

(11) Número de Publicação: **PT 1734049 E**

(51) Classificação Internacional:

**C07K 7/06** (2007.10) **C07K 16/00** (2007.10)  
**C12N 15/00** (2007.10) **A61K 38/00** (2007.10)

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

---

(22) Data de pedido: **2003.03.27**

(30) Prioridade(s): **2002.05.29 DE 10225144**

(43) Data de publicação do pedido: **2006.12.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.12.03**  
**251/2008**

(73) Titular(es):

**IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH**  
**PAUL-EHRLICH-STR. 15 72076 TÜBINGEN DE**

(72) Inventor(es):

**TONI WEINSCHENK DE**  
**HANS-GEORG RAMMENSEE DE**  
**STEFAN STEVANOVIC DE**

(74) Mandatário:

**ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS PT**  
**RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA**

(54) Epígrafe: **PEPTÍDEOS ASSOCIADOS A TUMORES DE LIGAÇÃO À MOLÉCULA MHC**

(57) Resumo:

**RESUMO****"PEPTÍDEOS ASSOCIADOS A TUMORES DE LIGAÇÃO À MOÉCULA MHC"**

A invenção refere um péptido associado a tumores com uma sequência de aminoácidos escolhida entre o conjunto das sequências SEQ ID N° 1 a SEQ ID N° 79 do protocolo de sequências anexo, em que o péptido possui a capacidade de se ligar a uma molécula do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I humano. Além disso, a invenção refere a utilização dos péptidos para produção de medicamentos e para tratamento de doenças tumorais. Além disso, é descrita uma formulação farmacêutica que contém, pelo menos, um dos péptidos.

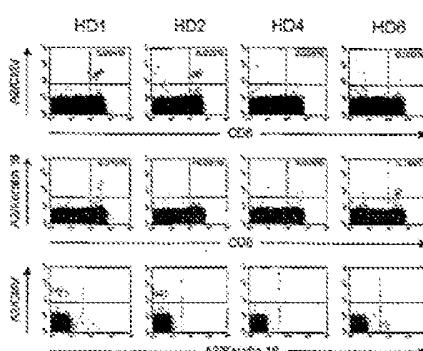


Figura 1

**DESCRIÇÃO**

**"PEPTÍDEOS ASSOCIADOS A TUMORES DE LIGAÇÃO À MOLECULA MHC"**

A presente invenção trata de peptídeos associados a tumores, que possuem a capacidade de se unir com uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade humano (MHC) da classe I.

Esses tipos de peptídeos são utilizados, p. ex., na imunoterapia de doenças tumorais.

A detecção de抗énios associados ao tumor (TAA) através de componentes do sistema imunitário tem um papel muito importante na eliminação de células tumorais por parte do sistema imunitário. Neste mecanismo encontra-se a condição necessária, para que haja diferenças qualitativas e quantitativas entre as células tumorais e as células normais. Para criar uma resposta antitumoral, as células tumorais devem primeiramente expressar抗énios, contra os quais é aplicada uma resposta imunológica que seja suficiente para eliminação do tumor em questão.

Na repulsão de tumores, há principalmente a participação de linfócitos T citotóxicos (denominados a seguir CTL) que expressam CD8. Para a activação de uma reacção imunológica deste tipo causada por células T

citotóxicas, é necessário apresentar proteínas/peptídeos estranhos a essas células. As células T só reconhecem os抗igénios como fragmentos de peptídeos, quando estes são apresentados nas superfícies de células das moléculas MHC. Essas moléculas MHC ("major histocompatibility complex") são receptores de peptídeos, que normalmente unem peptídeos dentro da célula para, em seguida, poder transportá-los até as superfícies de células. Esse complexo de peptídeos e molécula MHC pode ser reconhecido pelas células T. As moléculas MHC dos seres humanos também são denominadas抗igénios de leucócitos humanos (HLA).

Há duas classes de moléculas MHC: Moléculas MHC de classe I, que estão presentes na maioria das células com núcleo, apresentam peptídeos, que são gerados através da decomposição de proteínas endógenas. Moléculas MHC de classe II só estão presentes em células que apresentam抗igénios (APC) profissionais e apresentam peptídeos de proteínas exógenas, que no decorrer da endocitose são absolvidas e processadas por APC. Complexos de peptídeos e MHC da classe I são detectados por linfócitos T citotóxicos de CD8 positivos, complexos de peptídeos e MHC da classe II são detectados por células T auxiliares CD4.

Para que um peptídeo possa gerar uma resposta imunológica celular, ele deverá estar unido a uma molécula MHC. Este processo depende do alelo da molécula MHC e da sequência de aminoácidos do peptídeo. Geralmente, os peptídeos de ligação MHC da classe I têm um comprimento de

8-10 resíduos e, na sua sequência, possuem dois resíduos conservados ("âncoras"), que interagem com o sulco de ligação correspondente da molécula MHC.

Para que o sistema imunitário possa iniciar uma resposta CTL efectiva contra peptídeos derivados de tumores, esses peptídeos deverão estar aptos não apenas a unir-se com determinadas moléculas MHC de classe I, que são expressas de células tumorais, mas sim também deverão ser detectados por células T com receptores específicos de células T (TCR, "T-cell receptor").

O objectivo principal para o desenvolvimento de uma vacina para tumor é a identificação e a caracterização de抗igénios associados a tumores, que são detectados por CD8<sup>+</sup> CTL.

Os抗igénios, que são detectados por linfócitos T citotóxicos específicos de tumores e/ou pelos seus epitopos, podem ser moléculas provenientes de todas as classes de proteína, como p. ex., de enzimas, receptores, factores de transcrição, etc. Uma outra classe importante de抗igénios associados a tumores são as estruturas específicas de tecido, com p. ex.抗igénios CT ("cancer testis"), que são expressos em diferentes tipos de tumores e em tecidos testiculares saudáveis.

Para que as proteínas sejam reconhecidas pelos linfócitos T citotóxicos como抗igénios específicos de

tumores e, para que desta forma eles possam ser utilizados em uma terapia, certos pré-requisitos deverão ser cumpridos: Os抗igénios deverão ser expressos principalmente por células tumorais e não por tecidos normais ou apenas em baixas quantidades por estes. Além disso, recomenda-se que o抗igénio esteja presente não apenas em um tipo de tumor mas sim também em outros tipos e em concentrações mais elevadas. A presença de epitopos na sequência de aminoácidos do抗igénio também é extremamente essencial, pois estes peptídeos derivados de um抗igénio associado a tumores ("peptídeos imunogénicos") devem levar a uma resposta de célula T, seja ela *in vitro* ou *in vivo*.

Com isso, os TAAs são o ponto de partida para o desenvolvimento de uma vacina para tumor. Os métodos para identificação e caracterização de TAA baseiam-se, por um lado, na utilização de CTL já induzidos nos pacientes ou, por outro lado, na criação de perfis de transcrição diferenciais entre tumores e tecidos normais.

Porém, o reconhecimento de genes, que são sobre-expressos em tecidos tumorais ou expressos selectivamente nestes tipos de tecido, não fornecem nenhuma informação precisa para uma utilização dos抗igénios transcritos por estes genes na imunoterapia. Isso acontece devido ao facto, de que apenas epitopos unitários destes抗igénios são apropriados para uma utilização deste tipo, pois somente os epitopos dos抗igénios - e não o抗igénio por inteiro - podem levar a uma resposta de célula T através de um

apresentação MHC. Por esta razão, é importante seleccionar somente aqueles peptídeos provenientes de proteínas sobre-expressas ou expressas de modo selectivo, que são apresentadas com moléculas MHC, sendo que pontos de aplicação para a detecção de um tumor específico podem ser obtidos através de linfócitos T citotóxicos.

Por esta razão, a tarefa desta invenção é disponibilizar no mínimo uma nova sequência de aminoácidos para este tipo de peptídeo, que possui a capacidade de se unir com uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade humano (MHC) da classe I.

De acordo com a invenção, esta tarefa é resolvida através de uma disponibilização de um peptídeo associado a tumor com uma sequência de aminoácidos, que foi selecionada do grupo composto pela SEQ ID-Nr. 1 a SEQ ID-Nr. 79 conforme o protocolo de sequência anexado, sendo que este peptídeo possui a capacidade de se unir com uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade humano (MHC) da classe I.

