República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112012024997-5 B1**

**(22) Data do Depósito:** 30/03/2011

**(45) Data de Concessão:** 22/03/2022

**(54) Título:** PEPTÍDEO DE TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULA EPITELIAL 2 (ECT2), SEU USO, COMPOSIÇÕES PARA INDUZIR UM LINFÓCITO T CITOTÓXICO E PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER, E MÉTODOS IN VITRO PARA INDUZIR UMA 5 CÉLULA APRESENTADORA DE ANTÍGENO E UM LINFÓCITO T CITOTÓXICO

**(51) Int.Cl.:** C12N 15/09.

**(30) Prioridade Unionista:** 02/04/2010 US 61/320,577.

**(73) Titular(es):** ONCOTHERAPY SCIENCE, INC..

**(72) Inventor(es):** YUSUKE NAKAMURA; TAKUYA TSUNODA; RYUJI OHSAWA; SACHIKO YOSHIMURA; TOMOHISA WATANABE.

**(86) Pedido PCT:** PCT JP2011001909 de 30/03/2011

**(87) Publicação PCT:** WO 2011/122022 de 06/10/2011

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 01/10/2012

**(57) Resumo:** PEPTÍDEO DE TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULA EPITELIAL 2 (ECT2) E POLINUCLEOTÍDEO, SEUS USOS, COMPOSIÇÕES PARA INDUZIR UM LINFÓCITO T CITOTÓXICO E PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER, MÉTODOS IN VITRO PARA INDUZIR UMA CÉLULA APRESENTADORA DE ANTÍGENO E UM LINFÓCITO T CITOTÓXICO, BEM COMO ANTICORPO, VETOR E KIT DE DIAGNÓSTICO A presente invenção refere-se a peptídeos isolados derivados de SEQ ID NO: 42 e seus fragmentos, que se ligam a um antígeno HLA e induzem linfócitos T citotóxicos (CTL) e, assim, são adequadas ao uso no contexto de imunoterapia do câncer, mais particularmente, vacinas contra o câncer. Os peptídeos da invenção abragem as sequências de aminoácidos supracitadas assim como versões modificadas das mesmas, nas quais um, dois, ou vários aminoácidos são substituídos, deletados, inseridos ou adicinados, contanto que estas versões modificadas guardem a ligação ao HLA e/ou capacidade de indução de CTL indispensável das sequências originais. São ainda fornecidos ácidos nucleicos que codificam qualquer um dos peptídeos supracitados, assim como agentes, substâncias e/ou composições farmacêuticas que incluem ou incorporam qualquer um dos peptídeos ou ácidos nucleicos supracitrados. Os peptídeos, ácidos nucleicos, agentes, substâncias e composições farmacêuticas desta invenção encontram utilidade particular no tratamento de cânceres e tumores, incluindo, por exemplo, câncer (...).

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PEPTÍDEO DE TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULA EPITELIAL 2 (ECT2), SEU USO, COMPOSIÇÕES PARA INDUZIR UM LINFÓCITO T CITOTÓXICO E PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER, E MÉTODOS IN VITRO PARA INDUZIR UMA CÉLULA APRESENTADORA DE ANTÍGENO E UM LINFÓCITO T CITOTÓXICO".**

Campo Técnico

A presente invenção refere-se ao campo de ciência biológica, mais especificamente ao campo de terapia do câncer. Especificamente, a presente invenção refere-se a novos peptídeos que são extremamente eficazes como vacinas para o câncer, assim como fármacos para o tratamento e prevenção de tumores.

Prioridade

O presente pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. nº 61/320.577, depositado 2 de abril de 2010, cujo conteúdo completo está aqui incorporado a título de referência.

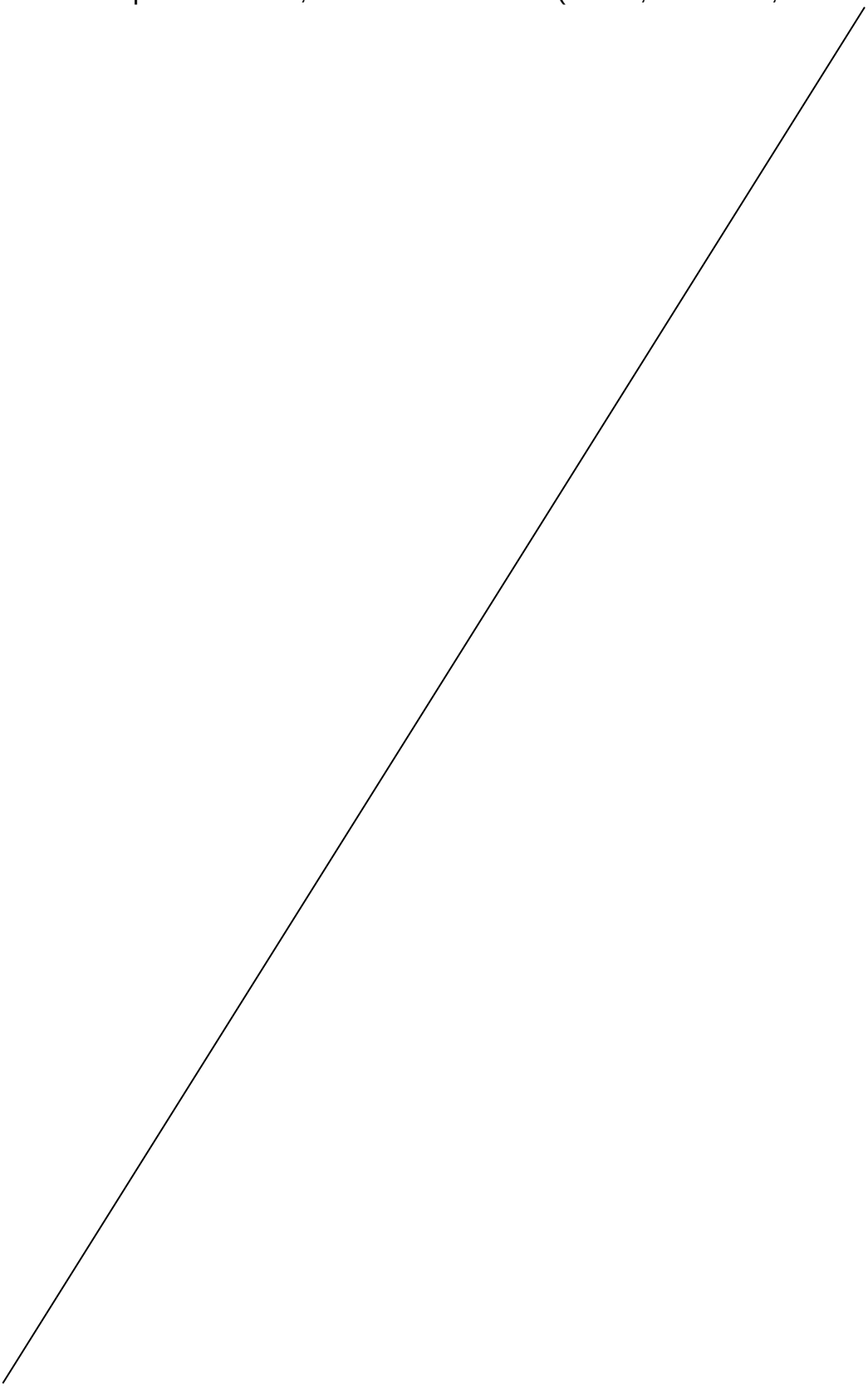
Antecedentes da Invenção

Foi demonstrado que CTLs CD8 positivos reconhecem peptídeos epítopos derivados de antígenos associados a tumores (TAAs) encontrados na molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I, e então matam as células tumorais. Desde a descoberta da família do antígeno do melanoma (MAGE) como o primeiro exemplo de TAAs, muitos outros TAAs foram descobertos através de abordagens imunológicas (NPL 1, Boon T, Int J Cancer 1993 Maio 8, 54(2): 177-80; NPL 2, Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9). Alguns destes TAAs estão atualmente sendo submetidos a desenvolvimento clínico como alvos imunoterapêuticos.

Os TAAs favoráveis são indispensáveis para a proliferação e sobrevida das células de câncer. O uso de tais TAAs como alvos para imunoterapia pode reduzir o bem descrito risco de escape imune das células de câncer que pode ser atribuído à deleção, mutação ou regulação negativa de TAAs como uma consequência da seleção imune terapeuticamente dirigida. Consequentemente, a identificação de novos TAAs capazes de induzir respostas

Segue-se folha 1a/86

imunes antitumorais potentes e específicas garante desenvolvimento adicional e a investigação clínica de estratégias de vacinação com peptídeo para diversos tipos de câncer, está em andamento (NPL 3, Harris CC, J Natl



Segue-se folha 2/86

Cancer Inst 1996 Out 16, 88(20): 1442-55; NPL 4, Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42; NPL 5, Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9; NPL 6, van der Burg SH et al., J Immunol 1996 Maio 1, 156(9): 3308-14; NPL 7, Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Out 15, 57(20): 4465-8; NPL 8, Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72; NPL 9, Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 Maio 5, 81(3): 459-66; NPL 10, Oiso M et al., Int J Cancer 1999 Maio 5, 81(3): 387-94). Até o momento, vários testes clínicos usando estes peptídeos derivados de antígenos associados a tumores foram relatados. Infelizmente, muitos dos testes de vacinas atuais mostraram apenas uma baixa taxa de resposta objetiva(NPL 11, Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Out 15, 20(20): 4169-80; NPL 12, Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Out, 188: 33-42; NPL 13, Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Set, 10(9): 909-15). Consequentemente, permanece uma necessidade por novos TAAs como alvos imunoterapêuticos.

O oncogene da sequência de transformação de célula epitelial 2 (ECT2) (GenBank, nº de acesso AY376439; por exemplo, SEQ ID No: 41) foi descoberto a partir dos transcritos identificados como sobre-regulados no câncer. O gene ECT2 está especificamente sobre-regulado em células tumorais de vários cânceres, incluindo, mas não se limitando a câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, leucemia mielóide crônica (LMC), câncer colorretal, câncer de esôfago, câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC), linfoma, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma renal e câncer de pulmão de pequenas células (SCLC) e, assim, é de importância particular para a presente invenção (PTL 1, WO2007/013671; PTL 2, WO2008/102557; PTL 3, WO2010/007791). Em particular, os peptídeos imunogênicos derivados de ECT2 podem ser úteis em matar seletivamente células tumorais que expressam tais antígenos.

Lista de citações

Literatura Não-Patentária

[NPL 1] Boon T, Int J Cancer, 1993 Mai 8, 54(2): 177-80

[NPL 2] Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9

[NPL 3] Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Out 16, 88(20): 1442-55

[NPL 4] Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42

[NPL 5] Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9

[NPL 6] van der Burg SH et al., J Immunol 1996 Mai 1, 156(9): 3308-14

[NPL 7] Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Out 15, 57(20): 4465-8

[NPL 8] Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72

[NPL 9] Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 Mai 5, 81(3): 459-66

[NPL 10] Oiso M et al., Int J Cancer 1999 Mai 5, 81(3): 387-94

[NPL 11] Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Out 15, 20(20): 4169-80

[NPL 12] Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Out, 188: 33-42

[NPL 13] Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Set, 10(9): 909-15

Literatura Patentária

[PTL 1] WO2007/013671

[PTL 2] WO2008/102557

[PTL 3] WO2010/007791

Sumário da Invenção

A presente invenção tem por base, pelo menos em parte, a descoberta de alvos adequados de imunoterapia. Pelo fato de as TAAs serem geralmente percebidas pelo sistema imune como "autólogas" e, portanto, frequentemente não terem imunogenicidade, a descoberta de alvos adequados é de extrema importância. Reconhecendo que ECT2 (SEQ ID NO: 42, codificada pelo gene de nº de acesso do GenBank AY376439 (por exemplo, SEQ ID NO: 44)) foi identificada como estando super regulada em cânceres, cujos exemplos incluem, mas não se limitam a, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, LMC, câncer colorretal, câncer de esôfago, NSCLC, linfoma, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma renal e SCLC, a presente invenção tem como objetivo ECT2 como um candidato para o alvo de imunoterapia de câncer/tumor, mais particularmente, novos peptídeos epítopos de ECT2 que podem servir como alvos imunoterapêuticos adequados.

Para isto, a presente invenção está direcionada, pelo menos em parte, à identificação de peptídeos epítopos específicos entre os produtos gênicos de ECT2 que possuem a capacidade de induzir CTLs específicos para ECT2. Conforme discutido em detalhes abaixo, células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) obtidas a partir de um doador saudável foram estimuladas com o uso de peptídeos candidatos a ligação a HLA-A*0201 derivados de ECT2. As linhagens de CTL com citotoxicidade específica contra células-alvo positivas para HLA-A2 pulsadas com cada um dos peptídeos candidatos foram então estabelecidas. Os resultados da presente invenção demonstram que estes peptídeos são peptídeos epítopos restritos por HLA-A2 que podem induzir respostas imunes potentes e específicas contra células que expressam ECT2. Estes resultados demonstram ainda que ECT2 é fortemente imunogênica e que seus epítopos são alvos eficazes para a imunoterapia do câncer/tumor.

Consequentemente, é um objeto da presente invenção fornecer peptídeos isolados que se ligam a antígenos HLA, incluindo ECT2 (SEQ ID NO: 42), e os seus fragmentos imunologicamente ativos. Espera-se que tais peptídeos tenham capacidade de indução de CTL e, desta forma, possam ser usados para induzir CTL ex vivo ou serem administrados a um indivíduo para induzir respostas imunes contra cânceres, cujos exemplos incluem, mas não se limitam a, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, LMC, câncer colorretal, câncer de esôfago, NSCLC, linfoma, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma renal e SCLC. Os peptídeos preferenciais são nonapeptídeos e decapeptídeos, com mais preferência, nonapeptídeos e decapeptídeos que têm a sequência de aminoácidos selecionada dentre as SEQ ID NOs: 1 a 40. Os peptídeos que possuem uma sequência de aminoácidos selecionada dentre as SEQ ID NOs: 1, 3 e 21 mostrou forte capacidade de indução de CTL e, assim, são particularmente preferenciais.

A presente invenção também contempla peptídeos modificados, que possuem uma sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 1 a 40, sendo que um, dois ou mais aminoácido(s) é/são substituído(s), inserido(s), de-

letado(s) ou adicionado(s), contanto que os peptídeos modificados guardem a capacidade de indução de CTL indispensável do peptídeo original.

A presente invenção ainda abrange polinucleotídeos isolados que codificam qualquer um dos peptídeos da presente invenção. Estes polinucleotídeos podem ser usados para preparar APCs com capacidade de indução de CTL ou, como os peptídeos da presente invenção descritos acima, podem ser administrados a um indivíduo para induzir respostas imunes contra cânceres.

Quando administrados a um indivíduo, os presentes peptídeos são apresentados sobre a superfície de APCs de modo a induzir CTLs que alvejam os respectivos peptídeos. Portanto, um objeto da presente invenção é fornecer agentes, composições e/ou substâncias que incluem ou incorporam quaisquer peptídeos ou polinucleotídeos da presente invenção para induzir CTLs. Tais agentes, composições e substâncias podem ser usadas para o tratamento e/ou profilaxia e/ou recorrência pós-operatória de cânceres, especialmente, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, LMC, câncer colorretal, câncer de esôfago, NSCLC, linfoma, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma renal e SCLC. Desta forma, é ainda outro objeto da presente invenção fornecer agentes, composições e/ou substâncias farmacêuticas para o tratamento e/ou profilaxia e/ou para a prevenção da recorrência pós-operatória de câncer, que incluem ou incorporam qualquer um dos peptídeos ou polinucleotídeos da presente invenção. Ao invés de, ou em adição aos presentes peptídeos ou polinucleotídeos, os agentes, composições e substâncias farmacêuticas da presente invenção podem incluir como ingredientes ativos, APCs ou exossomos que apresentam qualquer um dos presentes peptídeos.

Os peptídeos ou polinucleotídeos da presente invenção podem ser usados para induzir APCs que apresentam sobre sua superfície um complexo de um antígeno HLA e o presente peptídeo, por exemplo, por colocar APCs derivadas de um indivíduo em contato com o presente peptídeo ou introduzir um polinucleotídeo que codifica o peptídeo da presente invenção em APCs. Tais APCs possuem alta capacidade de indução de CTL con-

tra os peptídeos alvo e são úteis para imunoterapia do câncer. Consequentemente, a presente invenção abrange os métodos para induzir APCs com capacidade de indução de CTL assim como as APCs obtidas por tais métodos.

É um objeto adicional da presente invenção fornecer um método para induzir CTL, tais métodos incluindo a etapa de co-cultivar células CD8-positivas com APCs ou exossomos que apresentam o peptídeo da presente invenção sobre sua superfície ou a etapa de introduzir um gene que inclui um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de subunidade de receptor de célula T (TCR) que se liga ao presente peptídeo. Os CTLs obtidos por estes métodos podem ser usados no tratamento e/ou prevenção de cânceres, cujos exemplos incluem, mas não se limitam a, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, LMC, câncer colorretal, câncer de esôfago, NSCLC, linfoma, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma renal e SCLC. Portanto, é ainda outro objeto da presente invenção fornecer CTLs que podem ser obtidos pelos presentes métodos.

Um outro objeto da presente invenção é fornecer métodos para induzir uma resposta imune contra o câncer em um indivíduo que necessite, cujos métodos incluem a etapa de administrar composições ou substâncias incluindo os polipeptídeos ECT2 ou seus fragmentos imunologicamente ativos, polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos ECT2, exossomos ou APCs que apresentam os polipeptídeos ECT2.

A aplicabilidade da presente invenção se estende a qualquer uma dentre inúmeras doenças relacionadas com ou que surgem a partir da superexpressão de ECT2 câncer, cujos exemplos incluem, mas não se limitam a, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, LMC, câncer colorretal, câncer de esôfago, NSCLC, linfoma, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma renal e SCLC.

Especificamente, a presente invenção fornece o seguinte:

[1] Peptídeo isolado que consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42 ou um fragmento imunologicamente ativo do mesmo, sendo que o dito peptídeo se liga a um antígeno HLA e induz linfócitos T ci-

totóxicos (CTLs),

[2] Peptídeo isolado, de acordo com [1], em que o antígeno HLA é HLA-A2,

[3] Peptídeo isolado, de acordo com [1] ou [2], em que o dito peptídeo compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 1 a 40,

[4] Peptídeo isolado selecionado do grupo que consiste em:

(a) um peptídeo isolado que se liga a um antígeno HLA e induz linfócitos T citotóxicos (CTL) e consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42 ou um fragmento imunologicamente ativo do mesmo,

(b) o peptídeo isolado de (a), em que o antígeno HLA é HLA-A2,

(c) o peptídeo isolado de (a) ou (b), que compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 1 a 40, e

(d) peptídeo isolado de (a) ou (b) que consiste em uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 1 a 40, em que 1, 2, ou vários aminoácidos são substituídos, deletados, inseridos ou adicionados, desde que o dito peptídeo modificado guarde a capacidade de indução de CTL do peptídeo original,

[5] Peptídeo isolado de [4], que consiste em uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 1 a 40, em que o peptídeo tem uma das seguintes características, ou ambas:

(a) o segundo aminoácido da terminação N é selecionado do grupo que consiste em leucina ou metionina; e

(b) o aminoácido C-terminal é selecionado a partir do grupo que consiste em valina ou leucina,

[6] Peptídeo isolado, de acordo com [1] a [5], em que o dito peptídeo é um nonapeptídeo ou um decapeptídeo.

[7] Polinucleotídeo isolado que codifica o peptídeo como definido em qualquer um de [1] a [6],

[8] Composição para induzir CTL, sendo que a composição compreende um ou mais peptídeos como definidos em qualquer um de [1] a

[6], ou um ou mais polinucleotídeo(s) de [7].

[9] Composição farmacêutica para o tratamento e/ou profilaxia e/ou para a prevenção da recorrência pós-operatória de câncer, em que a composição compreende um ou mais peptídeos como definidos em qualquer um de [1] a [6], ou um ou mais polinucleotídeos como definidos em [7],

[10] Composição farmacêutica de acordo com [9], em que a dita composição é formulada para a administração a um indivíduo cujo antígeno HLA é HLA-A2,

[11] Composição farmacêutica de acordo com [9] ou [10], em que a dita composição é formulada para tratar câncer,

[12] Método para induzir uma célula apresentadora de antígeno (APC) com capacidade de indução de CTL, que compreende uma etapa selecionada do grupo que consiste em:

(a) colocar uma APC em contato com um peptídeo como definido em qualquer um de [1] a [6] in vitro, ex vivo ou in vivo, e

(b) introduzir um polinucleotídeo que codifica o peptídeo como definido em qualquer um de [1] a [6] em uma APC,

[13] Método para induzir CTL através de um método que compreende uma etapa selecionada do grupo que consiste em:

(a) co-cultivar células T CD8-positivas com APCs que apresentam um complexo de um antígeno HLA e um peptídeo como definido em qualquer um de [1] a [6] na sua superfície;

(b) cocultivar células T CD8-positivas com exossomos, que apresentam um complexo de um antígeno HLA e um peptídeo como definido em qualquer um de [1] a [6] na sua superfície; e

(c) introduzir um gene que compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de uma subunidade de receptor de célula T (TCR) ligado a um peptídeo como definido em qualquer um de [1] a [6] em uma célula T,

[14] APC isolada que apresenta um complexo de um antígeno HLA e um peptídeo como definido em qualquer um de [1] a [6] na sua superfície,

[15] APC de acordo com [14], que é induzida pelo método como definido em [12],

[16] CTL isolado que atinge qualquer um dos peptídeos como definidos em [1] a [6],

[17] CTL, de acordo com [16], que é induzido pelo método como definido em [13]

[18] Método de induzir uma resposta imune contra o câncer em um indivíduo que necessite, o dito método compreendendo a etapa de administrar ao indivíduo uma composição que compreende um peptídeo como definido em [1] a [6], um fragmento imunologicamente ativo do mesmo, ou um polinucleotídeo que codifica o peptídeo ou o fragmento,

[19] Anticorpo ou fragmento imunologicamente ativo do mesmo contra qualquer um dos peptídeos como definidos em [1] a [6],

[20] Vetor que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica qualquer um dos peptídeos como definidos em [1] a [6],

[21] Kit de diagnóstico que compreende qualquer um dos peptídeos como definidos em [1] a [6], o nucleotídeo como definido em [7] ou o anticorpo como definido em [19].

Deve ser compreendido que tanto o sumário da presente invenção anteriormente mencionado quanto a seguinte descrição detalhada se referem a modalidades exemplificadoras, e não são restritivos da invenção ou de outras modalidades alternativas da invenção.

Em adição ao acima, outros objetos e características da invenção se tornarão mais completamente aparentes quando a seguinte descrição detalhada for lida em conjunto com as figuras e exemplos em anexo. Entretanto, deve ser compreendido que tanto o sumário da invenção anteriormente mencionado quanto a seguinte descrição detalhada se referem a modalidades exemplificadas, e não são restritivos da invenção ou de outras modalidades alternativas da invenção. Em particular, embora a invenção seja aqui descrita com relação a inúmeras modalidades específicas, será entendido que a descrição é ilustrativa da invenção e não é considerada como limitadora da invenção. Várias modificações e aplicações podem ocorrer aos versa-

dos na técnica, sem que se desvie do espírito e escopo da invenção, conforme descrita pelas reivindicações em anexo. De modo semelhante, outros objetos, características, benefícios e vantagens da presente invenção serão evidentes a partir deste sumário e determinadas modalidades descritas a seguir, e serão facilmente evidentes aos versados na técnica. Tais objetos, características, benefícios e vantagens serão evidentes a partir da descrição acima em conjunto com os exemplos, dados, figuras em anexo e todas as deduções razoáveis a serem extraídas disto, sozinhas ou considerando as referências aqui incorporadas.

