, Wang, *et al.*, J. Immunol., (1995), 4685-4692).

Com a excepção de algumas poucas proteínas virais tais como o antígeno T grande de SV-40 e o antígeno da superfície da Hepatite B, a injeção de proteínas isoladas ou solúveis não origina a indução das CTL (Schirmbeck, *et al.*, Eur. J. Immunol., (1993), **23**, 1528-34). Induzem-se as CTL quando uma proteína entra no caminho da classe I do complexo principal de histocompatibilidade ("MHC I" ou "classe I") de processamento de antígenos. Para entrar neste caminho a proteína tem que estar presente no citossol de uma célula apresentadora de antígenos (APC). Aí ela é degradada a péptidos que são então transportados para o retículo endoplásmico, aonde se associam a moléculas HLA de classe I. Estes péptidos são então apresentados em conjunto com as moléculas da classe I à superfície da célula e podem servir como indutores e alvos de CTL restritos, específicos e alvejantes da classe I. Do ponto de vista fisiológico, só as proteínas que são sintetizadas endogenamente pela APC entram neste caminho.

A iniciação de uma resposta imunológica expande-se e activa linfócitos "nêscios", isto é, aqueles que não haviam anteriormente visto um imunógeno, a tornar-se

células "efectivadoras" que respondem activamente. Cada célula néscia tem o potencial para ver um e só um epítopo de antigénio, uma situação análoga a uma chave que entra numa fechadura. Só aquelas células que reconhecem o seu epítopo designado é que se tornam células efectivadoras.

As células T podem ser do tipo "ajudante" ou do tipo "citotóxico" (citotóxicas). As células T ajudantes segregam factores de crescimento para células linfóides, que estimulam a activação e a função de das células B e das T. As células T citotóxicas reconhecem e matam, quer directa quer indirectamente, as células que expressem um determinado antigénio. Tal como as células B, cada célula T tem receptores específicos para um único epítopo antigénico. Os receptores das células T reconhecem fragmentos de proteínas que são apresentados sobre a superfície celular pelos complexos principais de histocompatibilidade (MHC).

Há dois tipos diferentes de proteínas MHC, as da Classe I e as da Classe II, ambas as quais apresentam às células T fragmentos de degradação proteolítica de proteínas. As moléculas da Classe I que estão expressas na maior parte das células do corpo, apresentam fragmentos de proteínas endogenamente sintetizadas às células citotóxicas. As moléculas da Classe II que estão expressas em células especializadas que apresentam antigénios (APC) tais como os macrófagos, os monócitos, as células dendríticas e as células B apresentam fragmentos proteicos

às células T ajudantes. (Chen, CH e Wu, TC, J. Biomed. Sci., **5**(4): 231-52 1998).

Na maior parte dos casos, as moléculas da Classe I apresentam proteínas com origem exterior sintetizadas numa célula. Para apresentação pela Classe II, a proteína estranha pode ser sintetizada na célula ou adquirida pela célula a partir do exterior (isto é, apresentada sob a forma de uma proteína livre ou de um péptido). Quando um antígeno é sintetizado numa célula e apresentado tanto pelas moléculas de Classe I como pelas de Classe II, são produzidas células B produtoras de anticorpos e células T citotóxicas. No entanto, se um antígeno com origem exterior à célula for expresso apenas pela Classe II, então a resposta imunológica é largamente limitada apenas a células T ajudantes, e à produção de anticorpos. [THE SCIENTIFIC FUTURE OF DNA FOR IMMUNIZATION, American Academy of Microbiology, Robinson, et al., Editores, 1-29, 1997].

A resposta típica contra antígenos proteicos solúveis é portanto uma resposta mediada pela Classe II. A invenção presente representa composições e métodos que permitem a antígenos proteicos solúveis entrar no caminho de apresentação da Classe I.

Além disto, algumas das descendentes das células T estimuladas com antígenos não se desenvolvem a células efectivadoras, mas tornam-se células de memória que são capazes de sobreviver durante longos períodos de tempo na

ausência de novas provocações com antígenios. Estas células de memória são quiescentes e não produzem moléculas efectivadoras a não ser que sejam estimuladas por antígeno. (Veja-se , por exemplo, Abbas, AK et al., Editores, CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY, W.B. Saunders Co., páginas 116-123; 130-134, 1997).

As células T néscias (ou células T que não foram anteriormente expostas a um determinado antígeno) necessitam apenas da molécula correcta de restrição ao MHC I para sobreviverem, no entanto para se expandirem, elas também têm que ser expostas a antígeno. Em contraste, as células T de memória têm um limiar de activação funcional mais baixo, que facilita respostas secundárias que são mais rápidas e mais fortes do que as das células T néscias.

A. Antígenios Polipeptídicos

A invenção presente baseia-se na verificação de que as composições imunoestimuladoras que contenham uma componente polipetídica antigénica e uma sequência componente derivada do domínio intracelular da proteína HER-2 são eficazes para gerar uma resposta protectora induzida por DC, mediada por células T, contra o antígeno polipeptídico.

Os antígenios polipeptídicos com interesse específico são aqueles que estão associados a células de cancro, de tumores e/ou de agentes infecciosos.

Por exemplo, "antigénios específicos para tumores" e "antigénios associados a tumores" que são característicos de um determinado tipo de tecido, incluindo tecidos tumorais particulares, encontram utilidade nas proteínas de fusão imunoestimuladoras da invenção. Incluem-se como exemplos de antigénios tumorais, sem que eles se limitem a estes, HER-2/neu; fosfato de ácido prostático (PAP); MART-1 (associado ao melanoma; Coulie, *et al.*, J. Exp. Med. **180**: 35, 1994; Hawakami, *et al.*, PNAS **91**: 3515, 1994; Bakker, *et al.*, J. Exp. Med. **179**: 1005, 1994); os precursores de antigénios de rejeição de tumores, MAGE, BAGE e GAGE; NY-ESO (clonado de um cancro do esófago); SART-3 (um antigénio de carcinoma de células escamosas), antigénios de imunoglobulina específicos de determinados linfomas de células B, antigénios associados a tumores tais como o antigénio carcinoembriónico (CEA), p53, c-myc, molécula de adesão de células neurais (N-CAM) e mucina epitelial polimórfica (PEM), para além de qualquer uma de entre diversas proteínas expressas nas células tumorais.

Também têm interesse antigénios específicos de determinados agentes infecciosos, por exemplo, agentes virais incluindo, mas não se limitando a, o vírus da imunodeficiência humana (HTV), o vírus da hepatite B (HBV), a gripe, o vírus do papiloma humano (HPV), a febre (os coxsackievírus), o vírus da raiva, o vírus herpes simplex (HSV), e os agentes que provocam gastroenterite, incluindo os rotavírus, os adenovírus, os calicivírus, os astrovírus

e o vírus de Norwalk; agentes bacterianos incluindo, mas não se limitando a, *E. coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, *Hemophilus influenzae*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Streptococcus pneumoniae*, agentes fúngicos e parasitas tais como a *Giardia*.

HER-2, um Antígeno Exemplar para Utilização em Proteínas de Fusão Imunoestimuladoras

Os tumores malignos expressam diversas proteínas, incluindo moléculas que pertencem ao conjunto das moléculas ligadas à transformação, tais como o oncogene HER-2/Neu/ErbB-2.

De igual modo, foram identificados antígenos peptídicos produzidos pelo oncogene que são comuns a tipos específicos de tumor. Estes polipéptidos podem ser utilizados como reagentes que em geral estimulam respostas por parte de células T, eficazes para reagirem contra tumores que sejam portadores desses antígenos. O antígeno produzido pelo oncogene, HER-2/neu (Beckmann et al., Eur. J. Cancer **28**:322, 1992) está associado aos cânceros da mama e ginecológicos humanos.

A associação de uma sobre-expressão de HER-2 em células cancerosas com fenótipos malignos com a quimio-resistência é consistente com maus resultados clínicos para

pacientes com tumores que sobre-expressem HER-2. Quanto se segue é um breve resumo da sobre-expressão de HER-2 associada a diversos cancros:

A amplificação e a sobre-expressão do gene HER-2 está presente em cerca de 25-30 % dos cancros primários da mama e está associada a consequências clínicas desfavoráveis. Os estudos *in vitro* da sobre-expressão de HER-2 promoviam uma regulação em baixa do receptor de estrogénio (ER) em células de tumor da mama dependentes de estrogénio (Pietras *et al.*, 1995, *Oncogene* **10**: 2435), consistente com dados clínicos que mostravam que a sobre-expressão de HER-2 está associada ao fenótipo ER-negativo (Zeillinger *et al.*, 1989, *Oncogene* **4**: 109; Adnane *et al.*, 1989, *Oncogene* **4**: 1389), e o falhanço da terapia com tamoxifen em pacientes com sobre-expressão de HER-2 (Wright *et al.*, 1992, *Br. J. Cancer* 65:118).

Um estudo em pacientes com cancro colo-rectal demonstrou que o nível de expressão de HER-2 se correlacionava com a progressão do cancro colo-rectal, com o período isento de recaídas e com o período de tempo de sobrevivência após a cirurgia, e podia servir como factor de prognóstico independente nos cancros colo-rectais positivos em relação a HER-2 (Kapitanovic *et al.*, 1997, *Gastroenterology* **112**: 1103).

A expressão da proteína HER-2 também tem sido descrita como um indicador independente para o prognóstico

em cancros do ovário (Slamon *et al.*, 1989, Science **244**: 707) e do endométrio (Saffari *et al.*, 1995, Cancer Res. **55**: 5693).

A sobre-expressão de HER-2 em células NIH/3T3 resultou numa transformação celular e no crescimento de tumores em murganhos atímicos (Di Fiore *et al.*, 1987, Science **237**: 178; Hudziak *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 7159). Experiências em células e com animais mostraram que o aumento da actividade da tirosina quinase em HER-2 aumentava a expressão de fenótipos malignos (Hudziak *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 7159; Muller *et al.*, 1988, Cell **54**: 105; Yu & Hung, 1991, Oncogene **6**: 1991; Yu *et al.*, 1993, Cancer Res. **53**: 891; Zhau *et al.*, 1996, Prostate **28**: 73). Murganhos transgénicos sobre-expressando o oncogene c-neu activado promovido por um promotor de tumores da mama em murganhos, desenvolviam de forma síncrona múltiplos tumores da mama envolvendo por a totalidade das glândulas (Muller *et al.*, 1988, Cell **54**: 105).

A sobre-expressão de HER-2 também foi reportada como induzindo resistência a fármacos quimioterapêuticos em NSCLC, adenocarcinoma gástrico e cancro da mama (Tsai *et al.*, 1993, J. Natl. Cancer Inst. **85**: 897; Tsai *et al.*, 1995, J. Natl. Cancer Inst. **87**: 682; Paik *et al.*, 1991, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. **32**: 291; Wright *et al.*, 1992, Br. J. Cancer **65**: 118).

Os antigénios peptídicos e polipeptídicos de HER-2 podem ser isolados, sintetizados ou expressos de forma recombinante, seguindo métodos conhecidos na técnica. A sequência de ADN codificando para HER-2/Neu/ErbB-2 pode ser obtida junto do GenBank sob o N° de Acesso M11730 (mARN humano c-erb-B-2).

Tais antigénios isolados de HER-2 podem ser complexados com uma de entre diversas moléculas que aumentam a resposta imunológica, tal como se descreve adiante, quer quimicamente, quer como proteínas de fusão produzidas de forma recombinante, seguindo métodos bem conhecidos na técnica.

III. Proteína de Fusão Imunoestimuladoras

A invenção presente baseia-se na detecção de que as proteínas de fusão imunoestimuladoras que incluem uma componente com a sequência polipeptídica de um antigénio e uma sequência componente derivada do domínio intracelular da proteína HER-2 são eficazes para gerar uma resposta imunológica protectora induzida por DC e mediada por células T, contra a componente antigénica da proteína de fusão.

Um domínio intracelular exemplificativo da proteína HER-2 é apresentado neste documento, no entanto deverá entender-se que fragmentos mais curtos da sequência exemplificativa também podem apresentar actividade. O que é

da máxima importância é que se demonstrou que uma componente da sequência derivada do domínio intracelular da proteína HER-2 contribuía para a actividade imunoestimuladora das proteínas de fusão que contêm componentes com essa sequência.

Uma proteína de fusão imunoestimuladora construída na invenção também pode incluir uma ou mais sequências componentes seleccionadas de entre o conjunto constituído por GM-CSF, uma sequência repórter tal como o octapéptido imunodominante derivado de OVA, SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), uma ou mais sequências peptídicas de sinalização e um marcador sintético para purificação, por exemplo, uma sequência de aminoácidos adicionada ao terminal C.

As proteínas de fusão imunoestimuladoras exemplificativas construídas que se descrevem neste documento têm uma sequência de sinalização com 32 aminoácidos de PAP¹, uma sequência com 3 aminoácidos de PAP maduras², uma sequência de sinalização com 3 aminoácidos de HER-2³, e quer uma sequência de aminoácidos de marcação para purificação no terminal C contendo 9 aminoácidos, incluindo três alaninas consecutivas e seis histidinas consecutivas, quer uma sequência de aminoácidos de marcação para purificação no terminal C contendo 15 resíduos de aminoácidos e incluindo glicina, alanina, 4 prolina consecutivas, três alaninas consecutivas, e seis histidinas

consecutivas, com as características resumidas na Tabela 1, adiante.

¹ 32 aminoácidos correspondendo aos aminoácidos 1 a 32 do N° de Acesso do Genbank NM_001099.

² 3 aminoácidos correspondendo aos aminoácidos 33 a 35 do N° de Acesso do Genbank NM_001099.

³ 3 aminoácidos correspondendo aos aminoácidos 19 a 21 do N° de Acesso do Genbank M11730

Tabela 1. Componentes das Proteínas de Fusão
Exemplificativas de HER-2.

Construção	Sequência extracelular de HER-2 ⁴	SIINFEKL (OVA ₂₅₇₋₂₆₄)	Sequência intracelular de HER-2 ⁵	GM-CSF
HER500	+	-	+	-
HER500•hGM-CSF	+	-	+	127 aa (humana)
HER500*	+	+	+	-
HER500*• rGM-CSF	+	+	+	127 aa (do rato)
HER300*• rGM-CSF	+	+	-	127 aa (do rato)
⁴ 289 aminoácidos correspondendo aos aminoácidos 22 a 310 do N° de Acesso do Genbank M11730				
⁵ 217 aminoácidos correspondendo aos aminoácidos 1038 a				

Construção	Sequência extracelular de HER-2 ⁴	SIINFEKL (OVA ₂₅₇₋₂₆₄)	Sequência intracelular de HER-2 ⁵	GM-CSF
1254 do N° de Acesso do Genbank M11730				

Entender-se-á que uma proteína de fusão incluindo uma sequência polipeptídica antigénica como componente e uma sequência componente derivada do domínio intracelular da proteína HER-2 é por si só eficaz para gerar uma resposta imunológica induzida por DC e mediada por células T, contra a componente antigénica da proteína de fusão.

Portanto, a sequência SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), a sequência de sinalização de PAP, a sequência de aminoácidos de PAP madura, a sequência de sinalização de HER-2, e a sequência peptídica de marcação do terminal C que se exemplificaram acima não são necessárias para que se gere uma tal resposta.

As proteínas de fusão imunoestimuladoras da invenção podem ser modificadas ligando-as, de forma covalente ou não covalente, a uma molécula repórter. São conhecidas na técnica muitas moléculas repórter e a selecção de repórteres determina o formato do ensaio. Por exemplo, tal como se pormenoriza no Exemplo 1, o octapéptido imunodominante SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) derivado de OVA foi incorporado nas construções de fusão de HER-2 imunoestimuladoras exemplificativas e avaliou-se a apresentação antigénica destas construções. Em suma,

estimulou-se com DC que haviam sido pulsadas previamente com as construções de fusão de HER-2, o hibridoma B3Z de células T de rato que segrega IL-2, o qual responde ao SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), quando está ligado a MHC e classe I de rato, e avaliou-se a intensidade da resposta medindo a incorporação de [³H]timidina em células proliferantes dependentes de IL-2, a título de indicadores da apresentação do antígeno.

Incluem-se nos exemplos adicionais de proteínas de fusão para utilização na prática da invenção, sem que a estas elas se limitem, as que incluem a sequência de um antígeno de cancro directamente fundida aos 217 aminoácidos do domínio intracelular da membrana distal de HER-2, sem componentes de ligação adicionais nem péptidos marcadores. Incluem-se nos exemplos de tais proteínas de fusão, sem que a estes eles se limitem: uma proteína de fusão constituída por 180 aminoácidos do antígeno autoimunogénico de cancro dos testículos humano, NY-ESO-1 (aminoácidos 1 a 180 do N° de Acesso do GenBank U87459), fundidos aos 217 aminoácidos do domínio intracelular da membrana distal de HER-2 (aminoácidos 1038 a 1254 do N° de Acesso do GenBank M11730), apresentados neste documento como SEQ ID NO: 27, cuja sequência de codificação é apresentada como SEQ ID NO: 28); uma proteína de fusão contendo os 962 aminoácidos do antígeno do carcinoma de células escamosas, SART3-IC (aminoácidos 1 a 962 do N° de Acesso do GenBank AB020880), fundidos aos 217 aminoácidos do domínio intracelular da membrana distal de HER-2

(aminoácidos 1038 a 1254 do N° de Acesso do GenBank M11730), apresentada neste documento como SEQ ID NO: 29, cuja sequência de codificação é apresentada como SEQ ID NO: 30).

Tal como se sabe na técnica, também se pode produzir um péptido recombinante por uma fusão com um polipéptido heterólogo, tal como uma sequência de sinalização ou outro polipéptido que tenha um local de clivagem específico no terminal N da proteína madura ou do polipéptido. Em geral, a sequência de sinalização é específica para o vector/sistema celular do hospedeiro que se utilizar para expressar a proteína recombinante.

Os polipéptidos recombinantes ou proteínas de fusão que incluam uma sequência de marcação, colocada por exemplo no terminal de amino ou no de carbonilo do polipéptido, também são conhecidos na técnica. A sequência de sinalização permite uma detecção fácil do polipéptido, recorrendo a um anticorpo contra o marcador, e assim facilita a purificação do polipéptido por afinidade.

O factor de estimulação de colónias de granulócitos-macrófagos, (GM-CSF), tem sido incluído nas construções de fusão exemplificativas da invenção. O GM-CSF, uma glicoproteína com uma massa molecular aparente de cerca de 23-33.000 por SDS-PAGE, é uma citocina com função pleiotrópica tanto na hematopoiese como em imunologia. Demonstrou-se que os GM-CSF humanos e de rato se ligam às

células das linhagens monócito-macrófago, neutrófilo e eosinófilo. Quando se liga GM-CSF a receptores de elevada afinidade, resulta uma rápida internalização e degradação da GM-CSF (Metcalf e Nicola em THE HEMOPOIETIC COLONY-STIMULATING FACTORS, Cambridge University Press, NY (1995)). O efeito imunoestimulador de um complexo polipeptídico essencialmente constituído por GM-CSF e um antígeno polipeptídico é descrito também no USN 08/579,823 (permitido), que se incorpora expressamente neste documento por citação. Os GM-CSF humano e de rato são sintetizados com uma sequência de 17 aminoácidos hidrofóbica de liderança que é clivada por proteólise durante a secreção. Os polipéptidos maduros têm um comprimento de 127 aminoácidos, e podem inspeccionar-se as sequências respectivamente nos N^{os}. de Acesso do GenBank NM_000758 e U00620.

Entender-se-á que a sequência extracelular de HER-2⁶ que se descreve neste documento é um exemplo de uma sequência antigénica que se pode incorporar numa proteína de fusão imunoestimuladora da invenção. Em consequência pode-se de uma forma semelhante incorporar um de entre diversos antígenos associados a células tumorais ou a agentes infecciosos, numa proteína de fusão imunoestimuladora da invenção, que seja eficaz para gerar uma resposta imunológica protectora induzida por DC e mediada por células T, contra a componente antigénica da proteína de fusão. Na Secção IIA, acima, estão descritos mais em pormenor exemplos de antígenos.

⁶ 289 aminoácidos correspondendo aos aminoácidos 22 a 310 do N° de Acesso do Genbank M11730

Exemplos de Composições Antigénicas de HER-2

Uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção é fabricada por ligação química entre a sequência componente de antígeno e a sequência componente derivada do domínio intracelular da proteína HER-2, ou por expressão de uma sequência de codificação recombinante e contínua de ácidos nucleicos que é expressa sob a forma de uma proteína de fusão. Também se pode utilizar ligação química ou expressão de proteína recombinante para se incorporarem sequências peptídicas adicionais na proteína de fusão, por exemplo, uma sequência repórter, uma sequência de um péptido de sinalização e/ou um marcador para purificação.

São descritos adiante exemplos de sequências de codificação contínuas de ácidos nucleicos derivados de HER-2 humana, que estão expressas como proteínas de fusão.

A construção HER500 utilizada como exemplo (SEQ ID NO: 6) foi produzida por expressão de uma sequência de codificação incluindo, na direcção de 5' para 3': a sequência de codificação para uma sequência de sinalização de 32 aminoácidos de PAP, a sequência de codificação para uma sequência de 3 aminoácidos da proteína PAP madura, um agente de ligação Ala Arg, a sequência de codificação para

uma sequência de 3 aminoácidos, de sinalização de HER-2, a sequência de codificação para os 289 aminoácidos do domínio extracelular da membrana distal de HER-2 madura, a sequência de codificação para os 217 aminoácidos do domínio intracelular da membrana distal de HER-2 e a sequência de codificação para três alaninas consecutivas, e seis histidinas consecutivas.

A construção exemplificativa HER500• hGM-CSF (SEQ ID NO: 7) foi fabricada por expressão de uma sequência de codificação incluindo na direcção de 5' para 3': a sequência de codificação para uma sequência de 32 aminoácidos de sinalização da PAP, a sequência de codificação para uma sequência de 3 aminoácidos da proteína PAP madura, um agente de ligação Ala Arg, a sequência de codificação para uma sequência de 3 aminoácidos, de sinalização de HER-2, a sequência de codificação para os 289 aminoácidos do domínio extracelular da membrana distal de HER-2 madura, a sequência de codificação para os 217 aminoácidos do domínio intracelular da membrana distal de HER-2, um agente de ligação Ala Ala, a sequência de codificação para GM-CSF madura humana (127 resíduos), e a sequência de codificação para glicina, alanina, quatro prolinas consecutivas, três adeninas consecutivas, e seis histidinas consecutivas.