Desta maneira, a tarefa baseada na presente invenção é resolvida por completo.

Deste modo, os peptídeos identificados pelo tumor para obtenção de grandes quantidades e para a utilização em uma das finalidades listadas abaixo foram sintetizados ou depositados em células para a expressão.

Os inventores puderam isolar e identificar os peptídeos citados acima como ligandos específicos de moléculas MHC da classe I de tecidos tumorais. Neste contexto, o termo "associados a tumores" caracteriza os peptídeos, que foram isolados e identificados do material tumoral. Ou seja, estes peptídeos, que são apresentados em tumores reais (primários) estão sujeitos ao processamento antigénio em uma célula tumoral.

Os ligandos específicos podem ser aplicados em uma terapia de cancro, por exemplo, para induzir uma resposta imunológica contra células tumorais, que expressam os抗igénios correspondentes, dos quais os peptídeos se originaram.

Este tipo de resposta imunológica em forma de uma indução CTL pode ser alcançada *in vivo*. Para tal, o peptídeo é aplicado em forma de, por exemplo, uma composição farmacêutica a um paciente, que sofre de uma doença tumoral associada com o TAA.

Por outro lado, uma resposta CTL a um determinado tumor, que expressa os抗igénios, dos quais os peptídeos foram originados, também pode ser gerada de maneira *ex vivo*. Para isso, as células CTL precursoras são incubadas juntamente com as células que apresentam抗igénios e com os peptídeos. Em seguida, as CTLs simuladas deste modo são cultivadas e estas CTLs activadas são então aplicadas ao paciente.

Mesmo assim, ainda há a possibilidade, de carregar a APC *ex vivo* com os peptídeos e, em seguida, aplicar essa APC carregada ao paciente, que possui o tecido tumoral que expressa o抗igénio, do qual o peptídeo foi originado. Em seguida, as APCs poderão apresentar e activar o peptídeo *in vivo* ao CTL.

Os peptídeos de acordo com a invenção também podem ser utilizados como reagentes diagnósticos.

Com esses peptídeos também é possível descobrir, se há CTL direcionados especificamente contra um peptídeo dentro de uma população CTL ou se houveram induções através de uma terapia.

Além disso, com os peptídeos também é possível testar o aumento de células T precursoras, que mostraram uma reactividade contra o peptídeo definido.

Além disso, é possível utilizar o peptídeo como marcador para acompanhar o ciclo patogénico de um tumor, que expressa o抗igénio, do qual o peptídeo se originou.

Na tabela 1 anexada são apresentados os peptídeos identificados. Eles são atribuídos de acordo com os respectivos tipos de HLA, com os quais eles se unem. Além disso, na tabela ainda são apresentadas as proteínas, das quais o peptídeo se originou e a respectiva posição do

peptídeo na proteína em questão. As denominações inglesas das proteínas foram mantidas para, desta forma, poder evitar traduções equivocadas. Adicionalmente foram indicados os números Acc, que são registados no banco de genes do "National Center for Biotechnology Information" do National Institute of Health (veja <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Os inventores puderam isolar os peptídeos (ou ligandos) provenientes de tumores em células renais de dois pacientes, RCC01 e RCC13. Assim foram isolados 68 ligandos de tecidos tumorais do paciente RCC01 e 13 de tecidos tumorais do paciente RCC13. Dois dos ligandos identificados em ambos os pacientes eram idênticos. Eles eram os peptídeos com a SEQ ID-Nr. 1 e 3 (YVDPVITSI de proto-oncogénicos met (c-Met) e ALLNIKVKL de queratina 18).

Dos tumores dos pacientes, 79 ligandos puderam ser identificados, dos quais 30 estavam ligados aos HLA subtipos HLA-A\*02, 13 aos HLA-A\*68, 34 aos HLA-B\*18 ou HLA-B\*44 e 2 ao HLA\*24.

Ligandos HLA-A\*02 apresentaram motivos de peptídeo específicos de alelo: (leucina/valina, isoleucina, alanina, metionina na posição 2, leucina/valina, isoleucina ou alanina no terminal C)

Alguns dos ligandos são provenientes dos chamados genes "Housekeeping" de alta expressão, que são expressos uniformemente na maioria dos tecidos, mas muitos deles são caracterizados pela sua associação a tumores.

O peptídeo e com a sequência ID-Nr. 1 YVDPVITSI na verdade é, p. ex., um ligando, que é relacionado especialmente a tumores e proveniente de proto-oncogénicos met (c-Met) (posição 654-662). Os peptídeos com a sequência ID-Nr. 2, 22 e 23 são provenientes da adipofilina (também denominada como proteína "Adipose differentiation related") e apresentam as posições 129-137, 62-71 e 349-358 nesta proteína, sendo que os últimos dois contam como peptídeos apresentados através de HLA-A\*68. O ligando com a sequência ID-Nr. 3 é um ligando, que foi originado da queratina 18 e de lá ele se encontrava localizado na posição 365-373.

A maioria dos ligandos apresentou na posição 2 o aminoácido de glutamina (E), um aminoácido âncora do subtipo HLA-B\*44. Desta forma foi possível identificar os peptídeos provenientes de proteínas que já foram comprovados como imunogénicos em experiências passadas, como p. ex., o peptídeo com a sequência ID-Nr. 5, originado da proteína anexina II (posição em anexina II: 55-63). Com relação às moléculas MHC de classe II, essa proteína provou ser imunogénica em pacientes com melanoma (veja Heinz et al., The self peptide annexin II (208 - 223) presented by dendritic cells sensitizes autologous CD4+ T lymphocytes to recognize melanoma cells, 2001, Cancer Immunol. Immunother. 49:671-678).

Além disso, foi possível identificar alguns peptídeos provenientes de proteínas, que foram sobre-

expressas especialmente em tecidos tumorais. Desta maneira também foi possível identificar fragmentos de vimentina (EEIAFLKKL, posição 229-237) e caldesmon (DEAAFLERL, posição 92-100). Young et al., Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers, 2001, Am. J. Pathol., 158:1639-1651) comprovaram, que estas proteínas estavam sobre-expressas no tecido de tumores em células renais.

Além disso, os inventores também puderam identificar, entre outros, ligandos provenientes de ets-1 (NEFSLKGVD, posição 86-95), alfa-catenina (NEQDLGIQY, posição 169-177) e galectina 2 (SEVKFTVT, posição 80-88).

Adicionalmente, os inventores isolaram o fragmento YYMIGEQKF (sequência ID-Nr. 79), proveniente da enzima nicotinamida-N-metiltransferase (posição 203-211). Takahashi et al., Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:9754-9749, demonstraram, que esta enzima estava sobre-expressa no tecido do tumor em células renais.

Para um dos peptídeos identificados, os inventores puderam comprovar de modo surpreendente a presença de linfócitos T citotóxicos específicos no sangue do dador. Desta forma, há o potencial de activação de uma resposta CTL específica contra tumores.

Fora isso, os inventores puderam comprovar nas suas próprias experiências, que somente através da utilização de dois peptídeos seleccionados exemplarmente, foi possível gerar linfócitos T citotóxicos (CTL) *in vitro*, que eram específicos para o peptídeo com a SEQ ID-Nr. 1 (fragmento proto-oncogénicos c-Met ou peptídeo c-Met) ou específicos para o peptídeo com a SEQ ID-Nr. 2 (fragmento adipofilina ou peptídeo adipofilina). Com esse CTL foi possível destruir de modo direcccionado as células tumorais, que expressaram as proteínas correspondentes e, adicionalmente, que eram provenientes de diferentes linhas de células tumorais de diferentes pacientes. Os inventores também puderam mostrar, p. ex., que os CTL mencionados acima lisaram células dendríticas, que anteriormente foram "pulsadas" (carregadas) com os respectivos peptídeos. Através destas experiências, os inventores puderam mostrar que foi possível activar células T humanas *in vitro* com os peptídeos de acordo com a invenção agindo como epitopos. Os inventores ainda puderam demonstrar, que as mesmas CLTs, que foram obtidas de células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMNC) de um paciente e que eram específicas de determinados peptídeos, conseguiram destruir células do mesmo tipo de tumor de um outro paciente. Os inventores também mostraram que, com esses CLTs, também foi possível lisar células de outros tipos de tumores.