Breve Descrição dos Desenhos

Vários aspectos e aplicações da presente invenção se tornarão evidentes ao versado na técnica por referência à breve descrição das figuras e à descrição detalhada da presente invenção e suas modalidades preferenciais, que seguem.

Figura 1

A figura 1 compreende uma série de fotografias, (a) a (c), representando os resultados de testes de ELISPOT para IFN-gama em CTLs que foram induzidos com peptídeos derivados de ECT2. Os CTLs no poço número 6 estimulados com ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) (a), no poço número 5 estimulados com ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3) (b) e no poço número 1 estimulados com ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) (c) mostraram potente produção de IFN-gama em comparação ao controle. O quadrado no poço destes imagens indica que as células do poço correspondente foram expandidas para estabelecer linhagens de CTL. Nas figuras, "+" indica a produção de IFN-gama contra células-alvo pulsadas com o peptídeo adequado e "-" indica a produção de IFN-gama contra células-alvo não pulsadas com nenhum dos peptídeos.

Figura 2

A figura 2 compreende uma série de gráficos de linha, (a) a (c), representando os resultados de um ensaio ELISA para IFN-gama demonstrando a produção de IFN-gama de linhagens de CTL estimuladas com (a) ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1), (b) ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3) e (c)

ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21). Os resultados demonstram que as linhagens de CTL estabelecidas por estimulação com cada peptídeo mostram potente produção de IFN-gama em comparação ao controle. Nas figuras, "+" indica a produção de IFN-gama contra células-alvo pulsadas com o peptídeo adequado, e "-" indica a produção de IFN-gama contra células-alvo não pulsadas com os peptídeos.

Figura 3

A figura 3 representa um par de gráficos de linha (a) e (b) mostrando a produção de IFN-gama dos clones de CTL estabelecidos por diluição limitante a partir das linhagens de CTL estimuladas com (a) ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) e (b) ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3). Os resultados demonstram que os clones de CTL estabelecidos por estimulação com cada peptídeo mostraram potente produção de IFN-gama em comparação ao controle. Na figura, "+" indica a produção de IFN-gama contra células-alvo pulsadas com o peptídeo adequado e "-" indica a produção de IFN-gama contra células-alvo não pulsadas com nenhum dos peptídeos.

Figura 4

A figura 4 representa um par de gráficos de linha, (a) e (b), mostrando a atividade específica de CTL contra as células-alvo que expressam exogenamente ECT2 e HLA-A*0201. Células COS7 transfectadas com HLA-A*0201 ou com o gene de extensão completa de ECT2 foram preparadas como controles. O clone de CTL estabelecido com ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) (a) e a linha de CTL estabelecida com ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) (b) mostraram atividade específica de CTL contra células COS7 transfectadas com ambos ECT2 e HLA-A*0201 (círculo preto). Por outro lado, não se detectou atividade específica de CTL significativa contra células-alvo expressando HLA-A*0201 (triângulo) ou ECT2 (círculo branco).

Descrição das Modalidades

Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes aos descritos aqui possam ser usados na prática ou teste das modalidades da presente invenção, os materiais, métodos e dispositivos preferenciais são agora descritos. Entretanto, antes dos presentes materiais e métodos

serem descritos, deve ser compreendido que estas descrições são meramente ilustrativas e não se destinam a limitar a invenção. Deve ser compreendido que a presente invenção não se limita aos tamanhos, formatos, dimensões, materiais, metodologias, protocolos, etc. particulares aqui descritos, uma vez que estes podem variar de acordo com experimentação e/ou otimização de rotina. Além disso, a terminologia usada na descrição tem o único propósito de descrever as versões ou modalidades particulares, e não se destina a limitar o escopo da presente invenção que será limitada apenas pelas reivindicações em anexo.

A descrição de cada publicação, patente ou pedido de patente mencionado neste relatório descritivo está especificamente aqui incorporada por referência em sua totalidade. Entretanto, nada aqui deve ser interpretado como uma admissão de que a invenção não tem direito de anteceder tal descrição por virtude ou invenção anterior.

A menos que seja definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado conforme compreendido pelo versado na técnica à qual a presente invenção pertence. Em caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo as definições, irão controlar. Além disso, os materiais, métodos, e exemplos são apenas ilustrativos e não se destinam a limitar a invenção.

I. Definições

As palavras "a", "o", "um, "uma", para uso na presente invenção significam "pelo menos um" exceto onde especificamente indicado em contrário.

Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados de maneira intercambiável na presente invenção para referir-se a um polímero de resíduos de aminoácido. Os termos se aplicam a polímeros de aminoácido nos quais um ou mais resíduo(s) de aminoácidos pode(m) ser resíduo(s) modificado(s), ou resíduo(s) que não tem ocorrência natural, tal como um mimético(s) químico(s) artificial(is) de um aminoácido de ocorrência natural correspondente, assim como polímeros de aminoácido de ocorrência natural.

O termo "oligopeptídeo" usado algumas vezes no presente rela-

tório descritivo é usado para se referir aos peptídeos da presente invenção que têm 20 resíduos ou menos, tipicamente 15 resíduos ou menos, de comprimento e são compostos, tipicamente, por entre cerca de 8 e cerca de 11 resíduos, frequentemente 9 ou 10 resíduos.

O termo "aminoácido" para uso na presente invenção, refere-se a aminoácidos de ocorrência natural e sintéticos, assim como análogos de aminoácido e miméticos de aminoácido que funcionam de modo similar aos aminoácidos de ocorrência natural. O aminoácido pode ser L-aminoácidos ou D-aminoácidos. Aminoácidos de ocorrência natural são aqueles codificados pelo código genético, assim como aqueles modificados após tradução nas células (por exemplo, hidróxiprolina, gama-carbóxiglutamato, e O-fosfoserina). A expressão "análogo de aminoácido" refere-se a compostos que possuem a mesma estrutura química básica (um carbono alfa ligado a um hidrogênio, um grupo carbóxi, um grupo amino, e um grupo R) que um aminoácido de ocorrência natural, mas possuem um ou mais grupo(s) R modificado(s) ou cadeias principais modificadas (por exemplo, homoserina, norleucina, metionina, sulfóxido, metil metionina sulfônio). A expressão "mimético de aminoácido" refere-se a compostos químicos que possuem estruturas diferentes, mas funções similares aos aminoácidos em geral.

Os aminoácidos podem ser referidos na presente invenção por seus símbolos de três letras comumente conhecidos ou pelos símbolos de uma letra recomendados pela Comissão de Nomenclatura Bioquímica da IUPAC-IUB.

Os termos "gene", "polinucleotídeos", "nucleotídeos" e "ácidos nucleicos" são usados de maneira intercambiável na presente invenção e, exceto onde especificamente indicado em contrário, de maneira similar aos aminoácidos, são referidos por seus códigos de uma letra comumente aceitos.

Os termos "agente", "substância" e "composição" são usados de maneira intercambiável na presente invenção para fazer referência a um produto que inclui os ingredientes especificados nas quantidades especificadas, bem como qualquer produto que resulte, direta ou indiretamente, da

combinação dos ingredientes especificados nas quantidades especificadas. Tais termos, quando usados em relação ao modificador farmacêutico (por exemplo, "agente farmacêutico" e "composição farmacêutica") se destinam a abranger um produto que inclui o(s) ingrediente(s) ativo(s), e qualquer(quaisquer) ingrediente(s) inerte(s) que formam o veículo, bem como qualquer produto que resulte, direta ou indiretamente, da combinação, complexação ou agregação de quaisquer dois ou mais dos ingredientes, ou da dissociação de um ou mais dos ingredientes, ou de outros tipos de reações ou interações de um ou mais dos ingredientes. Consequentemente, no contexto da presente invenção, os termos "agente farmacêutico" e "composição farmacêutica" referem-se a qualquer produto feito pela mistura de uma molécula ou composto da presente invenção e um veículo farmaceuticamente ou fisiologicamente aceitável.

A expressão "veículo farmaceuticamente aceitável" ou "veículo fisiologicamente aceitável", para uso na presente invenção, significa um material, composição, substância ou carreador farmaceuticamente ou fisiologicamente aceitável incluindo, mas não se limitando a, uma carga, diluente, excipiente, solvente ou material de encapsulação líquido ou sólido envolvido no carreamento ou transporte dos presentes polifarmacóforos estruturados de um órgão, ou porção do corpo, a outro órgão, ou porção do corpo.

Os agentes farmacêuticos ou composições farmacêuticas da presente invenção podem ser usados, particularmente, como vacinas. No contexto da presente invenção, a expressão "vacina" (também chamada de uma "composição imunogênica") refere-se a uma substância que tem a função de induzir imunidade antitumoral mediante inoculação em animais.

O termo "ingrediente ativo" na presente invenção refere-se a uma substância em um agente ou composição que é biologicamente ou fisiologicamente ativa. Particularmente, no contexto de um agente ou composição farmacêutica, o termo "ingrediente ativo" se refere a uma substância que mostra um efeito farmacológico objetivo. Por exemplo, no caso de agentes ou composições farmacêuticas para uso no tratamento ou prevenção de câncer, os ingredientes ativos nos agentes ou composições podem levar a

pelo menos uma ação biológica ou fisiológica em células e/ou tecidos de câncer, diretamente ou indiretamente. De preferência, tal ação pode incluir reduzir ou inibir o crescimento da célula de câncer, danificar ou matar células e/ou tecidos de câncer e assim por diante. Tipicamente, o efeito indireto dos ingredientes ativos é a indução de CTLs que reconhecem ou matam células de câncer. Antes de ser formulado, o "ingrediente ativo" também pode ser chamado de "bulk", "substância farmacêutica" ou "produto técnico".

Exceto onde definido de outro modo, o termo "câncer" refere-se aos cânceres que superexpressam o gene ECT2, cujos exemplos incluem, mas não se limitam a, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, LMC, câncer colorretal, câncer de esôfago, NS-CLC, linfoma, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma renal e SCLC.

Exceto onde definido de outro modo, os termos "linfócito T citotóxico", "célula T citotóxica" e "CTL" são usados de maneira intercambiável na presente invenção e exceto onde especificamente indicado em contrário, referem-se um subgrupo de linfócitos T que são capazes de reconhecer células não autólogas (por exemplo, células tumorais/câncer, células infectadas por vírus) e induzir a morte destas células.

Exceto onde definido de outro modo, o termo "HLA-A2", Para uso na presente invenção, se refere representativamente aos subtipos, cujos exemplos incluem, mas não se limitam a HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-A*0228 e HLA-A*0250.

Exceto onde definido de outro modo, o termo "kit" para uso na presente invenção, é usado com relação a uma combinação de reagentes e outros materiais. É aqui contemplado que o kit pode incluir um microarranjo, chip, marcador, e assim por diante. O termo "kit" não se destina a estar limitado a uma combinação particular de reagentes e/ou materiais.

Para uso na presente invenção, no contexto de um indivíduo ou paciente, a expressão "positivo para HLA-A2" refere-se a que o indivíduo ou

paciente possui homozigoticamente ou heterozigoticamente o gene do antígeno de HLA-A2, e o antígeno HLA-A2 é expresso em células do indivíduo ou paciente como um antígeno HLA.

Até o ponto em que os métodos e composições da presente invenção encontram utilidade no contexto do "tratamento" de câncer, um tratamento é considerado "eficaz" se ele levar a benefício clínico como, redução na expressão de gene ECT2 ou uma redução no tamanho, prevalência, ou potencial metastático do câncer no indivíduo. Quando o tratamento é aplicado profilaticamente, "eficaz" significa que ele retarda ou evita cânceres de formar ou prevenir ou aliviar um sintoma clínico de câncer. Eficaz é determinado em associação com qualquer método conhecido para diagnosticar ou tratar o tipo de tumor específico.

Na medida em que os métodos e composições da presente invenção encontram utilidade no contexto do "prevenção" e "profilaxia" de câncer, tais termos são usados aqui de maneira intercambiável para se referir a qualquer atividade que reduz a carga de mortalidade ou morbidade da doença. A prevenção e a profilaxia podem ocorrer em "níveis de prevenção primários, secundários e terciários." Embora a prevenção e profilaxia primárias evitem o desenvolvimento de uma doença, os níveis secundários e terciários de prevenção e profilaxia abrangem atividades direcionadas para a prevenção e profilaxia da progressão de uma doença e o surgimento de sintomas, assim como redução do impacto negativo de uma doença já estabelecida pela restauração da função e redução das complicações relacionadas com a doença. Alternativamente, prevenção e profilaxia podem incluir uma ampla gama de terapias profiláticas direcionadas para aliviar a severidade do transtorno particular, por exemplo, reduzir a proliferação e metástase de tumores.

No contexto da presente invenção, o tratamento e/ou a profilaxia de câncer ou, e/ou a prevenção da sua recorrência pós-operatória inclui(em) qualquer uma das seguintes etapas, tais como remoção cirúrgica de células de câncer, inibição do crescimento das células de câncer, involução ou regressão de um tumor, indução de remissão e supressão de ocorrência de

câncer, regressão tumoral, e redução ou inibição de metástase. O tratamento e/ou a profilaxia eficaz do câncer reduz a mortalidade e melhora o prognóstico de indivíduos com câncer, reduz os níveis de marcadores tumorais no sangue, e alivia sintomas detectáveis que acompanham o câncer. Por exemplo, redução ou melhora dos sintomas constitui o tratamento e/ou a profilaxia eficaz e inclui 10%, 20%, 30% ou mais de redução, ou doença estável.

No contexto da presente invenção, o termo "anticorpo" refere-se a imunoglobulinas e fragmentos das mesmas que são reativos especificamente para uma proteína designada ou peptídeo da mesma. Um anticorpo pode incluir anticorpos humanos, anticorpos primatizados, anticorpos quiméricos, anticorpos biespecíficos, anticorpos humanizados, anticorpos fundidos a outras proteínas ou radiomarcadores, e fragmentos de anticorpo. Além disso, um anticorpo na presente invenção é usado em seu sentido mais amplo e abrange especificamente anticorpos monoclonais intactos, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos) formados a partir de pelo menos dois anticorpos intactos, e fragmentos de anticorpo desde que eles tenham a atividade biológica desejada. Um "anticorpo" indica todas as classes (por exemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM).

A menos que seja definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado conforme compreendido pelo versado na técnica à qual a presente invenção pertence.

II. Peptídeos

Para demonstrar que os peptídeos derivados de ECT2 funcionam como um antígeno reconhecido por CTLs, peptídeos derivados de ECT2 (SEQ ID NO: 42) foram analisados para determinar se eles eram epítopos antigênicos restritos por HLA-A2 que são alelos de HLA comumente encontrados (Date Y et al., Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152: 3913-24, 1994).

Candidatos de peptídeos de ligação ao HLA-A2 derivados de ECT2 foram identificados com base nas suas afinidades de ligação ao

HLA-A2. Os seguintes peptídeos candidatos foram identificados:

ECT2-A2-9-34 (SEQ ID NO: 1),
ECT2-A2-9-619 (SEQ ID NO: 2),
ECT2-A2-9-664 (SEQ ID NO: 3),
ECT2-A2-9-662 (SEQ ID NO: 4),
ECT2-A2-9-634 (SEQ ID NO: 5),
ECT2-A2-9-145 (SEQ ID NO: 6),
ECT2-A2-9-561 (SEQ ID NO: 7),
ECT2-A2-9-98 (SEQ ID NO: 8),
ECT2-A2-9-575 (SEQ ID NO: 9),
ECT2-A2-9-240 (SEQ ID NO: 10),
ECT2-A2-9-292 (SEQ ID NO: 11),
ECT2-A2-9-823 (SEQ ID NO: 12),
ECT2-A2-9-220 (SEQ ID NO: 13),
ECT2-A2-9-755 (SEQ ID NO: 14),
ECT2-A2-9-357 (SEQ ID NO: 15),
ECT2-A2-9-438 (SEQ ID NO: 16),
ECT2-A2-9-874 (SEQ ID NO: 17),
ECT2-A2-9-568 (SEQ ID NO: 18),
ECT2-A2-9-166 (SEQ ID NO: 19),
ECT2-A2-9-443 (SEQ ID NO: 20),
ECT2-A2-10-33 (SEQ ID NO: 21),
ECT2-A2-10-633 (SEQ ID NO: 22),
ECT2-A2-10-144 (SEQ ID NO: 23),
ECT2-A2-10-701 (SEQ ID NO: 24),
ECT2-A2-10-754 (SEQ ID NO: 25),
ECT2-A2-10-557 (SEQ ID NO: 26),
ECT2-A2-10-191 (SEQ ID NO: 27),
ECT2-A2-10-774 (SEQ ID NO: 28),
ECT2-A2-10-428 (SEQ ID NO: 29),
ECT2-A2-10-618 (SEQ ID NO: 30),
ECT2-A2-10-97 (SEQ ID NO: 31),

ECT2-A2-10-20 (SEQ ID NO: 32),
ECT2-A2-10-574 (SEQ ID NO: 33)
ECT2-A2-10-461 (SEQ ID NO: 34),
ECT2-A2-10-664 (SEQ ID NO: 35),
ECT2-A2-10-575 (SEQ ID NO: 36),
ECT2-A2-10-430 (SEQ ID NO: 37),
ECT2-A2-10-511 (SEQ ID NO: 38),
ECT2-A2-10-471 (SEQ ID NO: 39) e
ECT2-A2-10-87 (SEQ ID NO: 40).

Além disso, após estimulação in vitro de células T por células dendríticas (DCs) pulsadas (carregadas) com estes peptídeos, os CTLs foram estabelecidos corretamente pela estimulação das DCs com cada um dos seguintes peptídeos:

ECT2-A2-9-34 (SEQ ID NO: 1),
ECT2-A2-9-664 (SEQ ID NO: 3) e
ECT2-A2-10-33 (SEQ ID NO: 21).

Estes CTLs estabelecidos mostraram potente atividade específica de CTL contra células-alvo pulsadas com os respectivos peptídeos. Estes resultados demonstram que ECT2 é um antígeno reconhecido por CTLs e que os peptídeos testados são peptídeos epítopos de ECT2 restritos por HLA-A2.

Uma vez que o gene ECT2 está superexpresso em células de câncer tais como câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, LMC, câncer colorretal, câncer de esôfago, NSCLC, linfoma, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma renal e SCLC e não está expresso na maioria dos órgãos normais, ele é um bom alvo para imunoterapia do câncer. Desta forma, a presente invenção fornece nonapeptídeos (peptídeos que consistem em nove resíduos de aminoácido) e decapeptídeos (peptídeos que consistem em dez resíduos de aminoácido) de epítopos de ECT2 reconhecidos por CTL. Alternativamente, a presente invenção apresenta peptídeos isolados que se ligam a antígenos HLA e induzem linfócitos T citotóxicos (CTLs), sendo que o peptídeo tem a sequência

de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 ou é um fragmento imunologicamente ativo da mesma. Mais especificamente, em algumas modalidades, a presente invenção apresenta peptídeos que possuem uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 1 a 40.

Em geral, programas de computador atualmente disponíveis, por exemplo, na Internet, como aqueles descritos em Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75 e Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12: 1007-17 podem ser usados para calcular as afinidades de ligação entre vários peptídeos e antígenos HLA em ambiente virtual. A afinidade de ligação a antígenos HLA pode ser medida conforme descrito, por exemplo, em Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75, Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6): 1872-81, Larsen MV et al. BMC Bioinformatics. 2007 Out 31; 8: 424, Buus S et al. Tissue Antigens., 62:378-84, 2003, Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12: 1007-17, e Nielsen M et al. PLoS ONE 2007; 2: e796, que estão resumidos, por exemplo, em Lafuente EM et al., Current Pharmaceutical Design, 2009, 15, 3209-3220. Os métodos para determinar a afinidade de ligação são descritos, por exemplo, no documento Journal of Immunological Methods (1995, 185: 181-190) e Protein Science (2000, 9: 1838-1846). Portanto, pode-se usar programas de computador para selecionar os fragmentos derivados de ECT2 que têm alta afinidade de ligação a antígenos HLA. Consequentemente, a presente invenção abrange peptídeos compostos por quaisquer fragmentos derivados de ECT2 que seriam determinados por tais programas conhecidos como sendo capazes de ligar a antígenos HLA. Além disso, tais peptídeos podem incluir o peptídeo composto pela extensão completa de ECT2.

Os peptídeos da presente invenção, particularmente, os nonapeptídeos e decapeptídeos da presente invenção, podem ser flanqueados por resíduos de aminoácido adicionais, contanto que os peptídeos guardem sua capacidade de indução de CTL. Os resíduos de aminoácido adicionais particulares podem ser compostos por qualquer tipo de aminoácido desde que eles não prejudiquem a capacidade de indução de CTL do peptídeo original. Desta forma, a presente invenção abrange peptídeos que possuem

afinidade de ligação a antígenos HLA, que incluem os peptídeos derivados de ECT2. Tais peptídeos possuem, por exemplo, menos que cerca de 40 aminoácidos, frequentemente, menos que cerca de 20 aminoácidos, geralmente, menos que cerca de 15 aminoácidos.

Em geral, sabe-se que a modificação de um ou mais aminoácidos em um peptídeo não influencia a função do peptídeo, e em alguns casos até mesmo acentua a função desejada da proteína original. De fato, se tem conhecimento de peptídeos modificados (isto é, peptídeos que compreendem uma sequência de aminoácidos modificada pela substituição, deleção, inserção e/ou adição de um, dois ou vários resíduos de aminoácido de uma sequência de referência original)) que retêm a atividade biológica do peptídeo original (Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller e Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13). Desta forma, de acordo com uma modalidade da presente invenção, o peptídeo que tem capacidade de indução de CTL da presente invenção pode compreender um peptídeo que tem uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 1 a 40, sendo que um, dois ou mesmo mais aminoácidos são adicionados, inseridos, deletados e/ou substituídos.

Os versados na técnica compreenderão que adições, deleções, inserções e/ou substituições individuais a uma sequência de aminoácidos que alteram um único aminoácido ou uma pequena porcentagem de aminoácidos resulta na conservação das propriedades da cadeia lateral original do aminoácido; ela é, portanto, chamada de "substituição conservativa" ou "modificação conservativa", sendo que a alteração de uma proteína resulta em uma proteína com funções similares. Tabelas de substituição conservativa que fornecem aminoácidos funcionalmente similares são bem conhecidas na técnica. Exemplos de propriedades de cadeias laterais de aminoácidos são aminoácidos hidrofóbicos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrofílicos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), e cadeias laterais que possuem os seguintes grupos funcionais ou características em comum: uma cadeia lateral alifática (G, A, V, L, I, P); uma cadeia lateral contendo um grupo hidroxila (S, T,

Y); uma cadeia lateral contendo um átomo de enxofre (C, M); uma cadeia lateral contendo ácido carboxílico e amida (D, N, E, Q); uma cadeia lateral contendo uma base (R, K, H); e uma cadeia lateral contendo um grupo aromático (H, F, Y, W). Além disso, os oito grupos a seguir contêm, cada, aminoácidos que são substituições conservativas entre si:

1) alanina (A), glicina (G);

2) ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E);

3) asparagina (N), glutamina (Q);

4) arginina (R), lisina (K);

5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V);

6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptofano (W);

7) serina (S), treonina (T); e

8) cisteína (C), metionina (M) (consulte, por exemplo, Creighton, Proteins 1984).