A construção exemplificativa HER500* (SEQ ID NO: 8) foi fabricada por expressão de uma sequência de codificação incluindo na direcção de 5' para 3': a

sequência de codificação para uma sequência de 32 aminoácidos de sinalização da PAP, a sequência de codificação para uma sequência de 3 aminoácidos da proteína PAP madura, um agente de ligação Ala Arg, a sequência de codificação para uma sequência de 3 aminoácidos, de sinalização de HER-2, a sequência de codificação para os 289 aminoácidos do domínio extracelular da membrana distal de HER-2 madura, a sequência de codificação para os 217 aminoácidos do domínio intracelular da membrana distal de HER-2, um agente de ligação Ala, a sequência de codificação para o octapéptido imunodominante SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) derivado de OVA, a sequência de codificação para os 217 aminoácidos do domínio intracelular da membrana distal de HER-2, três alaninas consecutivas, e seis histidinas consecutivas.

A construção exemplificativa HER500*• rGM-CSF (SEQ ID NO: 9) foi produzida por expressão de uma sequência de codificação incluindo na direcção de 5' para 3': a sequência de codificação para uma sequência de 32 aminoácidos de sinalização da PAP, a sequência de codificação para uma sequência de 3 aminoácidos da proteína PAP madura, um agente de ligação Ala Arg, a sequência de codificação para uma sequência de 3 aminoácidos, de sinalização de HER-2, a sequência de codificação para os 289 aminoácidos do domínio extracelular da membrana distal de HER-2 madura, um agente de ligação Ala, a sequência de codificação para o octapéptido imunodominante derivado de OVA, SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), a sequência de codificação para

os 217 aminoácidos do domínio intracelular da membrana distal de HER-2, um agente de ligação Ala Ala, a sequência de codificação para GM-CSF madura de rato (127 resíduos), e a sequência de codificação para glicina, alanina, quatro prolinas consecutivas, alanina, e seis histidinas consecutivas.

A construção exemplificativa HER300*• rGM-CSF (SEQ ID NO: 10) por expressão de uma sequência de codificação incluindo na direcção de 5' para 3': a sequência de codificação para uma sequência de 32 aminoácidos de sinalização da PAP, a sequência de codificação para uma sequência de 3 aminoácidos da proteína PAP madura, um agente de ligação Ala Arg, a sequência de codificação para uma sequência de 3 aminoácidos, de sinalização de HER-2, a sequência de codificação para os 289 aminoácidos do domínio extracelular distal da membrana de HER-2 madura, um agente de ligação Ala, a sequência de codificação para o octapéptido imunodominante derivado de OVA, SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), um agente de ligação Ala Ala, a sequência de codificação para GM-CSF madura de rato (127 resíduos), e a sequência de codificação para glicina, alanina, quatro prolinas consecutivas, alanina, e seis histidinas consecutivas.

Os métodos para a produção de proteínas de fusão imunoestimuladoras por ligação química de uma sequência de um antigénio com uma sequência derivada do domínio intracelular da proteína HER-2 incluem as técnicas de

acoplamento convencionais já conhecidas. Nas construções que também incluïrem uma ou mais sequências peptídicas adicionais, também se leva a cabo a ligação química recorrendo a processos de acoplamento convencionais conhecidos na técnica. Por exemplo, podem acoplar-se os péptidos utilizando um agente desidratante tal como a diciclohexil-carbodi-imida (DCCI), para se formar uma ligação peptídica entre ambos os péptidos. Em alternativa, podem formar-se as ligações através de grupos sulfidrilo, de grupos amino em epsilon, de grupos carboxilo ou de outros grupos reactivos presentes nos polipéptidos, recorrendo a reagentes comercialmente disponíveis. (Pierce Co., Rockford, IL).

IV. Produção de proteínas de fusão recombinantes

A invenção inclui proteínas de fusão imunoestimuladoras produzidas utilizando técnicas recombinantes. Pode produzir-se uma proteína de fusão imunoestimulante destas por qualquer um de diversos métodos empregues rotineiramente pelos especialistas da técnica.

A não ser aonde se indicar algo em contrário, todos os termos utilizados neste documento têm o mesmo significado que teriam para um especialista da técnica relevante. Recomenda-se em especial aos interessados na prática da invenção Sambrook *et al.* (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Segunda Edição), Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., e Ausubel *FM et al.* (1989)

CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, N.Y., aonde encontrarão as definições e as técnicas utilizadas rotineiramente pelos especialistas da técnica.

Podem produzir-se as proteínas de fusão cultivando células hospedeiras procariotas ou eucariotas incluindo sequências de ácido nucleico que codifiquem para as proteínas de fusão, seguindo-se a recuperação da proteína de fusão a partir da célula hospedeira ou do meio de cultura.

A sequência de ácido nucleico que codifica para uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção é inserida num de entre uma multiplicidade de vectores de expressão, para expressar um polipéptido, desde que seja replicável e viável no hospedeiro. Em geral, a sequência de ácido nucleico de codificação é inserida num (ou em mais do que um) local de endonuclease de restrição apropriado, utilizando técnicas de rotina. Considera-se que estes processos e os processos relacionados de sub-clonagem se encontram ao alcance dos especialistas da técnica. O vector pode incluir sequências de regulação, incluindo por exemplo, sequências não codificantes, tais como intrões e elementos de controlo, isto é, elementos promotores e de terminação, ou regiões 5' e/ou 3' não traduzidas, eficazes para a expressão da sequência de codificação num hospedeiro adequado e/ou num ambiente do vector ou do hospedeiro na qual a sequência de codificação para a proteína de fusão

imunoestimuladora não se encontra normalmente expressa, operacionalmente ligado à sequência de codificação. São conhecidos muitos vectores e promotores na técnica, que se encontram comercialmente disponíveis, exemplos dos quais são descritos em Sambrook, *et al.*, (*supra*).

A invenção presente também diz respeito a células hospedeiras que tenham sido objecto de engenharia genética para conterem um vector eficaz para expressar uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção por técnicas recombinantes. As células hospedeiras são processadas por engenharia genética (isto é, são transduzidas, transformadas ou transfectadas) com um vector apropriado que pode ser, por exemplo, um vector de clonagem ou de expressão. O vector pode assumir a forma de um plasmídeo, de uma partícula viral, de um fago, etc. As condições de cultura, tais como a temperatura, o pH e outras semelhantes, são as utilizadas em rotina para a célula hospedeira seleccionada para a expressão, e serão aparentes aos especialistas da técnica.

Também são conhecidos dos especialistas da técnica métodos para se introduzirem ácidos nucleicos em células para a expressão de proteínas heterólogas. Incluem-se como exemplos a transfecção com fosfato de cálcio, a transfecção mediada por DEAE-Dextrana, a electroporação, a microinjecção nuclear, a fusão de protoplastos bacterianos com células intactas, e a utilização de polycatiões, por exemplo, polibreno ou poliornitina. O aspectos gerais da

transformação envolvendo células de mamífero foram descritos na Patente U.S. Nº. 4.399.216, e em Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, **185**: 527-537 (1990), sendo ambas estas obras expressamente incorporadas neste documento, por citação.

Incluem-se nas células hospedeiras adequadas para clonar ou expressar uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção, células procariotas, de levedura, de insecto e células eucariotas de ordem mais elevada. Incluem-se nas procariotas adequadas, sem que a estas elas se limitem, as eubactérias, tais como organismos gram-negativos ou gram-positivos, por exemplo, *E. coli*.

São derivadas de organismos multicelulares células hospedeiras para a expressão de uma proteína de fusão imunoestimuladora glicosilada. Incluem-se nos exemplos de células de invertebrados, as células de insectos tais como *Drosophila* S2 e *Spodoptera* Sf9, bem como células de plantas. Incluem-se nos exemplos de linhas de células hospedeiras úteis, as células de ovário de *hamster* Chinês (CHO) e as células COS. Considera-se que a selecção das células hospedeiras apropriadas está ao alcance dos especialistas da técnica.

Um processo para se produzir uma tal proteína de fusão imunoestimuladora inclui cultivarem-se células hospedeiras em condições adequadas para a expressão da proteína de fusão e recuperar-se a proteína de fusão a

partir da cultura de células. Em geral, podem encontrar-se os princípios, os protocolos, e as técnicas práticas para se maximizar a produtividade em culturas de células no MAMMALIAN CELL BIOTECHNOLOGY: A PRACTICAL APPROACH, M. Butler, editor (IRL Press, 1991) e em Sambrook *et al.*, *supra*. Mais especificamente, estão descritas as técnicas para expressão no sistema de Baculovírus em Engelhard EK *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. **91**: 3224-3227, 1994, que se incorpora expressamente neste documento por citação.

Podem cultivar-se células hospedeiras transformadas com sequências de nucleótidos codificando para uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção em condições adequadas para a expressão e a recuperação da proteína codificada a partir das culturas de células. A proteína produzida por uma célula recombinante pode ser segregada, estar ligada à membrana, ou contida intracelularmente, consoante a sequência e/ou o vector que especificamente forem utilizados.

Tal como os especialistas da técnica entenderão, um vector de expressão contendo um polinucleótido que codifique para uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção pode ser concebido com sequências de sinalização que ditam a secreção da proteína de fusão imunoestimuladora modificada através de uma membrana de uma célula procariota ou eucariota.

No Exemplo 1 pormenoriza-se a construção da proteína de fusão HER-2 imunoestimuladora exemplificativa, apresentando-se a sequência de ácidos nucleicos e a sequência de aminoácidos proteica deduzida na Tabela 2.

Utilizaram-se vectores de expressão incluindo as sequências de codificação para diversas proteínas de fusão de HER-2 para transfectar células 293-EBNA de mamífero, e células SF21 de insecto. Uma vez construídas, expressas e purificadas, testaram-se as proteínas de fusão de HER-2 contendo quer GM-CSF de rato, quer GM-CSF humano para determinar as suas bioactividades GM-CSF, em ensaios adequados que os especialistas da técnica utilizam de forma rotineira. Tanto as proteínas de fusão derivadas de células de insecto como de mamífero exibiam actividade como GM-CSF, tal como o comprovava a sua capacidade de suportar o crescimento de linhas celulares dependentes de GM-CSF. De uma forma semelhante, verificou-se a presença de HER-2 utilizando anticorpos monoclonais específicos contra HER-2, tanto em análise por transferência Western como num teste ELISA, seguindo métodos bem conhecidos na técnica.

Embora a descrição que antecede diga respeito a concretizações específicas da invenção presente, entender-se-á que as pessoas com conhecimentos da técnica podem substituir a sequência de codificação para diversos antigénios, e podem utilizar diferentes vectores e linhas de células para a expressão, seguindo métodos conhecidos, preparando destes modos composições da proteína de fusão

imunoestimuladora de acordo com os princípios que são estabelecidos neste documento.

Quer seja produzida por métodos de acoplamento químicos, quer pela expressão de uma sequência de codificação contínua, sob a forma de uma proteína de fusão recombinante, as DC podem ser expostas a uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção, que pode ser apresentada pelas DC referidas, no contexto do MHC I, resultando numa resposta imunológica celular à proteína de fusão.

V. Geração de Células Dendríticas Activadas (DC)

A. Isolamento e Caracterização de Precursores de DC e de DC

Podem obter-se precursores de células dendríticas humanas (precursores de DC) a partir de uma de entre uma série de origens, incluindo mas não se limitando a sangue periférico, sangue da espinha, medula óssea e órgãos linfóides.

Os precursores de DC isolados e enriquecidos por um de entre diversos métodos conhecidos na técnica podem originar uma população de precursores de DC eficaz para se levarem a cabo os métodos da invenção presente.

Numa via preferida, obtêm-se precursores de DC do sangue periférico. Nesta via, recolhem-se células mononucleares de sangue periférico (PBMC) a partir de doadores saudáveis por leucaferese como habitual, e isolam-se os precursores de DC, por exemplo, quer por uma centrifugação de densidade capaz de boiar num só passo ou e dois passos, utilizando uma solução de densidade capaz de boiar BDS 77, ou BDS 77 e 65, respectivamente (Dendreon Corp.), tal como descrito na USSN 60/168, 991 (0021), em propriedade.

Podem obter-se precursores de DC a partir de um sujeito saudável ou de um sujeito de que se sabe sofrer de uma doença associada à expressão de um antigénio específico. Estes precursores de DC podem ser alogénicos ou autólogos.

Uma vez obtidos os precursores de DC, eles são cultivados em condições apropriadas e durante um período de tempo suficiente para se expandir a população de células e manter as DC' num estado em que a absorção de antigénios seja óptima, bem como o processamento e a apresentação.

Numa via preferida de cultura dos precursores de DC, geram-se as DC a partir desses precursores de DC por cultura *ex vivo* em meio isento de soro ou de proteína, durante 40 horas, na ausência de citoquinas exógenas adicionadas, tal como se pormenoriza na USSN 60/158,618, em propriedade. Em suma, cultivam-se os precursores de DC

em sacos em teflon (American Fluoroseal) a uma densidade de 1×10^7 por mL em meio Aim V suplementado com glutamina 2 mM, numa incubadora humidificada, a 37°C e sob 5 % de CO₂ durante 40 horas. Durante o período de cultura pulsam-se os precursores de DC com Ag.

Incluem-se nos aspectos preferidos do isolamento e da cultura de DC, a utilização de um meio de cultura isento de citocinas fornecidas exogenamente, e a cultura em condições de isenção de soro de um modo eficaz para resultar na produção de DC superactivadas carregadas com Ag.

A pureza das DC nesta fracção pode ser quantificada utilizando, por exemplo, uma análise por citometria de fluxo (isto é, FACS) da caracterização fenotípica, tal como se descreveu mais em pormenor na USSN 60/158,618 em propriedade, em conjunto com a sua caracterização funcional. Leva-se a cabo a análise fenotípica da superfície das células utilizando amostras constituídas por cerca de $1-3 \times 10^7$ células, que se incubam em soro de murganho a 10 % normal em PBS, durante 10 minutos, se lavam com PBS e se voltam a suspender em 250-750 µL de PBS. Distribui-se então a suspensão de células a 30 µL/poço, em placas de 96 poços com fundo redondo. Adicionam-se Ab conjugados com FITC, PE, e PerCP, a 10 µL/poço, e incubam-se as células durante 20 minutos, às escuras e sobre gelo. Lavam-se então as células com 200 µL/poço de PBS e volta a suspender-se em PBS a 400 µL/poço,

depois analisa-se num FACScan (Becton Dickinson) utilizando células marcadas com Ab de igual isotipo como controlo negativo. Incluem-se nas características funcionais preferidas das DC maduras, a aquisição de capacidades aloestimuladoras e de apresentação de Ag.

As DC superactivadas carregadas com Ag já processaram um Ag e têm a capacidade de apresentar o Ag às células imunes, gerando rapidamente respostas imunológicas específicas contra Ag, por exemplo repostas de células T mediadas por CTL a antigénios tumorais.

De acordo com outro aspecto da invenção, as DC podem ser conservadas por crioconservação, tanto antes como depois da sua exposição à proteína de fusão de HER-2 da invenção. São descritos mais em pormenor métodos exemplificativos de crioconservação na USSN 60/168,991, em propriedade. Para uma crioconservação em pequena escala, podem voltar a suspender-se as células a $20\text{--}200 \times 10^6/\text{mL}$ em albumina de soro humano a 5 % previamente arrefecida (HAS) (Cruz Vermelha Suíça). Adicionou-se-lhe então gota a gota um volume igual de 20 % de sulfóxido de dimetilo (DMSO) na mesma solução de HAS descrita acima. Distribui-se a mistura em alíquotas em pequenos tubos, a 1 mL/tubo, e congela-se a -80°C de um dia para o outro numa câmara crioscópica (Nalgene). Transferem-se os tubos para um tanque com azoto líquido na manhã seguinte. Para crioconservação em grande escala, pode voltar a fazer-se uma suspensão das células a $30\text{--}600 \times 10^6/\text{mL}$ em AIM V. Adiciona-se então gradualmente o

mesmo volume de AIM V a 20 %. Congela-se a mistura em contentores para congelação (Cryocyte, Baxter) a 20 mL/saco, utilizando um sistema de congelação com velocidade controlada (Forma).

B. Avaliação da Antigenicidade das Proteínas de Fusão

Apresentação de Antígeno *In Vitro*

Pode utilizar-se um ensaio de apresentação de antígenos para se avaliar a capacidade de apresentação de antígenos de diversas proteínas de fusão imunoestimuladoras. Descreve-se um ensaio exemplificativo no Exemplo 1, em que o hibridoma B3Z de células T de murganho segregando IL-2, que responde ao péptido derivado de OVA SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄; Jameson *et al.*, 1993, J. Exp. Med. **177**: 1541) ligado a MHC de classe I (H2-K^b) de rato, é estimulado com diversas DC que haviam sido previamente pulsadas com proteínas de fusão HER-2 geneticamente modificadas, e avalia-se a intensidade da resposta medindo a incorporação de [³H]timidina em células proliferantes dependentes de IL-2.

O formato de ensaio que se descreveu pode ser utilizado para se avaliar a apresentação de antígenos utilizando uma titulação do antígeno em conjunto com um número determinado de APC.

B. Ensaaios in vivo em modelos em animais

Pode avaliar-se uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção *in vivo* em modelos em animais. Nesses casos, uma imunização prévia dos animais com a composição de proteína de fusão imunoestimuladora, ou com DC superactivadas tratadas *ex vivo* com a composição é eficaz para suprimir *in vivo* o crescimento de tumores ou de um agente infeccioso.

Num exemplo desta via, uma imunização prévia de murganhos com DC activadas previamente pulsadas com a composição de proteína de fusão de HER-2, HER500*• rGM-CSF (SEQ ID NO: 4), que tem uma componente antigénica constituída pelos 289 aminoácidos derivados do domínio extracelular de HER2 fundidos aos 217 aminoácidos derivados do domínio intracelular de HER2, suprimia o crescimento *in vivo* de tumores autólogos expressando HER-2, em murganhos (Exemplo 2). Noutra aproximação, inoculam-se animais, por exemplo murganhos, com um agente infeccioso específico ou com células que formam tumores, e depois tratam-se com uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção e avalia-se a capacidade da composição antigénica para suprimir *in vivo* o crescimento do agente infeccioso ou de um tumor estabelecido.

O Exemplo 3 ilustra esta aproximação, na medida em que se a injeção em murganhos previamente infectados, de DC activadas pulsadas *ex vivo* com as composições de

proteína de fusão de HER-2, HER500*• rGM-CSF (SEQ ID NO: 4), HER500• hGM-CSF (SEQ ID NO: 2), HER500* (SEQ ID NO: 3), e HER500 (SEQ ID NO: 1), aumentava o período de sobrevivência dos murganhos que haviam sido previamente inoculados com células tumorais autólogas expressando HER-2.

Os resultados dos estudos em animais confirmam que para se gerar uma resposta anti-tumoral eficaz, uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção tem que conter uma componente com uma sequência antigénica e uma componente com uma sequência derivada do domínio intracelular de HER-2.

VI. Composições e Métodos para Imunoterapis e para Terapia do Cancro

A invenção presente proporciona composições com proteína de fusão imunoestimuladora que são capazes de apresentar antigénios de uma forma eficaz para a indução de respostas proliferativas, tanto com células T CD8⁺ mediadas por CTL, como com CD4⁺.

Tal e qual, podem utilizar-se as composições de proteína de fusão imunoestimuladora da invenção presente que são universalmente úteis, nua série de aplicações imunoterapêuticas, imunoprolifáticas e de terapia do cancro, envolvendo a criação de respostas imunológicas primárias e secundárias.

A invenção também proporciona antígenos polipeptídicos ou proteicos solúveis modificados apresentados no contexto do MHC de Classe I.

Numa concretização preferida, uma imunização com um antígeno proteico modificado solúvel da invenção resulta numa resposta imunológica celular mediada pelo MHC de Classe I contra um antígeno que não originaria uma resposta imunológica celular com a mesma intensidade, se fosse proporcionado sob uma forma não modificada.

A imunização com um tal antígeno proteico solúvel modificado resulta numa resposta imunológica celular mediada por MHC de Classe I, cuja intensidade é maior e que portanto proporciona uma maior protecção do que uma resposta imunológica celular contra o mesmo antígeno, caso fosse proporcionado sob uma forma não modificada.

Numa concretização preferida, a invenção proporciona uma composição imunoestimuladora incluindo DC expostas *ex vivo* a uma proteína de fusão imunoestimuladora que inclua uma sequência polipeptídica antigénica e uma sequência componente derivada do domínio intracelular da proteína HER-2, tal como se descreveu acima, que é capaz de induzir respostas por células T mais eficazes, do que uma composição incluindo apenas o antígeno polipeptídico por si só.

Uma composição imunoestimuladora incluindo DC expostas *ex vivo* a uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção por si só, ou em combinação com a proteína de fusão imunoestimuladora, encontra utilidade em imunoterapia de um sujeito, e pode funcionar como uma vacina.

Num aspecto relacionado, a invenção inclui um método de se imunizar um sujeito contra um antigénio peptídico associado a um determinado tipo de cancro ou de doença infecciosa. O método inclui exporem-se as DC ou pulsarem-se, com uma composição de uma proteína de fusão imunoestimuladora, tal como se descreve adiante em mais pormenor.

Na prática dos métodos da invenção, o passo de exposição pode ser levado a cabo *in vitro* (*ex vivo*), *in vivo* ou tanto *in vitro* como *in vivo*. Por exemplo, pode injectar-se uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção directamente num sujeito ou podem expor-se DC à proteína de fusão imunoestimuladora *in vitro*, de um modo eficaz para induzir a apresentação à superfície celular da componente antigénica da proteína de fusão, devolvendo-se as DC pulsadas ao sujeito.

Pode utilizar-se uma composição antigénica contendo uma proteína de fusão imunoestimuladora por si só, ou em combinação com DC estimuladas por uma exposição *in vitro* à proteína de fusão imunoestimuladora, por exemplo, numa administração directa *in vivo*, em terapia somática ex

vivo, em dispositivos implantáveis *in vivo* ou em dispositivos extra-corporais *ex vivo*.