Em uma outra forma de execução preferida, os peptídeos - que possuam a sequência ID-Nr. 1 a 79 e nos

quais no mínimo um aminoácido tenha sido substituído por um outro aminoácido com características similares também podem ser utilizados para a estimulação de uma resposta imunológica.

Em relação ao respectivo subtipo MHC esses são, por exemplo, os aminoácidos âncoras que possam ser substituídos por aminoácidos com características químicas similares. Desta forma, em peptídeos associados ao MHC subtipo HLA-A\*02 na posição 2 é possível trocar leucina com isoleucina, valina ou metionina e vice-versa e, no terminal C, é possível trocar leucina com valina, isoleucina e alanina, todas elas apresentando cadeias laterais não polares.

Além disso, ainda foi possível utilizar peptídeos com a sequência ID-Nr. 1 a 79, que contenham um terminal N e/ou C com no mínimo mais um aminoácido ou que possua no mínimo um aminoácido que tenha sido detectado.

Mesmo assim ainda é possível utilizar peptídeos com a sequência ID-Nr. 1 a 79, nos quais no mínimo um aminoácido tenha sido modificado quimicamente.

O(s) aminoácido(s) é(são) escolhido(s) de tal forma, que a imunogenicidade do peptídeo não é prejudicada através da variação, ou seja, ela apresenta uma afinidade de ligação similar à molécula MHC e a capacidade de estimulação da célula T.

De acordo com a invenção, o peptídeo pode ser utilizado para o tratamento de doenças tumorais e/ou doenças adenomatosas.

As doenças tumorais a serem tratadas incluem, por exemplo, o cancro renal, o cancro mamário, o cancro de pâncreas, cancro do estômago, o cancro de testículo e/ou o cancro cutâneo. Porém, essa citação das doenças tumorais é apenas um exemplo e não deve limitar a área de actuação da invenção.

Através de experiências próprias, os inventores puderam provar que, de acordo com a invenção, os peptídeos podem ser utilizados para essa tal finalidade. Nestas experiências, foi comprovado que as CTL, geradas por conta própria especificamente para peptídeos, puderam destruir células tumorais de modo efectivo e selectivo.

Para a utilização de antigénios associados a tumores dentro de uma vacina contra tumores, fundamentalmente é possível implementar várias formas de aplicação. Conforme o descrito em Tighe et al., 1998, Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint, Immunol. Today 19(2):89-97, pois o antigénio pode ser aplicado como proteína recombinante com os aditivos ou sistemas de suporte adequados ou como cDNA de codificação para o antigénio em vectores de plasmida. Nestes casos, o antigénio presente no corpo do paciente de células que apresentam antigénios

(APC) deve ser processado e apresentado, para que uma resposta imunológica possa ser accionada.

Melief et al., 1996, Peptide-based cancer vaccines, Curr. Opin. Immunol. 8:651-657, apresentam uma possibilidade adicional: A utilização de peptídeos sintéticos como vacina.

O peptídeo poderá então ser utilizado em uma forma de execução juntamente com aditivos, ou ele poderá ser deslocado para a posição singular.

Como aditivo é possível utilizar, p. ex., o Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor (GM-CSF).

Outros exemplos para tais aditivos são hidróxido de alumínio, emulsões de óleos minerais, como p. ex., o aditivo freudiano, a saponina ou as ligações de silício.

A utilização de aditivos oferece a vantagem, de que a resposta imunológica gerada pelo peptídeo pode ser fortalecida e/ou o peptídeo pode ser estabilizado.

Em uma outra forma de execução preferida, o peptídeo é utilizado de modo unido com uma célula que apresenta抗igénios.

Essa medida tem a vantagem, de que os peptídeos podem ser apresentados ao sistema imunitário, especialmente

aos linfócitos T citotóxicos (CTL). Desta maneira, os CTL podem reconhecer as células tumorais e, em seguida, destruí-las de modo específico. Para uma tal finalidade, é adequada a utilização de, p. ex., células dendríticas, monócitos ou linfócitos B para actuarem como células que apresentam抗原s.

Sendo que as células são carregadas, p. ex., *ex vivo* com os peptídeos. Por outro lado também há a possibilidade de transferir as células com os DNAs de codificação para os peptídeos ou com os RNAs, para então poder trazer os peptídeos sobre as células para a realização da expressão.

Os inventores puderam comprovar nas suas experiências próprias, que foi possível carregar células dendríticas (DC) com peptídeos específicos e que essas células dendríticas carregadas activaram CLT específicos para o peptídeo. Isso significa, que o sistema imunitário pode ser estimulado a desenvolver CLT contra os tumores, que expressam os peptídeos correspondentes.

As células que carregam o peptídeo que apresenta抗原s podem ser utilizadas ou directamente ou activadas antes de uma actuação com, p. ex., com a proteína de choque térmico gp96. Essa proteína de choque térmico induz a expressão de moléculas MHC de classe I e de moléculas de coestimulação como a B7 e, fora isso, ela estimula a produção de citocinas. Através disso, a

activação de respostas imunológicas é accionada como um todo.

Em uma outra forma de execução preferida, os peptídeos são utilizados para a marcação de leucócitos, especialmente de linfócitos T.

Essa utilização é de vantagem, quando for necessário descobrir com a ajuda dos peptídeos, se em uma população CTL há ou não CLTs direcionados especificamente contra um determinado peptídeo.

O peptídeo também poderá ser utilizado como marcador para a avaliação de um ciclo de terapia em uma doença tumoral.

Mesmo em outras imunizações ou terapias também é possível utilizar o peptídeo para a monitorização da terapia. Com isso, o peptídeo é utilizável não apenas na área terapêutica, mas também na diagnóstica.

Em uma outra forma de execução, os peptídeos são utilizados para a fabricação de um anticorpo.

Os anticorpos policlonais podem ser obtidos de forma convencional por imunização de animais através da injecção do peptídeo e, subsequentemente, purificação da globulina imunológica.

Os anticorpos monoclonais podem ser produzidos de acordo com os protocolos padrão, conforme descrito, por exemplo, em Methods Enzymol. (1986), 121, Hybridoma technology and monoclonal antibodies.

Em mais um aspecto, a presente invenção também trata de uma composição farmacêutica, que contém um ou vários dos peptídeos.

Essa composição é usada, p. ex., na administração parenteral, tal como na administração subcutânea, intradér-mica, intramuscular ou oral. Para tanto, os peptídeos se encontram dissolvidos ou suspensos em um portador farmaceuticamente admissível, preferencialmente aquoso. Além disso, a composição pode conter excipientes, tais como tampões, agentes de ligação, agentes diluentes, etc.

Os peptídeos também podem ser administrados juntamente com substâncias estimulantes imunológicas, tais como as citocinas. Pode encontrar uma extensa lista de excipientes, que podem ser utilizados nesta composição, em, por exemplo, A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3. Ed., 2000, American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press.

O preparado também pode ser utilizado para prevenção, profilaxia e/ou terapia de doenças tumorais e/ou doenças adenomatosas.

O preparado farmacêutico, que contém no mínimo um dos peptídeos com a sequência ID-Nr. 1 a 79, é aplicado em um paciente que sofre de uma doença tumoral, com a qual o peptídeo ou o抗igénio em questão está associado. Desta forma, uma resposta imunológica específica do tumor poderá ser gerada na base de CTL específicos de tumores.

A quantidade do peptídeo ou dos peptídeos, contida na composição farmacêutica apresentada, limita-se a uma quantidade que atinja um efeito terapêutico efectivo. Os peptídeos contidos na composição também poderão ser ligados a, no mínimo, dois tipos diferentes de HLA.

Em mais um aspecto, a presente invenção trata de moléculas de ácido nucleico, que codificam para os peptídeos com a sequência ID-Nr. 1 a 79.

Neste contexto, as moléculas de ácido nucleico podem ser moléculas DNA ou RNA e, se necessário, elas também podem ser utilizadas na imunoterapia de doenças cancerígenas. O peptídeo expresso pela molécula de ácido nucleico induz uma resposta imunológica contra células tumorais, que expressam o peptídeo.

De acordo com a invenção, as moléculas de ácido nucleico também podem existir em um vector.

Além disso, a presente invenção também trata de células, que com a ajuda de moléculas de ácido nucleico -

que codificam os peptídeos - foram alteradas geneticamente de tal forma, que elas produzem um peptídeo com a sequência ID-Nr. 1 a 79.