Tais peptídeos modificados de modo conservativo também são considerados como peptídeos da presente invenção. Entretanto, o peptídeo da presente invenção não é restrito a isto e pode incluir modificações não-conservativas, desde que o peptídeo modificado resultante guarde a capacidade de indução de CTL do peptídeo original. Além disso, os peptídeos modificados não devem excluir peptídeos que podem induzir CTL de variantes polimórficas, homólogos interespécie, e alelos de ECT2.

Resíduos de aminoácido podem ser inseridos, substituídos ou adicionados aos peptídeos da presente invenção ou, alternativamente, os resíduos de aminoácido podem ser deletados do mesmo para se alcançar uma afinidade de ligação mais elevada. Para guardar a capacidade de indução de CTL, modifica-se (por inserção, deleção, adição e/ou substituição), de preferência, apenas um pequeno número (por exemplo, 1, 2 ou vários) ou uma pequena porcentagem de aminoácidos. Na presente invenção, o termo "vários" significa 5 ou menos aminoácidos, por exemplo, 4 ou 3 ou menos. A porcentagem de aminoácidos a ser modificada pode ser, por exemplo, 20% ou menos, de preferência 15% ou menos, com mais preferência 10% ou menos ou com mais preferência ainda 1 a 5%.

Quando usados no contexto de imunoterapia de câncer, os presentes peptídeos podem ser apresentados sobre a superfície de uma célula ou exossomo como um complexo com um antígeno HLA. Portanto, é preferível selecionar peptídeos que não induzem apenas CTLs, mas que também possuem alta afinidade de ligação ao antígeno HLA. Para isto, os peptídeos podem ser modificados por deleção, substituição, inserção e/ou adição dos resíduos de aminoácido para produzir um peptídeo modificado com afinidade de ligação aprimorada. Além de peptídeos que são apresentados naturalmente, uma vez que a regularidade das sequências de peptídeos apresentados pela ligação a antígenos HLA já é conhecida (J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307), modificações com base em tal regularidade podem ser introduzidas nos peptídeos imunogênicos da presente invenção.

Por exemplo, peptídeos que tem alta afinidade de ligação a HLA-A2 tendem a ter o segundo aminoácido da terminação N substituído por leucina ou metionina. De modo semelhante, peptídeos nos quais o aminoácido C-terminal é substituído por valina ou leucina também podem ser favoravelmente usados. Desta forma, peptídeos que possuem uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 1 a 40, nas quais o segundo aminoácido da terminação N da sequência de aminoácidos da dita SEQ ID NO é substituído por leucina ou metionina, e peptídeos e/ou nas quais a terminação C da sequência de aminoácidos da dita SEQ ID NO é substituída por valina ou leucina são contemplados pela presente invenção.

Substituições podem ser introduzidas não apenas nos aminoácidos terminais, mas também na posição de potencial reconhecimento pelos receptores de célula T (TCR) dos peptídeos. Vários estudos demonstraram que um peptídeo com substituições de aminoácido podem ter função igual ou melhor que o original, por exemplo, CAP1, p53 $_{(264-272)}$, Her-2/neu $_{(369-377)}$ ou gp100 $_{(209-217)}$ (Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002) Fev 1;168(3):1338-47., S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206 e S. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314).

A presente invenção também contempla a adição de um, dois ou vários aminoácidos à terminação N e/ou C dos presentes peptídeos. Tais peptídeos modificados com alta afinidade de ligação ao antígeno HLA e que guardar capacidade de indução de CTL também estão incluídos na presente invenção. Por exemplo, a presente invenção fornece um peptídeo isolado com comprimento menor que 14, 13, 12, 11, ou 10 aminoácidos, que compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em:

(i) uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 1 a 20, sendo que 1, 2, ou vários aminoácidos são substituídos, sendo que o peptídeo se liga a um antígeno HLA e induz linfócitos T citotóxicos, e

(ii) a sequência de aminoácidos de (i), em que a sequência de aminoácidos tem uma das seguintes características, ou ambas:

(a) o segundo aminoácido da terminação N da dita SEQ ID NO é selecionado do grupo que consiste em leucina ou metionina; e

(b) o aminoácido C-terminal da dita SEQ ID NO é selecionado a partir do grupo que consiste em valina ou leucina.

Além disso, a presente invenção também fornece um peptídeo isolado com comprimento menor que 15, 14, 13, 12, ou 11 aminoácidos, que compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em:

(i) uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21 a 40, sendo que 1, 2, ou vários aminoácidos são substituídos, sendo que o peptídeo se liga a um antígeno HLA e induz linfócitos T citotóxicos, e

(ii) a sequência de aminoácidos de (i), em que a sequência de aminoácidos tem uma das seguintes características, ou ambas:

(a) o segundo aminoácido da terminação N da dita SEQ ID NO é selecionado do grupo que consiste em leucina ou metionina; e

(b) o aminoácido C-terminal da dita SEQ ID NO é selecionado a partir do grupo que consiste em valina ou leucina.

Estes peptídeos são processados na APC para apresentar um peptídeo de (i), (ii), (i'), e (ii') sobre ela, quando estes peptídeos são colocados em contato com, ou introduzidos na APC.

Entretanto, quando a sequência de peptídeo é idêntica a uma porção da sequência de aminoácido de uma proteína endógena ou exógena que tem uma função diferente, efeitos colaterais como transtornos autoimunes ou sintomas alérgicos contra substâncias específicas podem ser induzidos. Portanto, pode-se realizar buscas de homologia com o uso de bases de dados disponíveis para evitar situações nas quais a sequência do peptídeo se assemelha à sequência de aminoácido de outra proteína. Quando se tornar claro a partir das buscas de homologia que não existe um peptídeo com 1 ou 2 diferenças de aminoácido com relação ao peptídeo pretendido, o peptídeo pretendido pode ser modificado de modo a aumentar sua afinidade de ligação com antígenos HLA, e/ou aumentar sua capacidade de indução de CTL sem qualquer perigo de efeitos colaterais.

Embora seja esperado que peptídeos que possuem alta afinidade de ligação aos antígenos HLA, conforme descrito acima, sejam altamente eficazes, os peptídeos candidatos, que são selecionados de acordo com a presença de alta afinidade de ligação como um indicador, são examinados adicionalmente quanto à presença de capacidade de indução de CTL. Na presente invenção, a expressão "capacidade de indução de CTL" indica a capacidade do peptídeo induzir CTLs quando apresentado sobre células apresentadoras de antígeno (APCs). Adicionalmente, "capacidade de indução de CTL" inclui a capacidade do peptídeo induzir ativação de CTL, proliferação de CTL, promover a lise de células-alvo pelos CTLs, e aumentar a produção de IFN-gama pelos CTLs.

A confirmação da capacidade de indução de CTL é feita pela indução de APCs transportando antígenos de MHC humanos (por exemplo, linfócitos B, macrófagos, e células dendríticas (DCs)) ou, mais especificamente, DCs derivadas de leucócitos mononucleares de sangue periférico humanos, e após estimulação com os peptídeos, misturar com células CD8-positivas, e então medir o IFN-gama produzido e liberado pelo CTL contra as

células-alvo. Como o sistema de reação, podem ser usados animais transgênicos que foram produzidos para expressar um antígeno HLA humano (por exemplo, os descritos em BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Ago, 61(8): 764-79, Artigos relacionados, Livros, Ligação externa, Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependent on MHC (HLA) class II restricted T(H) response). Por exemplo, as células-alvo podem ser radiomarcadas com $^{51}Cr$ e semelhantes, e a atividade citotóxica pode ser calculada a partir da radioatividade liberada pelas células-alvo. Alternativamente, isto pode ser examinado mediante a medição do IFN-gama produzido e liberado pelos CTLs na presença de APCs que transportam peptídeos imobilizados e visualização da zona de inibição no meio com o uso de anticorpos monoclonais anti-IFN-gama.

Como um resultado do exame da capacidade de indução de CTL dos peptídeos, conforme descrito acima, descobriu-se que nonapeptídeos e decapeptídeos selecionados a partir de peptídeos que possuem uma sequência de aminoácidos selecionados dentre SEQ ID NOs: 1 a 40 mostraram capacidade de indução de CTL particularmente alta assim como alta afinidade de ligação a um antígeno HLA. Desta forma, estes peptídeos são exemplificados como modalidades preferenciais da presente invenção.

Além disso, os resultados das análises de homologia demonstraram que estes peptídeos não compartilham homologia significativa a peptídeos derivados de nenhum outro produto gênico humano conhecido. Isto reduz a possibilidade de respostas imunes desconhecidas ou indesejadas quando os peptídeos são usados para imunoterapia. Portanto, também por este aspecto, estes peptídeos são úteis para gerar imunidade contra ECT2 em pacientes com câncer. Desta forma, os peptídeos da presente invenção, de preferência, peptídeos que possuem uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 1 a 40, estão contemplados pela presente invenção.

Além da modificação dos presentes peptídeos discutida acima, os peptídeos da presente invenção podem ser ainda ligados a outros peptí-

deos, desde que o peptídeo ligado resultante guarde a capacidade de indução de CTL indispensável do peptídeo original e, com mais preferência, também guarde a indispensável ligação ao HLA. Exemplos de "outros" peptídeos incluem: os peptídeos da presente invenção ou os peptídeos que podem ser induzidos por CTL derivados de outros TAAs. Os ligantes entre os peptídeos são bem conhecidos na técnica, por exemplo, AAY (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26), AAA, NKRK (R. P. M. Sutmuller et al., J Immunol. 2000, 165: 7308-7315) ou K (S. Ota et al., Can Res. 62, 1471-1476, K. S. Kawamura et al., J Immunol. 2002, 168: 5709-5715).

Por exemplo, peptídeos antigênicos associados a tumor não-ECT2 podem, também, ser usados de maneira substancialmente simultânea para aumentar a resposta imunológica através de HLA classe I e/ou classe II. É fato conhecido que células de câncer podem expressar mais de um gene associado a tumor. Consequentemente, está dentro do escopo da experimentação de rotina para um versado na técnica determinar se um indivíduo particular expressa genes associados a tumor adicionais e, então, incluir peptídeos de ligação ao HLA classe I e/ou HLA classe II derivados dos produtos de expressão de tais genes nas composições ou vacinas de ECT2 da presente invenção.

Exemplos de peptídeos de ligação ao HLA classe I e HLA classe II são conhecidos dos versados na técnica (por exemplo, consulte Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995), e podem ser usados com relação à presente invenção de uma maneira similar aos aqui apresentados. O versado na técnica pode preparar polipeptídeos incluindo um ou mais peptídeos ECT2 e um ou mais dos peptídeos não-ECT2, ou ácidos nucleicos que codificam tais polipeptídeos, com o uso de procedimentos padrão de biologia molecular.

Os peptídeos ligados acima são aqui chamados de "polítopos", i.e., são grupos de dois ou mais peptídeos potencialmente imunogênicos ou estimulantes da resposta imunológica que podem ser unidos em várias disposições (por exemplo, concatenados, sobrepostos). O polítopo (ou ácido nucléico que codifica o polítopo) pode ser administrado de acordo com protocolos-padrão de imunização, por exemplo, a animais, para testar a eficácia

do polítopo na estimulação, intensificação e/ou estimulação de uma resposta imunológica.

Os peptídeos podem ser unidos diretamente ou através do uso de sequências flanqueadoras para formar polítopos, e o uso de polítopos como vacinas é bem conhecido na técnica (ver, por exemplo, Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert et al., Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1997; Thomson et al., J Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn et al., J Exp. Med. 171(1):299-306, 1990). Polítopos contendo vários números e combinações de epítopos podem ser preparados e testados quanto ao reconhecimento por CTLs e quanto à eficácia em aumentar uma resposta imune.

Os peptídeos da presente invenção podem ser ligados, adicionalmente, a outras substâncias, contanto que eles guardem a capacidade de indução de CTL indispensável. Exemplos ilustrativos de tais "outras" substâncias adequadas incluem, mas não se limitam a: peptídeos, lipídios, açúcar e cadeias de açúcar, grupos acetila, polímeros naturais e sintéticos, etc. Os peptídeos podem conter modificações como glicosilação, oxidação da cadeia lateral ou fosforilação, etc., desde que as modificações não destruam a atividade biológica dos peptídeos, conforme descrito aqui. Estes tipos de modificações podem ser feitas para conferir funções adicionais (por exemplo, função de direcionamento, e função de liberação) ou para estabilizar o polipeptídeo.

Por exemplo, para aumentar a estabilidade in vivo de um polipeptídeo, é conhecido na técnica como introduzir D-aminoácidos, miméticos de aminoácido ou aminoácidos não-naturais; este conceito também pode ser adotado para os presentes polipeptídeos. A estabilidade de um polipeptídeo pode ser testada de várias formas. Por exemplo, peptidases e vários meios biológicos, como plasma humano e soro, podem ser usadas para testar estabilidade (consulte, por exemplo, Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302).

Além disso, conforme observado acima, dentre os peptídeos modificados que são substituídos, inseridos, deletados ou adicionados com

um, dois ou vários resíduos de aminoácido, os que possuem atividade igual ou superior em comparação aos peptídeos originais podem ser triados ou selecionados. A presente invenção, portanto, também fornece o método de triagem ou seleção de peptídeos modificados que possuem atividade igual ou superior em comparação aos originais. Por exemplo, o método pode incluir as etapas de:

a: substituir, inserir, deletar ou adicionar pelo menos um resíduo de aminoácido de um peptídeo da presente invenção,

b: determinar a atividade do peptídeo, e

c: selecionar o peptídeo que tem atividade igual ou superior em comparação ao original.

Na presente invenção, a atividade pode incluir atividade de ligação a MHC, APC ou capacidade de indução de CTL e atividade citotóxica.

Neste documento, os peptídeos da presente invenção também podem ser descritos como "peptídeo(s) ECT2 " ou "polipeptídeo(s) ECT2".

III. Preparação de peptídeos ECT2

Os peptídeos da presente invenção podem ser preparados com o uso de técnicas bem conhecidas. Por exemplo, os peptídeos podem ser preparados sinteticamente, por tecnologia de DNA recombinante ou síntese química. Os peptídeos da presente invenção podem ser sintetizados individualmente ou como polipeptídeos mais longos incluindo dois ou mais peptídeos. Os peptídeos podem ser isolados, isto é, purificados ou isolados de modo substancialmente isento de outras proteínas de ocorrência natural da célula hospedeira e fragmentos das mesmas, ou quaisquer outras substâncias químicas.

Os peptídeos da presente invenção podem conter modificações como glicosilação, oxidação da cadeia lateral ou fosforilação, desde que tais modificações não destruam a atividade biológica dos peptídeos originais. Outras modificações ilustrativas incluem incorporação de D-aminoácidos ou outros miméticos de aminoácido que podem ser usados, por exemplo, para aumentar a meia-vida sérica dos peptídeos.

Um peptídeo da presente invenção pode ser obtido através de

síntese química com base na sequência de aminoácido selecionada. Por exemplo, de métodos de síntese de peptídeo convencionais que podem ser adotados para a síntese incluem:

(i) Peptide Synthesis, Interscience, Nova Iorque, E.U.A., 1966;

(ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, Nova Iorque, 1976;

(iii) Peptide Synthesis (em japonês), Maruzen Co., 1975;

(iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (em japonês), Maruzen Co., 1985;

(v) Development of Pharmaceuticals (segundo volume) (em japonês), Vol. 14 (síntese de peptídeo), Hirokawa, 1991;

(vi) WO99/67288; e

(vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, Nova Iorque, 1980, 100-118.

Alternativamente, os presentes peptídeos podem ser obtidos pela adoção de quaisquer métodos de engenharia genética conhecidos para produzir peptídeos (por exemplo, Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101: 347-62). Por exemplo, primeiro, um vetor adequado contendo um polinucleotídeo que codifica o peptídeo pretendido em uma forma que pode ser expressa (por exemplo, à jusante de uma sequência regulatória que corresponde a uma sequência promotora) é preparado e transformado em uma célula hospedeira adequada. Tais vetores e células hospedeiras também são fornecidos pela presente invenção. A célula hospedeira é então cultivada para produzir o peptídeo de interesse. O peptídeo também pode ser produzido in vitro adotando um sistema de tradução in vitro.

IV. Polinucleotídeos

A presente invenção fornece polinucleotídeos que codificam qualquer um dos peptídeos da presente invenção supracitados. Estes incluem os polinucleotídeos derivados do gene ECT2 de ocorrência natural (nº de acesso no Genbank AY376439 (por exemplo, SEQ ID NO: 41)) assim como os que possuem uma sequência de nucleotídeos modificada de modo conservativo dos mesmos. Na presente invenção, a expressão "sequência de

nucleotídeo modificada de modo conservativo" refere-se a sequências que codificam sequências de aminoácido idênticas ou essencialmente idênticas. Devido à degeneração do código genético, um grande número de ácidos nucleicos funcionalmente idênticos codificam qualquer proteína dada. Por exemplo, todos os códons GCA, GCC, GCG, e GCU codificam o aminoácido alanina. Desta forma, em cada posição na qual uma alanina é especificada por um códon, o códon pode ser alterado para qualquer um dos códons correspondentes descritos sem alterar o polipeptídeo codificado. Tais variações de ácido nucleico, chamadas na técnica de "variações silenciosas", representam uma espécie de variante modificada de modo conservativo. Toda sequência de ácido nucleico descrita na presente invenção como sendo codificante de um peptídeo também descreve todas as variações silenciosas possíveis do ácido nucleico. Um versado na técnica facilmente reconhecerá que cada códon em um ácido nucleico (com a exceção de AUG, que é comumente o único códon para metionina, e TGG, que é comumente o único códon para o triptofano) pode ser modificado para produzir uma molécula funcionalmente idêntica. Consequentemente, cada sequência de nucleotídeos apresentada que codifica um peptídeo representa uma descrição implícita de variações silenciosas associadas com ela.

O polinucleotídeo da presente invenção pode ser composto de DNA, RNA e seus derivados. Conforme é bem conhecido na técnica, uma molécula de DNA é adequadamente composta por bases como as bases de ocorrência natural A, T, C, e G, e T é substituída por U em um RNA. O versado na técnica reconhece que bases que não tem ocorrência natural também podem ser incluídas nos polinucleotídeos.

O polinucleotídeo da presente invenção pode codificar vários peptídeos da presente invenção com ou sem sequências de aminoácido intervenientes. Por exemplo, a sequência de aminoácido interveniente pode fornecer um sítio de clivagem (por exemplo, sequência de reconhecimento de enzima) do polinucleotídeo ou dos peptídeos traduzidos. Além disso, o polinucleotídeo pode incluir qualquer sequência adicional à sequência codificante que codifica o peptídeo da presente invenção. Por exemplo, o polinu-

cleotídeo pode ser um polinucleotídeo recombinante que inclui sequências regulatórias necessárias para a expressão do peptídeo ou pode ser um vetor de expressão (plasmídio) com genes marcadores e semelhantes. Em geral, tais polinucleotídeos recombinantes podem ser preparados pela manipulação de polinucleotídeos através de técnicas recombinantes convencionais com o uso, por exemplo, de polimerases e endonucleases.

Técnicas recombinantes e de síntese química podem ser usadas para produzir os polinucleotídeos da presente invenção. Por exemplo, um polinucleotídeo pode ser produzido pela inserção em um vetor adequado, que pode ser expresso quando transfectado em uma célula competente. Alternativamente, um polinucleotídeo pode ser amplificado com o uso de técnicas de PCR ou expressão em hospedeiros adequados (consulte, por exemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque, 1989). Alternativamente, um polinucleotídeo pode ser sintetizado com o uso de técnicas em fase sólida, conforme descrito em Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3: 801-5.

V. Exossomos

A presente invenção fornece adicionalmente vesículas intracelulares chamadas exossomos, que apresentam complexos formados entre os peptídeos da presente invenção e antígenos HLA na sua superfície. Os exossomos podem ser preparados, por exemplo, pelo uso dos métodos detalhados no Pedido de Patente Japonês para Kohyo Publications Nº Hei 11-510507 e WO99/03499, e podem ser preparados com o uso de APCs obtidas a partir de pacientes que são submetidos a tratamento e/ou prevenção. Os exossomos da presente invenção podem ser inoculados como vacinas, de uma forma similar aos peptídeos da presente invenção.

O tipo de antígeno HLA incluído nos complexos deve se igualar ao do indivíduo que exige tratamento e/ou prevenção. Por exemplo, para japoneses, HLA-A2, particularmente HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-

A*0228 e HLA-A*0250 são frequentemente adequados. O uso do tipo A24 ou do tipo A2 que é altamente expresso entre os japoneses e caucasianos é favorável para obter resultados eficazes, e subtipos como HLA-A*0201, HLA-A*0202, HLA-A*0203, HLA-A*0204, HLA-A*0205, HLA-A*0206, HLA-A*0207, HLA-A*0210, HLA-A*0211, HLA-A*0213, HLA-A*0216, HLA-A*0218, HLA-A*0219, HLA-A*0228 e HLA-A*0250 também são usados. Tipicamente, na clínica, o tipo de antígeno HLA do paciente que exige tratamento é investigado com antecedência, o que permite a seleção adequada de peptídeos que possuem altos níveis de afinidade de ligação a este antígeno, ou que possuem capacidade de indução de CTL por apresentação de antígeno. Além disso, de modo a obter peptídeos que possuem alta afinidade de ligação e capacidade de indução de CTL, pode-se fazer substituição, inserção, deleção ou adição de 1, 2, ou vários aminoácidos com base na sequência de aminoácidos do peptídeo ECT2 parcial de ocorrência natural.

No caso do uso do antígeno HLA tipo A2 para o exossomo da presente invenção, os peptídeos que possuem a sequência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 40 possuem particular utilidade.

VI. Células apresentadoras de antígeno (APCs)

A presente invenção fornece, adicionalmente, APCs isoladas que apresentam complexos formados com antígenos HLA e os peptídeos da presente invenção na sua superfície. As APCs podem ser originadas de pacientes que são submetidos a tratamento e/ou prevenção, e podem ser administradas como vacinas ou em combinação com outros fármacos incluindo os peptídeos da presente invenção, exossomos, ou CTLs.

As APCs não são restritas a um tipo particular de célula e incluem células dendríticas (DCs), células de Langerhans, macrófagos, células B, e células T ativadas, que são conhecidas por apresentar antígenos proteicos na sua superfície celular de modo a serem reconhecidas por linfócitos. Uma vez que uma DC é uma APC representativa que tem a atividade de indução de CTL mais forte dentre as APCs, as DCs podem ser usadas como as APCs da presente invenção.

Por exemplo, as APCs da presente invenção podem ser obtidas

por induzir DCs de monócitos do sangue periférico e, então, colocá-las em contato (estimulá-las) com os peptídeos da presente invenção in vitro, ex vivo ou in vivo. Quando os peptídeos da presente invenção são administrados aos indivíduos, as APCs que apresentem os peptídeos da presente invenção são induzidas no corpo do indivíduo. Portanto, as APCs da presente invenção podem ser obtidas por coletar as APCs do indivíduo após administrar os peptídeos da presente invenção ao indivíduo. Alternativamente, as APCs da presente invenção podem ser obtidas por colocar APCs coletadas de um indivíduo em contato com o peptídeo da presente invenção.