Entender-se-á que se pode utilizar um qualquer de entre muitos métodos para se pulsarem as DC com uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção, para as tornar eficazes na apresentação de antígenos no contexto do MHC I. As experiências que se pormenorizam neste documento demonstram que a activação das DC por exposição a uma proteína de fusão imunoestimuladora facilita o processamento da componente antigénica da proteína de fusão através do caminho "endógeno" da classe I, de tal modo que os antígenos sejam apresentados em associação com moléculas de classe I de MHC, e sejam portanto também capazes de activar as CTL CD8⁺.

De quanto antecede, entender-se-á que a invenção proporciona composições e métodos que têm a característica única de que o processamento de antígenos proteicos solúveis ocorre através do caminho da Classe I do MHC I, e não pelo da Classe II.

VII. Aplicações Terapêuticas

A. Exposição de DC *ex vivo* a Composições de Proteína de Fusão Imunoestimuladora

A invenção baseia-se no facto de se ter verificado que as DC podem ser expostas a uma composição de

proteína de fusão imunoestimuladora, quer *in vitro* (ex vivo), quer *in vivo*, num sujeito, resultando numa resposta protectora mediada por células T contra a componente antigénica da proteína de fusão.

Tratam-se as DC *in vitro* (ex vivo) com uma composição de proteína de fusão imunoestimuladora, seguindo-se a sua administração ao sujeito. O sujeito pode ser o mesmo indivíduo do qual se obtiveram as DC (transplantação autóloga) ou um indivíduo diferente (transplantação alogénica). Na transplantação alogénica, o doador e o receptor são emparelhados com base na semelhança dos seus antígenios HLA para se minimizar a resposta imunológica tanto das células do doador como de receptor, umas contra as outras.

Pode tratar-se um sujeito com uma composição de proteína de fusão imunoestimuladora da invenção apenas, ou em combinação com um regime terapêutico tipicamente utilizado para o estado que se está a tratar, por exemplo terapia de radiação e/ou quimioterapia para o tratamento do cancro.

Em geral, os precursores são obtidos, cultivados em condições de isenção de soro, num meio que não contém citocinas fornecidas exogenamente, tal como se descreveu acima, seguindo-se uma exposição *in vitro* (ex vivo) das DC a uma composição de proteína de fusão imunoestimuladora da

invenção, seguindo-se uma re-infusão das DC activadas no sujeito.

A infusão da composição *ex vivo* de proteína de fusão imunoestimuladora com DC tratadas, proporciona um meio para uma geração rápida de uma resposta imunológica à componente antigénica da proteína de fusão.

B. Administração *in vivo* de uma Composição de Proteína de Fusão Imunoestimuladora

Noutro aspecto, a invenção inclui métodos para se tratar um sujeito administrando-lhe *in vivo* uma composição de proteína de fusão imunoestimuladora da invenção.

Numa concretização, o sujeito tem um tipo de cancro que expressa um antigénio específico para o tumor. De acordo com a invenção presente, pode fazer-se uma proteína de fusão imunoestimuladora que inclui uma sequência componente de antigénio específico para o tumor e uma sequência componente derivada do domínio intracelular de HER-2. Nesses casos, administram-se DC pulsadas *ex vivo* com esta proteína de fusão imunoestimuladora a um sujeito, por si só ou em combinação com a proteína de fusão, melhorando o resultado terapêutico para o sujeito, tal como se poderá ver, por exemplo, por um mais lento crescimento ou uma diminuição do crescimento das células cancerosas ou de um tumor sólido que expresse o antigénio específico para

o tumor, ou uma diminuição do número total de células cancerosas ou da carga tumoral total.

Numa concretização relacionada, foi diagnosticada ao sujeito uma infecção viral, bacteriana, fúngica ou outro tipo de infecção, que está associada com a expressão de um determinado antigénio, por exemplo, um antigénio viral. De acordo com a invenção presente, pode fazer-se uma proteína de fusão imunoestimuladora que inclua uma sequência componente constituída pelo antigénio, por exemplo, um antigénio específico de HBV, em conjunto com uma sequência componente derivada do domínio intracelular de HER-2. Em tais casos, administram-se ao sujeito DC pulsadas *ex vivo* com a proteína de fusão imunoestimuladora, por si só ou em combinação com a proteína de fusão, melhorando o resultado terapêutico para o sujeito, tal como se poderá ver por uma diminuição do crescimento do agente infeccioso responsável no sujeito e/ou por uma diminuição de, ou uma eliminação de, sintomas detectáveis tipicamente associados especificamente com aquela doença infecciosa.

Em qualquer situação, a administração *in vivo* de uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção a um sujeito proporciona um meio de gerar uma resposta imunológica protectora induzida por DC, mediada por células T, contra o antigénio no sujeito, dependendo de (1) a composição antigénica administrada, (2) a duração, a dose e a frequência da administração, e (2) o estado geral do sujeito.

Num exemplo, o sujeito tem um cancro que expressa HER e a administração de uma composição de uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção que inclua HER2 a título de componente antigénica da proteína de fusão proporciona um meio de se melhorar o resultado terapêutico para o sujeito. Nesta concretização, administra-se a composição imunoestimuladora de HER-2 ao sujeito de um modo eficaz para resultar numa resposta imunológica celular contra as células cancerosas que expressam HER-2, no sujeito.

C. Tratamento dos Pacientes

Uma veiculação eficiente da composição da proteína de fusão imunoestimuladora é um aspecto importante da invenção. De acordo com a invenção, tais vias de veiculação incluem, embora se não limitem a, diversas vias sistémicas, incluindo vias parenterais, por exemplo, injeção por via endovenosa (IV), subcutânea (SC), intraperitoneal (IP), e intramuscular (IM).

Entender-se-á que também são encarados métodos eficazes para veicular uma proteína de fusão imunoestimuladora a células dendríticas ou para introduzir uma proteína de fusão imunoestimuladora ou uma composição de DC num local muito próximo das células que expressem o antígeno.

Numa concretização preferida, a composição imunoestimuladora é uma proteína de fusão, contida num veículo aceitável do ponto de vista farmacêutico, e veiculado por via endovenosa. Num aspecto adicional desta concretização, a composição de proteína de fusão imunoestimuladora é administrada a intervalos regulares durante um período de tempo curto, por exemplo, a intervalos de duas semanas ao longo de dois meses ou menos. No entanto, em alguns casos administra-se a composição de proteína de fusão intermitentemente ao longo de um período de tempo mais longo.

Tipicamente, administra-se uma ou mais doses da proteína de fusão imunoestimuladora, em geral de duas em duas semanas e durante um período de cerca de dois meses. As doses preferidas para uma administração pelas vias IV, SC ou IM são de entre 5 µg/kg por paciente e cerca de 5 mg/kg por paciente.

Noutra concretização preferida, A composição imunoestimuladora inclui DC expostas *ex vivo* a uma proteína de fusão imunoestimuladora, contida num veículo aceitável do ponto de vista farmacêutico, e veiculada por uma via IV, SC ou IM.

Num aspecto desta concretização, a composição de proteína de fusão imunoestimuladora inclui entre 10^7 e 10^{11} DC, que foram expostas a entre 100 ng/mL e 1 mg/mL de uma determinada proteína de fusão imunoestimuladora, de um modo

eficaz para gerar DC carregadas com Ag, tal como se descreve nos Exemplos 2 e 3. Administram-se então doses de entre cerca de 10^7 e 10^{11} DC ao sujeito por injeção endovenosa ou SC ou IM, seguindo procedimentos bem estabelecidos durante um período de tempo curto, por exemplo a intervalos de duas em duas semanas ao longo de 2 meses ou menos. No entanto, em alguns casos, administra-se a composição de proteína de fusão imunoestimuladora intermitentemente ao longo de um período de tempo mais longo.

Administra-se tipicamente uma ou mais doses da composição de proteína de fusão imunoestimuladora, em geral a intervalos regulares durante um período de cerca de 2 meses. Em geral, o método inclui administrar-se a um sujeito, num veículo farmacêutico adequado, uma quantidade de uma composição de proteína de fusão imunoestimuladora ou de DC, eficaz para melhorar o resultado terapêutico para o paciente que está a ser tratado.

Pode consequentemente administrar-se a composição de proteína de fusão imunoestimuladora ou de DC num qualquer veículo conveniente, que seja fisiologicamente aceitável. Uma tal composição de proteína de fusão imunoestimuladora ou de DC pode incluir qualquer um de entre uma série de veículos padrão fisiologicamente aceitáveis empregues pelos indivíduos com conhecimentos médios da técnica. Incluem-se nos exemplos desses veículos farmacêuticos, sem que estes se limitem a eles, soro

salino, soro salino tamponizado com fosfato (PBS), água e solução de Ringer. Entender-se-á que a escolha de um veículo fisiologicamente aceitável variará dependendo do modo de administração que se houver seleccionado.

No âmbito deste pedido também se consideram composições com libertação prolongada. Estas podem incluir matrizes poliméricas semipermeáveis sob a forma de artigos com formas definidas, tais como películas ou microcápsulas.

Nas aplicações preferidas do método, o sujeito é um sujeito humano. O sujeito pode também ser um paciente com cancro, em especial um paciente a quem foi diagnosticado um cancro que expresse um antigénios específico ou associado ao cancro, e o paciente estar ou não a ser tratado com terapia de radiação e/ou quimioterapia.

Entender-se-á que a dose eficaz *in vivo* da composição de proteína de fusão imunoestimuladora ou de DC da invenção variará consoante a frequência e a via de administração, bem como o estado do sujeito em tratamento. Portanto uma terapia destas *in vivo* necessitará em geral de uma monitorização usando-se testes apropriados para o estado que se examina, levando a um ajustamento da dose correspondente ou do regime de tratamento, para se conseguir um resultado terapêutico óptimo.

D. Monitorização do Tratamento

A eficácia de um determinado regime terapêutico envolvendo os métodos descritos neste documento, pode ser monitorizada, por exemplo, monitorizando a indução de uma resposta por CTL, uma resposta por células T ajudantes, e/ou uma resposta com anticorpos à componente antigénica da proteína de fusão no sangue periférico, utilizando métodos bem conhecidos na técnica além de se monitorizar o estado do cancro e o estado biológico do sujeito, em diversas alturas após essa administração.

Nos casos em que foi diagnosticado ao sujeito um tipo específico de cancro, o estado do cancro também é monitorizado utilizando técnicas de diagnóstico apropriadas para o tipo de cancro em tratamento. De uma forma semelhante, nos casos em que foi diagnosticada ao sujeito uma forma específica de infecção, também se pode monitorizar o estado da infecção utilizando técnicas de diagnóstico apropriadas para o tipo de infecção em tratamento.

O regime de tratamento com a composição de proteína de fusão imunoestimuladora ou com DC pode ser ajustado (dose, frequência, via, etc.), tal como indicado, com base no estado do sujeito em tratamento e nos resultados dos ensaios descritos acima.

VIII. Utilidade

A invenção presente proporciona composições de proteína de fusão imunoestimuladora que são capazes de apresentar eficazmente antígenos para a indução de respostas proliferativas, tanto mediadas por células T CTL CD8⁺ como por células T CD4⁺.

Tal como são, as composições de proteína de fusão imunoestimuladora da invenção são universalmente úteis e podem ser empregues numa larga gama de aplicações imunoterapêuticas, imunoproliféricas e de terapia do cancro, envolvendo gerarem-se respostas imunológicas primárias e secundárias.

As composições de proteína de fusão imunoestimuladora da invenção encontram utilidade na imunoterapia de cancros que estão associados à expressão de um antígeno específico. Por exemplo, as composições da proteína de fusão HER-2 que se descreveram acima podem ser úteis na imunoterapia de tumores que expressem HER-2, tais como o carcinoma da mama, o cancro do ovário e o cancro do cólon.

As vantagens da invenção presente incluem a indução de uma imunidade celular melhorada a antígenos proteicos ou polipeptídicos isolados ou solúveis, através da apresentação de uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção a uma célula dendrítica (DC), resultando na activação das DC. Tal como se descreveu acima, essa indução não se observa em geral utilizando como materiais de

indução antigénios solúveis, proteicos ou polipeptídicos. Pode conseguir-se a activação das DC *in vitro* (*ex vivo*) utilizando DC autólogas ou alogénicas, ou pode ocorrer *in vivo*, após administração de uma proteína de fusão imunoestimuladora da invenção a um sujeito.

Os exemplos que se seguem ilustram a invenção mas não se pretende que a limitem seja de que forma for.

Exemplo 1

Produção de Proteínas de Fusão HER-2

Exemplificativas

Num exemplo, clonou-se HER-2 humana a partir de uma linha de células SK-BR3 seguindo os métodos conhecidos na técnica. Retirou-se o códon de paragem no terminal 3' da sequência por mutação, e inseriu-se um local Not I em vez dele e naquele lugar, para se fundir o cADN de HER-2 ao péptido de marcação do terminal C, ao GM-CSF de rato, ou ao ADN de GM-CSF humano. Clonou-se o ADN de GM-CSF a partir de uma biblioteca PBMC seguindo os métodos conhecidos. Inseriu-se um local Not I no terminal 5' do ADN, e inseriu-se um local de clonagem Xba I no terminal 3', em conjunto com um códon de paragem no quadro. Digeriram-se os cADN gerados por PCR com os enzimas de restrição apropriados e clonaram-se em vectores de restrição para transfecção a linhas de células específicas, de mamíferos ou de insectos.

Utilizaram-se vectores de expressão incluindo as sequências de codificação para diversas proteínas de fusão de HER2, para transfectar células 293-EBNA de mamífero (Invitrogen) (expressão transiente) e células SF21 de insecto (Clontech, Palo Alto, CA). Recuperaram-se produtos de proteína de fusão a partir dos sobrenadantes da cultura de tecidos, e purificaram-se por afinidade por passagem através de uma coluna de afinidade metálica, (resina NTA, Qiagen). Para o HER500-hGM-CSF, uma análise por SDS-PAGE revelou bandas proteicas migrando a 120 kDa e a 110 kDa, respectivamente como produtos de células de mamífero e de insecto. A dimensão prevista para o esqueleto do polipéptido 690 é de 74.877 Da.

Produziram-se proteínas derivadas de HER-2 humano como proteínas recombinantes, utilizando-se as sequências de codificação seguintes.

Produziu-se a construção HER500*• rGM-CSF (SEQ ID NO: 4) por expressão de uma sequência de codificação que incluía, na direcção de 5' para 3': um péptido de sinalização com 32 aminoácidos de PAP, uma sequência de 3 aminoácidos da proteína PAP madura, um agente de ligação Ala Arg, uma sequência de sinalização de HER-2 com 3 aminoácidos, 289 aminoácidos da membrana distal do domínio extracelular de HER-2 madura, um agente de ligação Ala, o octapéptido imunodominante derivado de OVA SIINFEEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), 217 aminoácidos da membrana distal do domínio intracelular de HER-2, um agente de ligação Ala Ala, uma

sequência de 127 aminoácidos GM-CSF de rato maduro, e Gly Ala Pro Pro Pro Pro Ala His His His His His His.

Produziu-se a construção HER300*• rGM-CSF (SEQ ID NO: 5) por expressão de uma sequência de codificação que incluía, na direcção de 5' para 3': um péptido de sinalização com 32 aminoácidos de PAP, uma sequência de 3 aminoácidos da proteína PAP madura, um agente de ligação Ala Arg, uma sequência de sinalização de HER-2 com 3 aminoácidos, 289 aminoácidos da membrana distal do domínio extracelular de HER-2 madura, um agente de ligação Ala, o octapéptido imunodominante derivado de OVA SIINFEEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), um agente de ligação Ala, uma sequência de 127 aminoácidos GM-CSF de rato maduro, e Gly Ala Pro Pro Pro Pro Ala His His His His His His.

Utilizaram-se vectores de expressão BP8 de baculovírus (Clontech) incluindo a sequência de codificação para as proteínas de fusão HER500*• rGM-CSF (SEQ ID NO: 9) ou HER300*• rGM-CSF (SEQ ID NO: 10), para transfectar células SF21. Recuperaram-se os produtos de proteína de fusão a partir dos sobrenadantes da cultura de tecidos, e purificou-se por cromatografia de afinidade para metal. Uma análise por SDS-PAGE revelou bandas proteicas migrando a 105 kDa para HER500*• rGM-CSF e a 60 kDa para HER300*• rGM-CSF.

Uma vez construídas, expressas e purificadas, as moléculas de fusão de HER-2 contendo GM-CSF de rato ou GM-

CSF humano foram testadas quanto à bioactividade de GM-CSF em ensaios apropriados, e verificou-se a presença de HER-2 utilizando anticorpos monoclonais específicos para HER-2, tanto em análise por transferência Western como num teste ELISA, seguindo métodos bem conhecidos na técnica.

Avaliação da apresentação *in vitro* de proteínas de fusão de HER-2

Utilizou-se o hibridoma B3Z de células T de murganho que segrega IL-2, o qual responde ao octapéptido imunodominante derivado de OVA SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄; Jameson et al., 1993, J. Exp. Med. 177: 1541), de classe I de MHC de murganho (H2-K^b), para avaliar a capacidade de apresentação de antigénios das proteínas de fusão de HER-2 contendo o octapéptido imunodominante derivado de OVA SIINFEKL.

Mantiveram-se as culturas de tecido em meio IMDM suplementado com 10 % de FCS, 2 mM em L-glutamina, com 0,1 mg/mL de sulfato de canamicina, 3×10^{-5} M em 2-ME (Gibco, Grand Island, NY) a 37°C, numa atmosfera humidificada contendo 5 % de CO₂ (incubador para cultura de tecidos).

Obtiveram-se preparações enriquecidas em DC activadas incubando células autólogas C57BL/6 de baço em frascos de cultura de tecidos durante 2 h a 37°C, removendo as células não aderentes, e cultivando as células aderentes restantes durante 2 dias com ionomicina 1 µM.

Levou-se a cabo um ensaio de secreção de IL-2 tal como se encontrava anteriormente descrito [Kruisbeek, 1998, em Coligan et al. (editores), Current Protocols in Immunology, Wiley, New York, NY, 1:3.14]. Mais especificamente, cultivaram-se 10^5 células de hibridoma em micropoços de 0,2 mL na presença de 3×10^4 DC activadas e diversas concentrações de antígenos de HER-2. No dia seguinte, recolheram-se os sobrenadantes das culturas e testaram-se a uma concentração de 50 % quanto á sua capacidade para suportarem a proliferação de 10^4 células HT-2 (uma linha de células dependente de IL-2) durante 24 h, tal como se mediu por incorporação de [3 H]timidina durante as últimas 6 h do período de cultura.

A resposta das células B3Z às proteínas de fusão HER300*• rGM-CSF e HER500*• rGM-CSF em relação à OVA (de Grau VII, ovalbumina 99 % pura de frango, adquirida junto da Sigma, St. Louis, MO), foi avaliada *in vitro*. A resposta de proliferação celular indicada como CPM baseados na absorção de 3 H-timidina (Fig. 1), mostrava que as proteínas de fusão HER300*• rGM-CSF e HER500*• rGM-CSF são mais eficientes na estimulação de B3Z do que a OVA nativa ela própria (respectivamente, cerca de 10 vezes e mais do que 100 vezes). A superioridade de 10 vezes da HER500*• rGM-CSF em reacção à HER300*• rGM-CSF indica que uma mais forte apresentação de Ag se correlaciona com a inclusão adicional dos 217 aminoácidos do domínio intracelular de HER-2 na

proteína de fusão (que estão presentes na HER500*• rGM-CSF mas ausentes na HER300*• rGM-CSF).

Exemplo 2

Prevenção do crescimento tumoral *in vivo* por imunização prévia com DC pulsadas com Ag

O efeito de uma imunização prévia com DC activadas pulsadas com HER-2 relativamente à supressão do crescimento *in vivo* de tumores autólogos expressando HER-2 foi avaliado num modelo em murganhos.

Gerou-se a linha de células tumorais de murganho E.HER-2 transfectando células EL-4 (de timoma derivado da estirpe de murganhos C57BL/6; ATCC, Rockville, MD) com o cADN de HER-2 humano de comprimento total, seguindo os métodos padrão.

Produziram-se proteínas derivadas de HER-2 humana sob a forma de proteínas recombinantes, tal como se descreveu anteriormente no Exemplo 1, utilizando as sequências de codificação que se seguem.

A construção HER500 (SEQ ID NO: 1) foi produzida por expressão de uma sequência de codificação que incluía, na direcção de 5' para 3': uma sequência de sinalização de PAP com 32 aminoácidos, uma sequência de 3 aminoácidos da proteína PAP madura, um agente de ligação Ala Arg, 3

aminoácidos da sequência de sinalização de HER-2, 289 aminoácidos do domínio extracelular distal de membrana de HER-2, 217 aminoácidos do domínio intracelular distal de membrana de HER-2, e um marcador do terminal C constituído por Ala Ala Ala His His His His His His.

A construção HER500• hGM-CSF (SEQ ID NO: 2) foi produzida por expressão de uma sequência de codificação que incluía, na direcção de 5' para 3': uma sequência de sinalização de PAP com 32 aminoácidos, uma sequência de 3 aminoácidos da proteína PAP madura, um agente de ligação Ala Arg, 3 aminoácidos da sequência de sinalização de HER-2, 289 aminoácidos do domínio extracelular distal de membrana de HER-2, 217 aminoácidos do domínio intracelular distal de membrana de HER-2, um agente de ligação Ala Ala, uma sequência de 127 aminoácidos de GM-CSF madura humana e um marcador do terminal C constituído por Gly Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ala His His His His His His.

A construção HER500* (SEQ ID NO: 3) foi produzida por expressão de uma sequência de codificação que incluía, na direcção de 5' para 3': uma sequência de sinalização de PAP com 32 aminoácidos, uma sequência de 3 aminoácidos da proteína PAP madura, um agente de ligação Ala Arg, 3 aminoácidos da sequência de sinalização de HER-2, 289 aminoácidos do domínio extracelular distal de membrana de HER-2, um agente de ligação Ala, o octapéptido imunodominante derivado de OVA SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), 217 aminoácidos do domínio intracelular distal de membrana de

HER-2, e um marcador do terminal C constituído por Ala Ala Ala His His His His His His.