Para tal, as células são transfectadas com os DNAs de codificação para os peptídeos ou com os RNAs correspondentes, sendo que através disso os peptídeos são levados sobre as células para a realização da expressão. Para uma tal finalidade, é adequada a utilização de, p. ex., células dendríticas, monócitos ou linfócitos B para actuarem como células que apresentam抗énios.

Entende-se por fim que as características explicadas acima, assim como as características que serão explicadas mais abaixo, são empregáveis não apenas na respectiva combinação indicada, mas também de modo individual, sem abandonar os limites da invenção aqui tratada.

Exemplos de execução da invenção são apresentadas e explicadas nos exemplos a seguir assim como nas figuras anexas. Eles apresentam:

Fig. 1 A detecção de linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos da queratina 18.

Fig. 2a-d A indução de c-Met (SEQ ID-Nr. 1), fig. 2a+b ou adipofilina (SEQ ID-Nr. 2), fig. 2c+d, respostas CLT específicas para o peptídeo *in vitro*;

Fig. 3a-f A lise específica de抗原s de c-Met ou linhas de células tumorais que expressam adipofilina através de CTL, induzidos por c-Met (SEQ ID-Nr. 1), fig. 3a-d, ou adipofilina (SEQ ID Nr. 2), fig. 3e-f, CTL induzidos por peptídeos;

Fig. 4a-c Ensaio de inibição de lise com células tumorais marcadas com  $^{51}\text{Cr}$  e não marcadas, células T pulsadas por peptídeos através de c-Met (SEQ ID-Nr. 1), fig. 4a+b, ou adipofilina (SEQ ID-Nr. 2), fig. 4c, CTL induzidos por peptídeos;

Fig. 5a+b A lise de autólogos, com DCs transfectadas com RNA tumorais através de c-Met (SEQ ID-Nr. 1), fig. 5a, ou adipofilina (SEQ ID-Nr. 2), fig. 5b, CTL induzido por peptídeos;

Fig. 6 Autólogos CTL induzidos *in vitro* específicos de adipofilina detectam células tumorais de um paciente com leucemia linfática crônica, mas não autólogos dendríticos ou células B.

**Exemplo 1**

**1.1. Amostras dos pacientes**

Duas amostras foram obtidas pelo Departamento de Urologia da Universidade de Tubinjo, provenientes de pacientes, que apresentam tumores em células renais comprovadas histologicamente. Nenhum dos dois pacientes

recebeu terapia pré-operativa. O paciente nº 1 (denominado a seguir RCC01) possuía a seguinte classificação HLA: HLA-A\*02 A\*68 B\*18 B\*44; e o paciente nº 2 (denominado a seguir RCC13) HLA-A\*02 A\*24 B\*07 B\*40.

#### 1.2. Isolamento dos peptídeos ligados a MHC de classe I

As amostras dos tumores foram congeladas a choque, tal como anteriormente descrito em Schirle, M. et al., Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach, 2000, European Journal of Immunology, 30:2216-2225. Os peptídeos foram isolados de acordo com os protocolos padrão, especificamente sob a utilização do anticorpo monoclonal W6/32, que é específico para a molécula HLA de classe I, ou do anticorpo monoclonal BB7.2, que é específico para HLA-A2. Barnstable, C.J. et al., Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis, 1978, Cell, 14:9-20 e Parham, P. & Brodsky, F.M., Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28, 1981, Hum. Immunol., 3:277-299, descreveram a fabricação e a aplicação destes anticorpos.

#### 1.3. Espectroscopia de massa

Peptídeos, que foram extraídos do tecido tumoral do paciente RCC01, foram separados através de "reversed

phase HPLC" (Sistema SMART,  $\mu$ RPC C2/C18 SC 2.1/19, Amersham Pharmacia Biotech) e as fracções obtidas foram analisadas através de nanoESI MS. Neste caso, procedeu-se de acordo com o descrito em Schirle, M. et al., Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach, 2000, European Journal of Immunology, 30:2216-2225.

Os peptídeos, que foram extraídos do tecido tumoral do paciente RCC13, foram identificados conforme descrito anteriormente através de LC-MS capilar, porém com algumas alterações pequenas: 100  $\mu$ l das amostras foram carregados, dessalinizados e pré-concentrados a uma coluna posterior de 300  $\mu$ m \* 5 mm C18  $\mu$  (LC Packings). O agente solvente e as amostras foram aplicados através de uma bomba injetora (PHD 2000, Harvard Apparatur, Inc.) com uma injecção de 100  $\mu$ l vedada (1710 RNR, Hamilton) a uma velocidade de 2  $\mu$ l/min. Para a separação dos peptídeos, a coluna de pré-concentração foi comutada perante uma coluna de 75  $\mu$ m \* 250 mm C-18 (LC Packings). Em seguida, um gradiente binário foi deslocado com 25-60% B dentro de 70 min., enquanto que o fluxo de 12  $\mu$ l/min foi reduzido para aproximadamente 300 nl/min, mais precisamente com a utilização de uma conexão TEE (ZT1C, Valco) e de uma coluna de 300  $\mu$ m \* 150 mm C-18.

Para garantir que o sistema estivesse livre de peptídeos residuais, foi medida uma amostra vazia de cada um. A fragmentação online foi executada conforme o descrito

acima e os espectros dos fragmentos foram analisados manualmente. As pesquisas de banco de dados (NCBInr, EST) foram efectuadas com a utilização do MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) .

**1.4. Identificação de ligandos 77 MHC de classe I do tecido tumoral do paciente RCC01**

Na tabela 1 anexada são apresentados os ligandos identificados, que estavam unidos aos HLA-A\*02, HLA-A\*68, HLA-B\*18 ou HLA-B\*44. Os peptídeos, que estavam associados ao HLA-A\*02, apresentaram motivos de peptídeo específicos de alelo: Desta maneira, na posição 2 encontrava-se leucina, valina, isoleucina, alanina ou metionina e no terminal C leucina, valina, isoleucina ou alanina. A maioria dos ligandos era proveniente das chamadas proteínas "Houskeeping", porém também foi possível detectar ligandos de proteínas, que foram associados a tumores.

Com ligandos associados a HLA-A\*68 foram identificados através dos seus aminoácidos âncoras teorina, isoleucina, valina, alanina, leucina na posição 2 e arginina ou lisina na extremidade C-terminal. Isso indica a presença do subtípo HLA-A\*6801. Fazem parte dos peptídeos associado ao HLA-A\*68 os dois ligandos de adipofilina, MTSALPEIQQK e MAGDIYSVFR, assim como o ETIPLTAEKL associado a tumores e proveniente de ciclina D1. O peptídeo TIVNILTNR é proveniente da anexina II, em relação à MHC de classe II, essa proteína provou ser imunogénica em pacientes com

melanoma (veja Heinzel et al., The self peptide annexin II (208 - 223) presented by dendritic cells sensitizes autologous CD4+ T lymphocytes to recognize melanoma cells, 2001, Cancer Immunol. Immunother. 49:671-678). Os demais ligandos apresentaram aminoácido de glutamina na posição 2, que é um aminoácido âncora para o subtipo HLA-B\*44. Até agora, o motivo de peptídeo para HLA-B\*18 ainda é desconhecido e, por isso, não foi possível diferenciar os ligandos de ambas estas moléculas HLA-B.

#### 1.5. Ligandos MHC de classe I do tecido tumoral do paciente RCC13

No tecido tumoral deste paciente também foi possível identificar os mesmos ligandos, que foram identificados no paciente RCC01 e que são provenientes de proto-oncogénicos met (c-Met) da queratina 18. Estes foram os peptídeos com a SEQ ID-Nr. Nr. 1 e 3. Além disso, foi possível obter outros ligandos deste tecido tumoral: Desta forma foi possível identificar um ligando proveniente da nicotinamida-N-metiltransferase (NNMT), um gene, que se encontra sobre-expresso em mais de 95 % de todos os cancros renais. Alguns outros ligandos continuaram a se sobrepor com o repertório de peptídeos do RCC01.