As APCs da presente invenção podem ser administradas a um indivíduo para induzir uma resposta imune contra o câncer no indivíduo, sozinhas ou em combinação com outros fármacos inclusive os peptídeos, exossomos ou CTLs da presente invenção. Por exemplo, a administração ex-vivo pode incluir as etapas de:

a: coletar APCs de um primeiro indivíduo,

b: colocar as APCs da etapa a em contato com o peptídeo e

c: administrar as APCs da etapa b a um segundo indivíduo.

O primeiro indivíduo e o segundo indivíduo podem ser o mesmo indivíduo, ou podem ser indivíduos diferentes. As APCs obtidas pela etapa b podem ser administradas como uma vacina para tratar e/ou prevenir câncer, cujos exemplos incluem, mas não se limitam a câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, LMC, câncer colorretal, câncer de esôfago, NSCLC, linfoma, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma renal e SCLC.

A presente invenção fornece, adicionalmente, um método ou processo para a fabricação de uma composição farmacêutica para induzir APCs, sendo que o método inclui a etapa de misturar ou formular o peptídeo da invenção com um veículo farmaceuticamente aceitável.

De acordo com um aspecto da presente invenção, as APCs possuem um alto nível de capacidade de indução de CTL. No termo de "alto nível de capacidade de indução de CTL", o alto nível é em relação ao nível da APC sem entrar em contato com o peptídeo ou peptídeos que podem não

induzir o CTL. Tais APCs que possuem alto nível de capacidade de indução de CTL podem ser preparadas por um método que inclui a etapa de transferir um polinucleotídeo que codifica o peptídeo da presente invenção a APCs in vitro, assim como o método acima mencionado. Os genes introduzidos podem estar sob a forma de DNAs ou RNAs. Exemplos de métodos para introdução incluem, sem limitações particulares, vários métodos convencionalmente executados neste campo, como lipofecção, eletroporação, e método com fosfato de cálcio. Mais especificamente, ele pode ser executado conforme descrito em Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; tradução japonesa publicada da publicação internacional nº 2000-509281. Pela transferência do gene para dentro de APCs, o gene sofre transcrição, tradução, e semelhantes na célula, e, então, a proteína obtida é processada pelo MHC classe I ou classe II, e procede através de uma via de apresentação para apresentar os peptídeos parciais.

VII. Linfócitos T citotóxicos (CTLs)

Um CTL induzido contra qualquer um dos peptídeos da presente invenção fortalece a resposta imune atingindo células de câncer in vivo e, assim, pode ser usado como uma vacina da mesma forma que os peptídeos em si. Desta forma, a presente invenção fornece CTLs isolados que são induzidos ou ativados especificamente por qualquer um dos presentes peptídeos.

Tais CTLs podem ser obtidos por (1) administrar o(s) peptídeo(s) da presente invenção a um indivíduo ou (2) colocar (estimular) as APCs derivadas do indivíduo e células CD8 positivas, ou leucócitos mononucleares do sangue periférico em contato in vitro com o(s) peptídeo(s) da presente invenção ou (3) colocar células CD8 positivas ou leucócitos mononucleares do sangue periférico em contato in vitro com as APCs ou exossomos que apresentam um complexo de um antígeno HLA e o peptídeo sobre sua superfície ou (4) introduzir um gene que inclui um polinucleotídeo que codifica uma subunidade de receptor de célula T (TCR) que se liga ao peptídeo da presente invenção. Tais APCs ou exossomos podem ser preparados pelos

métodos descritos acima e detalhes do método de (4) são descritos abaixo na seção "VIII. Receptor de célula T (TCR)".

Os CTLs da presente invenção podem ser derivados de pacientes que são submetidos a tratamento e/ou prevenção, e podem ser administrados sozinhos ou em combinação com outros fármacos, inclusive os peptídeos da presente invenção ou exossomos, com o propósito de efeitos de regulação. Os CTLs obtidos agem especificamente contra células-alvo que apresentam os peptídeos da presente invenção, por exemplo, os mesmos peptídeos usados para a indução. As células-alvo podem ser células que expressam ECT2 de forma endógena, tais como células de câncer, ou células que são transfectadas com o gene ECT2; e células que apresentam um peptídeo da presente invenção sobre a superfície celular devido à estimulação pelo peptídeo também podem servir como alvos de ataque do CTL ativado.

VIII. Receptor de célula T (TCR)

A presente invenção fornece, adicionalmente, uma composição que inclui ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos que são capazes de formar uma subunidade de um receptor de célula T (TCR), e métodos de uso da mesma. As subunidades de TCR possuem a capacidade de formar TCRs que conferem especificidade às células T contra células tumorais que apresentam ECT2. Com o uso de métodos conhecidos na técnica, os ácidos nucleicos das cadeias alfa e beta como as subunidades de TCR do CTL induzido por um ou mais peptídeos da presente invenção podem ser identificados (WO2007/032255 e Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003)). Por exemplo, o método de PCR é preferencial para analisar o TCR. Os iniciadores de PCR para a análise podem ser, por exemplo, iniciadores 5'-R (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') como iniciadores do lado 5' (SEQ ID NO: 43) e iniciadores 3-TRa-C (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3') específicos para a região C da cadeia alfa de TCR (SEQ ID NO: 44), iniciadores 3-TRb-C1 (5'-tcagaaatcctttctcttgac-3')específicos para a região C1 da cadeia beta de TCR (SEQ ID NO: 45) ou iniciadores 3-TRbeta-C2 (5'- ctagcctctggaatcctttctctt-3') específicos para a região C2 da cadeia beta de TCR (SEQ ID NO: 46) como

iniciadores do lado 3', porém sem limitação a estes. Os TCRs derivados podem se ligar às células-alvo que apresentam o peptídeo ECT2 com alta avidez e, opcionalmente, mediar a morte eficaz de células-alvo que apresentam o peptídeo ECT2 in vivo e in vitro.

Os ácidos nucleicos que codificam as subunidades de TCR podem ser incorporados em vetores adequados, por exemplo, vetores retrovirais. Estes vetores são bem conhecidos na técnica. Os ácidos nucleicos ou os vetores os incluindo podem ser transferidos para uma célula T, por exemplo, uma célula T de um paciente. Vantajosamente, a presente invenção fornece uma composição pronta para uso que permite a rápida modificação das células T do próprio paciente (ou as de outro mamífero) para produzir rapidamente e facilmente células T modificadas com excelentes propriedades de matar células de câncer.

O TCR específico é um receptor capaz de reconhecer especificamente um complexo de um peptídeo da presente invenção e uma molécula de HLA, fornecendo uma atividade específica de célula T contra a célula alvo quando o TCR é apresentado sobre a superfície da célula T. Um reconhecimento específico do complexo acima pode ser confirmado através de quaisquer métodos conhecidos, e os métodos preferenciais incluem, por exemplo, análise de marcação por multímero de HLA com o uso de moléculas de HLA e peptídeos da presente invenção e ensaio ELISPOT. Mediante a realização do ensaio ELISPOT pode-se confirmar que uma célula T que expressa o TCR sobre a superfície celular reconhece uma célula pelo TCR, e que o sinal é transmitido intracelularmente. A confirmação de que o complexo acima mencionado pode gerar uma atividade de célula T citotóxica quando o complexo existe sobre a superfície da célula T pode, também, ser executada por um método conhecido. Um método preferencial inclui, por exemplo, a determinação da atividade citotóxica contra célula alvo uma positiva para HLA, como o teste de liberação de cromo.

Além disso, a presente invenção fornece CTLs que são preparados por transdução com os ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos das subunidades de TCR que se ligam ao peptídeo ECT2, por exemplo,

SEQ ID NOs: 1 a 40, no contexto de HLA-A2.

Os CTLs transduzidos são capazes de se direcionar a células de câncer in vivo, e podem ser expandidos por métodos de cultivo in vitro bem conhecidos (por exemplo, Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). Os CTLs da presente invenção podem ser usados para formar uma composição imunogênica útil no tratamento ou prevenção de câncer em um paciente em necessidade de terapia ou proteção (WO2006/031221).

IX. Substâncias ou composições farmacêuticas

Uma vez que a expressão de ECT2 está especificamente elevada em cânceres, como, por exemplo, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, LMC, câncer colorretal, câncer de esôfago, NSCLC, linfoma, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma renal e SCLC em comparação ao tecido normal, os peptídeos ou polinucleotídeos da presente invenção podem ser usados para o tratamento e/ou para a profilaxia de câncer e/ou para a prevenção da recorrência pós-operatória dos mesmos. Desta forma, a presente invenção fornece um agente farmacêutico, substância ou composição para o tratamento e/ou profilaxia e/ou para a prevenção da recorrência pós-operatória de câncer, tal agente, substância ou composição incluindo um ou mais dos peptídeos ou polinucleotídeos da presente invenção como um ingrediente ativo. Alternativamente, os presentes peptídeos podem ser expressos sobre a superfície de qualquer um dos exossomos ou células anteriormente mencionados, tais como APCs, para uso como substâncias ou composições farmacêuticas. Além disso, os CTLs supracitados que atingem qualquer um dos peptídeos da invenção podem também ser usados como o ingrediente ativo das presentes substâncias ou composições farmacêuticas.

Os presentes agentes, substâncias ou composições farmacêuticas podem ser usados como uma vacina. No contexto da presente invenção, a expressão "vacina" (também chamada de uma composição imunogênica) refere-se a uma substância que tem a função de induzir imunidade antitumoral mediante inoculação em animais.

Os agentes, substâncias ou composições farmacêuticas da pre-

sente invenção podem ser usados para tratar e/ou prevenir cânceres, e/ou para a prevenção da recorrência pós-operatória dos mesmos em indivíduos ou pacientes, incluindo humanos e qualquer outro mamífero, incluindo, mas não se limitando a camundongo, rato, porco da guiné, coelho, gato, cachorro, ovelha, cabra, porco, gado, cavalo, macaco, babuíno, e chimpanzé, particularmente, um animal comercialmente importante ou um animal domesticado.

Em outra modalidade, a presente invenção também fornece o uso de um ingrediente ativo para a fabricação de agentes, substâncias ou composições farmacêuticas formuladas para o tratamento e/ou prevenção de cânceres ou tumores, o dito ingrediente ativo sendo selecionado dentre:

(a) um peptídeo da presente invenção;

(b) um ácido nucleico que codifica tal peptídeo, conforme descrito aqui, em uma forma que pode ser expressa;

(c) uma APC ou um exossomo que apresenta um peptídeo da presente invenção na sua superfície; e

(d) uma célula T citotóxica da presente invenção.

Alternativamente, a presente invenção fornece adicionalmente um ingrediente ativo para uso no tratamento ou prevenção de câncer ou tumor, o dito ingrediente ativo sendo selecionado dentre:

(a) um peptídeo da presente invenção;

(b) um ácido nucleico que codifica tal peptídeo, conforme descrito aqui, em uma forma que pode ser expressa;

(c) uma APC ou um exossomo que apresenta um peptídeo da presente invenção na sua superfície; e

(d) uma célula T citotóxica da presente invenção.

Alternativamente, a presente invenção fornece, adicionalmente, um método ou processo para a fabricação de um agente, composição ou substância farmacêutica para o tratamento ou prevenção de câncer ou tumor, sendo que o método ou processo inclui a etapa de formular um veículo farmaceuticamente ou fisiologicamente aceitável com um ingrediente ativo selecionado dentre:

(a) um peptídeo da presente invenção;

(b) um ácido nucleico que codifica tal peptídeo, conforme descrito aqui, em uma forma que pode ser expressa;

(c) uma APC ou um exossomo que apresenta um peptídeo da presente invenção na sua superfície; e

(d) uma célula T citotóxica da presente invenção.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece, adicionalmente, um método ou processo para a fabricação de um agente, composição ou substância farmacêutica para o tratamento ou prevenção de câncer ou tumor, em que o método ou processo inclui as etapas de misturar um ingrediente ativo com um veículo farmaceuticamente ou fisiologicamente aceitável, em que o ingrediente ativo é selecionado dentre:

(a) um peptídeo da presente invenção;

(b) um ácido nucleico que codifica tal peptídeo, conforme descrito aqui, em uma forma que pode ser expressa;

(c) uma APC ou um exossomo que apresenta um peptídeo da presente invenção na sua superfície; e

(d) uma célula T citotóxica da presente invenção.

De acordo com a presente invenção, observou-se que os peptídeos que possuem uma sequência de aminoácidos selecionada dentre as SEQ ID NO: 1 a 40 são peptídeos epítopos restritos por HLA-A2 ou os candidatos que podem induzir resposta imune potente e específica. Portanto, as presentes substâncias ou composições farmacêuticas que incluem qualquer um destes peptídeos com as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 1 a 40, são particularmente adequadas para administração aos indivíduos cujo antígeno HLA é HLA-A2. O mesmo se aplica a substâncias ou composições farmacêuticas que incluem os polinucleotídeos que codificam qualquer um destes peptídeos (isto é, os polinucleotídeos da presente invenção).

Os cânceres a serem tratados pelas substâncias ou composições farmacêuticas da presente invenção não se limitam e incluem qualquer câncer no qual ECT2 está envolvido (por exemplo, está superexpresso), incluindo, mas não se limitando a câncer de bexiga, câncer de mama, câncer

cervical, carcinoma colangiocelular, LMC, câncer colorretal, câncer de esôfago, NSCLC, linfoma, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma renal e SCLC.

As presentes substâncias ou composições farmacêuticas podem conter, além dos ingredientes ativos supracitados, outros peptídeos que têm a capacidade de induzir CTLs contra células de câncer, outros polinucleotídeos que codificam os outros peptídeos, outras células que apresentam os outros peptídeos, ou similares. Aqui, os outros peptídeos que possuem a capacidade de induzir CTLs contra células de câncer são exemplificados por antígenos específicos de câncer (por exemplo, TAAs identificados), mas não se restringem a eles.

Se necessário, as substâncias ou composições farmacêuticas da presente invenção podem incluir, opcionalmente, outras substâncias terapêuticas como um ingrediente ativo, desde que a substância não iniba o efeito antitumoral do ingrediente ativo, por exemplo, qualquer um dos presentes peptídeos. Por exemplo, as formulações podem incluir substâncias ou composições anti-inflamatórias, analgésicos, quimioterápicos e similares. Além de outras substâncias terapêuticas no medicamento em si, os medicamentos da presente invenção podem também ser administrados sequencialmente ou simultaneamente a uma ou mais outras substâncias ou composições farmacológicas. As quantidades de medicamento e de substância ou composição farmacológica dependem, por exemplo, de que tipo de substância(s) ou composição(ões) farmacológica(s) é/são usada(s), da doença sendo tratada, e do cronograma e vias de administração.

Deve-se compreender que além dos ingredientes particularmente mencionados aqui, as substâncias ou composições farmacêuticas da presente invenção podem incluir outras substâncias ou composições convencionais na técnica relacionada ao tipo de formulação em questão.

Em uma modalidade da presente invenção, as substâncias ou composições farmacêuticas podem ser incluídas em artigos de manufatura e kits contendo materiais úteis para tratar as condições patológicas da doença a ser tratada, por exemplo, câncer. O artigo de manufatura pode incluir um

recipiente de qualquer uma das substâncias ou composições farmacêuticas com um rótulo. Os recipientes adequados incluem garrafas, frascos, e tubos de teste. Os recipientes podem ser formados a partir de uma variedade de materiais, como vidro ou plástico. O rótulo no recipiente deve indicar a substância ou composição que é usada para o tratamento ou prevenção de uma ou mais condições da doença. O rótulo pode também indicar instruções para a administração etc.

Além do recipiente descrito acima, um kit incluindo uma substância ou composição farmacêutica da presente invenção pode, opcionalmente, incluir ainda um segundo recipiente contendo um diluente farmaceuticamente aceitável. Ele pode incluir, ainda, outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e bulas com instruções para uso.

As composições farmacêuticas podem, se desejado, ser apresentados em uma embalagem ou dispositivo aplicador que pode conter uma ou mais formas de dose unitária contendo o ingrediente ativo. A embalagem pode, por exemplo, incluir folha metálica ou plástica, tal como uma embalagem blister. A embalagem ou dispositivo aplicador pode ser acompanhado de instruções para a administração.

(1) Substâncias ou composições farmacêuticas contendo os peptídeos como o ingrediente ativo

Os peptídeos da presente invenção podem ser administrados diretamente como uma substância ou composição farmacêutica, ou se necessário, podem ser formulados por métodos de formulação convencionais. No último caso, além dos peptídeos da presente invenção, veículos, excipientes, e similares que são comumente usados para fármacos podem ser incluídos conforme for adequado sem limitações específicas. Exemplos de tais veículos são água esterilizada, solução salina fisiológica, tampão de fosfato, fluido de cultura etc. Além disso, as substâncias ou composições farmacêuticas podem conter, conforme necessário, estabilizadores, suspensões, conservantes, tensoativos e similares. Os substâncias ou composições farmacêuticas da presente invenção podem ser usadas com finalidades anti-câncer.

Os peptídeos da presente invenção podem ser preparados em combinação, incluindo dois ou mais peptídeos da presente invenção, para induzir CTL in vivo. Os peptídeos podem estar em um coquetel ou eles podem ser conjugados uns aos outros com o uso de técnicas padrão. Por exemplo, os peptídeos podem ser ligados quimicamente ou expressos como uma única sequência de polipeptídeo de fusão que pode ter um ou vários aminoácidos como um ligante (por exemplo, ligante de lisina: K. S. Kawamura et al. J. Immunol. 2002, 168: 5709-5715). Os peptídeos na combinação podem ser iguais ou diferentes. Pela administração dos peptídeos da presente invenção, os peptídeos são apresentados em alta densidade pelos antígenos HLA e, então, os CTLs que reagem especificamente com o complexo formado entre o peptídeo apresentado e o antígeno HLA são induzidos. Alternativamente, as APCs (por exemplo, DCs) são removidas dos indivíduos e, então, estimuladas pelos peptídeos da presente invenção para obter APCs que apresentam qualquer um dos peptídeos da presente invenção sobre sua superfície celular. Estas APCs são readministradas aos indivíduos para induzir CTLs nos indivíduos, e como um resultado, a agressividade ao endotélio associado ao tumor pode ser aumentada.

O agente, as substâncias ou composições farmacêuticas para o tratamento e/ou prevenção de câncer, que incluem qualquer um dos peptídeos da presente invenção como o ingrediente ativo, podem também incluir um adjuvante para que a imunidade celular seja estabelecida eficazmente. Alternativamente, o agente, a substância ou a composição farmacêutica pode ser administrada com outros ingredientes ativos ou pode ser administrada pela formulação em grânulos. Um adjuvante refere-se a qualquer composto, substância ou composição que intensifica a resposta imune contra a proteína quando administrado junto (ou sucessivamente) com a proteína que tem atividade imunológica. Um adjuvante que pode ser aplicado inclui os descritos na literatura (Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89). Exemplos de adjuvantes adequados incluem fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio, alume, toxina colérica, toxina de salmonela, adjuvante de Freund incompleto (IFA), adjuvante de Freund completo (CFA), ISCOMatrix, GM-CSF, CpG, emulsão óleo

em água, e similares, mas não se limitam a isto.

Além disso, formulações de lipossomo, formulações granulares nas quais o peptídeo é ligado a microesferas de alguns micrômetros de diâmetro e formulações nas quais um lipídio é ligado ao peptídeo podem ser convenientemente usadas.

Em outra modalidade da presente invenção, os peptídeos da presente invenção podem, também, ser administrados sob a forma de um sal farmaceuticamente aceitável. Exemplos preferíveis de sais incluem sais com um metal alcalino, sais com um metal, sais com uma base orgânica, sais com um ácido orgânico e sais com um ácido inorgânico.

Em algumas modalidades, as substâncias ou composições farmacêuticas da presente invenção incluem um componente que pré-ativa o CTL. Lipídios foram identificados como substâncias ou composições capazes de pré-ativar CTLs in vivo contra antígenos virais. Por exemplo, resíduos de ácido palmítico podem ser fixados aos grupos amino alfa e epsilon de um resíduo de lisina e, então, ligados a um peptídeo da presente invenção. O peptídeo lipidado pode, então, ser administrado diretamente em uma micela ou partícula, incorporado em um lipossomo, ou emulsionado em um adjuvante. Como outro exemplo de lipídio que pré-ativa respostas de CTL, lipoproteínas de E. coli, como a tripalmitoil-S-glicerilcisteinilseril-serina (P3CSS), podem ser usadas para pré-ativar CTL quando ligadas covalentemente a um peptídeo adequado (vide, por exemplo, Deres et al., Nature 1989, 342: 561-4).

O método de administração pode ser oral, intradérmico, subcutâneo, injeção intravenosa, ou similares, e administração sistêmica ou administração local às adjacências dos sítios alvo. A administração pode ser feita por administração única ou reforçada por múltiplas administrações. A dose dos peptídeos da presente invenção pode ser ajustada apropriadamente de acordo com a doença a ser tratada, idade do paciente, peso, método de administração, e similares, e é geralmente de 0,001 mg a 1000 mg, por exemplo, 0,01 mg a 100 mg, por exemplo, 0,1 mg a 10 mg, e pode ser administrada uma vez a cada em alguns dias até uma vez a cada alguns meses. O

versado na técnica pode selecionar apropriadamente uma dose adequada.

(2) Substâncias ou composições farmacêuticas contendo os polinucleotídeos como o ingrediente ativo

Os agentes, as substâncias ou composições farmacêuticas da presente invenção também podem incluir ácidos nucleicos que codificam o(s) peptídeo(s) aqui apresentado(s) em uma forma que pode ser expressa. Na presente invenção, a expressão "em uma forma que pode ser expressa" significa que o polinucleotídeo, quando introduzido em uma célula, será expresso in vivo como um polipeptídeo que induz imunidade antitumoral. Em uma modalidade exemplificada, a sequência de ácido nucleico do polinucleotídeo de interesse inclui elementos regulatórios necessários para a expressão do polinucleotídeo. O(s) polinucleotídeo(s) pode(m) ser equipado(s) de modo a obter inserção estável no genoma da célula alvo (consulte, por exemplo, Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12 para uma descrição de vetores de cassete de recombinação homóloga. Vide também, por exemplo, Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8; patentes U.S. nºs 5.580.859; 5.589.466; 5.804.566; 5.739.118; 5.736.524; 5.679.647; e WO 98/04720). Exemplos de tecnologias de aplicação à base de DNA incluem "DNA nude", aplicação facilitada (bupivacaína, polímeros, mediada por peptídeos), complexos de lipídio catiônico, e aplicação mediada por partículas ("arma de genes") ou mediada por pressão (consulte, por exemplo, a patente US No. 5.922.687).

Os peptídeos da presente invenção podem também ser expressos por vetores virais ou bacterianos. Exemplos de vetores expressão incluem hospedeiros virais atenuados, como vacínia e fowlpox. Esta abordagem envolve o uso de vírus vacínia, por exemplo, como um vetor para expressar sequências de nucleotídeo que codificam o peptídeo. Mediante introdução em um hospedeiro, o vírus vacínia recombinante expressa o peptídeo imunogênico, e assim gera uma resposta imune. Os vetores de vacínia e métodos úteis em protocolos de imunização são descritos, por exemplo, na patente US No. 4.722.848. Outro vetor é BCG (Bacilo de Calmette Guerin). Os vetores de BCG são descritos em Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60.