A construção HER500*rGM-CSF (SEQ ID NO: 4) foi produzida por expressão de uma sequência de codificação que incluía, na direcção de 5' para 3': uma sequência de sinalização de PAP com 32 aminoácidos, uma sequência de 3 aminoácidos da proteína PAP madura, um agente de ligação Ala Arg, 3 aminoácidos da sequência de sinalização de HER-2, 289 aminoácidos do domínio extracelular distal de membrana de HER-2, um agente de ligação Ala, o octapéptido imunodominante derivado de OVA SIINF EKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), 217 aminoácidos do domínio intracelular distal de membrana de HER-2, um agente de ligação Ala Ala, uma sequência de 127 aminoácidos GM-CSF de rato maduro e um marcador do terminal C constituído por Gly Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ala His His His His His His.

A construção HER300*rGM-CSF (SEQ ID NO: 5) foi produzida por expressão de uma sequência de codificação que incluía, na direcção de 5' para 3': uma sequência de sinalização de PAP com 32 aminoácidos, uma sequência de 3 aminoácidos da proteína PAP madura, um agente de ligação Ala Arg, 3 aminoácidos da sequência de sinalização de HER-2, 289 aminoácidos do domínio extracelular distal de membrana de HER-2, um agente de ligação Ala, o octapéptido imunodominante derivado de OVA SIINF EKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), um agente de ligação Ala, uma sequência de 127 aminoácidos de GM-CSF madura humana e um marcador do terminal C

constituído por Gly Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ala His His His His His His.

Administraram-se a murganhos fêmea com oito semanas de idade C57BL/6 aleatoriamente distribuídos, 3 injeções IP de $2,5 \times 10^5$ DC activadas pulsadas com Agem 0,1 mL de PBS, a intervalos de 2 semanas. Obtiveram-se preparações enriquecidas em DC activadas incubando células C57BL/6 de baço de murganhos fêmea em balões de cultura durante 2 h a 37°C, removendo as células não aderentes, e subsequentemente cultivando as células aderentes restantes durante 2 dias na presença de ionomicina 1 μ M (Sigma, St. Louis, MO; Czerniecki *et al.*, 1997, J. Immunol. **159**: 3823; Ridge *et al.*, 1998, Nature **393**: 474). Pulsaram-se as DC obtidas deste modo co-cultivando-as durante 16 h com cada uma das proteínas de fusão de HER-2 1 μ M, lavou-se duas vezes e injectou-se em murganhos. Duas semanas depois da última imunização *in vivo*, provocaram-se os murganhos com uma injeção IP de 5×10^5 células E.HER-2 em 0,1 mL de PBS. Monitorizaram-se diariamente os murganhos registando-se a sua sobrevivência. Os resultados de duas experiências independentes estão ilustrados respectivamente nas Figs. 2A e 2B.

Enquanto a imunização com DC pulsadas com HER500*• rGM-CSF impedia o crescimento do tumor, o tratamento com HER300*• rGM-CSF não apresentava efeitos (Fig. 2A). Estes resultados são consistentes com os resultados obtidos *in vitro* na medida em que confirmam a

importância do domínio intracelular de HER-2 para se atingir um teor forte de apresentação de Ag de modo a se gerar uma resposta anti-tumoral eficaz. Os resultados experimentais que se ilustram na Fig. 2B demonstram que também se pode gerar o teor significativo de protecção *in vivo* contra um tumor expressando HER-2 (a) quando se fundem imunogénios contendo HER500 com a GM-CSF humana (HER500• hGM-CSF), (b) na ausência de qualquer GM-CSF, quando estão presentes tanto a porção intracelular como a porção extracelular do antigénio HER-2 na construção (HER500 e HER500*), e (c) na ausência do octapéptido derivado de OVA SIINFEKL (HER500 e HER500• hGM-CSF).

Exemplo 3

Supressão *in vivo* de um tumor estabelecido por imunização com DC activadas pulsadas com Ag

Avaliou-se também em pormenor a eficácia da imunoterapia com diversas proteínas de fusão HER-2, através da administração das proteínas de fusão HER-2 a murganhos laboratoriais portadores de tumores (isto é, animais aos quais se haviam previamente injectado células tumorais expressando HER-2). Injectaram-se murganhos com doze semanas de idade, por via IP, 5×10^5 E.HER-2 células em 0,1 mL de PBS no dia 0, seguindo-se 2 injeções IP de $2,5 \times 10^5$ DC activadas pulsadas com Ag em 0,1 mL de PBS (preparadas tal como se descreveu no Exemplo 2), respectivamente um e doze dias mais tarde. Monitorizaram-se diariamente os

murganhos e a sua sobrevivência foi registrada. Tal como se ilustra na Fig. 3, um tratamento com DC pulsadas com as construções antigénicas contendo HER500 (HER500*• rGM-CSF, HER500, e HER500• hGM-CSF), exibiam um notável efeito terapêutico, prolongando consideravelmente a sobrevivência dos murganhos portadores de tumores.

Descrição	SEQ ID NO
Sequência de aminoácidos de HER500:	1
MRAAPLLLLARAASLSLGFLFLLFFWLDRSVLAKELARGAASTQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHLYQG CQVVQGNLELTYPNLSLFLQDIQEVQGYVLIHNPVRQVPLQRLRIVRGTLFEDNYALAVLDNGDPLN NTTPVTGASPGGLRELQRLSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPM CKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPA LVTYNTDTFESMPNPEGRTYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLTLGLEPSEEE APRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPTHDPSPQLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNO PDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERAKTILSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPOGGAAPQHPHPPAFSP AFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPAAAHHHHHHH	
Sequência de aminoácidos de HER500• hGM-CSF:	2
MRAAPLLLLARAASLSLGFLFLLFFWLDRSVLAKELARGAASTQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHLYQG CQVVQGNLELTYPNLSLFLQDIQEVQGYVLIHNPVRQVPLQRLRIVRGTLFEDNYALAVLDNGDPLN NTTPVTGASPGGLRELQRLSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPM CKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPA LVTYNTDTFESMPNPEGRTYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLTLGLEPSEEE APRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPTHDPSPQLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNO PDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERAKTILSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPOGGAAPQHPHPPAFSP AFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPAAPARSPSPSTQWEHVNAIQEARRLLNLSRDT AAEMNETVEISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGLTKLKGPLTMMASHYKQHCPTPETSCATQITFESF KENLKDFLLVIPFDCWEPVQEGAPPPAAHHHHHHH	
Sequência de aminoácidos de HER500*:	3
MRAAPLLLLARAASLSLGFLFLLFFWLDRSVLAKELARGAASTQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHLYQG CQVVQGNLELTYPNLSLFLQDIQEVQGYVLIHNPVRQVPLQRLRIVRGTLFEDNYALAVLDNGDPLN NTTPVTGASPGGLRELQRLSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPM CKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPA LVTYNTDTFESMPNPEGRTYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSASINFEKLGAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLTL GLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPTHDPSPQLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSP QPEYVNOQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERAKTILSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPOGGAAPQ HPHPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPAAAHHHHHHH	
Sequência de aminoácidos de HER500*• rGM-CSF:	4

Descrição	SEQ ID NO
MRAAPLLLARAASLSLGFLLFFWLDRLSVLAKELARGAASTQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHLQYQ CQVVQGNLELTYPNNAASLSLQDIQEVQGYVLIHNVQRVPLQRLRIVRGTLFEDNYALAVLDNGDPLN NTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLDITNRSRACHPCSPM CKGSRWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPA LVTYNTDTFESMPNPEGRTYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSASINFEKLGAGGMVHHRHRSSTRSGGDLTL GLEPSEEEAPRSLAPSEGAGSDVFDGLGMGAAGLQSLPHTDPSPLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSP QPEYVNQPDVVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERAKTILSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPOGGAAPQ HPPAFSPAFLDNLYYWDQPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGDLVPAAPTRSPNPVTRPWKHVDAIKEALS LLNDMRALENEKNEVDIISNEFSIQRPCTVQTRLKLYKQGLRGNLTCLNGALTMIAHYQTNCPPPTPETDCEI EVTTFEDFIKNLKGLFDIPFDCWKPVQKGAPPPPAHHHHHH	
Sequência de aminoácidos de HER300*• rGM-CSF:	5
MRAAPLLLARAASLSLGFLLFFWLDRLSVLAKELARGAASTQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHLQYQ CQVVQGNLELTYPNNAASLSLQDIQEVQGYVLIHNVQRVPLQRLRIVRGTLFEDNYALAVLDNGDPLN NTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLDITNRSRACHPCSPM CKGSRWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPA LVTYNTDTFESMPNPEGRTYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSASINFEKLAAPTRSPNPVTRPWKHVDAIKEALS LLNDMRALENEKNEVDIISNEFSIQRPCTVQTRLKLYKQGLRGNLTCLNGALTMIAHYQTNCPPPTPETDCEI EVTTFEDFIKNLKGLFDIPFDCWKPVQKGAPPPPAHHHHHH	
Sequência de nucleótidos codificando para HER500:	6
ATGAGAGCTGCACCCCTCCTCTGGCCAGGGCAGCAAGCCTTAGCCTTGGCTTCTTGTTCTGCTTTTTT CTGGCTAGACCGAAGTGTACTAGCCAAGGAGTTGGCGCGGGGCGCGCTGACCCAAGTGTGCACCGG CACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCTCTACCA GGGCTGCCAGGTGTGTCAGGGAAACCTGGAACCTACCTACCTGCCACCAATGCCAGCCTGTCTCTCTG CAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAACCAAGTGAGGCAGGTCCCACTGCAG AGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCAAGCTCTTTGAGGACAACATGCGCTGGCGGTGCTAGACCAATGGA GACCCGCTGAACAATACCAACCCCTGTCACAGGGGCTCCCCAGGAGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGA AGCCTCACAGAGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCAAGCTCTGCTACCAAGGACAG ATTTTGTGGAAGGACATCTTCCACAAGAACAACAGCTGGCTCTCAGCTGATAGACACCAACCGCTCTC GGGCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGTGTGCTGGGAGAGAGTTCTGAGGATTGTCA GAGCTGACGCGCACTGTCTGTGCGGTGGCTGTGCGCGCTGCAAGGGGCCACTGCCCACTGACTGTGCTG CATGAGCAGTGTGCTGCGGCTGCACGGGCCCCAAGCACTCTGACTGCTGGCTGCTGCCCTCAACC ACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCCAGCCCTGGTCACCTACAACACAGACACGTTTGAGTCCATGCC CAATCCCGAGGGCCGGTATACATTCGGCGCCAGCTGTGTGACTGCTGTCCCTACAACCTACCTTTCTACG GACGTGGGATCGGGCGCTGGGGGCAATGTTCCACCAAGGACCGCAGCTCATCTACCAGGAGTGGCGGT GGGGACCTGACACTAGGGCTGGAGCCCTCTGAAGAGGAGGCCCCAGGTCTCCACTGGCACCCCTCCGAA GGGGCTGGCTCCGATGTATTTGATGGTGACCTGGGAATGGGGGAGCCAAAGGGGCTGCAAAGCCTCCCC ACACATGACCCAGCCCTTACAGCGGTACAGTGAGGACCCACAGTACCCCTGCCCTCTGAGACTGAT GGCTACGTTGCCCCCTGACCTGCAGCCCCAGCCTGAATATGTGAACCAAGCAGATGTTCCGGCCCAAGC CCCCCTGCCCCGAGAGGGCCCTCTGCTGTGCTGCCGACCTGTGTTGCCACTCTGGAAAGGGCCAAGAC TCTCTCCCCAGGGAAGAAATGGGGTCTGCAAGACGTTTTTGCCTTTGGGGTGGCGTGGAGAACCCGAG TACTTGACACCCAGGGAGGAGCTGCCCCCTAGCCCCACCTCTCTGCTTACAGCCAGCCTTCGACA ACCTCTATTACTGGGACCAAGACCCACAGAGCGGGGGCTCCACCCAGCACCTTCAAAGGGACACCTA CGGCAGAGAACCCAGAGTACCTGGGTCTGGACGTGCCAGCGGCCGACATACCATCACCATCAC	
Sequência de nucleótidos codificando para HER500• hGM-CSF:	7

Descrição	SEQ ID NO
ATGAGAGCTGCACCCCTCCTCTGGCCAGGGCAGCAAGCCTTAGCCTTGGCTTCTTGTTCCTGCTTTTCTTCTGCTAGACCGGCTGCTAGACCGAAGTGTACTAGCCAAGGAGTTGGCGCGCGGGGCGCGTCGACCCAAGTGTGCACCGG CACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCTCTACCA GGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAACCTGGAACCTACCTACCTGCCACCAATGCCAGCCTGTCTTCTCTG CAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAACCAAGTGAGGCAGGTCCCACTGCAG AGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACAACCTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGA GACCCGCTGAACAATACCAACCCCTGTACAGGGGCTCCCCAGGAGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGA AGCCTCACAGAGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCAAGCTCTGCTACCAAGGACAG ATTTTGTGGAAGGACATCTTCCACAAGAACAACAGCTGGCTCTCAGCTGATAGACACCAACCGCTCTC GGGCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGCTGGGGAGAGAGTTCTGAGGATTGTCA GAGCTGACGCGCACTGTCTGTGCCGGTGGCTGTGCCCGCTGCAAGGGGCCACTGCCCACTGACTGTGTC CATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTGCACGGGCCCCAAGCACTCTGACTGCTGGCTGCCTCCACTTCAACC ACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCCAGCCCTGGTCACTACAACACAGACACGTTTGAGTCCATGCC CAATCCCGAGGGCCGGTATACATTGCGGCCAGCTGTGTGACTGCTGTCCCTACAACCTACCTTTCTACG GACGTGGGATCGGGCGCTGGGGCATGTGCCACCACAGGCACCGCAGCTCATCTACCAGGAGTGGCGGT GGGGACCTGACACTAGGGCTGGAGCCCTCTGAAGAGGAGGGCCCCAGGTCTCCACTGGCACCCCTCCGAA GGGCTGGCTCCGATGTATTTGATGGTGACCTGGGAATGGGGGAGCCAAGGGCTGCAAGCCCTCCCC ACACATGACCCAGCCCTCTACAGCGGTACAGTGAGGACCCACAGTACCCCTGCCCTCTGAGACTGAT GGCTACGTGTGCCCCCTGACCTGCAGCCCCAGCCTGAATATGTGAACAGCCAGATGTTCCGCCCCAGC CCCCTTCGCCCCGAGAGGGCCCTCTGCCTGCTGCCCGACCTGCTGGTGGCACTCTGGAAAGGGCCAGAC TCTCTCCCAAGGAAGATGGGGTCTGCAAGACGTTTTCCTTTGGGGGTGCCGTGGAGAACCCCGAG TACTTGACACCCAGGGAGGAGCTGCCCTCAGCCCCACCCCTCTCTGCTTCAGCCAGCCTTCGACA ACCTCTATTACTGGGACCAGGACCCACCAGAGCGGGGGCTCCACCCAGCACCTTCAAAGGGACACCTA CGGCAGAGAACCCAGAGTACCTGGGTCTGAGCTGCCAGCGGCCACCCGCCCGCTCGCCAGCCCCA GCACACAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCGGCTCTCTGAACTGAGTAGAGACA CTGCTGGTAGAGATGTGAATGAACAGTAGAAGTCACTCTCAGAAATGTTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCT ACAGACCCGCTGGAGCTGTACAAGCAGGGCCTGCGGGGAGCCTACCAAGCTCAAGGGCCCCCTTGAC CATGATGCCCAGCCACTACAAACAGCACTGCCCTCCAACCCCGAAACTTCTGTGCAACCCAGATTATC ACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGAACCTGAAGGACTTTCTGCTTGTCTATCCCTTTGACTGCTGGGAGCCAG TCCAGGAGGGCGCCACCCCGCGGGCGCCGACATACCATCACCATCAC	
Sequência de nucleótidos codificando para 8 HER500*:	
ATGAGAGCTGCACCCCTCCTCTGGCCAGGGCAGCAAGCCTTAGCCTTGGCTTCTTGTTCCTGCTTTTCTTCTGCTAGACCGGCTGCTAGACCGAAGTGTACTAGCCAAGGAGTTGGCGCGCGGGGCGCGTCGACCCAAGTGTGCACCGG CACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACCTCTACCA GGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAACCTGGAACCTACCTACCTGCCACCAATGCCAGCCTGTCTTCTCTG CAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAACCAAGTGAGGCAGGTCCCACTGCAG AGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACAACCTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGA GACCCGCTGAACAATACCAACCCCTGTACAGGGGCTCCCCAGGAGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGA AGCCTCACAGAGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCAAGCTCTGCTACCAAGGACAG ATTTTGTGGAAGGACATCTTCCACAAGAACAACAGCTGGCTCTCAGCTGATAGACACCAACCGCTCTC GGGCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGCTGGGGAGAGAGTTCTGAGGATTGTCA GAGCTGACGCGCACTGTCTGTGCCGGTGGCTGTGCCCGCTGCAAGGGGCCACTGCCCACTGACTGTGTC CATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTGCACGGGCCCAAGCACTCTGACTGCCTGGCTGCCTCCACTTCAACC ACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCCAGCCCTGGTCACTACAACACAGACACGTTTGAGTCCATGCC CAATCCCGAGGGCCGGTATACATTGCGGCCAGCTGTGTGACTGCTGTCCCTACAACCTACCTTTCTACG GACGTGGGATCCGCTAGCATCAATTAATTCGAGAAGTTGGGCGCTGGGGCATGGTCCACCAGGCAC CGCAGCTCATCTACCAGGAGTGGCGGTGGGGACCTGACACTAGGGCTGGAGCCCTCTGAAGAGGAGGCC CCCAGGTCTCCACTGGCACCCCTCCGAAGGGGCTGGCTCCGATGTATTGATGGTGACCTGGGAATGGGGG CAGCAAGGGGCTGCAAGCCCTCCCAACATGACCCAGCCCTCTACAGCGGTACAGTGAGGACCCCA CAGTACCCCTGCCCTCTGAGACTGATGGCTACGTTGCCCGCTGACCTGCAGCCCCAGCCCTGAAATATGT GAACAGCCAGATGTTTGGCCCCAGCCCCCTTCGCCCGAGAGGGCCCTCTGCTGTGCTGCCGACCTGCT GGTGCCACTCTGGAAGGGGCCAAGACTCTCTCCCAAGGAAGATGGGGTCTGCAAGACGTTTTCCTTGGC TTTGGGGTGGCTGGAGAACCCCGAGTACTTGACACCCAGGAGGAGCTGCCCTCAGCCCTCAGCCACCCCT CCTCTGCTTCAGCCAGCCTTCGACAACCTCTATTACTGGGACCAGGACCCACCAGAGCGGGGGGCTC CACCCAGCACCTTCAAAGGAGACCTACGCGAGAGAACCCAGAGTACCTGGGTCTGGACGTGCCAGCGG CCGCACATCACCATCACCATCAC	
Sequência de nucleótidos codificando para 9	