#### 1.6. Comprovação de células T específicas da queratina 18 no repertório normal da célula T CD8<sup>+</sup>

Células mononucleares do sangue periférico de pacientes saudáveis foram pigmentadas com tetrameres HLA-

A\*0201, que foram constituídos por peptídeos de adipofilina, queratina 18 ou proto-oncogénicos met (c-Met): Para a fabricação dos tetrameres, moléculas HLA-A\*0201 recombinadas foram constituídas *in vitro* com os peptídeos SVASTITGV (SEQ ID-Nr. 2, adipofilina), ALLNIKVKL (SEQ ID-Nr. 3, queratina 18) ou YVDPVITSI (SEQ ID-Nr. 1, proto-oncogénicos met, c-Met), limpas através de filtração por gel, biotiniladas e misturadas com estreptavidina para a conexão dos monomeres.

Inesperadamente pôde ser encontrada uma população significante de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, que eram específicos para queratina 18 em quatro de 22 pacientes saudáveis. Na fig. 1 são apresentados os resultados da pigmentação dupla através de dotplots, sendo que a fila do meio mostra os resultados da coloração com queratina 18. Entre 0,02 e 0,2 % das células T CD8<sup>+</sup> foram específicas para queratina 18. Com base na fila inferior dos dotplots, foi possível reconhecer, que essa ligação de tetramer de queratina 18 era específica.

### **Exemplo 2**

Para poder analisar a apresentação de peptídeos com a SEQ ID-Nr. 1 (YVDPVITSI) (fragmento de peptídeo do proto-oncogénico c-Met) e SEQ ID Nr. 2 (fragmento de peptídeo de adipofilina) através de células normais e a detecção dos peptídeos através de CTL, foi efectuada a indução de CTL *in vitro*, que eram específicos para o

peptídeo c-Met (peptídeo com a SEQ ID-Nr. 1) assim como CTL, que eram específicos para o peptídeo de adipofilina (SEQ ID-Nr. 2). Para tanto, foram utilizadas células dendríticas (DC), que foram originadas de células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMNC) de doadores saudáveis com HLA-A\*02 positivo.

#### 2.1. Obtenção de DC

As DCs foram isoladas através de centrifugação por gradientes de densidade Ficoll/Paque (Biochrom, Berlim, Alemanha) de PBMNC obtidos de sangue heparinizado. O sangue heparinizado foi obtido, por sua vez, de preparações "buffy coat" de doadores saudáveis do banco de sangue da Universidade de Tubinho. As células foram semeadas sobre pratos de 6 wells (Falcon, Heidelberg, Alemanha) ( $1 \times 10^7$  células/ 3 ml por well) em um agente RP10 (RPMI 1640, complementado com 10 % de soro fetal de vaca termicamente desactivado e com antibióticos). Depois de uma incubação de 2 horas a 37°C e 5 % CO<sub>2</sub>, as células não aderentes foram removidas e os monócitos sanguíneos aderentes foram cultivados no agente RP10, sendo que as seguintes citocinas foram adicionadas ao agente: GM-CSF humano recombinante (granulocyte makrophage colony stimulating factor; Leukomax, Novartis; 100ng/ml), interleucina IL-4 (R&D Systems, Wiesbaden, Alemanha; 1000 IU/ml) e TNF- $\alpha$  (factor-tumor-necrose  $\alpha$ ) (R&D Systems, Wiesbaden, Alemanha; 10 ng/ml).

## 2.2. Síntese dos peptídeos

De modo exemplar, dois peptídeos de ligação HLA-A\*02 (c-Met (SEQ ID-Nr. 1, YVDPVITSI) ou adipofilina (SEQ ID-Nr. 2, SVASTITGV), que foram identificados conforme o descrito acima) foram sintetizados através da utilização de grupos de protecção F-moc (9-Fluorenylmethyloxycarbonyl) sobre um sintetizador de peptídeos (432A, Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemanha) e analisados através de "reversed phase" HPLC e de espectroscopia de massa. Desta maneira, foi possível criar uma quantidade suficiente de peptídeos identificados.

## 2.3. Indução de uma resposta CTL específica de抗érgio sob a utilização de peptídeos sintéticos de HLA-A\*02 restringidos

Para a indução de CTL, as DCs obtidas no passo 2.1. ( $5 \times 10^5$ ) foram pulsadas com os peptídeos obtidos no passo 2.2. com a SEQ ID-Nr. 1 ou SEQ ID-Nr. 2 com 50 µg/ml cada um por 2 horas. Em seguida, elas foram lavadas e incubadas com  $2,5 \times 10^6$  autólogos PBMNC no agente RP10. Após um tempo de incubação de 7 dias, as células foram re-estimuladas com autólogos PBMNC pulsados por peptídeos. A este processo foi acrescido 1 ng/ml de interleucina IL-2 (R&D Systems) humana recombinante nos dias 1, 3 e 5. A actividade citotóxica do CLT, induzido deste modo, foi examinada no dia 5 após a última re-estimulação através de um ensaio padronizado de liberação de  $^{51}\text{Cr}$  (veja abaixo sob 2.4.: Ensaio CTL).

#### 2.4. Ensaio CTL

Como células target nos ensaios CTL foram utilizadas células tumorais, células pulsadas por peptídeos de diferentes linhas de células e DCs autólogas. Células pulsadas por peptídeos foram pulsadas com 50 µg/ml de peptídeo (SEQ ID-Nr. 1 ou SEQ ID-Nr. 2) durante duas horas. Todas as células target foram marcadas no agente RP10 (RPMI 1640, complementado com 10 % de soro fetal de vaca termicamente desactivado e com antibióticos) por uma hora a 37°C com  $[^{51}\text{Cr}]$ cromato de sódio ( $^{51}\text{Cr}$ ). Em seguida,  $10^4$  células/por well foram acrescentadas a um prato de 96 ondulações com chão arredondado. Diferentes quantidades de CLT foram adicionadas para que o volume final de 200 µl fosse alcançado, com incubação posterior por 4 horas a 37°C. Em seguida, os excessos (50µl/well) foram colhidos e contados em um prato contador beta. A lise específica foi calculada percentualmente da seguinte maneira:  $100 \times (\text{liberação experimental} - \text{liberação espontânea}) / (\text{liberação máxima} - \text{liberação espontânea})$ . A liberação espontânea e a liberação máxima foram determinadas na presença do preparado ou de 2 % trítono X-100.

#### 2.5. Resultados da indução CTL

##### a) Actividade citotóxica CTL perante DCs pulsadas por peptídeos

Na fig. 2 são apresentados os resultados do

ensaio de liberação  $^{51}\text{Cr}$  (veja sob 2.4.) relativo à actividade citotóxica do CLT induzido (veja sob 2.3.) perante células T2 ou DC. As linhas de células T2 de HLA-A\*02 positiva e deficiente de TAP (Transporter associated with Antigen processing); (Transportador de peptídeo TAP a transportar fragmentos de peptídeo de um抗igénio de proteína do citosol para o retículo endoplasmático, onde eles se associam com moléculas MHC.)

Nas fig. 2a e 2b é apresentada a actividade citotóxica do CLT, que foi induzido com a utilização do peptídeo com a SEQ ID-Nr. 1, perante células T2 e DC, sendo que ambos os tipos de células foram pulsadas anteriormente com o peptídeo (c-Met) com a SEQ ID-Nr. 1 (caixa de cor preta cheia) ou com um peptídeo irrelevante (Survivin (= "Sv"; ELTLGEFLKL; SEQ ID-Nr. 80) ou HIV (ILKEPVHGV; Pol. HIV-1 peptídeo de transcriptase reversa, posição de aminoácido 476-484; SEQ ID-Nr. 81)). Na fig. 2c e 2d é apresentada a actividade citotóxica do CLT, induzido com a utilização do peptídeo com a SEQ ID-Nr. 2, perante células T2 e DC, que foram pulsadas anteriormente com o peptídeo (adipofilina) com a SEQ ID-Nr. 2.

A lise específica, que se reflecte na liberação de  $^{51}\text{Cr}$ , foi considerada nas fig. 2a a 2d - assim como nos diagramas CTL-lise das fig. 3 a 5 - contra diferentes relações de células efectoras (CTL) até as células de destino (células marcadas com  $^{51}\text{Cr}$  a serem lisadas).