Uma ampla variedade de outros vetores úteis para administração terapêutica ou imunização, por exemplo, vetores de adenovírus e de vírus adeno-associados, vetores retrovirais, vetores de Salmonella typhi, vetores da toxina antraz detoxificada e similares, serão evidentes. Consulte, por exemplo, Shata et al., Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14: 571-85.

A liberação de um polinucleotídeo a um paciente pode ser direta, na qual o paciente é exposto diretamente a um vetor transportando o polinucleotídeo, ou indireta, na qual as células são primeiro transformadas com o polinucleotídeo de interesse in vitro e, então, as células são transplantadas no paciente. Estas duas abordagens são conhecidas, respectivamente, como terapias gênicas in vivo e ex vivo.

Para revisões gerais dos métodos de terapia gênica, consulte Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 1993, 12: 488-505; Wu e Wu, Biotherapy 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33: 573-96; Mulligan, Science 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215). Os métodos de tecnologia de DNA recombinante de conhecimento comum no estado da técnica que são aplicáveis à presente invenção são descritos por Ausubel et al., em Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; e por Krieger, em Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990.

O método de administração pode ser oral, intradérmico, subcutâneo, injeção intravenosa, ou similares, e administração sistêmica ou administração local às adjacências dos sítios alvo também podem ser usadas. A administração pode ser feita por administração única ou reforçada por múltiplas administrações. A dose do polinucleotídeo no veículo adequado ou células transformadas com o polinucleotídeo que codifica os peptídeos da presente invenção pode ser ajustada apropriadamente de acordo com a doença a ser tratada, idade do paciente, peso, método de administração, e similares, e é geralmente de 0,001 mg a 1000 mg, por exemplo, 0,01 mg a 100 mg, por exemplo, 0,1 mg a 10 mg, e pode ser administrada uma vez a cada alguns

dias até uma vez a cada alguns meses. O versado na técnica pode selecionar apropriadamente a dose adequada.

X. Métodos de uso dos peptídeos, exossomos, APCs e CTLs

Os peptídeos e polinucleotídeos da presente invenção podem ser usados para preparar ou induzir APCs e CTLs. Os exossomos e APCs da presente invenção podem também ser usados para induzir CTLs. Os peptídeos, polinucleotídeos, exossomos e APCs podem ser usados em combinação com qualquer outro composto, contanto que os compostos adicionais não inibam a capacidade de indução de CTL. Desta forma, quaisquer das substâncias ou composições farmacêuticas supracitadas da presente invenção podem ser usadas para induzir CTLs. Em adição a isto, aquelas que incluem os peptídeos e polinucleotídeos também podem ser usadas para induzir APCs, conforme explicado abaixo.

(1) Método para induzir células apresentadoras de antígeno (APCs)

A presente invenção apresenta métodos para induzir APCs com alta capacidade de indução de CTL com o uso dos peptídeos ou polinucleotídeos da presente invenção.

Os métodos da presente invenção incluem a etapa de colocar as APCs em contato com os peptídeos da presente invenção in vitro, ex vivo ou in vivo. Por exemplo, o método de colocar as APCs em contato com os peptídeos ex vivo pode incluir as etapas de:

a: coletar APCs de um indivíduo; e

b: colocar as APCs da etapa a em contato com o peptídeo.

As APCs não são restritas a um tipo particular de célula e incluem DCs, células de Langerhans, macrófagos, células B, e células T ativadas, que são conhecidas por apresentar antígenos proteicos na sua superfície celular de modo a serem reconhecidas por linfócitos. De preferência, as DCs podem ser usadas uma vez que elas têm a capacidade de indução de CTL mais forte entre as APCs. Quaisquer peptídeos da presente invenção podem ser usados sozinhos ou com outros peptídeos da presente invenção.

Por outro lado, quando os peptídeos da presente invenção são

administrados a um indivíduo, as APCs são colocadas em contato com os peptídeos in vivo, e consequentemente, as APCs com alta capacidade de indução de CTL são induzidas no corpo do indivíduo. Desta forma, a presente invenção inclui a administração dos peptídeos da presente invenção a um indivíduo. De modo similar, quando os polinucleotídeos da presente invenção são administrados a um indivíduo em uma forma que pode ser expressa, os peptídeos da presente invenção são expressos e colocados em contato com APCs in vivo, consequentemente, as APCs com alta capacidade de indução de CTL são induzidas no corpo do indivíduo. Desta forma, a presente invenção também pode incluir a administração dos polinucleotídeos da presente invenção a um indivíduo. A expressão "forma que pode ser expressa" é descrita acima na seção "IX. Substâncias e composições farmacêuticas, (2) Substâncias ou composições farmacêuticas contendo os polinucleotídeos como o ingrediente ativo".

Além disso, a presente invenção pode incluir a introdução do polinucleotídeo da presente invenção em uma APC para induzir APCs com capacidade de indução de CTL. Por exemplo, o método pode incluir as etapas de:

a: coletar APCs de um indivíduo; e

b: introduzir um polinucleotídeo que codifica um peptídeo da presente invenção.

A etapa b pode ser feita conforme descrito acima na seção "VI. Células apresentadoras de antígeno".

Alternativamente, a presente invenção apresenta um método para preparar uma célula apresentadora de antígeno (APC) que induz especificamente atividade de CTL contra ECT2, sendo que o método pode incluir uma das seguintes etapas:

(a) colocar uma APC em contato com um peptídeo da presente invenção in vitro, ex vivo ou in vivo; e

(b) introduzir um polinucleotídeo que codifica um peptídeo da presente invenção em uma APC.

(2) Método para induzir CTLs

A presente invenção também fornece métodos para induzir CTLs com o uso dos peptídeos, polinucleotídeos, exossomos ou APCs da presente invenção.

A presente invenção fornece, adicionalmente, métodos para induzir CTLs com o uso de um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que é capaz de formar uma subunidade de receptor de célula T (TCR) que reconhece um complexo dos peptídeos da presente invenção e antígenos HLA. De preferência, os métodos para induzir CTLs podem incluir pelo menos uma etapa selecionada dentre:

a) colocar uma célula T CD8-positiva em contato com uma célula apresentadora de antígeno e/ou um exossomo que apresenta na sua superfície um complexo de um antígeno HLA e um peptídeo da presente invenção; e

b) introduzir um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que é capaz de formar uma subunidade de TCR que reconhece um complexo de um peptídeo da presente invenção e um antígeno HLA em uma célula CD8-positiva.

Quando os peptídeos, os polinucleotídeos, APCs, ou exossomos da presente invenção são administrados a um indivíduo, as CTLs são induzidas no corpo do indivíduo, e a força da resposta imune que atinge as células de câncer é intensificada. Desta forma, os métodos da presente invenção incluem a etapa de administrar os peptídeos, os polinucleotídeos, as APCs ou exossomos da presente invenção a um indivíduo.

Alternativamente, CTLs também podem ser induzidos pelo seu uso ex vivo e após a indução do CTL, os CTLs ativados podem ser colocados de volta no indivíduo. Por exemplo, o método pode incluir as etapas de:

a: coletar APCs de um indivíduo;

b: colocar as APCs da etapa a em contato com o peptídeo; e

c: cocultivar as APCs da etapa b com células CD8-positivas.

As APCs a serem cocultivadas com as células CD8-positivas na etapa c acima podem também ser preparadas pela transferência de um gene que inclui um polinucleotídeo da presente invenção em APCs, conforme

descrito acima na seção "VI. Células apresentadoras de antígeno", embora a presente invenção não se limite a isto e abranja qualquer APC que apresenta eficazmente um complexo de um antígeno HLA e o peptídeo desta invenção na sua superfície.

Ao invés destas APCs, os exossomos que apresentam um complexo de um antígeno HLA e o peptídeo da presente invenção na sua superfície também podem ser usados. Especialmente, a presente invenção pode incluir a etapa de co-cultivar exossomos que apresentam um complexo de um antígeno HLA e o peptídeo da presente invenção sobre sua superfície. Tais exossomos podem ser preparados pelos métodos descritos acima na seção "V. Exossomos".

Além disso, o CTL pode ser induzido pela introdução de um gene que inclui um polinucleotídeo que codifica a subunidade de TCR que se liga ao peptídeo da presente invenção em células CD8-positivas. Tal transdução pode ser feita conforme descrito acima na seção "VIII. Receptor de célula T (TCR)".

Além disso, a presente invenção fornece um método ou processo para a fabricação de uma substância ou composição farmacêutica que induz CTLs, sendo que o método inclui a etapa de misturar ou formular o peptídeo da presente invenção com um veículo farmaceuticamente aceitável.

(3) Método para induzir resposta imune

Além disso, a presente invenção apresenta métodos de induzir uma resposta imunológica contra doenças relacionadas a ECT2. As doenças adequadas podem incluir câncer, cujos exemplos incluem, mas não se limitam a câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, LMC, câncer colorretal, câncer de esôfago, NSCLC, linfoma, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma renal e SCLC.

Os métodos da presente invenção podem incluir a etapa de administrar substância(s) ou composição(ões) contendo qualquer um dos peptídeos da presente invenção ou polinucleotídeos que os codificam. O método da presente invenção pode também contemplar a administração de exosso-

mos ou APCs que apresentam qualquer um dos peptídeos da presente invenção. Para detalhes, consulte o item "IX. Substâncias ou composições farmacêuticas", particularmente a parte que descreve o uso das substâncias ou composições farmacêuticas da presente invenção como vacinas. Além disso, os exossomos e APCs que podem ser empregados para os presentes métodos para induzir resposta imune são descritos em detalhes nos itens "V. Exossomos", "VI. Células apresentadoras de antígeno (APCs)", e (1) e (2) de "X. Métodos de uso dos peptídeos, exossomos, APCs e CTLs", acima.

A presente invenção também fornece um método ou processo para a fabricação de uma substância ou composição farmacêutica que induz resposta imune, sendo que o método pode incluir a etapa de misturar ou formular o peptídeo da presente invenção com um veículo farmaceuticamente aceitável.

Alternativamente, o método da presente invenção pode incluir a etapa de administrar uma vacina ou uma composição farmacêutica da presente invenção, que contém:

(a) um peptídeo da presente invenção;

(b) um ácido nucleico que codifica tal peptídeo, conforme descrito aqui, em uma forma que pode ser expressa;

(c) uma APC ou um exossomo que apresenta um peptídeo da presente invenção na sua superfície; ou

(d) uma célula T citotóxica da presente invenção.

No contexto da presente invenção, um câncer que superexpressa ECT2 pode ser tratado com estes ingredientes ativos. Exemplos destes cânceres incluem, mas não se limitam a câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, LMC, câncer colorretal, câncer de esôfago, NSCLC, linfoma, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma renal e SCLC. Consequentemente, antes da administração das vacinas ou composições farmacêuticas que incluem os ingredientes ativos, é preferível confirmar se o nível de expressão de ECT2 nas células ou tecidos de câncer a serem tratados está aumentada em comparação a células normais do mesmo órgão. Desta forma, em uma modalidade, a presente inven-

ção apresenta um método para tratar câncer que (super) expressa ECT2, cujo método pode incluir as etapas de:

i) determinar o nível de expressão de ECT2 nas células ou tecido(s) obtidos a partir de um indivíduo com o câncer a ser tratado;

ii) comparar o nível de expressão de ECT2 com o controle normal; e

iii) administrar pelo menos um componente selecionado do grupo que consiste em (a) a (d) descritos acima a um indivíduo com câncer que superexpressa ECT2 em comparação ao controle normal.

Alternativamente, a presente invenção também fornece uma vacina ou composição farmacêutica que inclui pelo menos um componente selecionado dentre (a) a (d) descritos acima, para uso na administração a um indivíduo que tem câncer que superexpressa ECT2. Em outras palavras, a presente invenção fornece, adicionalmente, um método para identificar um indivíduo a ser tratado com o polipeptídeo ECT2 da presente invenção, tal método incluindo a etapa de determinar um nível de expressão de ECT2 em células ou tecido(s) derivado(s) do indivíduo, em que um aumento do nível em comparação a um nível de controle normal do gene indica que o indivíduo pode ter câncer que pode ser tratado com o polipeptídeo ECT2 da presente invenção. Os métodos para o tratamento de câncer da presente invenção são descritos em mais detalhes abaixo.

Qualquer célula ou tecido derivado do indivíduo pode ser usado para a determinação da expressão de ECT2, desde que ele inclua o produto de transcrição ou tradução objetivo de ECT2. Exemplos de amostras biológicas incluem, mas não se limitam a, tecidos e fluidos corporais, como sangue, escarro e urina. De preferência, a célula ou tecido derivado do indivíduo contém uma população de célula que inclui uma célula epitelial, com mais preferência, uma célula epitelial cancerosa ou uma célula epitelial derivada de tecido com suspeita de ser canceroso. Adicionalmente, se necessário, a célula pode ser purificada a partir dos tecidos e fluidos corporais obtidos e, então, usada como a amostra derivada do indivíduo.

Um indivíduo a ser tratado pelo presente método é, de preferên-

cia, um mamífero. Exemplos de mamíferos incluem, mas não se limitam, por exemplo, a seres humanos, primatas não humanos, camundongos, ratos, cachorros, gatos, cavalos, e vacas.

De acordo com a presente invenção, o nível de expressão de ECT2 nas células ou tecidos obtidos de um indivíduo pode ser determinado. O nível de expressão pode ser determinado no nível do produto de transcrição (ácido nucleico), com o uso de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, o mRNA de ECT2 pode ser quantificado com o uso de sondas por métodos de hibridização (por exemplo, hibridização Northern). A detecção pode ser executada em um chip, um arranjo ou similares. O uso de um arranjo pode ser preferencial para detectar o nível de expressão de ECT2. Os versados na técnica podem preparar estas sondas usando a informações de sequência de ECT2. Por exemplo, o cDNA de ECT2 pode ser usado como a sonda. Se necessário, as sondas podem ser marcadas com um marcador adequado, como corantes, substâncias fluorescentes e isótopos, e o nível de expressão do gene pode ser detectado como a intensidade dos marcadores hibridizados.

Além disso, o produto de transcrição de ECT2 (por exemplo, SEQ ID NO: 42) pode ser quantificado com o uso de iniciadores por métodos detecção por amplificação (por exemplo, RT-PCR). Tais iniciadores podem ser preparados com base na informação da sequência do gene disponível.

Especificamente, uma sonda ou iniciador usado para o presente método hibridiza sob condições estringentes, moderadamente estringentes ou pouco estringentes ao mRNA de ECT2. Para uso na presente invenção expressão "condições (de hibridização) estringentes" refere-se às condições sob as quais uma sonda ou iniciador hibridizará a sua sequência alvo, mas não a outras sequências. Condições estringentes dependem da sequência e serão diferentes sob circunstâncias diferentes. A hibridização específica de sequências mais longas é observada em temperaturas mais elevadas do que sequências mais curtas. Em geral, a temperatura de uma condição estringente é selecionada para ser cerca de 5 graus C inferior ao ponto de fusão térmico (Tm) para uma sequência específica em uma força iônica e um

pH definidos. A Tm é a temperatura (sob uma força iônica, pH e concentração de ácido nucleico definidos) na qual 50% das sondas complementares a sua sequência alvo hibridizam à sequência alvo no equilíbrio. Uma vez que as sequências alvo estão geralmente presentes em excesso, na Tm, 50% das sondas estão ocupadas no equilíbrio. Tipicamente, as condições estringentes serão aquelas nas quais a concentração de sal é menor que cerca de 1,0 M de íon sódio, tipicamente cerca de 0,01 a 1,0 M de íon sódio (ou outros sais) em pH 7,0 a 8,3 e a temperatura é de pelo menos cerca de 30 graus C para sondas ou iniciadores curtos (por exemplo, 10 a 50 nucleotídeos) e pelo menos cerca de 60 graus C para sondas ou iniciadores mais longos. Condições estringentes também podem ser alcançadas com a adição de substâncias desestabilizadoras, como formamida.

Uma sonda ou iniciador da presente invenção é, tipicamente, um oligonucleotídeo substancialmente purificado. O oligonucleotídeo inclui, tipicamente, uma região da sequência de nucleotídeos que hibridiza sob condições estringentes a uma sequência de pelo menos cerca de 2000, 1000, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, ou 25 nucleotídeos consecutivos da fita senso de um ácido nucleico que inclui uma sequência de ECT2, ou uma sequência de nucleotídeos da fita antissenso de um ácido nucleico que compreende uma sequência de ECT2, ou de um mutante de ocorrência natural destas sequências. Em particular, por exemplo, em uma modalidade preferencial, um oligonucleotídeo que tem 5 a 50 bases de comprimento pode ser usado como um iniciador para amplificar os genes a serem detectados. Com mais preferência, mRNA ou cDNA de um gene ECT2 pode ser detectado com uma sonda ou iniciador de oligonucleotídeo de um tamanho específico, geralmente, 15 a 30b de comprimento.

Em modalidades preferenciais, o comprimento da sonda ou iniciador de oligonucleotídeo pode ser selecionado a partir de 15 a 25. Procedimentos de teste, dispositivos, ou reagentes para a detecção do gene pelo uso de tal sonda ou iniciador de oligonucleotídeo são bem conhecidos (por exemplo, microarranjo de oligonucleotídeos ou PCR). Nestes testes, as sondas ou iniciadores podem também incluir sequências marcadoras ou ligan-

tes. Adicionalmente, as sondas ou iniciadores podem ser modificados com um marcador detectável ou ligante de afinidade a ser capturado. Alternativamente, em procedimentos de detecção à base de hibridização, um polinucleotídeo que tem algumas centenas (por exemplo, cerca de 100 a 200) bases até alguns quilobases (por exemplo, cerca de 1000 a 2000) de comprimento pode também ser usado para uma sonda (por exemplo, teste de *northern blotting* ou análise de microarranjo de cDNA).

Alternativamente, o produto de tradução pode ser detectado para o diagnóstico da presente invenção. Por exemplo, a quantidade de proteína ECT2 (SEQ ID NO: 42) ou o fragmento imunologicamente ativo da mesma, pode ser determinada. Métodos para determinar a quantidade da proteína como o produto de tradução incluem métodos de imunoensaio que usam um anticorpo que reconhece especificamente a proteína. O anticorpo pode ser monoclonal ou policlonal. Além disso, qualquer fragmento ou modificação (por exemplo, anticorpo quimérico, scFv, Fab, $F(ab')_2$, Fv, etc.) do anticorpo pode ser usado para a detecção, contanto que o fragmento ou anticorpo modificado guarde a capacidade de ligação à proteína ECT2. Tais anticorpos contra os peptídeos da presente invenção e os seus fragmentos também são fornecidos pela presente invenção. Métodos para preparar estes tipos de anticorpos para a detecção de proteínas são bem conhecidos na técnica, e qualquer método pode ser empregado na presente invenção para preparar tais anticorpos e equivalentes dos mesmos.

Como outro método para detectar o nível de expressão do gene ECT2 com base no seu produto de tradução, a intensidade de coloração pode ser medida através de análise imuno-histoquímica com o uso de um anticorpo contra a proteína ECT2. Especificamente, nesta medição, uma coloração forte indica presença/nível aumentado da proteína e, simultaneamente, alto nível de expressão do gene ECT2.

O nível de expressão de um gene alvo, por exemplo, o gene ECT2, em células de câncer pode ser determinado como estando aumentado se o nível aumentar em relação ao nível de controle (por exemplo, o nível em células normais) do gene alvo, por exemplo, em 10%, 25%, ou 50%; ou

aumentar para mais de 1,1 vezes, mais de 1,5 vezes, mais de 2,0 vezes, mais de 5,0 vezes, mais de 10,0 vezes, ou mais.

O nível do controle pode ser determinado ao mesmo tempo em que o das células de câncer com o uso de amostra(s) coletada(s) anteriormente e armazenada(s) de um indivíduo(s) cujo estado(s) de doença (canceroso ou não canceroso) é/são conhecido(s). Além disso, células normais obtidas a partir de regiões não cancerosas de um órgão que tem o câncer a ser tratado podem ser usadas como controle normal. Alternativamente, o nível de controle pode ser determinado por um método estatístico com base nos resultados obtidos pela análise do(s) nível(is) de expressão do gene ECT2 determinado(s) anteriormente em amostras de indivíduos com estados de doença conhecidos. Além disso, o nível de controle pode ser obtido a partir de uma base de dados de padrões de expressão de células testadas anteriormente. Além disso, de acordo com um aspecto da presente invenção, o nível de expressão do gene ECT2 em uma amostra biológica pode ser comparado a vários níveis de controle, determinados a partir de várias amostras de referência. É preferencial usar um nível de controle determinado a partir de uma amostra de referência derivada de um tipo de tecido similar ao da amostra biológica derivada de um indivíduo. Além disso, é preferencial usar o valor padrão dos níveis de expressão do gene ECT2 em uma população com um estado de doença conhecido. O valor padrão pode ser obtido através de qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, uma faixa de média +/- 2 S.D. ou média +/- 3 S.D. pode ser usada como o valor padrão.

No contexto da presente invenção, um nível de controle determinado a partir de uma amostra biológica sabidamente não cancerosa é chamado de "nível de controle normal". Por outro lado, se o nível de controle for determinado a partir de uma amostra biológica de câncer, ele é chamado de "nível de controle canceroso". A diferença entre o nível de expressão de uma amostra e o nível de controle pode ser normalizada para o nível de expressão de ácidos nucleicos controle, por exemplo, genes de manutenção, cujos níveis de expressão conhecidamente não mudam dependendo do estado canceroso ou não canceroso da célula. Genes de controle exemplificadores

incluem, mas não se limitam a, beta-actina, gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase, e proteína ribossomal P1.

Quando o nível de expressão do gene ECT2 está aumentado em comparação ao nível de controle normal, ou é similar/equivalente ao nível de controle canceroso, o indivíduo pode ser diagnosticado com o câncer a ser tratado.

A presente invenção também apresenta um método de (i) diagnosticar se um indivíduo tem suspeita de ter o câncer a ser tratado e/ou (ii) selecionar um indivíduo para o tratamento do câncer, cujo método pode incluir as etapas de:

a) determinar o nível de expressão de ECT2 nas células ou tecido(s) obtidos a partir de um indivíduo com suspeita de ter o câncer a ser tratado;

b) comparar o nível de expressão de ECT2 com um controle normal;

(c) diagnosticar o indivíduo como tendo o câncer a ser tratado caso o nível de expressão de ECT2 esteja aumentado em comparação ao nível de controle normal; e

d) selecionar o indivíduo para o tratamento do câncer se o indivíduo for diagnosticado como tendo o câncer a ser tratado na etapa c).

Alternativamente, tal método pode incluir as etapas de:

a) determinar o nível de expressão de ECT2 nas células ou tecido(s) obtidos a partir de um indivíduo com suspeita de ter o câncer a ser tratado;

b) comparar o nível de expressão de ECT2 com um nível de controle canceroso;

c) diagnosticar o indivíduo como tendo o câncer a ser tratado caso o nível de expressão de ECT2 seja similar ou equivalente ao nível de controle canceroso; e

d) selecionar o indivíduo para o tratamento do câncer se o indivíduo for diagnosticado como tendo o câncer a ser tratado na etapa c).