Descrição	SEQ ID NO
HBR500* • rGM-CSP:	
ATGAGAGCTGCACCCCTCCTCCTGGCCAGGGCAGCAAGCCTTAGCCTTGGCTTCTTGTTTCTGCTTTT TTTCTGGCTAGACCGAAGTGTACTAGCCAAGGAGTTGGCGCGCGGGGCCGCGCTCGACCCAAAGTGTGC ACCGGCACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACC TCTACCAGGGCTGCCAGGTGGTGCAAGGAAACCTGGAACTCACCTACCTGCCACCAATGCCAGCCT GTCCTTCTGCAAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAACCAAGTGAGGCGAG GTCCCACTGCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACAACTATGCCCTGGCCG TGCTAGACAATGGAGACCCGCTGAACAATACCACCCCTGTACAGGGGCTCCCCAGGAGGCTGCG GGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCACAGAGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCAAG CTCTGCTACCAGGACACGATTTTGTGGAAGGACATCTTCCACAAGAACAACCAAGCTGGCTCTCACAC TGATAGACACCAACCGCTCTCGGGCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGCTGG GGAGAGAGTTCTGAGGATTGTGAGAGCCTGACGCGCACTGTCTGTGCCGGTGGCTGTGCCCGCTGCA AGGGGCCACTGCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGTGCACGGGCCCAAGCACTC TGACTGGCTGGCTGCTCCACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCCAGCCCTGGTCA CCTACAACACAGACACGTTTGTAGTCCATGCCCAATCCCGAGGGCCGGTATACATTCCGGGCCAGCTG TGTGACTGCTGTCCCTACAACCTACCTTTCTACGGACGTGGGATCCGCTAGCATCATTAATTTGAGA AGTTGGGCGCTGGGGGCGATGGTCCACCACAGGCACCGCAGCTCATCTACCAGGAGTGGCGGTGGGGA CCTGACACTAGGGCTGGAGCCCTCTGAAGAGGAGGCCCCAGGTCTCCACTGGCACCCTCCGAAGGG GCTGGCTCCGATGTATTTGATGGTGACCTGGGAATGGGGGCGAGCCAAGGGGCTGCAAAAGCCTCCCA CACATGACCCAGCCCTCTACAGCGGTACAGTGAGGACCCACAGTACCCCTGCCCTCTGAGACTGA TGGCTACGTTGCCCCCTGACCTGCAGCCCCAGCCTGAATATGTGAACAGCCAGATGTTCCGGCC CAGCCCCCTTCGCCCCGAGAGGGCCCTCTGCTGCTGCCCGACCTGCTGGTGCCACTCTGGAAGGG CCAAGACTCTCTCCCAAGGAAGAAATGGGGTCTGTCAAAGACGTTTTCCTTTGGGGGTGCCGTGGA GAACCCCGAGTACTTGACACCCAGGGAGGAGCTGCCCTCAGCCCCACCTCTCTGCTTCAGC CCAGCCTTCGACAACTCTATTACTGGGACCAGGACCCACAGAGCGGGGGGCTCCACCCAGCACCT TCAAAGGGACACCTACGGCAGAGAACCCAGAGTACCTGGGTCTGGACGTGCCAGCGGCCGCCCA CCCGCTCACCAACCTGTACCCCGGCCCTGGAAGCATGTAGATGCCATCAAAGAAGCTCTGAGCCT CCTAAATGACATGCGTGTCTGGAGAACGAAAAGAACGAAGACGTAGACATCATCTAATGAGTTC TCCATCCAGAGGCGGACATGTGTGCAGACCCGCTGAAGCTATACAAGCAGGGTCTACGGGGCAACC TCACCAACTCAATGGCGCCTTGACCATGATAGCCAGCCACTACCAGACGAACCTGCCCTCCAAACCC GGAACTGACTGTGAAATAGAAGTCACCACTTTGAGGATTTATAAAGAACCTTAAAGGCTTTCTG TTTGATATCCCTTTTGAAGCTGCTGGAAGCCGGTCCAGAAAGGCGCGCCACCCCGCCGGCGCATACC ATCACCATCAC	
Sequência de nucleótidos codificando para	10
HER300* • rGM-CSF:	
ATGAGAGCTGCACCCCTCCTCCTGGCCAGGGCAGCAAGCCTTAGCCTTGGCTTCTTGTTTCTGCTTTT TTTCTGGCTAGACCGAAGTGTACTAGCCAAGGAGTTGGCGCGCGGGGCCGCGCTCGACCCAAAGTGTGC ACCGGCACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCGAGACCCACCTGGACATGCTCCGCCACC TCTACCAGGGCTGCCAGGTGGTGCAAGGAAACCTGGAACTCACCTACCTGCCACCAATGCCAGCCT GTCCTTCTGCAAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAACCAAGTGAGGCGAG GTCCCACTGCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACAACTATGCCCTGGCCG TGCTAGACAATGGAGACCCGCTGAACAATACCACCCCTGTACAGGGGCTCCCCAGGAGGCTGCG GGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCACAGAGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCAAG CTCTGCTACCAGGACACGATTTTGTGGAAGGACATCTTCCACAAGAACAACCAAGCTGGCTCTCACAC TGATAGACACCAACCGCTCTCGGGCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGCTGG GGAGAGAGTTCTGAGGATTGTGAGAGCCTGACGCGCACTGTCTGTGCCGGTGGCTGTGCCCGCTGCA AGGGGCCACTGCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGTGCACGGGCCCAAGCACTC TGACTGCTGCTGCTGCCCTCCACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCCAGCCCTGGTCA CCTACAACACAGACACGTTTGTAGTCCATGCCCAATCCCGAGGGCCGGTATACATTCCGGGCCAGCTG TGTGACTGCTGTCCCTACAACCTACCTTTCTACGGACGTGGGATCCGCTAGCATCATTAATTTGAGA AGTTGGGCGCCCCACCCGCTCACCAACCTGTACCCGGCCCTGGAAGCATGTAGATGCCATCAA AGAAGCTCTGAGCCTCTAAATGACATGCGTGTCTGGAGAACGAAAAGAACGAAGACGTAGACAT CATCTCTAATGAGTTCTCCATCCAGAGGCCGACATGTGTGCAAGCCCGCTGAAGCTATACAAGCAG GGTCTACGGGGCAACCTCACCAAACTCAATGGCGCCTTGACCATGATAGCCAGCCACTACCAGACGA ACTGCCCTCCAAACCCCGAAACTGACTGTGAAATAGAAGTCACCACTTTGAGGATTTATAAAGAA CCTTAAAGGCTTTCTGTTTGATATCCCTTTTGAAGCTGCTGGAAGCCGGTCCAGAAAGGCGCGCCACCC CGCGGGCGCATCACCATCACCATCAC	

Descrição	SEQ ID NO
Sequência de sinal PAP com 32 aminoácidos: (correspondendo aos aminoácidos 1 a 32 do número 11 de Acesso no GenBank NM_001099) MRAAPLLLARAASLSLGFLFLLFFWLDRSLA	
Sequência de 3 aminoácidos de PAP maduro: (correspondendo aos aminoácidos 33 a 35 do número 12 de Acesso no GenBank NM_001099) KEL	
Sequência de 3 aminoácidos de sinal de HER-2: (correspondendo aos aminoácidos 19 a 21 do N° de Acesso do GenBank M11730) GAA	13
Sequência de 2 aminoácidos de ligação entre PAP 14 maduro e a sequência do sinal de HER-2: Ala Arg	
Sequência de 9 aminoácidos do terminal C nas 15 construções de HER500 e de HER500*: Ala Ala Ala His His His His His His	
Sequência de 15 aminoácidos do terminal C de 16 HER500-hGM-CSF: Gly Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ala His His His His His His	

Descrição	SEQ ID NO
Sequência de 13 aminoácidos do terminal C de construções HER500* e HER300* GM-CSF de rato: Gly Ala Pro Pro Pro Pro Ala His His His His His His	17
Sequência de aminoácidos de GM-CSF maduro humano: (correspondente aos aminoácidos 18 a 144 do Número de Acesso do GenBank NM_000758) APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDAAEMNETVEISEMFDLQEPCLQTRLELYKQGLRGS LT KLKGPLTMMASHYKQHCPTPETSCATQITFESFKENLKDILLVIPFDCWEPVQE	18
Sequência de nucleótidos do GM-CSF maduro humano: (correspondente aos nucleótidos 60 a 440 do número de Acesso do GenBank NM_000758) GCACCCGCCCGCTCGCCAGCCCGAGCAGCGAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCC GGCGTCTCCTGAACCTGAGTAGAGACACTGCTGCTGAGATGAATGAAACAGTAGAAGTCATCTCAGA AATGTTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCTGGAGCTGTACAAGCAGGCGCTGCGG GGCAGCCTCACCAAGCTCAAGGGCCCTTGACCATGATGGCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCCCTC CAACCCCGGAAACTTCTGTGCAACCCAGACTATCACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGAACCTGAAGGA CTTTCTGCTTGCATCCCTTTGACTGCTGGGAGCCAGTCCAGGAG	19
Sequência de aminoácidos do GM-CSF maduro do rato: (correspondente aos aminoácidos 1 a 127 do Número de Acesso do GenBank U00620) APTRSPNPVTRPWKHVDAIKEALSLNDMRALENEKNEVDIISNEFSIQRPTCVQTRLKLYKQGLRGNLT KLNGALTMIAASHYQTNCPPTPETDCEIEVTTFEDFIKNLKGFLFDIPFDCWKPVQK	20
Sequência de nucleótidos do GM-CSF maduro do rato: (correspondente aos nucleótidos 1 a 381 do Número de Acesso do GenBank U00620) GCACCCACCCGCTCACCAACCTGTACCCGGCCCTGGAAGCATGTAGATGCCATCAAAGAAGCTC TGAGCCTCCTAAATGACATGCGTGCTCTGGAGAACGAAAAGAACGAGTAGACATCATCTCTAA TGAGTTCTCCATCCAGAGGCCGACATGTGTGCAGACCCGCTGAAGCTATACAAGCAGGGTCTACGG GGCAACCTCACAAACTCAATGGCGCCTTGACCATGATAGCCAGCCACTACCAGACGAAGTGCCTC CAACCCCGGAAACTGACTGTGAAATAGAAGTACCACCTTTGAGGATTTCATAAAGAACCTTAAAGG CTTTCTGTTTGATATCCCTTTGACTGCTGGAAGCCGGTCCAGAAA	21

Descrição	SEQ ID NO
Péptido repórter nas construções de HER500* e HER500* GM-CSF de rato: (octapéptido imunodominante derivado de OVA SIINFEKL (OV A ₂₅₇₋₂₆₄))	22
289 aminoácidos do domínio extracelular distal da membrana de HER-2 maduro: (aminoácidos 22 a 310 do Número de Acesso do GenBank M11730) STQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHLVYQGCQVQGNLELTYPNLSLFLQDIQEVQGYVLIHNPQ VRQVPLQLRIVRGTLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQL CYQDTILWKDIFHKNNQLALTLDITNRSRACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPL PTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRTYFGASCVTACPY NYLSTDVGS	23
sequência de codificação para 289 aminoácidos do domínio extracelular distal da membrana de HER-2 maduro: (nucleótidos 214 a 1080 do Número de Acesso do GenBank M11730) AGCACCCAAAGTGTGCACCGGCACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCAGACCCACCTGG ACATGCTCCGCCACCTCTACCAGGGCTGCCAGGTGGTGACGGGAAACCTGGAACCTACCTACCTGCC CACCAATGCCAGCCTGTCTTCTGTCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCAC AACCAAGTGAGGCAGGTCCCACTGCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCACCCAGCTCTTTGAGGACA ACTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGAGACCCGCTGAACAATACCACCCCTGTACAGGGGCTC CCCAGGAGGCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCACAGAGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATC CAGCGGAACCCAGCTCTGCTACCAGGACACGATTTGTGGAAGGACATCTCCACAAGAACAACC AGCTGGCTCTCACACTGATAGACACCAACCGCTCTCGGGCTGCCACCCCTGTCTCCGATGTGTAAG GGCTCCCGCTGCTGGGGAGAGATTCTGAGGATTGTGAGCCTGACGCGCACTGTCTGTGCCGGTG GCTGTGCCCGCTGCAAGGGGCCACTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTGCAC GGGCCCCAAGCACTCTGACTGCCTGGCCTGCCTCCACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCAC TGCCCCAGCCCTGGTCACCTACAACACAGACACGTTTGAGTCCATGCCCAATCCCGAGGGCCGGTATA CATTCGGCGCCAGCTGTGTGACTGCCTGTCCCTACAACCTACCTTTCTACGGACGTGGGATCC	24
217 aminoácidos do domínio distal intracelular da membrana de HER-2: (aminoácidos 1038 a 1254 do Número de Acesso do GenBank M11730) GAGGMVHHRHKSSTKSGGGDLILGLEFSEEEAFKSLAPFSEGAGSDVFDGDLGMGAARKGLQSLFTHDFS PLQRYSEDPVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNPQDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERAKTILSPGKN GVVKDVFAGFGAVENPEYLTTPQGAAPQPHPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEY LGLDVP	25

Descrição	SEQ ID NO
sequência de codificação para 217 aminoácidos do domínio distal intracelular da membrana de HER-2: (nucleótidos 3262 a 3912 do Número de Acesso do GenBank M11730) GGCGCTGGGGGCATGGTCCACCACAGGCACCGCAGCTCATCTACCAGGAGTGGCGGTGGGGACCTGACACTAGGGCTGGAGCCCTCTGAAGAGGAGGCCCCAGGTCTCCACTGGCACCCCTCCGAAGGGGCTGGCTCCGATGTATTTGATGGTGACCTGGGAATGGGGGCAGCCAAGGGGCTGCAAAGCCTCCCCACACATGACCCAGCCCTCTACAGCGGTACAGTGAGGACCCACAGTACCCCTGCCCTCTGAGACTGATGGCTACGTTGCCCCCTGACCTGCAGCCCCAGCCTGAATATGTGAACCAGCCAGATGTTGCGCCCCAGCCCCCTTCGCCCCGAGAGGGCCCTCTGCCTGCTGCCCGACCTGCTGGTGCCACTCTGGAAAGGGCCAAGACTCTCTCCCCAGGGAAGAATGGGGTCGTCAAAGACGTTTTTGCCTTTGGGGGTGCCGTGGAGAACCCCGAGTACTTGACACCCAGGGAGGAGCTGCCCTCAGCCCCACCTCCTCCTGCCTTCAGCCAGCCTTCGACAACCTCTATTACTGGGACAGGACCCACCAGAGCGGGGGGCTCCACCCAGCACCTTCAAAGGGACACCTACGGCAGAGAACCAGAGTACCTGGGTCTGGACGTGCCA	26
Sequência de Aminoácidos NY-ESO-IC: aminoácidos 1 a 180 do N°. de Acesso do GenBank U87459, fundidos aos 217 aminoácidos do domínio distal intracelular da membrana de HER-2 (aminoácidos 1038 a 1254 do N°. de Acesso do GenBank M11730)	27
Sequência do ADN NY-ESO-IC: nucleótidos 54 a 593 do N°. de acesso do GenBank U87459 fundidos à sequência de codificação para os 217 aminoácidos do domínio distal intracelular da membrana de HER-2 (nucleótidos 3262 a 3912 do N°. de Acesso do GenBank M11730):	28
Sequência de Aminoácidos SART3-IC: aminoácidos 1 a 962 do N° de Acesso do GenBank AB020880 fundidos aos 217 aminoácidos do domínio distal intracelular da membrana de HER-2 (aminoácidos 1038 a 1254 do N°. de Acesso do GenBank M11730)	29
Sequência do ADN SART3-IC: nucleótidos 20 a 2905 do N° de Acesso do GenBank AB020880 fundidos à sequência de codificação para os 217 aminoácidos do domínio distal intracelular da membrana de HER-2 (nucleótidos 3262 a 3912 do N°. de Acesso do GenBank M11730):	30

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Dendreon Corporation

<120> Composições e Métodos para Imunoterapia
Baseada em Células Dendríticas

<130> 7636-0022.41

<140> Ainda Não Atribuído

<141> Incluído Neste Documento

<150> US 60/193.504

<151> 2000-03-30

<160> 30

<170> FastSEQ para Windows, Versão 4.0

<210> 1

<211> 555

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> construção de HER500

<400> 1

Met	Arg	Ala	Ala	Pro	Leu	Leu	Leu	Ala	Arg	Ala	Ala	Ser	Leu	Ser	Leu
1				5					10					15	
Gly	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	Phe	Phe	Trp	Leu	Asp	Arg	Ser	Val	Leu	Ala
			20					25					30		
Lys	Glu	Leu	Ala	Arg	Gly	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr
		35				40						45			
Asp	Met	Lys	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met
	50				55						60				
Leu	Arg	His	Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu
65				70						75					80
Leu	Thr	Tyr	Leu	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile
			85						90					95	
Gln	Glu	Val	Gln	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln	Val	Arg	Gln
			100					105					110		
Val	Pro	Leu	Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu
		115				120						125			
Asp	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn
	130				135						140				
Thr	Thr	Pro	Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln
145				150						155					160
Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg
			165					170						175	
Asn	Pro	Gln	Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile	Phe
		180					185						190		
His	Lys	Asn	Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser
		195				200						205			
Arg	Ala	Cys	His	Pro	Cys	Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp
	210				215						220				
Gly	Glu	Ser	Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala
225				230						235					240
Gly	Gly	Cys	Ala	Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His
			245					250						255	

Glu	Gln	Cys	Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu
			260					265					270		
Ala	Cys	Leu	His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro
		275					280					285			
Ala	Leu	Val	Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro
		290				295					300				
Glu	Gly	Arg	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr
305					310					315					320
Asn	Tyr	Leu	Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	Gly	Met	Val	His
				325					330					335	
His	Arg	His	Arg	Ser	Ser	Ser	Thr	Arg	Ser	Gly	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr
			340					345					350		
Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Ser	Glu	Glu	Glu	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Leu	Ala
		355					360					365			
Pro	Ser	Glu	Gly	Ala	Gly	Ser	Asp	Val	Phe	Asp	Gly	Asp	Leu	Gly	Met
		370				375					380				
Gly	Ala	Ala	Lys	Gly	Leu	Gln	Ser	Leu	Pro	Thr	His	Asp	Pro	Ser	Pro
385					390					395					400
Leu	Gln	Arg	Tyr	Ser	Glu	Asp	Pro	Thr	Val	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	Thr
			405						410					415	
Asp	Gly	Tyr	Val	Ala	Pro	Leu	Thr	Cys	Ser	Pro	Gln	Pro	Glu	Tyr	Val
			420					425					430		
Asn	Gln	Pro	Asp	Val	Arg	Pro	Gln	Pro	Pro	Ser	Pro	Arg	Glu	Gly	Pro
		435					440					445			
Leu	Pro	Ala	Ala	Arg	Pro	Ala	Gly	Ala	Thr	Leu	Glu	Arg	Ala	Lys	Thr
		450				455					460				
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Asn	Gly	Val	Val	Lys	Asp	Val	Phe	Ala	Phe	Gly
465					470					475					480
Gly	Ala	Val	Glu	Asn	Pro	Glu	Tyr	Leu	Thr	Pro	Gln	Gly	Gly	Ala	Ala
				485					490					495	
Pro	Gln	Pro	His	Pro	Pro	Pro	Ala	Phe	Ser	Pro	Ala	Phe	Asp	Asn	Leu
			500					505					510		
Tyr	Tyr	Trp	Asp	Gln	Asp	Pro	Pro	Glu	Arg	Gly	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr
		515					520					525			
Phe	Lys	Gly	Thr	Pro	Thr	Ala	Glu	Asn	Pro	Glu	Tyr	Leu	Gly	Leu	Asp
	530					535					540				
Val	Pro	Ala	Ala	Ala	His	His	His	His	His	His					
545					550					555					

<210> 2

<211> 690

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> construção de HER500-hGM-CSF

<400> 2

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

Val	Pro	Leu	Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu		
		115					120					125					
Asp	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn		
		130					135					140					
Thr	Thr	Pro	Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln		
145					150					155					160		
Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg		
				165					170					175			
Asn	Pro	Gln	Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile	Phe		
		180					185						190				
His	Lys	Asn	Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser		
		195					200					205					
Arg	Ala	Cys	His	Pro	Cys	Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp		
		210				215					220						
Gly	Glu	Ser	Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala		
225					230					235					240		
Gly	Gly	Cys	Ala	Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His		
			245						250					255			
Glu	Gln	Cys	Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu		
			260				265						270				
Ala	Cys	Leu	His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro		
		275					280					285					
Ala	Leu	Val	Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro		
		290				295						300					
Glu	Gly	Arg	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr		
305					310					315					320		
Asn	Tyr	Leu	Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	Gly	Met	Val	His		
				325					330					335			
His	Arg	His	Arg	Ser	Ser	Ser	Thr	Arg	Ser	Gly	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr		
			340				345						350				
Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Ser	Glu	Glu	Glu	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Leu	Ala		
		355					360					365					
Pro	Ser	Glu	Gly	Ala	Gly	Ser	Asp	Val	Phe	Asp	Gly	Asp	Leu	Gly	Met		
		370				375					380						
Gly	Ala	Ala	Lys	Gly	Leu	Gln	Ser	Leu	Pro	Thr	His	Asp	Pro	Ser	Pro		
385					390					395					400		
Leu	Gln	Arg	Tyr	Ser	Glu	Asp	Pro	Thr	Val	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	Thr		
				405					410					415			
Asp	Gly	Tyr	Val	Ala	Pro	Leu	Thr	Cys	Ser	Pro	Gln	Pro	Glu	Tyr	Val		
			420					425					430				
Asn	Gln	Pro	Asp	Val	Arg	Pro	Gln	Pro	Pro	Ser	Pro	Arg	Glu	Gly	Pro		
		435					440					445					
Leu	Pro	Ala	Ala	Arg	Pro	Ala	Gly	Ala	Thr	Leu	Glu	Arg	Ala	Lys	Thr		
		450				455					460						
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Asn	Gly	Val	Val	Lys	Asp	Val	Phe	Ala	Phe	Gly		
465					470					475					480		
Gly	Ala	Val	Glu	Asn	Pro	Glu	Tyr	Leu	Thr	Pro	Gln	Gly	Gly	Ala	Ala		
				485					490					495			
Pro	Gln	Pro	His	Pro	Pro	Pro	Ala	Phe	Ser	Pro	Ala	Phe	Asp	Asn	Leu		
			500				505						510				
Tyr	Tyr	Trp	Asp	Gln	Asp	Pro	Pro	Glu	Arg	Gly	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr		
		515					520					525					
Phe	Lys	Gly	Thr	Pro	Thr	Ala	Glu	Asn	Pro	Glu	Tyr	Leu	Gly	Leu	Asp		
		530				535					540						
Val	Pro	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Arg	Ser	Pro	Ser	Pro	Ser	Thr	Gln	Pro		
545					550					555					560		
Trp	Glu	His	Val	Asn	Ala	Ile	Gln	Glu	Ala	Arg	Arg	Leu	Leu	Asn	Leu		
				565					570					575			
Ser	Arg	Asp	Thr	Ala	Ala	Glu	Met	Asn	Glu	Thr	Val	Glu	Val	Ile	Ser		
			580					585					590				
Glu	Met	Phe	Asp	Leu	Gln	Glu	Pro	Thr	Cys	Leu	Gln	Thr	Arg	Leu	Glu		
		595					600					605					

Leu	Tyr	Lys	Gln	Gly	Leu	Arg	Gly	Ser	Leu	Thr	Lys	Leu	Lys	Gly	Pro
610						615					620				
Leu	Thr	Met	Met	Ala	Ser	His	Tyr	Lys	Gln	His	Cys	Pro	Pro	Thr	Pro
625					630					635					640
Glu	Thr	Ser	Cys	Ala	Thr	Gln	Ile	Ile	Thr	Phe	Glu	Ser	Phe	Lys	Glu
				645					650					655	
Asn	Leu	Lys	Asp	Phe	Leu	Leu	Val	Ile	Pro	Phe	Asp	Cys	Trp	Glu	Pro
			660					665					670		
Val	Gln	Glu	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	His	His	His	His
		675					680					685			
His	His														
690															

<210> 3

<211> 564

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> construção de HER500*

<400> 3

Met	Arg	Ala	Ala	Pro	Leu	Leu	Leu	Ala	Arg	Ala	Ala	Ser	Leu	Ser	Leu
1				5					10					15	
Gly	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	Phe	Phe	Trp	Leu	Asp	Arg	Ser	Val	Leu	Ala
			20					25					30		
Lys	Glu	Leu	Ala	Arg	Gly	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr
		35				40						45			
Asp	Met	Lys	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met
50					55						60				
Leu	Arg	His	Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu
65				70						75					80
Leu	Thr	Tyr	Leu	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile
			85					90						95	
Gln	Glu	Val	Gln	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln	Val	Arg	Gln
			100					105					110		
Val	Pro	Leu	Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu
		115				120						125			
Asp	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn
130					135						140				
Thr	Thr	Pro	Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln
145				150						155					160
Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg
			165					170						175	
Asn	Pro	Gln	Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile	Phe
			180				185						190		
His	Lys	Asn	Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser
		195				200						205			
Arg	Ala	Cys	His	Pro	Cys	Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp
210					215							220			
Gly	Glu	Ser	Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala
225				230						235					240
Gly	Gly	Cys	Ala	Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His
			245					250						255	
Glu	Gln	Cys	Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu
		260					265						270		
Ala	Cys	Leu	His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro
		275				280						285			
Ala	Leu	Val	Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro
290					295						300				
Glu	Gly	Arg	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr
305				310						315					320