Como pode ser notado nas fig. 2a a 2d, com a ajuda de uma linha de células CTL - obtidas após uma reestimulação de duas semanas - foi possível determinar uma eliminação de células específica de抗原s: Somente as células que apresentam ou o peptídeo c-Met com a SEQ ID-Nr. 1 (fig. 2a e 2b) ou o peptídeo de adipofilina com a SEQ ID Nr. 2 (fig. 2c e 2d) (veja nas fig. 2a a 2d com as respectivas curvas com os símbolos da caixa de cor preta cheia) foram destruídas por uma quantidade crescente de CTL; as células de controlo carregadas com peptídeos irrelevantes não foram destruídas (curvas com os símbolos de caixa vazios). Desta forma foi possível mostrar a especificidade da actividade citolítica.

b) Actividade citotóxica CTL perante linhas de células tumorais

Em um próximo passo, foi testado através de um ensaio de liberação  $^{51}\text{Cr}$  se as CTL - que são específicas para o peptídeo c-Met com a SEQ ID-Nr. 1 ou para o peptídeo de adipofilina com a SEQ ID-Nr. 2 - conseguiram detectar e lisar células tumorais, que expressaram proto-oncogénicos c-Met ou adipofilina endógena.

Para isso foram utilizadas as seguintes linhas de células HLA-A\*02 positivas, marcadas com  $^{51}\text{Cr}$ : HCT 116 (cancro intestinal; obtido pelo Prof. G. Pawelec, Tubinho, Alemanha), A 498, MZ 1257 e MZ 1774 (carcinoma de células renais; obtidos pelo Prof. A. Knuth, Frankfurt, Alemanha),

MCF-7 (cancro mamário; comprado pela ATCC, American Type Culture Collection), Mel 1479 (melanoma; obtido pelo Prof. G. Pawelec, Tubinho, Alemanha) e U 266 (mieloma múltipla; obtido por Prof. G. Pawelec, Tubinho, Alemanha). Essas linhas de células expressaram o proto-oncogénico c-Met e adipofilina endógena como estruturas de destino ("targets").

A linha de células B Croft (EBV(Vírus Epstein-Barr) imortalizada; HLA-A\*02 positiva; obtida por O.J. Finn, Pittsburgh, USA) e a linha de células SK-OV-3 (carcinoma do ovário; HLA-A\*03 positiva; obtida por O.J. Finn, Pittsburgh, USA) foram incluídas nos estudos como controle negativo. Células K 562 (p. ex. obtidas pela Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ; ACC 10) foram utilizadas, para determinar a actividade de células assassinas naturais (NK), pois esta linha de células é altamente sensível com relação a células assassinas.

Todas as linhas de células foram cultivadas em um agente RP10 (RPMI 1640, complementado com 10 % de soro fetal de vaca termicamente desactivado e com antibióticos).

Com as linhas de células tumorais mencionadas acima e o CTL induzido conforme 2.3. foram realizados ensaios de liberação de <sup>51</sup>Cr (veja em 2.4.).

As figuras 3a a 3f apresentam os resultados do

ensaio CTL, sendo que nas fig. 3a a 3d foram utilizados CTL, que foram induzidos com a utilização do peptídeo c-Met com a SEQ ID-Nr. 1, e nas fig. 3e e 3f foram utilizados CTL, que foram induzidos com a utilização do peptídeo de adipofilina com a SEQ ID-Nr. 2.

Como pode ser notado nas figuras 3a a 3f, os CTL - que eram específicos para o peptídeo c-Met com a SEQ ID-Nr. 1 (fig. 3a a 3d) ou para o peptídeo de adipofilina com a SEQ ID-Nr. 2 (fig. 3e e 3f) - lisaram de modo eficiente as células tumorais, que expressam tanto HLA-A\*02 como c-Met ou adipofilina (ou seja, na fig. 3a a linha de células HCT 116, na fig. 3b a linha de células A 498, na fig. 3c as linhas de células MZ 1257 e MEL 1479 e na fig. 3d as linhas de células MCF-7 e U 266; na fig. 3e as linhas de células A 498, U 266 e MCF-7, na fig. 3f as linhas de células MZ 1774, Mel 1479 e MZ 1257. A lise específica - como descrito acima em 2.4. - foi medida através da liberação de  $^{51}\text{Cr}$ . A linha de células de controlo SK-OV-3 (HLA-A-\*02 negativa) não foram lisadas nem pelo pelos CTLs, que foram induzidos pelo peptídeo com a SEQ ID-Nr. 1, e nem pelos CTLs, que foram induzidos pelo peptídeo com a SEQ ID-Nr. 2. Isso provou, que ambos os peptídeos devem ser apresentados em relação com moléculas HLA-A\*02 nas células tumorais, para lisar as células target de modo eficiente. Através disso a especificidade de antígeno e a restrição de MHC do CTL foram comprovadas.

Além disso, as células CTL induzidas *in vitro*

pelo peptídeo com a SEQ ID-Nr. Também não reconheceram a linha de células K562 (veja as fig. 3a, 3b e 3d), o que demonstra que a actividade citotóxica não pôde ser administrada pelas células assassinas naturais (NK).

c) Ensaio de inibição

Para continuar a verificar a especificidade de抗igénio e a restrição de MHC dos CTL induzidos *in vitro*, o ensaio de inibição foi efectuado com linhas de células inibidoras não marcadas com  $^{51}\text{Cr}$  ("frias").

Aqui foi analisada a capacidade de linhas de células pulsadas por peptídeos, para inibir a lise das células tumorais e/ou competir com elas. Para tal, foi empregado um excesso de inibidores (ou seja, de células pulsadas, não marcadas). A relação do inibidor (células pulsadas por peptídeos) com o target (células tumorais) foi de 20:1. Durante a lise de linhas de células inibidoras, nenhum  $^{51}\text{Cr}$  pôde ser liberado, pois as linhas de células inibidoras não estavam marcadas.

Como inibidora foi utilizada a linha de células T2 (HLA-A\*02; deficiente de TAP; veja sob 2.5.a)). Antes dos ensaios, a linha de células T2 foi pulsada com os peptídeos relevantes (SEQ ID-Nr. 1 ou 2) ou com um peptídeo de controlo irrelevante (Survivin (=Sv), SEQ ID-Nr. 80).

Os resultados destes testes são mostrados nas

fig. 4a a 4c, senso que nas fig. 4a e 4b foram utilizados CTL, que foram induzidos através do peptídeo c-Met com a SEQ ID-Nr.1 e na fig. 4c foram utilizados CTL, que foram induzidos através do peptídeo de adipofilina com a SEQ ID Nr. 2.

Nas fig. 4a e 4b foi testada a lise das linhas de células U 266 e A 498 marcadas com  $^{51}\text{Cr}$ , sem linha de células inibidoras (curvas com os símbolos da caixa de cor preta cheia); com a linha de células inibidoras T2, pulsadas com um peptídeo irrelevante (Survivin; SEQ ID-Nr. 80; controlo negativo, curvas com os triângulos cheios); e com a linha de células inibidoras T2, pulsadas com o peptídeo c-Met com a SEQ ID-Nr. 1 (curvas com losangos não cheios).

Sem a presença de células inibidoras foi observada uma lise das células tumorais através de CTL (veja nas fig. 4a a 4d as curvas com os símbolos de caixa de cor preta cheia). Como pode ser observado nas figuras 4a e 4b, não foi efectuada nenhuma lise das células tumorais mesmo com um excesso de inibidores (e com isso também não houve liberação de  $^{51}\text{Cr}$ ), enquanto o inibidor target era pulsado com o peptídeo c-Met com a SEQ ID-Nr. 1 (veja as respectivas curvas com os símbolos de losangos não cheios). A actividade da CTL é dirigida às células T2 não marcadas existentes no excesso, de tal modo que estas e não as células tumorais foram lisadas. As células T2, que foram pulsadas com um peptídeo irrelevante (cada uma com

Survivin; SEQ ID-Nr. 80), não conseguiram inibir a lise das células tumorais através de CLT, de tal modo que o  $^{51}\text{Cr}$  liberado pôde ser medido (veja na fig. 4a e 4b as curvas com os triângulos de cor preta cheios).