A presente invenção fornece, adicionalmente, um kit de diagnós-

tico para diagnosticar ou determinar um indivíduo que tem, ou com suspeita de ter, um câncer que pode ser tratado com o polipeptídeo ECT2 da presente invenção, que pode, também, ser útil para avaliar e/ou monitorar a eficácia ou aplicabilidade de uma imunoterapia para o câncer. De preferência, o câncer inclui, mas não se limita, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, LMC, câncer colorretal, câncer de esôfago, NSCLC, linfoma, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma renal e SCLC. Mais particularmente, o kit pode incluir, de preferência, pelo menos um reagente para detectar a expressão do gene ECT2 em uma célula do indivíduo, cujo reagente pode ser selecionado a partir do grupo de:

(a) um reagente para detectar o mRNA do gene ECT2;

(b) um reagente para detectar a proteína ECT2 ou o fragmento imunologicamente ativo da mesma; e

(c) um reagente para detectar a atividade biológica da proteína ECT2.

Exemplos de reagentes adequados para detectar o mRNA do gene ECT2 podem incluir ácidos nucleicos que se ligam especificamente ou identificam o mRNA de ECT2, como, por exemplo, oligonucleotídeos que têm uma sequência complementar a uma porção do mRNA de ECT2. Estes tipos de oligonucleotídeos são exemplificados por iniciadores e sondas específicas para o mRNA de ECT2. Estes tipos de oligonucleotídeos podem ser preparados com base em métodos bem conhecidos na técnica. Se necessário, o reagente para detectar o mRNA de ECT2 pode ser imobilizado sobre uma matriz sólida. Além disso, mais de um reagente para detectar o mRNA de ECT2 pode estar incluído no kit.

Por outro lado, exemplos reagentes adequados para a detecção da proteína ECT2 ou o fragmento imunologicamente ativo da mesma podem incluir anticorpos contra a proteína ECT2 ou o fragmento imunologicamente ativo da mesma. O anticorpo pode ser monoclonal ou policlonal. Além disso, qualquer fragmento ou modificação (por exemplo, anticorpo quimérico, scFv, Fab, $F(ab')_2$, Fv, etc.) do anticorpo pode ser usado como o reagente, contanto que o fragmento ou anticorpo modificado guarde a capacidade de ligação

à proteína ECT2 ou ao fragmento imunologicamente ativo da mesma. Métodos para preparar estes tipos de anticorpos para a detecção de proteínas são bem conhecidos na técnica, e qualquer método pode ser empregado na presente invenção para preparar tais anticorpos e equivalentes dos mesmos. Adicionalmente, o anticorpo pode ser marcado com moléculas para geração de sinal através de uma técnica de ligação direta ou uma técnica de marcação indireta. Marcadores e métodos para marcar anticorpos e detectar a ligação dos anticorpos aos seus alvos são bem conhecidos na técnica, e quaisquer marcadores e métodos podem ser empregados para a presente invenção. Além disso, mais de um reagente para detectar a proteína ECT2 pode estar incluído no kit.

O kit pode conter mais de um dos reagentes supracitados. O kit pode incluir ainda uma matriz sólida e um reagente para ligação de uma sonda contra o gene ECT2 ou anticorpo contra um peptídeo ECT2, um meio e um recipiente para cultivar células, reagentes de controle positivo e negativo, e um anticorpo secundário para detectar um anticorpo contra um peptídeo ECT2. Por exemplo, amostras de tecido obtidas a partir de indivíduos sem câncer ou acometidos com câncer, podem servir como reagentes de controle úteis. Um kit da presente invenção podem incluir, também, outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e bulas (por exemplo, escritas, fitas, CD-ROM, etc) com instruções para uso. Estes reagentes e similares pode ser guardados em um recipiente com um rótulo. Os recipientes adequados podem incluir garrafas, frascos, e tubos de teste. Os recipientes podem ser formados a partir de uma variedade de materiais, como vidro ou plástico.

Em uma modalidade da presente invenção, quando o reagente é uma sonda contra o mRNA de ECT2, o reagente pode ser imobilizado sobre uma matriz sólida, tal como uma fita porosa, para formar pelo menos um sítio de detecção. A medição ou região de detecção da fita porosa pode incluir uma pluralidade de sítios, cada um contendo um ácido nucleico (sonda). Uma tira de teste podem conter, também, sítios para controles negativos

e/ou positivos. Alternativamente, sítios de controle podem estar situados em uma fita separada da tira de teste. Opcionalmente, os diferente sítios de detecção podem conter diferentes quantidades de ácidos nucleicos imobilizados, isto é, uma maior quantidade no primeiro sítio de detecção e quantidades menores em sítios subsequentes. Mediante a adição de uma amostra de teste, o número de sítios apresentando um sinal detectável fornece uma indicação quantitativa da quantidade de mRNA de ECT2 presente na amostra. Os sítios de detecção podem ser configurados em qualquer formato adequadamente detectável e possuem, tipicamente, o formato de uma haste ou ponto ocupando a largura da tira de teste.

O kit da presente invenção pode incluir, também, uma amostra de controle positivo ou amostra padrão de ECT2. A amostra de controle positivo da presente invenção pode ser preparada por coletar amostras positivas para ECT2 e, então, testar seus níveis de ECT2. Alternativamente, uma proteína ou um polinucleotídeo ECT2 purificado pode ser adicionado às células que não expressam ECT2 para formar a amostra positiva ou a amostra padrão de ECT2. Na presente invenção, a ECT2 purificada pode ser uma proteína recombinante. O nível de ECT2 da amostra de controle positivo é, por exemplo, maior que o valor de corte.

Em uma modalidade, a presente invenção fornece adicionalmente um kit de diagnóstico que inclui uma proteína ou uma proteína parcial da mesma capaz de reconhecer especificamente o anticorpo da presente invenção ou seu fragmento.

Exemplos de peptídeos parciais da presente invenção incluem polipeptídeos que compreendem pelo menos 8, de preferência 15, e com mais preferência 20 aminoácidos contíguos na sequência de aminoácidos de uma proteína da presente invenção. O câncer pode ser diagnosticado mediante a detecção de um anticorpo em uma amostra (por exemplo, sangue, tecido) com o uso de uma proteína ou um peptídeo (polipeptídeo) da presente invenção. O método para preparar a proteína e os peptídeos da presente invenção é descrito acima.

Os métodos para diagnóstico de câncer da presente invenção

podem ser feitos mediante a determinação da diferença entre a quantidade de um anticorpo anti-ECT2 e aquele na amostra de controle correspondente, conforme descrito acima. O indivíduo está com suspeita de ter câncer caso as células ou tecidos do indivíduo contenham anticorpos contra os produtos de expressão (ECT2) do gene e a quantidade do anticorpo anti-ECT2 seja determinada como sendo maior que o valor de corte em comparação ao controle normal.

Em outra modalidade, um kit de diagnóstico da presente invenção pode incluir o peptídeo da presente invenção e uma molécula HLA que se liga a ele. O método para detectar CTLs antígeno-específicos com o uso de peptídeos antigênicos e moléculas HLA já foi estabelecido (por exemplo, Altman JD et al., Science. 1996, 274(5284): 94-6). Desta forma, o complexo do peptídeo da presente invenção e a molécula HLA pode ser aplicado ao método de detecção para detectar CTLs específicos do antígeno tumoral permitindo, assim, a detecção precoce de recorrência e/ou metástase de câncer. Adicionalmente, ele pode ser empregado para a seleção de indivíduos que podem ser administrados com os fármacos que incluem o peptídeo da presente invenção como um ingrediente ativo, ou a avaliação do efeito do tratamento dos fármacos.

Particularmente, de acordo com o método conhecido (vide, por exemplo, Altman JD et al., Science. 1996, 274(5284): 94-6), pode-se preparar o complexo oligomérico, como um tetrâmero, da molécula HLA radiomarcada e o peptídeo da presente invenção. Com o uso do complexo, o diagnóstico pode ser feito, por exemplo, pela quantificação dos CTLs específicos para o peptídeo antígeno nos linfócitos do sangue periférico derivados do indivíduo com suspeita de ter câncer.

A presente invenção fornece adicionalmente um método ou agentes de diagnóstico para avaliar a resposta imunológica do indivíduo pelo uso de epítopos peptídeos aqui descritos. Em uma modalidade da presente invenção, os peptídeos restritos por HLA-A02, conforme aqui descritos, podem ser usados como reagentes para avaliar ou prever uma resposta imune de um indivíduo. A resposta imune a ser avaliada pode ser induzida por co-

locar um imunógeno em contato com células imunocompetentes in vitro ou in vivo. Em algumas modalidades, quaisquer substâncias ou composições que podem resultar na produção de CTLs antígeno-específicos que reconhecem e se ligam ao(s) epítopo(s) peptídeo(s) podem ser empregadas como o reagente. Os reagentes peptídicos não precisam ser usados como o imunógeno. Sistemas de teste que são usados para tal análise incluem desenvolvimentos técnicos relativamente recentes como tetrâmeros, coloração para linfocinas intracelulares e testes de liberação de interferon, ou testes ELISPOT. Em modalidades preferenciais, as células imunocompetentes para a avaliação de uma resposta imunológica, podem ser selecionadas dentre sangue periférico, linfócito de sangue periférico (PBL), e células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Os métodos para coletar ou isolar tais células imunocompetentes são bem conhecidos na técnica. Em uma modalidade alternativa preferencial, as células imunocompetentes a serem colocadas em contato com o reagente de peptídeo incluem células apresentadoras de antígeno, como células dendríticas.

Por exemplo, os peptídeos da presente invenção podem ser usados em testes de coloração de tetrâmeros para avaliar as células mononucleares de sangue periférico quanto a presença de CTLs antígeno-específicos após a exposição a um antígeno ou um imunógeno de célula tumoral. O complexo tetramérico de HLA pode ser usado para visualizar diretamente os CTLs antígeno-específicos (vide, por exemplo, Ogg et al., Science 279: 2103-2106, 1998; e Altman et al, Science 174: 94-96, 1996) e determinar a frequência da população do CTL antígeno-específico em uma amostra de células mononucleares de sangue periférico. Um reagente tetramérico que usa um peptídeo da invenção pode ser gerado conforme descrito abaixo.

Um peptídeo que se liga a uma molécula HLA é reenovelado na presença da cadeia pesada de HLA correspondente e da beta 2-microglobulina para gerar um complexo trimolecular. No complexo, a terminação carboxila da cadeia pesada é biotinilada em um local que foi manipulado anteriormente na proteína. Então, estreptavidina é adicionada ao complexo para

formar um tetrâmero que consiste no complexo trimolecular e estreptavidina. Através de estreptavidina marcada com fluorescência, o tetrâmero pode ser usado para corar células antígeno-específicas. As células podem, então, ser identificadas, por exemplo, por citometria de fluxo. Tal análise pode ser usada com fins de diagnóstico ou prognóstico. As células identificadas pelo procedimento também podem ser usadas com fins terapêuticos.

A presente invenção fornece, adicionalmente reagentes para avaliar respostas imunes de memória (consulte, por exemplo, Bertoni et al, J. Clin. Invest. 100: 503-513, 1997 e Penna et al., J Exp. Med. 174: 1565-1570, 1991) incluindo os peptídeos da presente invenção. Por exemplo, amostras de PBMC (célula mononuclear de sangue periférico) de pacientes com o câncer a ser tratado podem ser analisadas com relação à presença de CTLs antígeno-específicos com o uso de peptídeos específicos. Uma amostra de sangue contendo células mononucleares pode ser avaliada pelo cultivo das PBMCs e estimulação das células com um peptídeo da invenção. Após um período de cultivo adequado, a população celular expandida pode ser analisada, por exemplo, para a atividade de CTL.

Os peptídeos também podem ser usados como reagentes para avaliar a eficácia de uma vacina. As PBMCs obtidas a partir de paciente vacinado com um imunógeno podem ser analisadas com o uso, por exemplo, de qualquer um dos métodos descritos acima. O paciente tem o HLA tipado, e os reagentes de epítopo peptídeo que reconhecem as moléculas alelo-específicas presentes no paciente são selecionados para a análise. A imunogenicidade da vacina pode ser indicada pela presença de CTLs epítopo-específicos na amostra de PBMC. Os peptídeos da invenção podem, também, ser usados para fazer anticorpos, com o uso de técnicas bem conhecidas na arte (consulte, por exemplo, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; e Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow e Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), que podem ser úteis como reagentes para diagnosticar, detectar e monitorar o câncer. Tais anticorpos podem incluir aqueles que reconhecem um peptídeo no contexto de uma molécula HLA, isto é, anticorpos que se ligam a um complexo de peptídeo-

MHC.

Os peptídeos e composições da presente invenção têm vários usos, alguns dos quais são descritos aqui. Por exemplo, a presente invenção apresenta um método para diagnosticar ou detectar um transtorno caracterizado pela expressão de um polipeptídeo imunogênico ECT2. Estes métodos envolvem a determinação da expressão de um peptídeo de ligação ao HLA de ECT2, ou um complexo de um peptídeo de ligação ao HLA de ECT2 e uma molécula de HLA classe I em uma amostra biológica. A expressão de um peptídeo ou complexo de peptídeo e molécula de HLA classe I pode ser determinada ou detectada mediante o teste com um parceiro de ligação para o peptídeo ou complexo. Em uma modalidade preferencial, um parceiro de ligação para o peptídeo ou complexo pode ser um anticorpo que reconhece e se liga especificamente ao peptídeo. A expressão de ECT2 em uma amostra biológica, como uma biópsia tumoral, também pode ser testada por protocolos de amplificação por PCR padrão com o uso de iniciadores para ECT2. Um exemplo de expressão tumoral é apresentado aqui e descrição adicional de condições e iniciadores exemplificadores para a amplificação de ECT2 podem ser encontrados no documento WO2003/27322, estando o seu conteúdo aqui incorporado a título de referência.

De preferência, os métodos de diagnóstico envolvem colocar uma amostra biológica isolada de um indivíduo em contato com um agente específico para o peptídeo de ligação ao HLA de ECT2 para detectar a presença do peptídeo de ligação ao HLA de ECT2 na amostra biológica. Para uso na presente invenção, "colocar em contato" significa colocar a amostra biológica em proximidade suficiente ao agente e sob as condições adequadas, por exemplo, de concentração, temperatura, tempo, força iônica, para permitir a interação específica entre o agente e o peptídeo ECT2 de ligação ao HLA que estão presentes na amostra biológica. Em geral, as condições para colocar o agente em contato com a amostra biológica são condições conhecidas pelos elementos versados na técnica para facilitar uma interação específica entre uma molécula e seu cognato (por exemplo, uma proteína e seu receptor cognato, um anticorpo e sua antígeno proteico cognato, um

ácido nucleico e sua sequência complementar cognata) em uma amostra biológica. Condições exemplificadoras para facilitar uma interação específica entre uma molécula e seu cognato são descritas na patente US nº 5.108.921, concedida a Low et al., cujo conteúdo está aqui incorporado a título de referência.

O método de diagnóstico da presente invenção pode ser feito em in vivo ou in vitro, ou ambos. Consequentemente, a amostra biológica pode estar situada in vivo ou in vitro na presente invenção. Por exemplo, a amostra biológica pode ser um tecido in vivo e o agente específico para o polipeptídeo imunogênico ECT2 pode ser usado para detectar a presença de tais moléculas no tecido. Alternativamente, a amostra biológica pode ser coletada ou isolada in vitro (por exemplo, uma amostra de sangue, biópsia tumoral, extrato de tecido). Em uma modalidade particularmente preferencial, a amostra biológica pode ser uma amostra contendo células, com mais preferência, uma amostra contendo células tumorais coletadas de um indivíduo a ser diagnosticado ou tratado.

Alternativamente, o diagnóstico pode ser feito por um método que permite a quantificação direta de células T antígeno-específicas pela coloração com complexos multiméricos de HLA marcados com fluoresceína (por exemplo, Altman, J. D. et al., 1996, Science 274: 94; Altman, J. D. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10330). Coloração para linfocinas intracelulares, e testes de liberação de interferon-gama ou testes ELISPOT também foram fornecidos. A coloração de multímeros, coloração de linfocina intracelular e os testes ELISPOT parecem ser pelo menos 10 vezes mais sensíveis do que testes mais convencionais (Murali-Krishna, K. et al., 1998, Immunity 8: 177; Lalvani, A. et al., 1997, J. Exp. Med. 186: 859; Dunbar, P. R. et al., 1998, Curr. Biol. 8: 413). Pentâmeros (por exemplo, US 2004-209295A), dextrâmeros (por exemplo, WO 02/072631), e estreptâmeros (por exemplo, Nature medicine 6. 631-637 (2002)) pode, também, ser usados.

Consequentemente, em algumas modalidades, a presente invenção apresenta um método para diagnosticar ou avaliar uma resposta imunológica de um indivíduo ao qual pelo menos um dos peptídeos ECT2 da

presente invenção foi administrado, o método incluindo as etapas de:

a: colocar um imunógeno em contato com células imunocompetentes sob a condição adequada

de indução de CTL específico para o imunógeno;

(b) detectar ou determinar o nível de indução do CTL induzido na etapa (a); e

(c) correlacionar a resposta imunológica do indivíduo com o nível de indução de CTL.

No contexto da presente invenção, o imunógeno é pelo menos um de (a) um peptídeo ECT2 selecionado dentre as sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 1 a 40, e (b) peptídeos que possuem tais sequências de aminoácido, nos quais tais sequências de aminoácido foram modificadas com 1, 2 ou mais substituição(ões) de aminoácido. Entretanto, as condições adequadas para indução do CTL específico para o imunógeno são bem conhecidas na técnica. Por exemplo, células imunocompetentes podem ser cultivadas in vitro na presença de imunógeno(s) para induzir CTL imunógeno-específico. De modo a induzir CTLs imunógeno-específicos, quaisquer fatores estimulantes podem ser adicionados à cultura de células. Por exemplo, IL-2 é um fator estimulante preferencial para a indução de CTL.

Em algumas modalidades, a etapa de monitorar ou avaliar a resposta imunológica de um indivíduo a ser tratado com a terapia para câncer com peptídeo pode ser realizada antes, durante e/ou após o tratamento. Em geral, durante um protocolo de terapia do câncer, os peptídeos imunogênicos são administrados repetidamente a um indivíduo a ser tratado. Por exemplo, os peptídeos imunogênicos podem ser administrados toda semana durante 3 a 10 semanas. Consequentemente, a resposta imunológica do indivíduo pode ser avaliada ou monitorada durante o protocolo de terapia para o câncer. Alternativamente, a etapa de avaliação ou monitoramento da resposta imunológica à terapia do câncer pode ocorrer ao final do protocolo de tratamento.

De acordo com a presente invenção, a indução intensificada de CTL específico para um imunógeno, em comparação a um controle indica

que o indivíduo a ser avaliado ou diagnosticado respondeu imunologicamente ao(s) imunógeno(s) que foi/foram administrados. Os controles adequados para avaliar a resposta imunológica podem incluir, por exemplo, um nível de indução de CTL quando células imunocompetentes não são colocadas em contato com peptídeo, ou são colocadas em contato com peptídeo(s) de controle tendo sequências de aminoácido diferentes de quaisquer peptídeos ECT2 (por exemplo, sequência de aminoácido aleatória). Em uma modalidade preferencial, a resposta imunológica do indivíduo é avaliada de uma forma sequência-específica, pela comparação com uma resposta imunológica entre cada imunógeno administrado ao indivíduo. Em particular, mesmo quando uma mistura de alguns tipos de peptídeos ECT2 é administrada ao indivíduo, a resposta imunológica pode variar dependendo dos peptídeos. Neste caso, pela comparação da resposta imunológica entre cada peptídeo, os peptídeos aos quais o indivíduo mostra resposta mais elevada podem ser identificados.

XI. Anticorpos

A presente invenção apresenta adicionalmente, anticorpos que se ligam aos peptídeos da presente invenção. Os anticorpos preferenciais se ligam especificamente ao peptídeo da presente invenção e não se ligarão (ou se ligarão fracamente) ao não peptídeo da presente invenção. Alternativamente, os anticorpos se ligam ao peptídeo da invenção bem como aos seus homólogos. Anticorpos contra o peptídeo da invenção podem ser usados em testes de diagnóstico e prognóstico do câncer e em metodologias de formação de imagens. De modo similar, estes anticorpos podem ser usados no tratamento, diagnóstico, e/ou prognóstico de outros cânceres, na medida em que ECT2 também está expresso ou superexpresso no paciente com câncer. Além disso, anticorpos expressos de modo intracelular (por exemplo, anticorpos de cadeia única) podem encontrar uso terapêutico no tratamento de cânceres nos quais a expressão de ECT2 está envolvida, cujos exemplos incluem, mas não se limitam a câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, LMC, câncer colorretal, câncer de esôfago, NSCLC, linfoma, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma

renal e SCLC.

A presente invenção fornece, adicionalmente, vários testes imunológicos para a detecção e/ou quantificação da proteína ECT2 (SEQ ID NO: 42) ou seus fragmentos, incluindo polipeptídeos que possuem uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 1 a 40. Tais testes podem incluir um ou mais anticorpos anti-ECT2 capazes de reconhecer e se ligar a uma proteína ECT2 ou seus fragmentos, conforme for adequado. Na presente invenção, os anticorpos anti-ECT2 que se ligam ao polipeptídeo ECT2 reconhecem, de preferência, um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO: 1 a 40. Uma especificidade de ligação do anticorpo pode ser confirmada com um teste de inibição. Isto é, quando a ligação entre um anticorpo a ser analisado e o polipeptídeo ECT2 de extensão completa é inibida na presença de quaisquer fragmentos de polipeptídeos que possuem a sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NO: 1 a 40, o anticorpo se liga especificamente ao fragmento. No contexto da presente invenção, tais testes imunológicos são feitos em vários formatos de testes imunológicos bem conhecidos na técnica, incluindo, mas não se limitando a diversos tipos de radioimunoensaios, técnica imunocromatográfica, ensaios imunossorvente ligados à enzima (ELISA), ensaios imunofluorescentes ligados a enzimas (ELIFA), e similares.

Testes imunológicos relacionados, mas que não usam anticorpo, da invenção também podem incluir testes de imunogenicidade de célula T (inibidor ou estimulante) bem como testes de ligação ao MHC. Além disso, métodos imunológicos de formação de imagens capazes de detectar cânceres que expressam ECT2 também são fornecidos pela invenção, incluindo, mas não se limitando a métodos de formação de imagens radiocintigráficas com o uso dos anticorpos marcados da presente invenção. Tais testes podem ser usados clinicamente na detecção, monitoramento, e prognóstico de cânceres que expressam ECT2 incluindo, mas não se limitando a câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, LMC, câncer colorretal, câncer de esôfago, NSCLC, linfoma, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma renal e SCLC.

A presente invenção fornece, adicionalmente, um anticorpo que se liga ao peptídeo da invenção. O anticorpo da invenção pode ser usado em qualquer forma, como, por exemplo, anticorpos monoclonais ou policlonais, e inclui antissoro obtido pela imunização de um animal, como um coelho, com o peptídeo da invenção, todas as classes de anticorpos policlonais e monoclonais, anticorpos humanos e anticorpos humanizados produzidos por recombinação genética.

Um peptídeo da invenção usado como um antígeno para obter um anticorpo pode ser derivado de qualquer espécie animal, mas de preferência, é derivado de um mamífero, como um ser humano, camundongo, ou rato, com mais preferência, de um ser humano. Um peptídeo derivado de ser humano pode ser obtido a partir das sequências de nucleotídeo ou aminoácido aqui apresentadas.