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

<210> 4

<211> 697

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> construção de HER500*-rGM-CSF

<400> 4

Met	Arg	Ala	Ala	Pro	Leu	Leu	Leu	Ala	Arg	Ala	Ala	Ser	Leu	Ser	Leu
1				5					10				15		
Gly	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	Phe	Phe	Trp	Leu	Asp	Arg	Ser	Val	Leu	Ala
		20						25					30		
Lys	Glu	Leu	Ala	Arg	Gly	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr
	35					40						45			
Asp	Met	Lys	Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met
50					55					60					
Leu	Arg	His	Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu
65				70					75					80	
Leu	Thr	Tyr	Leu	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile
			85					90					95		
Gln	Glu	Val	Gln	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln	Val	Arg	Gln
		100						105					110		
Val	Pro	Leu	Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu
	115					120						125			
Asp	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn
130					135					140					
Thr	Thr	Pro	Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln
145				150						155					160

Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg
Asn	Pro	Gln	Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile	Phe
His	Lys	Asn	Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser
Arg	Ala	Cys	His	Pro	Cys	Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp
Gly	Glu	Ser	Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala
225					230					235					240
Gly	Gly	Cys	Ala	Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His
					245					250					255
Glu	Gln	Cys	Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu
					260					265					270
Ala	Cys	Leu	His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro
					275										285
Ala	Leu	Val	Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro
					290										300
Glu	Gly	Arg	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr
305					310						315				320
Asn	Tyr	Leu	Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Ala	Ser	Ile	Ile	Asn	Phe	Glu
					325										335
Lys	Leu	Gly	Ala	Gly	Gly	Met	Val	His	His	Arg	His	Arg	Ser	Ser	Ser
					340										350
Thr	Arg	Ser	Gly	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Ser	Glu
					355										365
Glu	Glu	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Glu	Gly	Ala	Gly	Ser
					370										380
Asp	Val	Phe	Asp	Gly	Asp	Leu	Gly	Met	Gly	Ala	Ala	Lys	Gly	Leu	Gln
385					390						395				400
Ser	Leu	Pro	Thr	His	Asp	Pro	Ser	Pro	Leu	Gln	Arg	Tyr	Ser	Glu	Asp
					405										415
Pro	Thr	Val	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	Thr	Asp	Gly	Tyr	Val	Ala	Pro	Leu
					420										430
Thr	Cys	Ser	Pro	Gln	Pro	Glu	Tyr	Val	Asn	Gln	Pro	Asp	Val	Arg	Pro
					435										445
Gln	Pro	Pro	Ser	Pro	Arg	Glu	Gly	Pro	Leu	Pro	Ala	Ala	Arg	Pro	Ala
					450										460
Gly	Ala	Thr	Leu	Glu	Arg	Ala	Lys	Thr	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Asn	Gly
465					470						475				480
Val	Val	Lys	Asp	Val	Phe	Ala	Phe	Gly	Gly	Ala	Val	Glu	Asn	Pro	Glu
					485										495
Tyr	Leu	Thr	Pro	Gln	Gly	Gly	Ala	Ala	Pro	Gln	Pro	His	Pro	Pro	Pro
					500										510
Ala	Phe	Ser	Pro	Ala	Phe	Asp	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Asp	Gln	Asp	Pro
					515										525
Pro	Glu	Arg	Gly	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr	Phe	Lys	Gly	Thr	Pro	Thr	Ala
					530										540
Glu	Asn	Pro	Glu	Tyr											

<210> 5

<211> 479

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> construção de HER300*-rGM-CSF

<400> 5

```

Met Arg Ala Ala Pro Leu Leu Leu Ala Arg Ala Ala Ser Leu Ser Leu
 1      5      10      15
Gly Phe Leu Phe Leu Leu Phe Phe Trp Leu Asp Arg Ser Val Leu Ala
 20      25      30
Lys Glu Leu Ala Arg Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr
 35      40      45
Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met
 50      55      60
Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu
 65      70      75      80
Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile
 85      90      95
Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln
100      105      110
Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu
115      120      125
Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn
130      135      140
Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln
145      150      155      160
Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg
165      170      175
Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe
180      185      190
His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser
195      200      205
Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp
210      215      220
Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala
225      230      235      240
Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His
245      250      255
Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu
260      265      270
Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro
275      280      285
Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro
290      295      300
Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr
305      310      315      320
Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser Ala Ser Ile Ile Asn Phe Glu
325      330      335
Lys Leu Ala Ala Pro Thr Arg Ser Pro Asn Pro Val Thr Arg Pro Trp
340      345      350
Lys His Val Asp Ala Ile Lys Glu Ala Leu Ser Leu Leu Asn Asp Met
355      360      365

Arg Ala Leu Glu Asn Glu Lys Asn Glu Asp Val Asp Ile Ile Ser Asn
370      375      380
Glu Phe Ser Ile Gln Arg Pro Thr Cys Val Gln Thr Arg Leu Lys Leu
385      390      395      400
Tyr Lys Gln Gly Leu Arg Gly Asn Leu Thr Lys Leu Asn Gly Ala Leu
405      410      415
Thr Met Ile Ala Ser His Tyr Gln Thr Asn Cys Pro Pro Thr Pro Glu
420      425      430
Thr Asp Cys Glu Ile Glu Val Thr Thr Phe Glu Asp Phe Ile Lys Asn
435      440      445
Leu Lys Gly Phe Leu Phe Asp Ile Pro Phe Asp Cys Trp Lys Pro Val
450      455      460
Gln Lys Gly Ala Pro Pro Pro Pro Ala His His His His His
465      470      475

```

<210> 6

<211> 1665

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> construção de HER500

<400> 6

atgagagctg	cacccctcct	cctggccagg	gcagcaagcc	ttagccttgg	cttcttgttt	60
ctgctttttt	tctggctaga	ccgaagtgtg	ctagccaagg	agttggcgcg	cggggccgcg	120
tcgacccaag	tgtgcacogg	cacagacatg	aagctgcggc	tccttgccag	tcccagagacc	180
cacctggaca	tgtccgcca	cctctaccag	ggctgccagg	tggtgcaggg	aaacctggaa	240
ctcacctacc	tgccaccaa	tgccagcctg	tccttccctg	aggatatcca	ggaggtgcag	300
ggctacgtgc	tcctcgctca	caaccaagtg	aggcaggtcc	cactgcagag	gctgcggatt	360
gtgcgaggca	cccagctcct	tgaggacaac	tatgccttgg	ccgtgctaga	caatggagac	420
ccgctgaaca	ataccacccc	tgtcacaggg	gcctcccag	gaggcctgcg	ggagctgcag	480
cttcgaagcc	tcacagagat	cttgaaagga	gggtcttga	tccagcgga	ccccagctc	540
tgctaccagg	acacgatttt	gtggaaggac	atcttccaca	agaacaacca	gctggctctc	600
acactgatag	acaccaaccg	ctctcggggc	tgccaccctt	gttctccgat	gtgtaagggc	660
tcccgtgct	ggggagagag	ttctgaggat	tgtcagagcc	tgacgcgcac	tgtctgtgcc	720
gggtggctgtg	cccgtgcaa	ggggccactg	ccactgact	gctgccatga	gcagtgtgct	780
gcccgttgca	cgggcccaa	gcactctgac	tgctggcct	gcctccactt	caaccacagt	840
ggcatctgtg	agctgcaactg	cccagccctg	gtcacctaca	acacagacac	gtttgagttc	900
atgcccaatc	ccgagggccg	gtatacatte	ggcgccagct	gtgtgactgc	ctgtccctac	960
aactaccttt	ctacggacgt	gggatcgggc	gctgggggca	tggtccacca	caggcaccgc	1020
agctcatcta	ccaggagtgg	cggtggggac	ctgacaactag	ggctggagcc	ctctgaagag	1080
gaggccccca	ggtctccact	ggcaccctcc	gaaggggctg	gctccgatgt	atttgatggg	1140
gacctgggaa	tgggggcagc	caaggggctg	caaagcctcc	ccacacatga	ccccagccct	1200
ctacagcggg	acagtgagga	ccccacagta	ccctgcccct	ctgagactga	tggctacgtt	1260
gccccctga	cctgcagccc	ccagcctgaa	tatgtgaacc	agccagatgt	tcggccccag	1320
cccccttcgc	cccagagagg	ccctctgcct	gctgcccagc	ctgctggtgc	cactctggaa	1380
agggccaaga	ctctctcccc	aggggaagaat	ggggtcgta	aagacgtttt	tgcctttggg	1440
ggtgcccgtg	agaaccccga	gtacttgaca	ccccagggag	gagctgcccc	tcagccccac	1500
cctcctcctg	ccttcagccc	agccttcgac	aacctctatt	actgggacca	ggaccacca	1560
gagcgggggg	ctccacccag	caccttcaaa	gggacaccta	cggcagagaa	cccagagtac	1620
ctgggtctgg	acgtgccagc	ggccgcacat	caccatcacc	atcac		1665

<210> 7

<211> 2070

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> construção de HER500-hGM-CSF

<400> 7

atgagagctg	cacccctcct	cctggccagg	gcagcaagcc	ttagccttgg	cttcttgttt	60
ctgctttttt	tctggctaga	cogaagtgt	ctagccaagg	agttggcgcg	cggggcccgg	120
tcgacccaag	tgtgcaccgg	cacagacatg	aagctgcggc	tccctgccag	tcccagagacc	180
cacctggaca	tgctccgcca	cctctaccag	ggctgccagg	tggtgcaggg	aaacctggaa	240
ctcacctacc	tgcccaccaa	tgccagcctg	tccttcctgc	aggatatcca	ggaggtgcag	300
ggctacgtgc	tcctcgctca	caaccaagtg	aggcaggtcc	cactgcagag	gctgcccatt	360
gtgcgaggca	cccagctctt	tgaggacaac	tatgccctgg	ccgtgctaga	caatggagac	420
ccgctgaaca	ataccacccc	tgtcacaggg	gcctccccag	gaggcctgcg	ggagctgcag	480
cttcgaagcc	tcacagagat	cttgaaaagg	gggtctctga	tccagcgga	ccccagctc	540
tgctaccagg	acacgatttt	gtggaaggac	atcttcacac	agaacaacca	gctggctctc	600
acactgatag	acaccaaccg	ctctcggggc	tgccaccctc	gttctccgat	gtgtaagggc	660
tcccgtctgt	ggggagagag	ttctgaggat	tgtcagagcc	tgacgcgcac	tgtctgtgcc	720
ggtggctgtg	ccgctgcaa	ggggccactg	cccactgact	gctgccatga	gcagtgtgct	780
gccggctgca	cgggcccca	gcactctgac	tgcttgccct	gcctccactt	caaccacagt	840
ggcatctgtg	agctgcactg	cccagccctg	gtcacctaca	acacagacac	gtttgagttc	900
atgcccatac	ccgagggccg	gtatacattc	ggcgccagct	gtgtgactgc	ctgtccctac	960
aaactacctt	ctacggacgt	gggatcgggc	gctgggggca	tggtccacca	caggcaccgc	1020
agctcatcta	acaggagtgg	cgggtggggac	ctgacactag	ggctggagcc	ctctgaagag	1080
gaggccccca	ggtctccact	ggcaccctcc	gaaggggctg	gctccgatgt	atttgatggt	1140
gacctgggaa	tggggggcagc	caaggggctg	caaagcctcc	ccacacatga	ccccagccct	1200
ctacagcggt	acagtgagga	ccccacagta	cccctgccct	ctgagactga	tggtctacgtt	1260
gccccctga	cctgcagccc	ccagcctgaa	tatgtgaacc	agccagatgt	tcggccccag	1320
cccccttcgc	cccgagaggg	ccctctgcct	gctgcccgac	ctgctggtgc	caactctggaa	1380
agggccaaga	ctctctcccc	aggggaagaat	ggggtcgtca	aagacgtttt	tgcttttggg	1440
ggtgccgtgg	agaaccccga	gtacttgaca	ccccagggag	gagctgcccc	tcagccccac	1500
cctcctcctg	ccttcagccc	agccttcgac	aacctctatt	actgggacca	ggaocccaca	1560
gagcgggggg	ctccacccag	cacottcaaa	gggacacct	cggcagagaa	cccagagtac	1620
ctgggtctgg	acgtgccagc	ggccgcaccc	gcccgcctgc	ccagcccccag	cacacagccc	1680
tgggagcatg	tgaatgccat	ccaggaggcc	cggcgtctcc	tgaacctgag	tagagacact	1740
gctgctgaga	tgaatgaaac	agtagaagtc	atctcagaaa	tgtttgacct	ccaggagccg	1800
acctgcctac	agaccgcctc	ggagctgtac	aagcagggcc	tgccggggcag	cctcaccaaq	1860
ctcaagggcc	cotttgacat	gatggccagc	cactacaaa	agcaactgcc	tccaaccccc	1920
gaaacttcct	gtgcaaccca	gattatcacc	tttgaaagtt	tcaaaagagaa	cctgaaggac	1980
tttctgcttg	tcattcccctt	tgactgctgg	gagccagttc	aggagggcgc	gccacccccg	2040
ccggcgggccg	cacatcacca	tcaccatcac				2070

<210> 8

<211> 1692

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> construção de HER500*

<400> 8

atgagagctg	cacccctect	cctggccagg	gcagcaagcc	ttagccttgg	cttcttgttt	60
ctgctttttt	tctggctaga	ccgaagtgt	ctagccaagg	agttggcgcg	cggggcccgcg	120
tgcaccaag	tgtgcaccgg	cacagacatg	aagctgcggc	tccttgccag	tcccagagacc	180
cacctggaca	tgtcccgcca	cctctaccag	ggctgccagg	tgggtcaggg	aaacctggaa	240
ctcacctacc	tgccaccaca	tgccagcctg	tccttcctgc	aggatatcca	ggaggtgcag	300
ggctacgtgc	tcatcgctca	caaccaagtg	aggcaggtcc	cactgcagag	gctgcggatt	360
gtgcgaggca	cccagctott	tgaggacaac	tatgccctgg	ccgtgctaga	caatggagac	420
ccgctgaaca	ataccacccc	tgtcacaggg	gcctccccag	gaggcctgcg	ggagctgcag	480
cttcgaagcc	tcacagagat	cttgaagga	gggtcttga	tccagcggaa	ccccagctc	540
tgctaccagg	acacgatttt	gtggaaggac	atcttcacac	agaacaacca	gctggctctc	600
acactgatag	acaccaaccg	ctctcggggc	tgccaccctt	gttctccgat	gtgtaagggc	660
tcccgtgct	ggggagagag	ttctgaggat	tgtcagagcc	tgacgcgcac	tgtctgtgcc	720
gggtggtgtg	cccgtgcaa	ggggccactg	cccactgact	gctgccatga	gcagtgtgct	780
gccggtgca	cgggccccaa	gcactctgac	tgccctggcc	gcctccactt	caaccacagt	840
ggcatctgtg	agctgcactg	cccagccctg	gtcacctaca	acacagacac	gtttgagtcc	900
atgcccaatc	ccgagggccg	gtatacattc	ggcgccagct	gtgtgactgc	ctgtccctac	960
aactaccttt	ctacggacgt	gggatccgct	agcatcatta	atttcgagaa	gttgggcgct	1020
gggggcatgg	tccaccacag	gcaccgcagc	tcatctacca	ggagtggcgg	tggggacctg	1080
acactagggc	tggagccctc	tgaagaggag	gccccaggt	ctccactggc	accctccgaa	1140
ggggctggct	ccgatgtatt	tgatggtgac	ctgggaatgg	gggcagccaa	ggggctgcaa	1200
agcctcccca	cacatgaccc	cagccctcta	cagcggtaac	gtgaggaccc	cacagtaccc	1260
ctgccctctg	agactgatgg	ctacgttgcc	ccctgacct	gcagcccca	gctgaatat	1320
gtgaaccagc	cagatgttcg	gccccagccc	ccttcgcccc	gagaggggcc	tctgcctgct	1380
gcccagacctg	ctggtgccac	tctggaaagg	gccaagactc	tctccccagg	gaagaatggg	1440
gtcgtcaaag	acgtttttgc	ctttgggggt	gccgtggaga	accccgagta	cttgacaccc	1500
cagggaggag	ctgccccctc	gccccaccct	cctctgcct	tcagcccagc	cttcgacaac	1560
ctctattact	gggaccagga	cccaccagag	cggggggctc	caccagcac	cttcaaaggg	1620
acacctacgg	cagagaaccc	agagtacctg	ggtctggacg	tgccagcggc	cgcacatcac	1680
catcaccatc	ac					1692

<210> 9

<211> 2091

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> construção de HER500*-rGM-CSF

<400> 9

```

atgagagctg caccocctcct cctggccagg gcagcaagcc ttagccttg gctcttgttt 60
ctgctttttt tctggctaga ccgaagtgt aagctgcggc agttggcgcg cggggccgcg 120
tcgacccaag tgtgcaccgg cacagacatg aagctgcggc tccctgccag tcccagagacc 180
cacctggaca tgctccgcca cctctaccag ggctgccagg tggcgcaggg aaacctggaa 240
ctcacctacc tgcccaccaa tggcagcctg tccctcctgc aggatatcca ggaggtgcag 300
ggctacgtgc tcatcgctca caaccaagt aggcaggctc cactgcagag gctgaggatt 360
gtgcgaggca cccagctctt tgaggacaac tatgccctgg ccgtgctaga caatggagac 420
ccgtgaaca ataccacccc tgtcacagg gctccccag gaggcctgcg ggagctgcag 480
cttcgaagcc tcacagagat cttgaaagga ggggtcttga tccagcggaa ccccagctc 540
tgctaccagg acacgatttt gtggaaggac atcttccaca agaacaacca gctggctctc 600
ccgtgatag acaccaaccg ctctcggggc tgccaccctt gtctcctgat gtgtaagggc 660
tcccgctgct ggggagagag ttctgaggat tgcagagcc tgacgcgcac tgtctgtgcc 720
ggcgtgctgt cccgtgcaa ggggccactg cccactgact gctgccatga gcagtgtgct 780
gcccgtgca cgggccccaa gcactctgac tgcctggcct gcctccactt caaccacagt 840
ggcatctgtg agctgcactg ccagccctg gtacacctca acacagacac gtttgagtcc 900
atgcccatac ccgagggcgc gtatacattc ggccagcgt gtgtgactgc ctgtccctac 960
aactaccttt ctacggacgt gggatccgct agcatcatta atttcgagaa gttgggcgct 1020
gggggcatgg tccaccacag gcaccgcagc tcatctacca ggagtgccgg tggggacctg 1080
acactagggc tggagccctc tgaagaggag gcccccagg ctccactggc accctccgaa 1140
ggggctggct cagatgtatt tgatggtgac ctgggaatgg gggcagccaa ggggctgcaa 1200
agcctcccca cacatgacct cagccctcta cagcgttaca gtgaggacct cacagtacct 1260
ctgccctctg agactgatgg ctacgttgcc cccctgacct gcagccccca gcctgaatat 1320
gtgaaccagc cagatgttcg gccccagccc ccttcgcccc gagagggccc tctgcctgct 1380
gcccgcacct ctggtgccac tctggaaaag gcccaagact tctccccagg gaagaatggg 1440
gtcgtcaaag acgtttttgc ctttgggggt gccgtggaga accccgagta cttgacacct 1500
caggaggagg ctgcccctca gcccaccct cctcctgct tccagccagc cttcgacaaa 1560
ctctattact gggaccagga cccaccagag cggggggctc caccagcac cttcaaaggg 1620
acacctacgg cagagaacct agagtacct ggctggacg tgcagcggc cggccccacc 1680
cgctcaccga accctgtcac ccggccctgg aagcatgtag atgccatcaa agaagctctg 1740
agcctoctaa atgacatgcy tgccttgagg aacgaaaaga acgaagacgt agacatcatc 1800
tctaatgagt tctccatcca gagcccgaca tgtgtgcaga ccgcctgaa gctatacaag 1860
cagggtctac ggggcaacct caccaaaact aatggcgct tgacctgat agccagccac 1920
taccagacga actgccctcc aaccccgaa actgactgtg aaatagaagt caccaccttt 1980
gaggatttca taaagaacct taaaggcttt ctgtttgata tcccttttga ctgctggaag 2040
ccgttccaga aaggcgcgcc acccccgcgc gcgcatcacc atcaccatca c 2091

```

<210> 10

<211> 1437

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> construção de HER300*rGM-CSF

<400> 10

```

atgagagctg caccctctct cctggccagg gcagcaagcc ttagccttgg cttcttgttt      60
ctgctttttt tctggctaga ccgaagtgtg ctagccaagg agttggcgcg cggggcccgcg      120
tcgacccaag tgtgcaccgg cacagacatg aagctgcggc tccctgccag tcccagagacc      180
cacctggaca tgctcggcca cctctaccag ggctgccagg tgggtgcagg aaacctggaa      240
ctcacctacc tgcccaccaa tgccagcctg tccttcctgc aggatatcca ggaggtgcag      300
ggctacgtgc tcatcgtcna caaccaagtg aggcagggtcc cactgcagag gctgcggatt      360
gtgcgaggca cccagctctt tgaggacaac tatgccctgg ccgtgctaga caatggagac      420
ccgctgaaca ataccacccc tgtcacaggg gcctcccag gaggcctgcg ggagctgcag      480
cttcgaagcc tcacagagat cttgaaagga ggggtcttga tccagcggaa ccccagctc      540
tgctaccagg acacgatttt gtggaaggac atcttcacaa agaacaacca gctggctctc      600
acactgatag acaccaaccg ctctcggggc tgccacccct gtctctccgat gtgtaagggc      660
tcccgtgct ggggagagag ttctgaggat tgtcagagcc tgacgcgcac tgtctgtgcc      720
gggtggctgtg ccgctgcaa ggggccactg cccactgact gctgccatga gcagtgtgct      780
gccggtgca cgggcccacaa gcaactctgac tgccctggcct gcctccactt caaccacagt      840
ggcatctgtg agctgcactg cccagccctg gtcacctaca acacagacac gtttgagtcc      900
atgcccaatc ccgagggcgg gtatacattc ggcgcagct gtgtgactgc ctgtccctac      960
aactacottt ctacggacgt gggatccgct agcatcatta atttcgagaa gttggccgcc      1020
cccaccgct caccacaccc tgtcacccgg ccctggaagc atgtagatgc catcaaagaa      1080
gctctgagcc tctaaatga catgcgtgct ctggagaacg aaaagaacga agacgtagac      1140
atcatctcta atgagttctc catccagagg ccgacatgtg tgcagaccgg cctgaagcta      1200
tacaagcagg gtctacgggg caacctcacc aaactcaatg gcgccttgac catgatagcc      1260
agccactacc agacgaactg ccctccaacc ccggaactg actgtgaaat agaagtcacc      1320
accttgagg atttcataaa gaaccttaaa ggctttctgt ttgatatccc ttttgactgc      1380
tggaagccgg tccagaaagg cgcgccaccc ccgcggcgcg atcaccatca ccatcac      1437