Algo similar pôde ser observado na utilização de CTL, que foram induzidos através da utilização do peptídeo de adipofilina com a SEQ ID-Nr. 2 (veja a fig. 4c):

A restrição de MHC e a especificidade de antigénio da actividade citotóxica, que foi administrada pela CTL induzida por adipofilina, pôde ser confirmada sob a utilização de um anticorpo monoclonal específico de HLA-A\*02 e em um ensaio de inibição com inibidor não marcado ("frio"): Os resultados desta experiência são mostrados na fig. 4c. As células tumorais A 498 foram bloqueadas através de adição do anticorpo específicos de HLA-A\*02 (anticorpos monoclonais BB7.2, IgG2b, obtidos por S. Stefanovic, Tubinho), de tal modo que elas não foram lisadas através da adição de CTL e, com isso, nenhum  $^{51}\text{Cr}$  foi liberado (ver a fig. 4c com as curvas com os símbolos de triângulos não cheios). Como controlo serviu um anticorpo não específico, que não bloqueou a molécula HLA-A\*02 (ChromPure Maus IgG, Dianova, Alemanha; veja na fig. 4c as curvas com as caixas cheias). Para estas experiências de inibição as células foram incubadas sobre pratos de 96 wells por 30 min. com 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de anticorpos antes da colheita.

Além disso, pôde ser descoberto que a linha de

células T2 de competição pulsadas com o peptídeo irrelevante Survivin com a SEQ ID-Nr. 80 (T2/SV), não conseguiu inibir a lise administrada pela CTL das células tumorais A 498 (veja na fig. 4c a curva com os círculos de cor preta cheios). No entanto, a lise das células tumorais pôde ser inibida pela linha de células inibidoras T2 (T2/AD) pulsada com o peptídeo de adipofilina com a SEQ ID-Nr. 2, de tal modo que neste último caso não houve uma medição de liberação de  $^{51}\text{Cr}$  (veja na fig. 4c a curva com os símbolos x).

d) Lise específica de DCs transfectadas

Em uma outra experiência, foi analisada a actividade citotóxica do CTL em uma abordagem de experimento autólogo. Para isso, como células target foram utilizadas DCs autólogas, que foram obtidos dos mesmos PBMNC, que foram utilizados para a indução CTL (veja sob 2.2.). Antes da realização do ensaio CTL, as DCs foram electroporadas com RNA, que anteriormente foi isolado de linhas de células tumorais ou que representa RNA de controlo (EGFP-RNA transcritos *in vitro* (enhanced Green fluorescent Protein-RNA); pSP64 Poly(A) EGFPII, obtido por Van Tendeloo, Antuérpia, Bélgica). Segundo os dados do fabricante, todo o RNA foi isolado de células tumorais através de QIAGEN Rneasy Mini Kits (QIAGEN, Hilden, Alemanha). A quantidade e a pureza do RNA foram determinadas fotometricamente e armazenadas em alíquotas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Antes da electroporação no dia 6, DCs não amadurecidos foram lavadas duas vezes com o agente X-VIVO 20 livre de soro (BioWhittaker, Walkersville, USA) e resuspensos em uma concentração final de  $2 \times 10^7$  células/ml. Em seguida, 200 µl da suspensão da célula foram misturados com 10 µg de todo o RNA e electroporados em uma tina de 4 mm através de Easyject Plus<sup>TM</sup> (Peqlab, Erlangen, Alemanha) (parâmetro: 300 V, 150 µF, 1540 Ω, tempo de pulso: 231 ms). Após a electroporação, as células foram transmitidas imediatamente ao agente RP10 e, consequentemente, transferidas de volta para incubador. Mais de 80 % das células permaneceram vivas após a electroporação.

Os resultados destas abordagens de experimento são mostrados na fig. 5a e 5b. Na fig. 5a foram utilizados CLTs, que foram induzidos através de utilização do peptídeo c-Met com a SEQ ID-Nr. 1, na fig. 5b foram utilizados CLTs, que foram induzidos através da utilização do peptídeo de adipofilina com a SEQ ID-Nr. 2.

Depois da realização do ensaio CTL com o CTL induzidos através do peptídeo c-Met com a SEQ ID-Nr. 1 (veja sob 2.4.) foi possível observar um lise específica de DCs, que foram electroporadas com RNA de linhas de células tumorais que expressam c-Met (A 498 e MCF-7) (veja a fig. 5a, as curvas com os símbolos de cor preta cheia). No entanto, as DCs que foram electroporadas com RNA de linha de células tumorais Croft - que não expressam c-Met não foram lisadas (veja as respectivas curvas com os losangos não cheios).

CTL, que foram induzidos pelo peptídeo de adipofilina com a SEQ ID-Nr. 2, lisaram DCs, que foram electroporadas com RNA de linhas de células A 498 que expressam adipofilina (veja a fig. 5b, as curvas com os triângulos de cor preta cheia). Além disso, também foi executada a lise das DCs, que tinham sido pulsadas com o peptídeo de adipofilina com a SEQ ID-Nr. 2 (veja a fig. 5b curvas com losangos pretos cheios). Por outro lado, não foi executada a lise das DCs, que tinham sido electroporadas com o RNA de controlo (EGFP) (veja a fig. 5b curvas com triângulos de cor preta não cheios)

Isso demonstra que - após a transfecção de DC com RNA das células tumorais de c-Met ou adipofilina positiva - os peptídeos identificados, ou seja, o peptídeo c-Met com a SEQ ID-Nr. 1 e o peptídeo de adipofilina com a SEQ ID-Nr. 2 foram processados e apresentados.

e) Indução de CLT específico de adipofilina em um paciente com leucemia linfática crónica

Em uma outra experiência, foram gerados CLTs a partir do PBMNC de um paciente com HLA-A-\*0201 positivo e leucemia linfática crónica (CLL). Esses CLTs eram específicos para o peptídeo de adipofilina com a SEQ ID Nr. 2. O paciente se encontrava em remissão, após um tratamento com fludarabina. Além disso, células primárias autólogas CLL e DC deste paciente foram utilizadas como targets marcados com  $^{51}\text{Cr}$  em um ensaio, no qual foi administrada

uma liberação de  $^{51}\text{Cr}$  através de CTL induzidos por peptídeos. Conforme apresentado na fig. 6, tanto as DCs autólogas deste paciente - que foram pulsadas com o peptídeo de adipofilina com a SEQ ID-Nr. 2 ("DC+AD") - como também as células CLL autólogas ("células CLL") foram lisados através de CTL induzidos por peptídeos. No entanto, as DCs, que foram pulsadas com o peptídeo irrelevante Survivin com a SEQ ID-Nr. 80, não foram lisadas ("DC+SV"). Mesmo as células B não malignas e a linha de células K 562 também não foram lisadas pelo CLT.

A especificidade da resposta CTL foi confirmada em um ensaio de inibição, sendo que as linhas de células T2 (veja acima) foram utilizadas como células inibidoras T2; cada uma delas foi pulsada com o peptídeo de adipofilina com a SEQ ID-Nr. 2 ou com o peptídeo irrelevante Survivin com a SEQ ID-Nr. 80. Os CLTs, que foram induzidos através de utilização do peptídeo de adipofilina com a SEQ ID-Nr. 2, também lisaram as células inibidoras em excesso, que foram pulsadas com o peptídeo relevante com a SEQ ID-Nr. 2, de tal modo que neste caso as células tumorais marcadas com  $^{51}\text{Cr}$  não foram lisadas (veja na fig. 6 as curvas com as caixas de cor preta cheias).

Resumindo, com isso os inventores puderam mostrar que os peptídeos identificados representam substâncias muito promissoras, que podem ser utilizadas dentro de uma imunoterapia para uma grande quantidade de doenças (tumorais).