De acordo com a presente invenção, o peptídeo a ser usado como um antígeno de imunização pode ser uma proteína completa ou um peptídeo parcial da proteína. Um peptídeo parcial pode incluir, por exemplo, o fragmento amino (N)-terminal ou carbóxi (C)-terminal de um peptídeo da presente invenção.

Aqui, um anticorpo é definido como uma proteína que reage com a extensão completa ou com um fragmento de um peptídeo ECT2. Em uma modalidade preferencial, um anticorpo da presente invenção pode reconhecer fragmentos de peptídeos ECT2 que possuem uma sequência de aminoácidos selecionada dentre SEQ ID NOs: 1 a 40. Os métodos para sintetizar oligopeptídeos são bem conhecidos na técnica. Após a síntese, os peptídeos podem ser, opcionalmente, purificados antes do uso como um imunógeno. Na presente invenção, o oligopeptídeo (por exemplo, 9 ou 10 mer) pode ser conjugado ou ligado a carreadores para acentuar a imunogenicidade. A hemocianina do molusco keyhole limpet (KLH) é bem conhecida como o carreador. Métodos para conjugar KLH e peptídeo também são bem conhecidos na técnica.

Alternativamente, um gene que codifica um peptídeo da invenção ou seu fragmento pode ser inserido em um vetor de expressão conheci-

do, que é então usado para transformar uma célula hospedeira, conforme descrito na presente invenção. O peptídeo desejado ou seu fragmento pode ser recuperado de fora ou de dentro das células hospedeiras por qualquer método padrão, e pode ser subsequentemente usado como um antígeno. Alternativamente, células inteiras que expressam o peptídeo ou seus lisados ou um peptídeo sintetizado quimicamente podem ser usadas como o antígeno.

Qualquer animal mamífero pode ser imunizado com o antígeno, mas, de preferência, a compatibilidade com as células parentais usadas para a fusão celular é levada em consideração. Em geral, animais das famílias Rodentia, Lagomorpha ou Primata podem ser usados. Os animais da família Rodentia incluem, por exemplo, camundongo, rato e hamster. Os animais da família Lagomorpha incluem, por exemplo, coelho. Os animais da família Primata incluem, por exemplo, um macaco de Catarrhini (macaco do velho mundo) como Macaca fascicularis, macaco Rhesus, babuíno sagrado e chimpanzés.

Métodos para imunização de animais com antígenos são conhecidos na técnica. Injeção intraperitoneal ou injeção subcutânea de antígenos é um método padrão para imunização de mamíferos. Mais especificamente, os antígenos podem ser diluídos e suspensos em uma quantidade adequada de solução salina tamponada com fosfato (PBS), solução salina fisiológica, etc. Se desejado, a suspensão de antígeno pode ser misturada com uma quantidade adequada de um adjuvante padrão, como adjuvante de Freund completo, transformado em emulsão e, então, administrado aos animais mamíferos. De preferência, isto é seguido de várias administrações de antígeno misturado com uma quantidade apropriada de adjuvante de Freund incompleto a cada 4 a 21 dias. Um carreador adequado pode, também, ser usado para a imunização. Após a imunização, conforme descrito acima, o soro pode ser examinado por um método padrão quanto a um aumento na quantidade dos anticorpos desejados.

Anticorpos policlonais contra os peptídeos da presente invenção podem ser preparados pela coleta de sangue do mamífero imunizado exa-

minado para o aumento dos anticorpos desejados no soro, e separação do soro do sangue por qualquer método convencional. Os anticorpos policlonais incluem soro contendo os anticorpos policlonais, e a fração contendo os anticorpos policlonais pode ser isolada do soro. Imunoglobulina G ou M pode ser preparada a partir de uma fração que reconhece apenas o peptídeo da presente invenção com o uso, por exemplo, de uma coluna de afinidade acoplada com o peptídeo da presente invenção, e purificação adicional desta fração com o uso de coluna de proteína A ou proteína G.

Para preparar anticorpos monoclonais, células imunes são coletadas do mamífero imunizado com o antígeno e verificadas quanto a um nível elevado dos anticorpos desejados no soro, conforme descrito acima, e são submetidas à fusão celular. As células imunes usadas para a fusão celular podem ser obtidas, de preferência, a partir do baço. Outras células parentais preferenciais a serem fundidas com o imunócito acima incluem, por exemplo, células de mieloma de mamíferos e, com mais preferência, células de mieloma que adquiriram uma propriedade para a seleção de células fundidas por fármacos.

O imunócito e as células de mieloma acima podem ser fundidos de acordo com métodos conhecidos, por exemplo, o método de Milstein et al. (Galfre e Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46 (1981)).

Os hibridomas resultantes obtidos pela fusão celular podem ser selecionados pelo cultivo deles em um meio de seleção padrão, como meio HAT (meio contendo hipoxantina, aminopterina e timidina). A cultura celular é continuada tipicamente no meio HAT por vários dias até várias semanas, o tempo sendo suficiente para permitir que todas as outras células, com a exceção do hibridoma desejado (células não fundidas), morram. A seguir, diluição limitante padrão pode ser feita para selecionar e clonar uma célula de hibridoma que produz o anticorpo desejado.

Além do método acima, no qual um animal não humano é imunizado com um antígeno para preparar um hibridoma, linfócitos humanos como os infectados pelo vírus EB podem ser imunizados com um peptídeo, células que expressam peptídeo ou seus lisados in vitro. A seguir, os linfóci-

tos imunizados são fundidos a células de mieloma derivadas de um ser humano que são capazes de dividir indefinidamente, como U266, para produzir um hibridoma produtor de um anticorpo humano desejado que é capaz de se ligar ao peptídeo (Pedido de Patente Japonês publicado e não examinado nº Sho 63-17688).

Os hibridomas obtidos são subsequentemente transplantados para a cavidade abdominal de um camundongo e os líquidos de ascite são extraídos. Os anticorpos monoclonais obtidos podem ser purificados, por exemplo, por precipitação com sulfato de amônio, coluna de proteína A ou proteína G, cromatografia de troca iônica DEAE ou uma coluna de afinidade à qual o peptídeo da presente invenção é acoplado. O anticorpo da presente invenção pode ser usado não apenas para purificação e detecção do peptídeo da presente invenção, mas também como um candidato a um agonista e antagonista do peptídeo da presente invenção.

Alternativamente, uma célula imune, como um linfócito imunizado, que produz anticorpos pode ser imortalizada por um oncogene e usada para preparar anticorpos monoclonais.

Os anticorpos monoclonais assim obtidos também podem ser preparados de forma recombinante com o uso de técnicas de engenharia genética (vide, por exemplo, Borrebaeck e Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, publicado no Reino Unido por MacMillan Publishers LTD (1990)). Por exemplo, um DNA que codifica um anticorpo pode ser clonado a partir de uma célula imune, como um hibridoma ou um linfócito imunizado que produz o anticorpo, inserido em um vetor adequado, e introduzido nas células hospedeiras para preparar um anticorpo recombinante. A presente invenção fornece, adicionalmente, anticorpos recombinantes preparados conforme descrito acima.

Além disso, um anticorpo da presente invenção pode ser um fragmento de um anticorpo ou anticorpo modificado, contanto que ele se ligue a um ou mais dos peptídeos da invenção. Por exemplo, o fragmento de anticorpo pode ser Fab, $F(ab')_2$, Fv ou Fv de cadeia única (scFv), no qual os fragmentos Fv das cadeias H e L são ligados por um ligante adequado (Hus-

ton et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83 (1988)). Mais especificamente, um fragmento de anticorpo pode ser gerado pelo tratamento de um anticorpo com uma enzima, como papaína ou pepsina. Alternativamente, um gene que codifica o fragmento de anticorpo pode ser construído, inserido em um vetor de expressão e expresso em uma célula hospedeira adequada (vide, por exemplo Co et al., J Immunol 152: 2968-76 (1994); Better e Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96 (1989); Pluckthun e Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515 (1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121: 652-63 (1986); Rousseaux et al., Methods Enzymol 121: 663-9 (1986); Bird e Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7 (1991)).

Um anticorpo pode ser modificado pela conjugação com uma variedade de moléculas, como polietileno glicol (PEG). A presente invenção proporciona tais anticorpos modificados. O anticorpo modificado pode ser obtido mediante a modificação química de um anticorpo. Estes métodos de modificação são convencionais na técnica.

Alternativamente, um anticorpo da presente invenção pode ser obtido como um anticorpo quimérico, entre uma região variável derivada de um anticorpo não humano e a região constante derivada do anticorpo humano, ou como um anticorpo humanizado que inclui a região determinante de complementaridade (CDR) derivada do anticorpo não-humano, a região estrutural (FR) e a região constante derivada do anticorpo humano. Tais anticorpos podem ser preparados de acordo com tecnologia conhecida. A humanização pode ser feita mediante a substituição de CDRs ou sequências de CDR de roedor pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano (vide, por exemplo, Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988)). Consequentemente, tais anticorpos humanizados são anticorpos quiméricos, sendo que um domínio variável substancialmente menor dos domínios variáveis humanos intactos foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana.

Anticorpos completamente humanos que incluem regiões variáveis humanas além das regiões estruturais e constantes humanas também podem ser usados. Tais anticorpos podem ser produzidos com o uso de vá-

rias técnicas conhecidas. Por exemplo, métodos in vitro envolvem o uso de bibliotecas recombinantes de fragmentos de anticorpo humano apresentadas em bacteriófago (por exemplo, Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991). De modo similar, anticorpos humanos podem ser produzidos pela introdução de loci de imunoglobulina humana em animais transgênicos, por exemplo, camundongos nos quais os genes de imunoglobulina endógenos foram parcial ou completamente inativados. Esta abordagem é descrita, por exemplo, nas patentes U.S. 6.150.584. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016.

Anticorpos obtidos conforme descrito acima podem ser purificados até homogeneidade. Por exemplo, a separação e purificação do anticorpo pode ser feita de acordo com métodos de separação e purificação usados para proteínas em geral. Por exemplo, o anticorpo pode ser separado e isolado pelo uso adequadamente selecionado e combinado de cromatografias em coluna, como cromatografia de afinidade, filtro, ultrafiltração, salting-out, diálise, eletroforese em gel de poliacrilamida SDS e focalização isoelétrica (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow e David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), porém não se limitam a isto. Uma coluna de proteína A e uma coluna de proteína G podem ser usadas como a coluna de afinidade. Exemplos de colunas de proteína A a serem usadas incluem, por exemplo, Hyper D, POROS e Sepharose F.F. (Pharmacia).

Exemplos de cromatografia, com a exceção de afinidade, incluem, por exemplo, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica, filtração em gel, cromatografia de fase reversa, cromatografia de adsorção e similares (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). Os procedimentos cromatográficos podem ser executados por cromatografia em fase líquida, como HPLC e FPLC.

Por exemplo, medição de absorbância, ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), imunoensaio enzimático (EIA), radioimunoensaio (RIA) e/ou imunofluorescência podem ser usados para medir a atividade de ligação ao antígeno do anticorpo da invenção. Em ELISA, o anticorpo da

presente invenção é imobilizado sobre uma placa, um peptídeo da invenção é aplicado à placa, e, então, uma amostra contendo um anticorpo desejado, como o sobrenadante da cultura das células produtoras de anticorpo ou anticorpos purificados, é aplicado. A seguir, um anticorpo secundário que reconhece o anticorpo primário e é marcado com uma enzima, como fosfatase alcalina, é aplicado, e a placa é incubada. A seguir, após a lavagem, um substrato enzimático, como fosfato de p-nitrofenila, é adicionado à placa, e a absorbância é medida para avaliar a atividade de ligação ao antígeno da amostra. Um fragmento do peptídeo, como um fragmento C-terminal ou N-terminal, pode ser usado como o antígeno para avaliar a atividade de ligação do anticorpo. BIAcore (Pharmacia) pode ser usado para avaliar a atividade do anticorpo de acordo com a presente invenção.

Os métodos acima permitem a detecção ou medição do peptídeo da invenção pela exposição do anticorpo da invenção a uma amostra que supostamente contém o peptídeo da invenção, e detecção ou medição do complexo imune formado pelo anticorpo e o peptídeo.

Pelo fato do método de detecção ou medição do peptídeo de acordo com a invenção poder detectar ou medir especificamente um peptídeo, o método pode encontrar uso em uma variedade experimentos nos quais o peptídeo é usado.

XII. Vetores e células hospedeiras

A presente invenção fornece, adicionalmente, um vetor e uma célula hospedeira na qual um nucleotídeo que codifica o peptídeo da presente invenção é introduzido. Um vetor da presente invenção pode ser útil para manter um nucleotídeo, especificamente um DNA, da presente invenção na célula hospedeira, para expressar o peptídeo da presente invenção, ou para administrar o nucleotídeo da presente invenção para terapia gênica.

Quando E. coli é uma célula hospedeira e o vetor é amplificado e produzido em uma grande quantidade em E. coli (por exemplo, JM109, DH5 alfa, HB101 ou XL1Blue), o vetor deve ter "ori" para ser amplificado em E. coli e um gene marcador para selecionar as células de E. coli transformadas (por exemplo, um gene de resistência à fármacos selecionado por um fár-

maco como ampicilina, tetraciclina, canamicina, cloranfenicol ou similares). Por exemplo, vetores da série M13, vetores da série pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, etc. podem ser usados. Além disso, pGEM-T, pDIRECT e pT7 também podem ser usados para subclonar e extrair cDNA bem como os vetores descritos acima. Quando um vetor é usado para produzir a proteína da presente invenção, um vetor de expressão pode ser usado. Por exemplo, um vetor de expressão a ser expresso em E. coli deve ter as características acima para ser amplificado em E. coli. Quando células de E. coli, como JM109, DH5 alfa, HB101 ou XL1 Blue, são usadas como uma célula hospedeira, o vetor deve ter um promotor, por exemplo, o promotor de lacZ (Ward et al., Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1992)), o promotor de araB (Better et al., Science 240: 1041-3 (1988)), o promotor de T7 ou similares, que pode expressar eficientemente o gene desejado em E. coli. Neste sentido, pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (Qiagen), pEGFP e pET (nesse caso, o hospedeiro é, de preferência, BL21 que expressa RNA polimerase T7), por exemplo, podem ser usados ao invés dos vetores acima. Adicionalmente, o vetor pode conter, também, uma sequência de sinal para a secreção de peptídeo. Uma sequência de sinal exemplificadora que direciona o peptídeo a ser secretado para o periplasma de E. coli é a sequência de sinal pelB (Lei et al., J Bacteriol 169: 4379 (1987)). Meios para introdução dos vetores nas células hospedeiras alvo incluem, por exemplo, o método de cloreto de cálcio, e o método de eletroporação.

Além de E. coli, por exemplo, vetores de expressão derivados de mamíferos (por exemplo, pcDNA3 (Invitrogen) e pEGF-BOS (Nucleic Acids Res 18(17): 5322 (1990)), pEF, pCDM8), vetores de expressão derivados de células de inseto (por exemplo, "sistema de expressão de baculovírus Bacto-BAC" (GIBCO BRL), pBacPAK8), vetores de expressão derivados de plantas (por exemplo, pMH1, pMH2), vetores de expressão derivados de vírus animais (por exemplo, pHSV, pMV, pAdexLcw), vetores de expressão derivados de retrovírus (por exemplo, pZIpneo), vetor de expressão derivado de levedura (por exemplo, "Pichia Expression Kit" (Invitrogen), pNV11, SP-Q01) e vetores de expressão derivados de Bacillus subtilis (por exemplo,

pPL608, pKTH50) podem ser usados para produzir o polipeptídeo da presente invenção.

De modo a expressar o vetor em células animais, como células CHO, COS ou NIH3T3, o vetor deve carregar um promotor necessário para a expressão nestas células, por exemplo, o promotor de SV40 (Mulligan et al., Nature 277: 108 (1979)), o promotor de MMLV-LTR, o promotor de EF1 alfa (Mizushima et al., Nucleic Acids Res 18: 5322 (1990)), o promotor de CMV e similares e, de preferência, um gene marcador para selecionar os transformantes (por exemplo, um gene de resistência a medicamentos selecionado por um fármaco (por exemplo, neomicina, G418)). Exemplos de vetores conhecidos com estas características incluem, por exemplo, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK -CMV, pOPRSV e pOP13.

Os exemplos a seguir são apresentados para ilustrar a presente invenção e para ajudar um versado na técnica a prepará-la e utilizá-la. Os exemplos não se destinam a limitar de outro modo o escopo da invenção.

## EXEMPLOS

### Materiais e Métodos

#### Linhagens celulares

T2 (HLA- A2), uma linhagem celular linfoblastoide B humana, e COS7, uma linhagem celular de rim de macaco verde africano, foram adquiridas junto à ATCC.

#### Seleção de peptídeos candidatos derivados de ECT2

Peptídeos de 9-mer e 10-mer derivados de ECT2 que se ligam à molécula de HLA-A*0201 foram previstos com o uso do programa para previsão de ligação "BIMAS" (www-bimas.citdcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/hla_bindken_parker_comboform) (Parker et al. (J Immunol 1994, 152(1): 163-75), Kuzushima et al. (Blood 2001, 98(6): 1872-81)). Estes peptídeos foram sintetizados pela Biosynthesis (Lewisville, Texas) de acordo com um método de síntese em fase sólida padrão e purificados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC). A pureza (>90%) e a identidade dos peptídeos foram determinadas por HPLC analítico e análise de espectrometria de massa, respectivamente. Os peptídeos foram dis-

solvidos em sulfóxido de dimetila a 20 mg/ml e armazenados a -80 graus C.

Indução de CTL in vitro

Células dendríticas derivadas de monócitos (DCs) foram usadas como células apresentadoras de antígeno para induzir respostas de linfócito T citotóxico (CTL) contra peptídeos apresentados sobre antígeno leucocitário humano (HLA). As DCs foram geradas in vitro conforme descrito em outro local (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8). Especificamente, células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) isoladas de um voluntário normal (positivas para HLA- A*0201) por solução Ficoll-Plaque (Pharmacia) foram separadas por aderência a uma placa plástica para cultura de tecidos (Becton Dickinson) de modo a enriquecê-las como a fração de monócitos. A população enriquecida com monócitos foi cultivada na presença de 1.000 U/ml de fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (R&D System) e 1.000 U/ml de interleucina (IL)-4 (R&D System) em meio AIM-V (Invitrogen) contendo 2% de soro autólogo desativado por calor (AS). Após 7 dias de cultura, as DCs induzidas por citocina foram pulsadas com 20 microgramas/ml de cada um dos peptídeos sintetizados na presença de 3 microgramas/ml de beta 2-microglobulina durante 3 horas a 37 graus C em meio AIM-V. As células geradas pareceram expressar moléculas associadas a DC, como CD80, CD83, CD86 e HLA classe II, nas suas superfícies celulares (dados não mostrados). Estas DCs pulsadas com peptídeos foram então inativadas por irradiação com raios-X (20 Gy) e foram misturadas a uma proporção de 1:20 com células T CD8+ autólogas, obtidas por seleção positiva com o kit CD8 positive Isolation Kit (Dynal). Estas culturas foram colocadas em placas de 48 poços (Corning); cada poço continha 1,5 x $10^4$ DCs pulsadas com peptídeos, 3 x $10^5$ células T CD8+ e 10 ng/ml de IL-7 (R&D System) em 0,5 ml de meio AIM-V/2% AS. Três dias depois, estas culturas foram suplementadas com IL-2 (CHIRON) a uma concentração final de 20 IU/ml. Nos dias 7 e 14, a células T foram estimuladas adicionalmente com as DCs pulsadas com peptídeos autólogas. As DCs foram preparadas todas as vezes pela mesma forma descrita acima. Os CTLs foram testados contra células T2 pulsadas com peptídeo após o 3º ciclo de estimulação com peptí-

deo no dia 21 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Abr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dez 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 Mai, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Ago, 96(8): 498-506).

Procedimento de expansão de CTL

Os CTLs foram expandidos em cultura com o uso do método similar ao descrito por Riddell et al. (Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Out 19, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Fev, 2(2): 216-23). Um total de 5 x $10^4$ CTLs foi suspenso em 25 ml de meio AIM-V/5% AS com 2 tipos de linhagens celulares linfoblastoides B humanas, inativadas por mitomicina C, na presença de 40 ng/ml de anticorpo monoclonal anti-CD3 (Pharmingen). Um dia após o início das culturas, 120 IU/ml de IL-2 foram adicionados às culturas. As culturas foram supridas com meio AIM-V/5% AS fresco contendo 30 IU/ml de IL-2 nos dias 5, 8 e 11 (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Abr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dez 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 Mai, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Ago, 96(8): 498-506).

Estabelecimento de clones de CTL

Foram feitas diluições para ter 0,3, 1, e 3 CTLs/poço em placas de microtitulação de 96 poços de fundo redondo (Nalge Nunc International). Os CTLs foram cultivados com 1 X $10^4$ células/ poço de 2 tipos de linhagens celulares linfoblastoides B humanas, 30 ng/ml de anticorpo anti-CD3, e 125 U/ml de IL-2 em um total de 150 microlitros/poço de meio AIM-V contendo 5% de AS. 50 microlitros/poço de IL-2 foram adicionados ao meio 10 dias mais tarde para alcançar uma concentração final de 125 U/ml de IL-2. A atividade de CTL foi testada no 14º dia, e os clones de CTL foram expandidos usando o mesmo método descrito acima (Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dez 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 Mai, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Ago, 96(8): 498-506).

Atividade específica de CTL

Para examinar a atividade específica de CTL, teste immunospot

ligado à enzima (ELISPOT) para interferon (IFN)-gama e ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) para IFN-gama foram executados. Especificamente, células T2 (1 x $10^4$/poço) pulsadas com peptídeo foram preparadas como células estimulantes. As células cultivadas em 48 poços foram usadas como células respondedoras. O ensaio ELISPOT para IFN-gama e o ensaio ELISA para IFN-gama foram feitos de acordo com os procedimentos do fabricante.

Estabelecimento das células que expressam de modo forçado o gene alvo e/ou HLA-A02

O cDNA que codifica uma fase aberta de leitura dos genes alvo ou HLA-A*0201 foi amplificado por PCR. O produto amplificado por PCR foi clonado em um vetor. Os plasmídios foram transfectados em COS7, que é a linhagem de células null para os genes alvo e HLA-A*0201, com o uso de lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante. Após 2 dias da transfecção, as células transfectadas foram coletadas com versene (Invitrogen) e usadas como as células-alvo (5 x $10^4$ células/ poço) para teste atividade de CTL.

Resultados

Expressão de ECT2 intensificada em cânceres

O dados do perfil de expressão gênica global obtidos a partir de vários cânceres com o uso de microarranjo de cDNA revelaram que a expressão de ECT2 (nº de Acesso no Genbank AY376439; SEQ ID No: 41) estava elevada. A expressão ECT2 estava validamente elevada em 17 de 19 cânceres de bexiga, 5 de 12 cânceres de mama, 14 de 14 cânceres cervicais, 13 de 13 carcinomas colangiocelulares, 5 de 5 LMC, 7 de 8 cânceres colorretais, 12 de 16 cânceres de esôfago, 6 de 16 NSCLC, 8 de 10 linfomas, 1 de 1 cânceres pancreáticos, 10 de 13 cânceres de próstata, 3 de 6 carcinomas renais e 12 de 13 cânceres SCLC em comparação ao tecido normal correspondente (Tabela 1).