```

<210> 11

<211> 32

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

```

Met Arg Ala Ala Pro Leu Leu Leu Ala Arg Ala Ala Ser Leu Ser Leu
 1             5             10             15
Gly Phe Leu Phe Leu Leu Phe Phe Trp Leu Asp Arg Ser Val Leu Ala
                20                25                30

```

<210> 12

<211> 3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

```

Lys Glu Leu
 1

```

<210> 13

<211> 3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

Gly Ala Ala
1

<210> 14

<211> 2

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> agente de ligação

<400> 14

Ala Arg
1

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sequência do terminal C das construções de
HER500 e de HER500*

<400> 15

Ala Ala Ala His His His His His His
1 5

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sequência do terminal C da construção de
HER500-hGM-CSF

<400> 16

Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	His	His	His	His	His	His
1				5					10				15	

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sequência do terminal C das construções de
HER500* e HER300* GM-CSF de rato

<400> 17

Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	His	His	His	His	His	His
1				5					10			

<210> 18

<211> 127

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

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

<210> 19

<211> 381

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

gcacccgccc	gctcgcccag	ccccagcacg	cagccctggg	agcatgtgaa	tgccatccag	60
gaggcccggc	gtctcctgaa	cctgagtaga	gacactgctg	ctgagatgaa	tgaaacagta	120
gaagtcacat	cagaaatggt	tgacctccag	gagccgacct	gcctacagac	ccgcctggag	180
ctgtacaagc	agggcctgcg	gggcagcctc	accaagctca	agggcccctt	gaccatgatg	240
gccagccact	acaagcagca	ctgccctcca	accccggaag	cttcctgtgc	aaccagact	300
atcaccttg	aaagtttcaa	agagaacctg	aaggactttc	tgcttgatcat	cccctttgac	360
tgctgggagc	cagtcagga	g				381

<210> 20

<211> 127

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 20

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

<210> 21

<211> 381

<212> ADN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 21

gcacccaccc	gctcacc	ccctgtcacc	cggccctgga	agcatgtaga	tgccatcaaa	60
gaagctctga	gcctcctaaa	tgacatgcgt	gctctggaga	acgaaaagaa	cgaagacgta	120
gacatcatct	ctaagagtt	ctccatccag	aggccgacat	gtgtgcagac	ccgcctgaag	180
ctatacaagc	agggtctacg	gggcaacctc	accaaactca	atggcgcctt	gaccatgata	240
gccagccact	accagacgaa	ctgccctcca	accccgga	ctgactgtga	aatagaagtc	300
accacctttg	aggatttc	aaagaacctt	aaaggctttc	tgtttgatat	cccttttgac	360
tgctggaagc	cgggtccagaa	a				381

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> octapéptido imunodominante derivado de OVA

<400> 22

Ser	Ile	Ile	Asn	Phe	Glu	Lys	Leu
1			5				

<210> 23

 $211 > 289$

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

[illegible]

<210> 24

<211> 867

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 24

```

agcaccgaag tgtgcaccgg cacagacatg aagctgcggc tccctgccag tcccagagacc    60
cacctggaca tgctccgcca cctctaccag ggctgccagg tggcgcaggg aaacctggaa    120

ctcacctacc tgcccaccaa tgccagcctg tccttcctgc aggatatcca ggaggtgcag    180
ggctacgtgc tcatcgctca caaccaagtg aggcagggcc cactgcagag gctgcggatt    240
gtgcgaggca cccagctctt tgaggacaac tatgccctgg ccgtgctaga caatggagac    300
ccgctgaaca ataccacccc tgtcacaggg gcctcccag gaggcctgcg ggagctgcag    360
cttcgaagcc tcacagagat cttgaaagga ggggtcttga tccagcggaa ccccagctc    420
tgctaccagg acacgatttt gtggaaggac atcttcacac agaacaacca gctggctctc    480
acactgatag acaccaaccg ctctcggggc tgccacccct gttctccgat gtgtaagggc    540
tcccgtgctg ggggagagag ttctgaggat tgtcagagcc tgacgcgcac tgtctgtgcc    600
ggtggctgtg cccgctgcaa ggggccactg cccactgact gctgccatga gcagtgtgct    660
gccggctgca cgggccccaa gcactctgac tgccctggcc gcctccactt caaccacagt    720
ggcatctgtg agctgcactg cccagccctg gtcacctaca acacagacac gtttgagtcc    780
atgcccgaac cggagggccg gtatacattc ggcgccagct gtgtgactgc ctgtccctac    840
aactaccttt ctacggacgt gggatcc

```

<210> 25

<211> 217

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 25

```

Gly Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
 1      5      10      15
Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu
 20      25      30
Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val
 35      40      45
Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu
 50      55      60
Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr
 65      70      75      80
Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys
 85      90      95
Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro
 100     105     110
Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala
 115     120     125
Thr Leu Glu Arg Ala Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val
 130     135     140
Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu
 145     150     155     160
Thr Pro Gln Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Ala Phe
 165     170     175
Ser Pro Ala Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu
 180     185     190
Arg Gly Ala Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn
 195     200     205
Pro Glu Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro
 210     215

```

<210> 26

<211> 651

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

ggcgctggg	gcatgggtcca	ccacaggcac	cgcagctcat	ctaccaggag	tggcggtggg	60
gacctgacac	taggggtgga	gccctctgaa	gaggaggccc	ccaggtctcc	actggcacc	120
tccgaagggg	ctggctccga	tgtatttgat	ggtgacctgg	gaatgggggc	agccaagggg	180
ctgcaaagcc	tccccacaca	tgaccccagc	cctctacagc	ggtacagtga	ggaccccaca	240
gtaccctgc	cctctgagac	tgatggctac	gttgccccc	tgacctgcag	ccccagcct	300
gaatatgtga	accagccaga	tgttcggcc	cagccccctt	cgccccgaga	gggccctctg	360
cctgctgccc	gacctgctgg	tgccactctg	gaaagggcc	agactctctc	cccaggaag	420
aatggggtcg	tcaaagacgt	ttttgccttt	gggggtgccg	tggagaaccc	cgagtacttg	480
acaccccagg	gaggagctgc	ccctcagccc	cacctcctc	ctgccttcag	cccagccttc	540
gacaacctct	attactgga	ccaggaccca	ccagagcggg	gggtccacc	cagcaccttc	600
aaagggacac	ctacggcaga	gaaccagag	tacctgggtc	tggacgtgcc	a	651

<210> 27

<211> 397

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> antígeno tumoral NY-ESO-IC

<400> 27

Met 1	Gln	Ala	Glu	Gly 5	Arg	Gly	Thr	Gly	Gly 10	Ser	Thr	Gly	Asp	Ala 15	Asp
Gly	Pro	Gly	Gly 20	Pro	Gly	Ile	Pro	Asp	Gly 25	Pro	Gly	Gly	Asn 30	Ala	Gly
Gly	Pro	Gly 35	Glu	Ala	Gly	Ala	Thr 40	Gly	Gly	Arg	Gly	Pro 45	Arg	Gly	Ala
Gly	Ala	Ala	Arg	Ala	Ser	Gly 55	Pro	Gly	Gly	Gly	Ala 60	Pro	Arg	Gly	Pro
His 65	Gly	Gly	Ala	Ala	Ser 70	Gly	Leu	Asn	Gly	Cys 75	Cys	Arg	Cys	Gly	Ala 80
Arg	Gly	Pro	Glu	Ser 85	Arg	Leu	Leu	Glu	Phe 90	Tyr	Leu	Ala	Met	Pro 95	Phe
Ala	Thr	Pro	Met 100	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala 105	Arg	Arg	Ser	Leu	Ala 110	Gln	Asp
Ala	Pro	Pro 115	Leu	Pro	Val	Pro	Gly 120	Val	Leu	Leu	Lys	Glu 125	Phe	Thr	Val
Ser	Gly	Asn	Ile	Leu	Thr	Ile 135	Arg	Leu	Thr	Ala	Ala 140	Asp	His	Arg	Gln
Leu 145	Gln	Leu	Ser	Ile	Ser 150	Ser	Cys	Leu	Gln	Gln	Leu 155	Ser	Leu	Leu	Met 160
Trp	Ile	Thr	Gln	Cys 165	Phe	Leu	Pro	Val	Phe	Leu	Ala 170	Gln	Pro	Pro 175	Ser
Gly	Gln	Arg	Arg 180	Gly	Ala	Gly	Gly	Met 185	Val	His	His	Arg 190	His	Arg	Ser
Ser	Ser	Thr 195	Arg	Ser	Gly	Gly	Gly 200	Asp	Leu	Thr	Leu	Gly 205	Leu	Glu	Pro
Ser	Glu	Glu 210	Glu	Ala	Pro	Arg 215	Ser	Pro	Leu	Ala	Pro 220	Ser	Glu	Gly	Ala
Gly 225	Ser	Asp	Val	Phe	Asp 230	Gly	Asp	Leu	Gly	Met 235	Gly	Ala	Ala	Lys	Gly 240
Leu	Gln	Ser	Leu	Pro 245	Thr	His	Asp	Pro	Ser	Pro	Leu 250	Gln	Arg	Tyr 255	Ser
Glu	Asp	Pro	Thr 260	Val	Pro	Leu	Pro	Ser 265	Glu	Thr	Asp	Gly	Tyr 270	Val	Ala
Pro	Leu	Thr 275	Cys	Ser	Pro	Gln	Pro 280	Glu	Tyr	Val	Asn 285	Gln	Pro	Asp	Val
Arg	Pro	Gln 290	Pro	Pro	Ser 295	Pro	Arg	Glu	Gly	Pro	Leu 300	Pro	Ala	Ala	Arg
Pro 305	Ala	Gly	Ala	Thr	Leu 310	Glu	Arg	Ala	Lys	Thr 315	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys 320
Asn	Gly	Val	Val	Lys 325	Asp	Val	Phe	Ala	Phe	Gly 330	Gly	Ala	Val	Glu 335	Asn
Pro	Glu	Tyr 340	Leu	Thr	Pro	Gln	Gly	Gly 345	Ala	Ala	Pro	Gln	Pro 350	His	Pro
Pro	Pro	Ala 355	Phe	Ser	Pro	Ala	Phe 360	Asp	Asn	Leu	Tyr 365	Tyr	Trp	Asp	Gln
Asp 370	Pro	Pro	Glu	Arg	Gly 375	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr 380	Phe	Lys	Gly	Thr	Pro
Thr 385	Ala	Glu	Asn	Pro	Glu 390	Tyr	Leu	Gly	Leu	Asp 395	Val	Pro			

<210> 28

$\langle 211 \rangle$ 1191

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> antígeno tumoral NY-ESO-IC

<400> 28

atgcaggccg	aaggccgggg	cacagggggg	tcgacgggcg	atgctgatgg	cccaggaggc	60
cctggcattc	ctgatggccc	agggggcaat	gctggcggcc	caggagaggc	gggtgccacg	120
ggcggcagag	gtccccgggg	cgcaggggca	gcaagggcct	cggggccggg	aggaggcgcc	180
ccgcggggtc	cgcattggcg	cgcggttca	gggctgaatg	gatgctgcag	atgcggggcc	240
agggggcccg	agagccgcct	gcttgagttc	tacctcgcca	tgcctttcgc	gacacccatg	300
gaagcagagc	tggcccgag	gagcctggcc	caggatgccc	caccgcttcc	cgtgccaggg	360
gtgcttctga	aggagtac	tgtgtccggc	aacatactga	ctatccgact	gactgctgca	420
gaccaccgcc	aactgcagct	ctccatcagc	tctgtctcc	agcagcttcc	cctggtgatg	480
tggatcacgc	agtgtttct	gcccgtgttt	ttggctcagc	ctccctcagg	gcagaggcgc	540
ggcgtgggg	gcatgggtcca	ccacaggcac	cgcagctcat	ctaccaggag	tggcgggtggg	600
gacctgacac	tagggctgga	gccctctgaa	gaggaggccc	ccaggctctcc	actggcacc	660
tccgaagggg	ctggctccga	tgtatttgat	ggtgacctgg	gaatgggggc	agccaagggg	720
ctgcaaagcc	tccccacaca	tgacccacgc	cctctacagc	ggtacagtga	ggacccacaca	780
gtacccctgc	cctctgagac	tgatggctac	gttgcccccc	tgacctgcag	ccccagcct	840
gaatatgtga	accagccaga	tgttcggccc	cagccccctt	cgcgccgaga	gggccctctg	900
cctgtgccc	gacctgctgg	tgccactctg	gaaagggcca	agactctctc	cccagggaag	960
aatggggtcg	tcaaagacgt	ttttgccttt	gggggtgccc	tggagaaccc	cgagtacttg	1020
acacccagc	gaggagctgc	ccctcagccc	cacctctctc	ctgccttcag	cccagccttc	1080
gacaacctct	attactggga	ccaggaccca	ccagagcggg	gggctccacc	cagcaccttc	1140
aaagggacac	ctacggcaga	gaacccagag	tacctgggtc	tggacgtgcc	a	1191

<210> 29

<211> 1179

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> SART-3-IC

<400> 29

Met	Ala	Thr	Ala	Ala	Glu	Thr	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Glu	Ala	Glu	Ser
1				5					10					15	
Lys	Ala	Gly	Pro	Lys	Ala	Asp	Gly	Glu	Glu	Asp	Glu	Val	Lys	Ala	Ala
			20					25					30		
Arg	Thr	Arg	Arg	Lys	Val	Leu	Ser	Arg	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Tyr
		35					40					45			
Lys	Thr	Met	Gly	Pro	Ala	Trp	Asp	Gln	Gln	Glu	Glu	Gly	Val	Ser	Glu
	50					55				60					
Ser	Asp	Gly	Asp	Glu	Tyr	Ala	Met	Ala	Ser	Ser	Ala	Glu	Ser	Ser	Pro
65					70					75					80
Gly	Glu	Tyr	Glu	Trp	Glu	Tyr	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Lys	Asn	Gln	Leu
			85					90						95	
Glu	Ile	Glu	Arg	Leu	Glu	Glu	Gln	Leu	Ser	Ile	Asn	Val	Tyr	Asp	Tyr
			100					105					110		
Asn	Cys	His	Val	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Leu	Arg	Leu	Glu	Gly	Glu	Leu
		115					120					125			
Thr	Lys	Val	Arg	Met	Ala	Arg	Gln	Lys	Met	Ser	Glu	Ile	Phe	Pro	Leu
	130					135					140				
Thr	Glu	Glu	Leu	Trp	Leu	Glu	Trp	Leu	His	Asp	Glu	Ile	Ser	Met	Ala
145					150					155					160

Gln	Asp	Gly	Leu	Asp	Arg	Glu	His	Val	Tyr	Asp	Leu	Phe	Glu	Lys	Ala	165	170	175
Val	Lys	Asp	Tyr	Ile	Cys	Pro	Asn	Ile	Trp	Leu	Glu	Tyr	Gly	Gln	Tyr	180	185	190
Ser	Val	Gly	Gly	Ile	Gly	Gln	Lys	Gly	Gly	Leu	Glu	Lys	Val	Arg	Ser	195	200	205
Val	Phe	Glu	Arg	Ala	Leu	Ser	Ser	Val	Gly	Leu	His	Met	Thr	Lys	Gly	210	215	220
Leu	Ala	Leu	Trp	Glu	Ala	Tyr	Arg	Glu	Phe	Glu	Ser	Ala	Ile	Val	Glu	225	230	235
Ala	Ala	Arg	Leu	Glu	Lys	Val	His	Ser	Leu	Phe	Arg	Arg	Gln	Leu	Ala	245	250	255
Ile	Pro	Leu	Tyr	Asp	Met	Glu	Ala	Thr	Phe	Ala	Glu	Tyr	Glu	Glu	Trp	260	265	270
Ser	Glu	Asp	Pro	Ile	Pro	Glu	Ser	Val	Ile	Gln	Asn	Tyr	Asn	Lys	Ala	275	280	285
Leu	Gln	Gln	Leu	Glu	Lys	Tyr	Lys	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	Leu	Leu	Gln	290	295	300
Ala	Glu	Ala	Pro	Arg	Leu	Ala	Glu	Tyr	Gln	Ala	Tyr	Ile	Asp	Phe	Glu	305	310	315
Met	Lys	Ile	Gly	Asp	Pro	Ala	Arg	Ile	Gln	Leu	Ile	Phe	Glu	Arg	Ala	325	330	335
Leu	Val	Glu	Asn	Cys	Leu	Val	Pro	Asp	Leu	Trp	Ile	Arg	Tyr	Ser	Gln	340	345	350
Tyr	Leu	Asp	Arg	Gln	Leu	Lys	Val	Lys	Asp	Leu	Val	Leu	Ser	Val	His	355	360	365
Asn	Arg	Ala	Ile	Arg	Asn	Cys	Pro	Trp	Thr	Val	Ala	Leu	Trp	Ser	Arg	370	375	380
Tyr	Leu	Leu	Ala	Met	Glu	Arg	His	Gly	Val	Asp	His	Gln	Val	Ile	Ser	385	390	395
Val	Thr	Phe	Glu	Lys	Ala	Leu	Asn	Ala	Gly	Phe	Ile	Gln	Ala	Thr	Asp	405	410	415
Tyr	Val	Glu	Ile	Trp	Gln	Ala	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Leu	Arg	Arg	Arg	Val	420	425	430
Asp	Phe	Lys	Gln	Asp	Ser	Ser	Lys	Glu	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Ala	435	440	445
Phe	Thr	Arg	Ala	Leu	Glu	Tyr	Leu	Lys	Gln	Glu	Val	Glu	Glu	Arg	Phe	450	455	460
Asn	Glu	Ser	Gly	Asp	Pro	Ser	Cys	Val	Ile	Met	Gln	Asn	Trp	Ala	Arg	465	470	475
Ile	Glu	Ala	Arg	Leu	Cys	Asn	Asn	Met	Gln	Lys	Ala	Arg	Glu	Leu	Trp	485	490	495
Asp	Ser	Ile	Met	Thr	Arg	Gly	Asn	Ala	Lys	Tyr	Ala	Asn	Met	Trp	Leu	500	505	510
Glu	Tyr	Tyr	Asn	Leu	Glu	Arg	Ala	His	Gly	Asp	Thr	Gln	His	Cys	Arg	515	520	525
Lys	Ala	Leu	His	Arg	Ala	Val	Gln	Cys	Thr	Ser	Asp	Tyr	Pro	Glu	His	530	535	540
Val	Cys	Glu	Val	Leu	Leu	Thr	Met	Glu	Arg	Thr	Glu	Gly	Ser	Leu	Glu	545	550	555
Asp	Trp	Asp	Ile	Ala	Val	Gln	Lys	Thr	Glu	Thr	Arg	Leu	Ala	Arg	Val	565	570	575
Asn	Glu	Gln	Arg	Met	Lys	Ala	Ala	Glu	Lys	Glu	Ala	Ala	Leu	Val	Gln	580	585	590
Gln	Glu	Glu	Glu	Lys	Ala	Glu	Gln	Arg	Lys	Arg	Ala	Arg	Ala	Glu	Lys	595	600	605
Lys	Ala	Leu	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Ile	Arg	Gly	Pro	Glu	Lys	Arg	Gly	610	615	620
Ala	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Lys	Glu	Trp	Gly	Asp	Asp	Glu	Glu	Glu	Gln	625	630	635
Pro	Ser	Lys	Arg	Arg	Arg	Val	Glu	Asn	Ser	Ile	Pro	Ala	Ala	Gly	Glu	645	650	655