Tabela 1

Proporção de casos nos quais se observou regulação positive de ECT2 em tecido canceroso em comparação ao tecido normal correspondente.

| | |
|---|---|
| Câncer de bexiga | 17/19 |
| Câncer de mama | 5/12 |
| cervical | 14/14 |
| Carcinoma colangiocelular | 13/13 |
| LMC | 5/5 |
| Câncer colorretal | 7/8 |
| Câncer de esôfago | 12/16 |
| NSCLC | 6/16 |
| Linfoma | 8/10 |
| Câncer pancreático | 1/1 |
| Câncer de próstata | 10/13 |
| Carcinoma renal | 3/6 |
| SCLC | 12/13 |

Predição de peptídeos de ligação à HLA-A04 derivados de ECT2

As tabelas 2a e 2b mostram os peptídeos de ECT2 de 9 mer e 10 mer de ligação ao HLA-A02 em ordem de alta afinidade de ligação. Um total de 40 peptídeos com potencial capacidade de ligação ao HLA-A02 foram selecionados e examinados para determinar os peptídeos epítopos.

Tabela 2a

Peptídeos de 9mer de ligação a HLA-A02 derivados de ECT2

| SEQ ID NO | Posição de início | Sequência de aminoácidos | Classificação |
|---|---|---|---|
| 1 | 34 | LLIGSTSYV | 650,311 |
| 2 | 619 | QIFDVVYEV | 333,677 |
| 3 | 664 | FLFNDCLEI | 177,566 |
| 4 | 662 | TLFLFNDCL | 147,174 |
| 5 | 634 | LLSSHRSLV | 118,238 |
| 6 | 145 | MMNLVLCFT | 115,74 |

Tabela 2a - continuação

| SEQ ID NO | Posição de início | Sequência de aminoácidos | Classificação |
|---|---|---|---|
| 7 | 561 | LLIRPVQRL | 83,527 |
| 8 | 98 | VVTDFQDSV | 78,982 |
| 9 | 575 | LLNDLKKHT | 51,94 |
| 10 | 240 | FQDCILSFL | 50,414 |
| 11 | 292 | FEPSKKLYV | 34,216 |
| 12 | 823 | ALMTSHGSV | 33,455 |
| 13 | 220 | NEQDFYAAV | 31,606 |
| 14 | 755 | MLCRHVANT | 29,137 |
| 15 | 357 | AQLSRETDV | 26,092 |
| 16 | 438 | NILATIIQL | 24,997 |
| 17 | 874 | TLSRSTTHL | 21,362 |
| 18 | 568 | RLPSVALLL | 21,362 |
| 19 | 166 | TLVHHMGGV | 20,796 |
| 20 | 443 | IIQLFQVPL | 18,975 |

A posição de início indica o número do resíduo de aminoácido a partir da terminação N de ECT2

A classificação de ligação é gerada por "BIMAS"

Tabela 2b

Peptídeos de 10mer de ligação a HLA-A02 derivados de ECT2

| SEQ ID NO | Posição de início | Sequência de aminoácidos | Classificação |
|---|---|---|---|
| 21 | 33 | NLLIgSTSYV | 1415,383 |
| 22 | 633 | NLLSsHRSLV | 257,342 |
| 23 | 144 | SMMN1VLCFT | 251,905 |
| 24 | 701 | LMPLsQIKKV | 196,407 |
| 25 | 754 | KMLCrHVANT | 160,303 |
| 26 | 557 | SLVE1LIRPV | 131,175 |
| 27 | 191 | TQGEkFRVAV | 109,867 |

Tabela 2b - continuação

| SEQ ID NO | Posição de início | Sequência de aminoácidos | Classificação |
|---|---|---|---|
| 28 | 774 | YTADpESFEV | 105,669 |
| 29 | 428 | ELYQtESNYV | 91,809 |
| 30 | 618 | KQIFdVVYEV | 56,767 |
| 31 | 97 | FVVTdFQDSV | 52,126 |
| 32 | 20 | SIFDsKVTEI | 50,051 |
| 33 | 574 | LLLNdLKKHT | 46,873 |
| 34 | 461 | ILAPeEIKTI | 40,792 |
| 35 | 664 | FLFNdCLEIA | 39,07 |
| 36 | 575 | LLND1KKHTA | 34,627 |
| 37 | 430 | YQTEsNYVNI | 29,924 |
| 38 | 511 | DLVKtYPPFV | 28,69 |
| 39 | 471 | FGSIpDIFDV | 27,86 |
| 40 | 87 | GLDSpEFENV | 25,901 |

A posição de início indica o número do resíduo de aminoácido a partir da terminação N de ECT2.

A classificação de ligação é gerada por "BIMAS".

Indução de CTL com os peptídeos previstos a partir de ECT2 restritos com HLA- A*0201

Os CTLs para estes peptídeos derivados de ECT2 foram gerados de acordo com os protocolos descritos em "Materiais e métodos". A atividade de CTL específica para o peptídeo foi determinada por ensaio ELISPOT para IFN-gama (figura 1a-c). O poço número nº 6 estimulado com ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) (a), o poço nº 5 estimulado com ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3) (b) e o poço nº 1 estimulado com ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) (c) demonstrou potente produção de IFN-gama em comparação aos poços de controle. Como um resultado, isto indicou que ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) (a), ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3) (b) e ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) (c) derivados de ECT2 foram selecionados co-

mo os peptídeos que podiam induzir potentes CTLs.

Estabelecimento de linhagens e clones de CTL contra peptídeos derivados de ECT2

As células que mostraram atividade específica de CTL do peptídeo, detectadas por ensaio ELISPOT para IFN-gama no poço nº 6 estimuladas com ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) (a), nº 5 estimuladas com ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3) (b) e nº 1 estimuladas com ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) (c) foram expandidas e as linhagens de CTL foram estabelecidas pelo processo de diluição limitante descrito acima na seção de "Materiais e métodos". A atividade de CTL destas linhagens de CTL foi determinada por ensaio ELISA para IFN-gama (figuras 2a -c). As linhagens de CTL demonstraram potente produção de IFN-gama contra as células-alvo pulsadas com o peptídeo correspondente em comparação às células-alvo sem pulso com peptídeo. Além disso, o clone de CTL foi estabelecido por diluição limitante a partir de linhagens de CTL conforme descrito em "Materiais e métodos", e a produção de IFN-gama a partir dos clones de CTL contra as células-alvo pulsadas com peptídeo foi determinada por ensaio ELISA para IFN-gama. Produções de IFN-gama potentes foram determinadas a partir de clones de CTL estimulados com ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) (a) e ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3) (b) na figura 3.

Atividade específica de CTL contra células-alvo que expressam exogenamente ECT2 e HLA-A*0201

As linhagens e clones de CTL estabelecidos criados contra estes peptídeos foram examinados quanto a sua capacidade de reconhecer células-alvo que expressam de forma endógena ECT2 e a molécula de HLA-A*0201. A atividade específica de CTL contra células COS7 que foram transfectadas com a extensão completa do gene ECT2 e da molécula HLA-A*0201 (um modelo específico para as células-alvo que expressam exogenamente os genes de ECT2 e HLA-A*0201) foi testada com o uso das linhagens e clones de CTL criados pelo peptídeo correspondente como as células efetoras. Células COS7 transfectadas com a extensão completa do gene ECT2 ou HLA-A* 0201 foram preparadas como controles. Na figura 4,

o clone CTL estimulado com ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) (a) e a linhagem de CTL estimulada com ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) (b) mostraram potente atividade de CTL contra células COS7 que expressam ECT2 e HLA- A* 0201. Por outro lado, nenhuma atividade específica de CTL significativa foi detectada contra os controles. Desta forma, estes dados demonstraram claramente que ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) (a), ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) (b) foram expressos naturalmente sobre as células-alvo com a molécula HLA-A*0201 e foram reconhecidos pelos CTLs. Estes resultados indicam que ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1) (a) e ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) (b) derivado de ECT2 pode ser adequado como uma vacina para o câncer para o tratamento de pacientes com tumores que expressam ECT2.

Análise de homologia dos peptídeos antigênicos

Os CTLs estimulados com ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1), ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3) e ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) mostraram atividade de CTL específica e significativa. Este resultado pode ser devido ao fato de as sequências de ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1), ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3) e ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) serem homólogas ao peptídeo derivado de outras moléculas que sabidamente sensibilizam o sistema imune humano. Para excluir esta possibilidade, análises de homologia foram feitas para estas sequências de peptídeo usando como pesquisa o algoritmo BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) que não revelou nenhuma sequência com homologia significativa. Os resultados das análises de homologia indicam que as sequências de ECT2-A02-9-34 (SEQ ID NO: 1), ECT2-A02-9-664 (SEQ ID NO: 3) e ECT2-A02-10-33 (SEQ ID NO: 21) são únicas e, portanto, há pouca possibilidade, de acordo com nosso conhecimento, de que estas moléculas gerem resposta imunológica indesejada a moléculas não relacionadas.

Em suma, novos peptídeos epítopos de HLA-A2 derivados de ECT2 foram identificados. Além disso, os resultados demonstram que peptídeos epítopos de ECT2 podem ser adequados para uso na imunoterapia do câncer.

Aplicação Industrial

A presente invenção fornece novos TAAs, particularmente aqueles derivados de ECT2 que podem induzir respostas imunes antitumorais potentes e específicas e possuem aplicabilidade para uma ampla variedade de tipos de câncer. Tais TAAs podem ser úteis como vacinas peptídicas contra doenças associadas a ECT2, por exemplo, câncer, mais particularmente, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, carcinoma colangiocelular, LMC, câncer colorretal, câncer de esôfago, NSCLC, linfoma, câncer pancreático, câncer de próstata, carcinoma renal e SCLC.

Embora a presente invenção seja descrita aqui em detalhes e com referência as suas modalidades específicas, deve ser compreendido que a descrição anteriormente mencionada é exemplificadora e tem natureza explicativa e se destina a ilustrar a presente invenção e suas modalidades preferenciais. Através de experimentação de rotina, um versado na técnica compreenderá facilmente que várias alterações e modificações podem ser feitas, sem que se desvie do espírito e escopo da presente invenção, cujos limites precisos são definidos pelas reivindicações em anexo.

## REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo isolado, caracterizado pelo fato de que é selecionado do grupo consistindo em:

um peptídeo isolado, que consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 1, 3 e 21, em que 1 ou 2 aminoácidos é(são) substituído(s), com a condição de que o dito peptídeo retenha a capacidade de induzir linfócitos T citotóxicos (CTL) do peptídeo original, em que a(s) substituição(ões) é(são) selecionada(s) do grupo consistindo de:

(a) o segundo aminoácido do N-terminal da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 3 ou 21 é substituído por um aminoácido de metionina; e

(b) o aminoácido C-terminal da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 3 ou 21 é substituído por leucina.

2. Composição para induzir um CTL, caracterizada pelo fato de que compreende um veículo farmaceuticamente aceitável em combinação com um adjuvante e um ingrediente selecionado a partir de um ou mais peptídeo(s), como definido(s) na reivindicação 1, ou um ou mais peptídeo(s) consistindo de uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 1, 3 e 21.

3. Composição farmacêutica para o tratamento e/ou profilaxia e/ou a prevenção de recorrência pós-operatória de câncer, caracterizada pelo fato de que compreende um veículo farmaceuticamente aceitável em combinação com um adjuvante e um ingrediente selecionado a partir de um ou mais peptídeo(s), como definido(s) na reivindicação 1, ou um ou mais peptídeo(s) consistindo de uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 1, 3 e 21.

4. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que é formulada para a administração em um indivíduo cujo antígeno HLA é HLA-A2.

5. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizada pelo fato de que é formulada para o tratamento de câncer.

6. Método *in vitro* para induzir uma célula apresentadora de antígeno (APC) com capacidade de induzir CTL, caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa de:

colocar uma APC em contato com o peptídeo, como definido na reivindicação 1, ou o(s) peptídeo(s) consistindo de uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 1, 3 e 21.

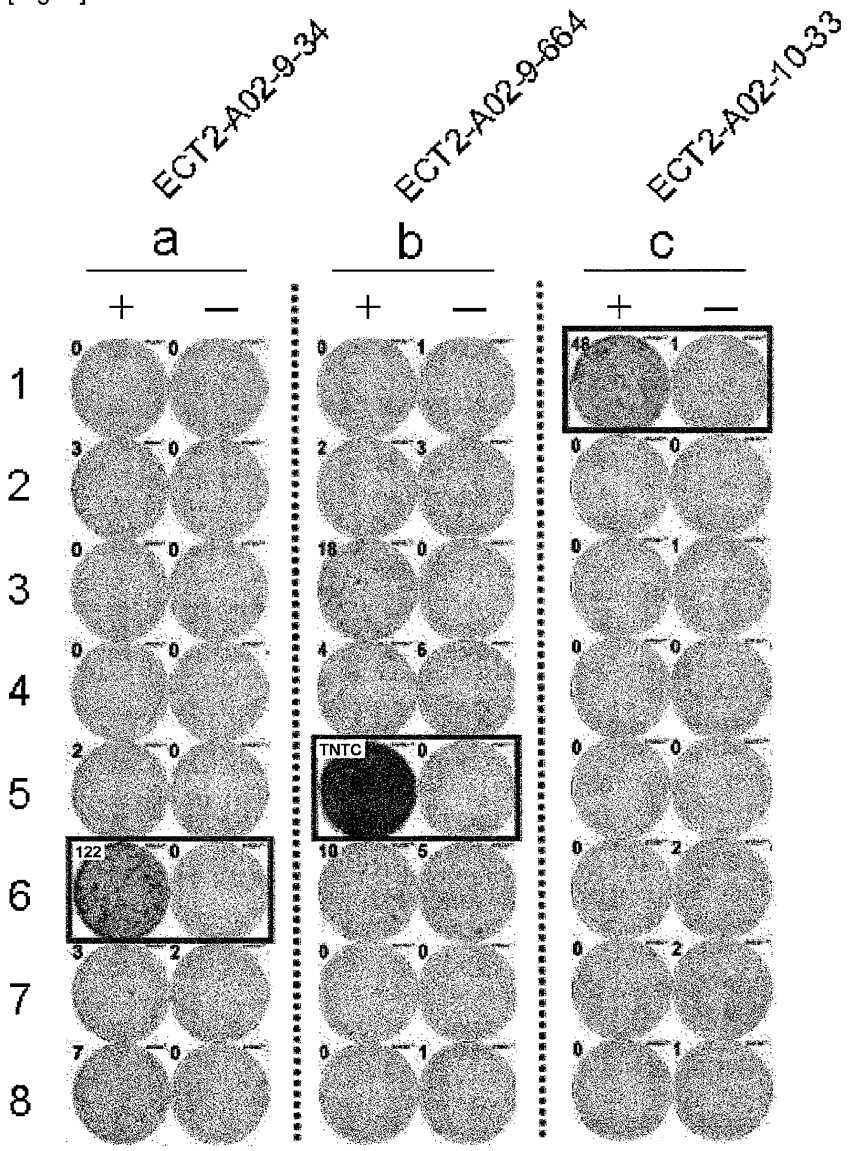
7. Método *in vitro* para induzir um CTL, caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa selecionada do grupo consistindo em:

(a) cocultivar células T CD8 positivas com APCs que apresentam, em sua superfície, um complexo de um antígeno HLA e o peptídeo, como definido na reivindicação 1, ou o(s) peptídeo(s) consistindo de uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 1, 3 e 21; e

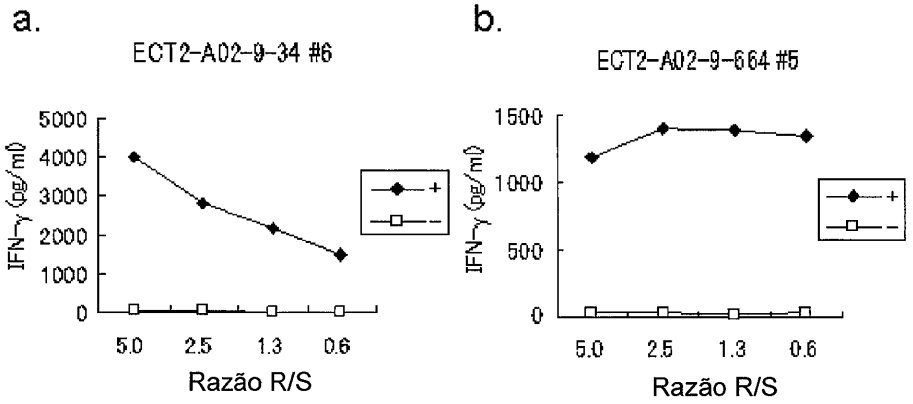
(b) cocultivar células T CD8 positivas com exossomas que apresentam, em sua superfície, um complexo de um antígeno HLA e o peptídeo, como definido na reivindicação 1, ou o(s) peptídeo(s) consistindo de uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 1, 3 e 21.

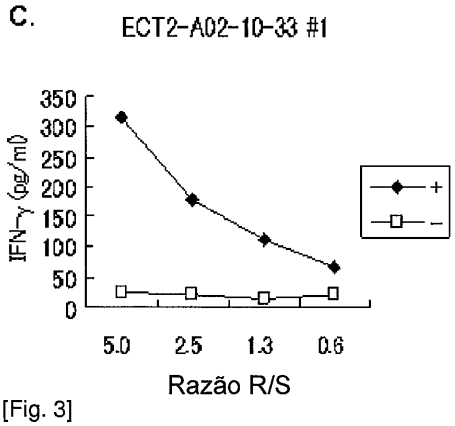
8. Uso do peptídeo, como definido na reivindicação 1, ou do peptídeo consistindo de uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 1, 3 e 21, caracterizado pelo fato de que é na preparação de uma composição para induzir uma resposta imune contra câncer em um indivíduo em necessidade do mesmo, em que a composição compreende um veículo farmaceuticamente aceitável em combinação com um adjuvante, e os referidos peptídeos como um ingrediente.

[Fig. 1]

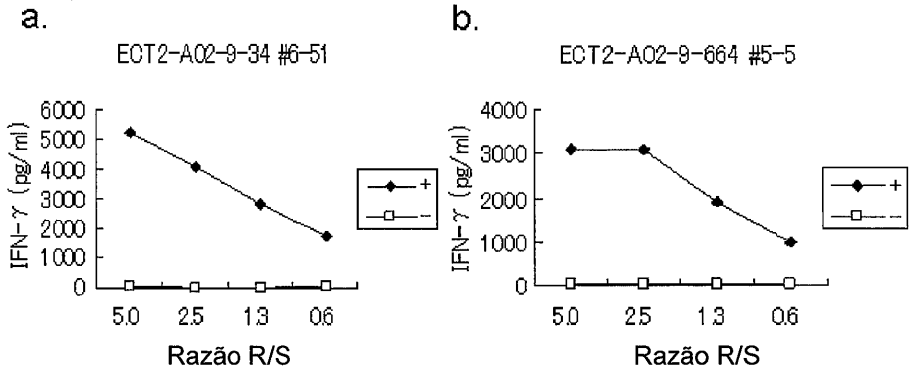

ECT2-A02-9-34
ECT2-A02-9-664
ECT2-A02-10-33
a
b
c
+
—
1
2
3
4
5
6
7
8
122
TNTC

[Fig. 2]


a.
ECT2-A02-9-34 #6
IFN-γ (pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
5.0
2.5
1.3
0.6
Razão R/S
+
−
b.
ECT2-A02-9-664 #5
IFN-γ (pg/ml)
1500
1000
500
0
5.0
2.5
1.3
0.6
Razão R/S
+
−

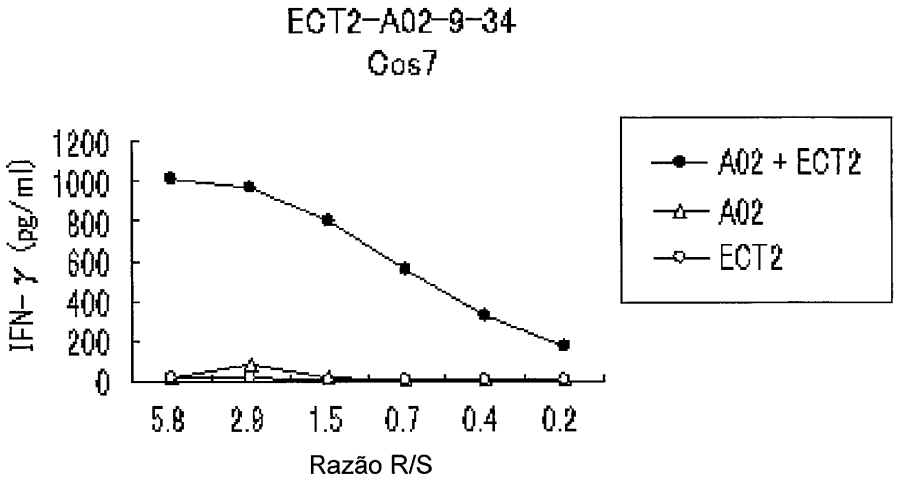

c.
ECT2-A02-10-33 #1
IFN-γ (pg/ml)
350
300
250
200
150
100
50
0
5.0
2.5
1.3
0.6
Razão R/S
+
−

[Fig. 3]

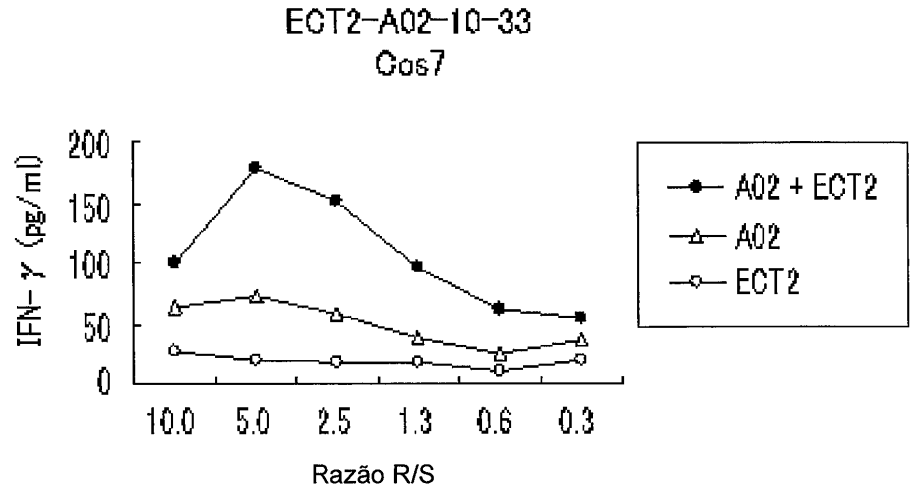

a.
ECT2-A02-9-34 #6-51
IFN-γ (pg/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
5.0
2.5
1.3
0.6
Razão R/S
+
−
b.
ECT2-A02-9-664 #5-5
IFN-γ (pg/ml)
4000
3000
2000
1000
0
5.0
2.5
1.3
0.6
Razão R/S
+
−

[Fig. 4]

a.


ECT2-A02-9-34
Cos7
IFN-γ (pg/ml)
1200
1000
800
600
400
200
0
5.8
2.9
1.5
0.7
0.4
0.2
Razão R/S
A02 + ECT2
A02
ECT2

b.


ECT2-A02-10-33
Cos7
IFN-γ (pg/ml)
200
150
100
50
0
10.0
5.0
2.5
1.3
0.6
0.3
Razão R/S
A02 + ECT2
A02
ECT2