Thr	Gln	Asn	Val	Glu	Val	Ala	Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Lys	Cys	Ala	Ala	
			660					665					670			
Val	Asp	Val	Glu	Pro	Pro	Ser	Lys	Gln	Lys	Glu	Lys	Ala	Ala	Ser	Leu	
		675					680					685				
Lys	Arg	Asp	Met	Pro	Lys	Val	Leu	His	Asp	Ser	Ser	Lys	Asp	Ser	Ile	
	690					695					700					
Thr	Val	Phe	Val	Ser	Asn	Leu	Pro	Tyr	Ser	Met	Gln	Glu	Pro	Asp	Thr	
	705				710					715					720	
Lys	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Ala	Cys	Gly	Glu	Val	Val	Gln	Ile	Arg	
				725					730					735		
Pro	Ile	Phe	Ser	Asn	Arg	Gly	Asp	Phe	Arg	Gly	Tyr	Cys	Tyr	Val	Glu	
			740					745					750			
Phe	Lys	Glu	Glu	Lys	Ser	Ala	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Met	Asp	Arg	Lys	
		755				760						765				
Ser	Val	Glu	Gly	Arg	Pro	Met	Phe	Val	Ser	Pro	Cys	Val	Asp	Lys	Ser	
	770					775					780					
Lys	Asn	Pro	Asp	Phe	Lys	Val	Phe	Arg	Tyr	Ser	Thr	Ser	Leu	Glu	Lys	
	785				790					795					800	
His	Lys	Leu	Phe	Ile	Ser	Gly	Leu	Pro	Phe	Ser	Cys	Thr	Lys	Glu	Glu	
				805					810					815		
Leu	Glu	Glu	Ile	Cys	Lys	Ala	His	Gly	Thr	Val	Lys	Asp	Leu	Arg	Leu	
			820					825					830			
Val	Thr	Asn	Arg	Ala	Gly	Lys	Pro	Lys	Gly	Leu	Ala	Tyr	Val	Glu	Tyr	
		835					840					845				
Glu	Asn	Glu	Ser	Gln	Ala	Ser	Gln	Ala	Val	Met	Lys	Met	Asp	Gly	Met	
	850					855					860					
Thr	Ile	Lys	Glu	Asn	Ile	Ile	Lys	Val	Ala	Ile	Ser	Asn	Pro	Pro	Gln	
	865				870					875					880	
Arg	Lys	Val	Pro	Glu	Lys	Pro	Glu	Thr	Arg	Lys	Ala	Pro	Gly	Gly	Pro	
			885						890					895		
Met	Leu	Leu	Pro	Gln	Thr	Tyr	Gly	Ala	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Thr	Gln	
			900					905					910			
Leu	Ser	Leu	Leu	Pro	Arg	Ala	Leu	Gln	Arg	Pro	Ser	Ala	Ala	Ala	Pro	
		915					920					925				
Gln	Ala	Glu	Asn	Gly	Pro	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Val	Ala	Ala	Pro	Ala	
		930				935					940					
Ala	Thr	Glu	Ala	Pro	Lys	Met	Ser	Asn	Ala	Asp	Phe	Ala	Lys	Leu	Phe	
	945				950					955					960	
Leu	Arg	Gly	Ala	Gly	Gly	Met	Val	His	His	Arg	His	Arg	Ser	Ser	Ser	
			965						970					975		
Thr	Arg	Ser	Gly	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Ser	Glu	
			980					985					990			
Glu	Glu	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Glu	Gly	Ala	Gly	Ser	
		995				1000						1005				
Asp	Val	Phe	Asp	Gly	Asp	Leu	Gly	Met	Gly	Ala	Ala	Lys	Gly	Leu	Gln	
	1010					1015						1020				
Ser	Leu	Pro	Thr	His	Asp	Pro	Ser	Pro	Leu	Gln	Arg	Tyr	Ser	Glu	Asp	
	1025				1030					1035					1040	
Pro	Thr	Val	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	Thr	Asp	Gly	Tyr	Val	Ala	Pro	Leu	
			1045						1050					1055		
Thr	Cys	Ser	Pro	Gln	Pro	Glu	Tyr	Val	Asn	Gln	Pro	Asp	Val	Arg	Pro	
			1060					1065					1070			
Gln	Pro	Pro	Ser	Pro	Arg	Glu	Gly	Pro	Leu	Pro	Ala	Ala	Arg	Pro	Ala	
		1075					1080					1085				
Gly	Ala	Thr	Leu	Glu	Arg	Ala	Lys	Thr	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Asn	Gly	
		1090				1095					1100					
Val	Val	Lys	Asp	Val	Phe	Ala	Phe	Gly	Gly	Ala	Val	Glu	Asn	Pro	Glu	
	1105				1110					1115					1120	
Tyr	Leu	Thr	Pro	Gln	Gly	Gly	Ala	Ala	Pro	Gln	Pro	His	Pro	Pro	Pro	
			1125						1130					1135		
Ala	Phe	Ser	Pro	Ala	Phe	Asp	Asn	Leu	Tyr	Trp	Asp	Gln	Asp	Pro		
			1140					1145					1150			
Pro	Glu	Arg	Gly	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr	Phe	Lys	Gly	Thr	Pro	Thr	Ala	
			1155				1160					1165				
Glu	Asn	Pro	Glu	Tyr	Leu	Gly	Leu	Asp	Val	Pro						
			1170				1175									

<211> 3537

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> SART-3-IC

<400> 30

atggcgactg	cgcccgaaac	ctcggttca	gaaccggag	ctgagtccaa	ggctggggcc	60
aaggctgacg	gagaggagga	tgagggttaag	gcggttagga	caaggagaaa	ggtgttatcg	120
cgggctgtgg	ccgctgcgac	atacaagacc	atggggccag	cgtgggatca	gcaggaggaa	180
ggcgtgagcg	agagcgatgg	ggatgagtag	gccatggctt	cctccgcgga	gagctccccc	240
ggggagtagc	agtgggaata	tgacgaagag	gaggagaaaa	accagctgga	gattgagaga	300
ctggaggagc	agttgtctat	caacgtotat	gactacaact	gccatgtgga	cttgatcaga	360
ctgctcaggc	tggaaggggg	gcttaccaag	gtgaggatgg	cccgcagaa	gatgagtga	420
atctttccct	tgactgaaga	gctctggctg	gagtggtgc	atgacgagat	cagcatggcc	480
caggatggcc	tggaacagaga	gcacgtgtat	gacctctttg	agaaagccgt	gaaggattac	540
atctgtccta	acattttggct	agagtatggc	cagtactcag	ttggtgggat	tggtcagaaa	600
gggtggcctt	agaaagtctc	ctcgtgtttt	gaaagggctc	tctcgtctgt	tggtttacat	660
atgaccaaag	gactgcacct	ctgggaggct	taccgagagt	ttgaaagtgc	gattgtggaa	720
gctgctcgcc	ttgagaaagt	ccacagtcct	ttccggcgac	agttggcgat	ccactctctat	780
gatatggagg	ccacattttgc	agagtatgaa	gaatggtcag	aagacccaat	accagagtca	840
gtaattcaga	actataacaa	agcactacag	cagctggaga	aatataaacc	ctatgaagaa	900
gcactgttct	aggcagaggg	accaaggctg	gcagaatata	aagcatatat	cgattttgag	960
atgaaaattg	gcgatcctgc	tcgcatticag	ttgatctttg	agcgcgcctt	ggtcgagaa	1020
tgccctgtcc	cagacttatg	gatccgttac	agtcagtacc	tagatcgaca	actgaaagta	1080
aaggattttg	ttttatctgt	acataaccgc	gctattagaa	actgcccctg	gacagttgcc	1140
ttatggatgg	ggtaacctct	ggccatggag	agacalggag	ttgatccatca	agtaatttct	1200
gtaacctctc	agaaagcttt	gaatgccggc	ttcatccagg	ccactgatta	tgtggagatt	1260
tggaaggcat	accttgatta	cctgaggaga	aggggttgatt	tcaaaacaga	ctccagtaaa	1320
gagctggagg	agttgagggc	cgcccttact	cgtgccttgg	agtatctgaa	gcaggaggtg	1380
gaagaagcgc	tcaatgagag	tggtgatcca	agctgcgtga	ttatgcagaa	ctgggtcagg	1440
attgaggctc	gactgtgcaa	taacatgcag	aaagctcggg	aactctggga	tagcatcatg	1500
accagaggaa	atgccaaagta	cgccaacatg	tggtctagagt	attacaacct	ggaaagagct	1560
catggtgaca	ccagcactg	ccggaaggct	ctgcacggg	ccgtccagtg	caccagtgc	1620
taccagagcg	acgtctgcga	agtggttact	acccatggaga	ggacagaagg	ttctttagaa	1680
gattgggata	tagctgttca	gaaaactgaa	acccgattag	ctcgtgtcaa	tgagcagaga	1740
atgaaggctg	cagagaagga	agcagccctt	gtgcagcaag	aagaaagaaa	ggctgaacaa	1800
cggaaaagag	ctcgggctga	gaagaaagcg	ttaaaaaaga	agaaaaagat	cagaggccca	1860
gagaagcgcg	ggacagatga	ggacagatga	aaagagtggt	gcgatgatga	agaagagcag	1920
ccttccaaac	gcagaagggt	cgagaacagc	atccctgcag	ctggagaaac	acaaaaatgta	1980
gaagttagcag	cagggccccg	tggaatagt	gctgccgtag	atgtggagcc	cccttcgaag	2040
cagaaggaga	aggcagcctc	cctgaagagg	gacatgccc	aggtgctgca	cgacagcagc	2100
aaggacagca	tcacctctct	tgtaagcaac	ctgccttaca	gcattgcagga	gcgggacacg	2160
aagctcaggc	cactcttcga	ggcctgtggg	gaggtggtcc	agatccgacc	catcttcagc	2220
aacctgtggg	atctccgagg	ttactgtctac	gtggagttaa	aagaagagaa	atcagccctt	2280
caggcactgg	agatggaccg	gaaaagtgtg	gaaggagggc	caatgtttgt	ttccccctgt	2340
gtggataaga	gcaaaaaccc	cgattttaag	gtgttcagg	acagcacttc	cctagagaaa	2400
cacaagctgt	tcactctcagg	cctgcctttc	tcctgtacta	aagaggaaact	agaagaaatc	2460
tgtaaggctc	atggcaccgt	gaaggacctc	aggtggttca	ccaaccgggc	tggaacacca	2520
aagggcctgg	cctacgtgga	gtatgaaaat	gaatcccagg	cgtcgcaggc	tgtgatgaag	2580
atggacggca	tgactatcaa	agagaacatc	atcaaagtgg	caatcagcaa	ccctcctcag	2640
aggaaagtgc	cagagaagcc	agagaccagg	aaggcaccag	gtggccccat	gcttttgccg	2700
cagacatacg	gagcgagggg	gaagggaagg	acgcagctgt	ctctactgcc	tcgtgccttg	2760
cagcgcccaa	gtgctgcagc	tcctcaggct	gagaacggcc	ctgcccgggc	tcctgcagtt	2820
gccgccccag	cagccaccga	ggcaccacaag	atgtccaatg	ccgattttgc	caagctgttt	2880
ctgagaggcg	ctgggggcat	ggtccaccac	aggcaccgca	gctcatctac	caggagtggc	2940
ggtggggacc	tgacactagg	gctggagccc	tctgaagagg	aggcccccag	gtctccactg	3000
gcacctcccg	aaggggctgg	ctccgatgta	tttgatgggt	acctgggaat	gggggcagcc	3060
aaggggctgc	aaagcctccc	cacacatgac	cccagccctc	tacagcggtg	cagtggagac	3120
cccacagtac	ccctgccttc	tgagactgat	ggctacgttg	ccccctgac	ctgcagcccc	3180
cagcctgaat	atgtgaacca	gccagatggt	cgccccagc	cccttcgccc	ccgagagggc	3240
cctctgctg	ctgcccagcc	tgtgtgtgcc	actctggaaa	gggccaagac	tctctcccca	3300
gggaagaatg	gggtcgtcaa	agacgttttt	gcctttgggg	gtgccgtgga	gaaccccgag	3360
tacttgacac	cccagggagg	agctgcccct	cagccccacc	ctcctcctgc	cttcagccca	3420
gccttcgaca	acctctatta	ctgggaaccag	gacccaccag	agcggggggc	tcacccagc	3480
accttcaaa	ggacacctac	ggcagagaa	ccagagtacc	tggggtctgga	cgtgcca	3537

Lisboa, 9 de Junho de 2011.

REIVINDICAÇÕES

1. Uma proteína de fusão imunoestimuladora HER-2, incluindo:

uma componente, sequência polipeptídica ou proteica de um antigénio, e uma sequência componente seleccionada de entre o conjunto constituído por HER500 (SEQ ID NO: 1), HER500.hGM-CSF (SEQ ID NO: 2), HER500* (SEQ ID NO: 3) e HER500*.rGM-CSF (SEQ ID NO: 4), em que a referida proteína de fusão imunoestimuladora seja eficaz para originar uma resposta imunológica celular à sequência componente, polipeptídica ou proteica, da proteína de fusão.

2. A proteína de fusão imunoestimuladora HER-2 da reivindicação 1, em que a sequência componente do domínio intracelular de HER-2 tenha a sequência apresentada como SEQ ID NO: 25.

3. A proteína de fusão imunoestimuladora HER-2 da reivindicação 1, em que a componente polipeptídica ou proteica esteja associada a células tumorais.

4. A proteína de fusão imunoestimuladora HER-2 da reivindicação 1, em que a componente polipeptídica ou

proteica seja a sequência do domínio extracelular distal da membrana de HER-2 madura, apresentada como SEQ. ID. NO: 23.

5. A proteína de fusão imunoestimuladora HER-2 da reivindicação 1, em que a proteína de fusão seja HER500.hGM-CSF (SEQ ID NO: 2).

6. T A proteína de fusão imunoestimuladora HER-2 da reivindicação 1, em que a resposta imunológica celular seja uma resposta imunológica induzida por células dendríticas, mediada por células T.

7. Uma composição de uma proteína de fusão imunoestimuladora HER-2 da reivindicação 1, incluindo:

a proteína de fusão imunoestimuladora da reivindicação 1, e células dendríticas superactivadas por uma exposição *in vitro* à proteína de fusão imunoestimuladora.

8. Um método *in vitro* de produzir DC superactivadas, por exposição a uma proteína de fusão imunoestimuladora, incluindo:

expor-se uma célula dendrítica (DC) ou um precursor de célula dendrítica (DCP) à proteína de fusão imunoestimuladora de qualquer uma das reivindicações 1 a 7, de um modo eficaz para resultar numa resposta imunológica celular à

sequência componente antigénica polipetídica ou proteica da proteína de fusão.

9. Utilização da proteína de fusão imunoestimuladora de qualquer uma das reivindicações 1 a 7 para a preparação de uma composição farmacêutica para produzir DC superactivadas por exposição de uma célula dendrítica (DC) ou de um precursor de células dendríticas (DCP) de um modo eficaz para que resulte uma resposta imunológica celular à sequência componente antigénica polipeptídica ou proteica, da proteína de fusão.

10. A utilização de uma proteína de fusão imunoestimuladora HER2 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, no fabrico de um medicamento para tratar cancro, em que o cancro esteja associado a um determinado antígeno.

11. A utilização de DC superactivadas tal como se definiram na reivindicação 8 ou na 9, no fabrico de um medicamento para tratar o cancro, em que o cancro esteja associado a um determinado antígeno.

Lisboa, 9 de Junho de 2011.

RESUMO

**"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA IMUNOTERAPIA BASEADA
EM CÉLULAS DENDRÍTICAS"**

São descritas proteínas de fusão imunoestimuladoras e métodos para gerar respostas imunológicas protectoras induzidas por DC e mediadas por células T *in vitro* e *in vivo*. As proteínas de fusão imunoestimuladoras incluem uma componente de antigénio polipeptídico e uma componente imunoestimuladora derivada do domínio intracelular da proteína HER-2. Também se descrevem composições imunoestimuladoras incluindo células dendríticas pulsadas com uma dessas proteínas de fusão imunoestimuladoras, e métodos para imunoterapia utilizando as composições.

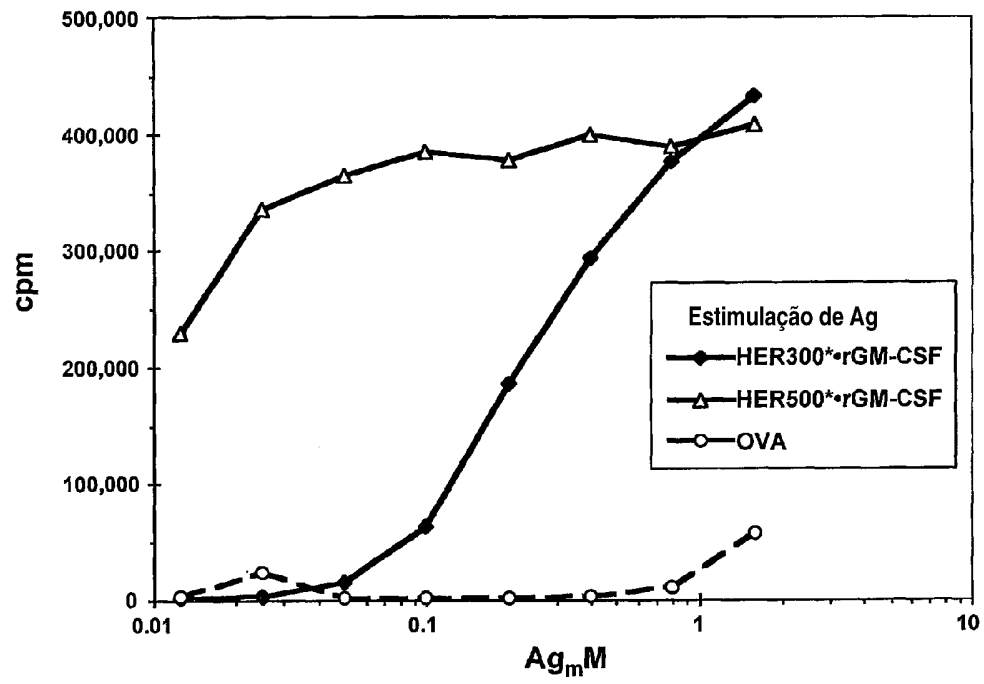


Fig. 1

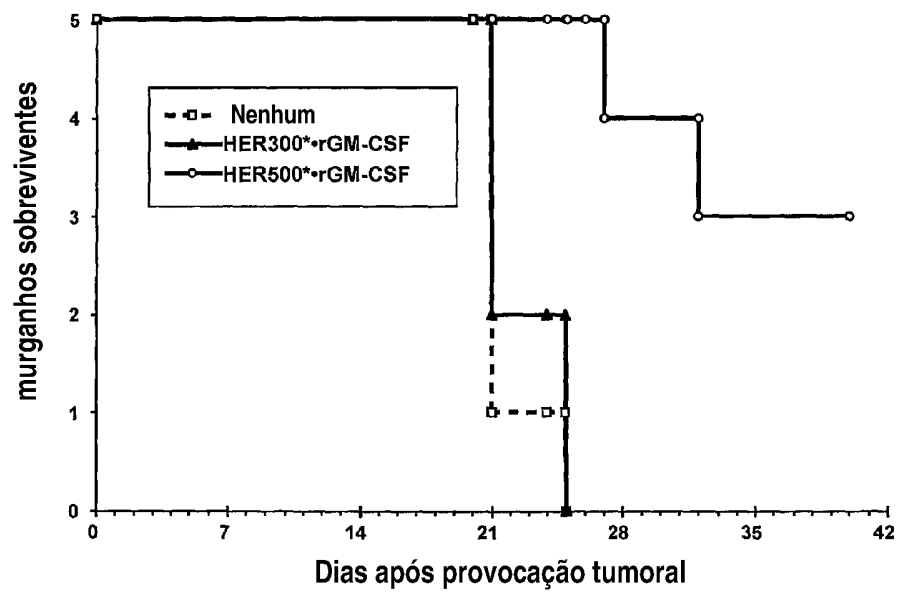


Fig. 2A

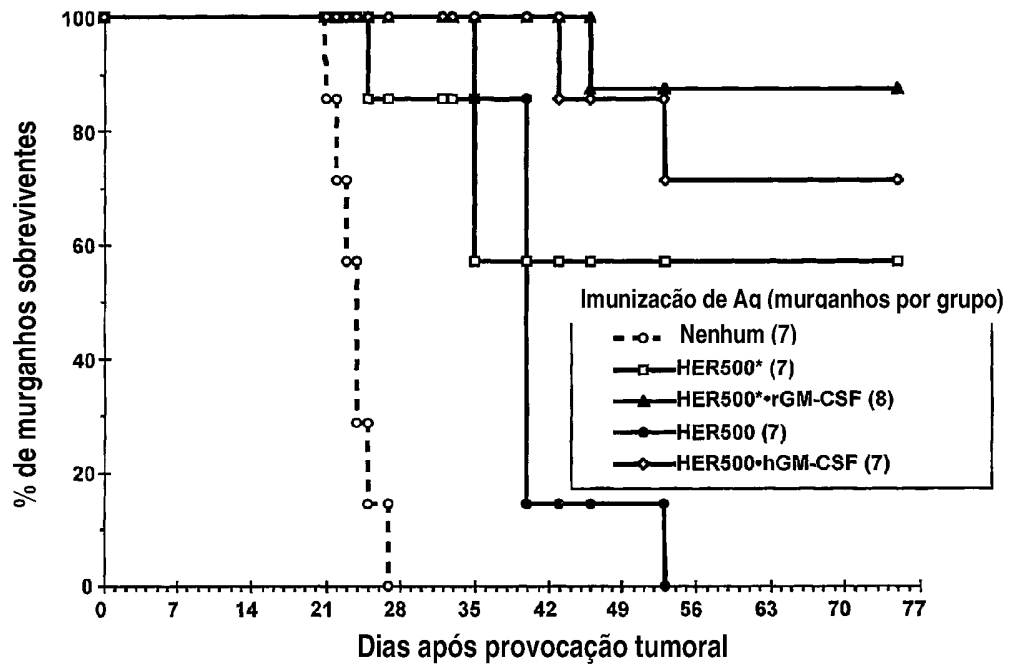


Fig. 2B

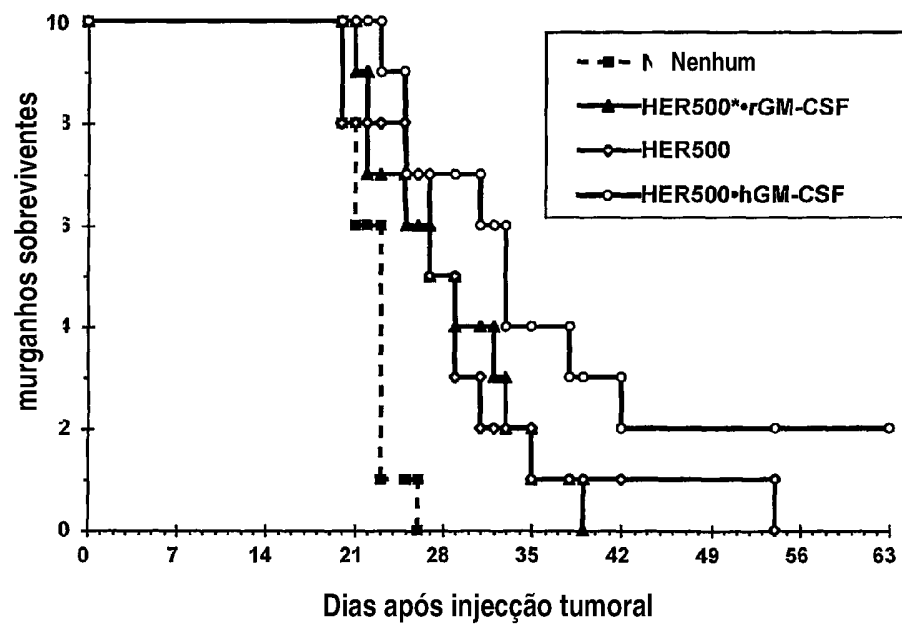


Fig. 3