**Tabela 1**

<u>Sequência</u>	<u>Posição/tipo de gene</u>	<u>Acc. Nr.</u>	<u>SEQ ID-Nr.</u>
<b>Paciente RCC01</b>			
<b>HLA-A*02</b>			
1. YVDPVITSI	654-662 met proto-oncogen	J02958	SEQ ID-Nr. 1
2. SVASTITGV	129-137 adipose differentiation-related protein	X97324	SEQ ID-Nr. 2
3. ALLNIKVKL	365-373 keratin 18	M26326	SEQ ID-Nr. 3
4. ALFDGDPHL	1-9 KIAA0367	AB002365	SEQ ID-Nr. 4
5. RLLDYVVNI	679-687 hypothetical protein FLJ20004	AB040951	SEQ ID-Nr. 5
6. ALANGIEEV	101-109 apolipoprotein L, 3	AY014906	SEQ ID-Nr. 6
7. QLIDKVWQL	593-601 SEC14 ( <i>S.cerevisiae</i> )-like 1	D67029	SEQ ID-Nr. 7
8. ALSDLEITL	389-397 mitogen inducible 2	Z24725	SEQ ID-Nr. 8
9. ILDTGTIQL	174-182 kidney- and liver-specific gene	AB013094	SEQ ID-Nr. 9
10. SLLGGDVVSV	27-36 delta sleep inducing peptide, immunoreactor	AF153603	SEQ ID-Nr. 10
11. FLDGNELTL	167-175 chloride intracellular channel 1	U93205	SEQ ID-Nr. 11
12. NLLPKLHIV	179-187 chloride intracellular channel 1	U93205	SEQ ID-Nr. 12
13. ALASHLIEA	507-515 EH-domain containing 2	AF181263	SEQ ID-Nr. 13
14. SLYGGTITI	296-304 hypothetical protein FLJ11189	AK000697	SEQ ID-Nr. 14
15. FLLDKKIGV	218-226 chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	AF026166	SEQ ID-Nr. 15

(continuação)

<u>Sequência</u>	<u>Posição/tipo de gene</u>	<u>Acc. Nr.</u>	<u>SEQ ID-Nr.</u>
<u>Paciente RCC01</u>			
<b>HLA-A*02</b>			
16. FLDGNEMTL	178-186 chloride intracellular channel 4	AF097330	SEQ ID-Nr. 16
17. AIVDKVPSV	147-155 coat-protein gamma-cop	AF100756	SEQ ID-Nr. 17
18. DVASVIVTKL	241-250 signal recognition particle 54kD	U51920	SEQ ID-Nr. 18
19. LASVSTVL	130-137 hemoglobin, alpha 2	AF230076	SEQ ID-Nr. 19
20. VMAPRTLVL	3-11 HLA-A		SEQ ID-Nr. 20
21. LLFDRPMHV	267-275 hnRNP M	L03532	SEQ ID-Nr. 21
<b>HLA-A*68</b>			
22. MTSALPIIQK	62-71 adipose differentiation-related protein	X97324	SEQ ID-Nr. 22
23. MAGDIYSVFR	349-358 adipose differentiation-related protein	X97324	SEQ ID-Nr. 23
24. ETIPLTAEKL	115-124 cyclin D1/PRAD1	X59798	SEQ ID-Nr. 24
25. DVMVGPFKLR	934-943 A kinase (PRKA) anchor protein 2	AJ303079	SEQ ID-Nr. 25
26. TIIDILTKR	64-72 annexin A1	X05908	SEQ ID-Nr. 26
27. TIVNILTNR	55-63 annexin A2	BC001388	SEQ ID-Nr. 27
28. TIIDIITHR	385-393 annexin A6	J03578	SEQ ID-Nr. 28
29. SIFDGRVVAK	107-116 putative membrane protein	AB020980	SEQ ID-Nr. 29
30. STIEYVIQR	115-123 Sec23 ( <i>S. cerevisiae</i> ) homolog B	BC005032	SEQ ID-Nr. 30

(continuação)

<b>HLA-A*68</b>				
31.	ELIKPPTILR	132-141 adaptor-related protein complex 3	AF092092	SEQ ID-Nr. 31
32.	EIAMATVTALR	248-258 aldolase A, fructose-biphosphate	X12447	SEQ ID-Nr. 32
33.	ETIGEILKK	95-103 hnRNP K	BC000355	SEQ ID-Nr. 33
34.	SLADIMAKR	86-94 ribosomal protein L24	BC000690	SEQ ID-Nr. 34
<b>HLA-B*44 ou HLA-B*18</b>				
35.	EEIAFLKKL	229-237 vimentin	M14144	SEQ ID-Nr. 35
36.	DEAAFLERL	92-100 caldesmon 1	M64110	SEQ ID-Nr. 36
37.	DEMVKVLVL	545-552 spectrin, beta, non-erythrocytic 1	M96803	SEQ ID-Nr. 37
38.	DEVKFLTV	191-198 annexin A4	M82809	SEQ ID-Nr. 38
39.	NENSLFKSL	935-943 clathrin, heavy polypeptide (Hc)	D21260	SEQ ID-Nr. 39
40.	DEFKVVVV	373-380 coat protein, gamma-cop	AF100756	SEQ ID-Nr. 40
41.	EEVKLIKHM	137-145 ferritin, light polypeptide	M11147	SEQ ID-Nr. 41
42.	DEVKLPAKL	158-166 polymerase I and transcript release factor	AF312393	SEQ ID-Nr. 42
43.	TERELKVAY	637-645 hypothetical protein FLJ20004	AB040951	SEQ ID-Nr. 43
44.	NEFSLKGVD	86-95 ets-1	J04101	SEQ ID-Nr. 44
45.	NEQDLGIQY	169-177 catenin alpha 1	D13866	SEQ ID-Nr. 45

(continuação)

<b>HLA-B*44 ou HLA-B*18</b>				
46.	EERIVELF	306-313 signal transducer and activator of transcription 3	BC000627	SEQ ID-Nr. 46
47.	EEIREAFRVF	84-93 calmodulin 3	J04046	SEQ ID-Nr. 47
48.	DEYIYRHFF	344-352 cell cycle progression 8 protein	AF011794	SEQ ID-Nr. 48
49.	DELELHQRF	308-316 adenovirus 5 E1A binding protein	X86098	SEQ ID-Nr. 49
50.	SEVKFTVTTF	80-88 galectin 2	M87842	SEQ ID-Nr. 50
51.	IETIINTF	12-19 calgranulin B	M26311	SEQ ID-Nr. 51
52.	KENPLQFKF	61-69/72-80 villin 2 (ezrin)/(radixin)	J05021/ L02320	SEQ ID-Nr. 52
53.	DEVRTLTY	41-48 hnRNP methyltransferase, <i>S. cerevisiae</i> -like 2	Y10807	SEQ ID-Nr. 53
54.	GEAVVNRVF	43-51 large multifunctional protease 2, LMP2	Z14977	SEQ ID-Nr. 54
55.	EEVLIPDQKY	385-394 F-box and leucine-rich repeat protein 3A	AF126028	SEQ ID-Nr. 55
56.	DEGRLVLEF	163-171 sterol O-acyltransferase 1	L21934	SEQ ID-Nr. 56
57.	DEVELIHF	838-845 chromatin-specific transcription elongation factor	AF152961	SEQ ID-Nr. 57
58.	VEVLLNYAY	83-91 NS1-binding protein	AF205218	SEQ ID-Nr. 58
59.	TENDIRVMF	120-128 CUG triplet repeat, RNA-binding protein 1	AF267534	SEQ ID-Nr. 59
60.	LEGLTVVY	62-69 coatomer protein complex subunit zeta 1	AF151878	SEQ ID-Nr. 60

(continuação)

<b>HLA-B*44 ou HLA-B*18</b>				
61.	NELPTVAF	192-199 hypothetical protein	AK001475	SEQ ID-Nr. 61
62.	EEFGQAFSF	77-85 MHC, class II, DP alpha 1	X03100	SEQ ID-Nr. 62
63.	VEAIFSKY	33-40 hnRNP C (C1/C2)	M29063	SEQ ID-Nr. 63
64.	DERTFHIFY	277-285 myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle	M69181	SEQ ID-Nr. 64
65.	TEKVLAAYV	206-214 aldolase B, fructose-bisphosphate	K01177	SEQ ID-Nr. 65
66.	VESPLSVSF	159-167 hypothetical protein FLJ22318	AK025971	SEQ ID-Nr. 66
67.	SEAGSHTLQW	MHC-I		SEQ ID-Nr. 67
68.	DEGKVIRF	56-63 EST reading frame-1	BF431469	SEQ ID-Nr. 68
<b>Paciente ROC13</b>				
<b>HLA-A*02</b>				
69.	ALAAVVTEV	frameshift, DDX3 reading frame +2	AF061337	SEQ ID-Nr. 69
70.	TLIEDILGV	209-217 transient receptor protein 4 associated protein	AL132825	SEQ ID-Nr. 70
71.	ALFGALFLA	2-10 phospholipid transfer protein	L26232	SEQ ID-Nr. 71
72.	VLATLVLLL	72-80 EST	AA483794	SEQ ID-Nr. 72
73.	TLDDDLIAAV	325-333 hypothetical protein FLJ10042	AK000904	SEQ ID-Nr. 73
74.	YLDNGVVVFV	316-324 damage-specific DNA binding protein 1 (127kD)	U18299	SEQ ID-Nr. 74
75.	SVFAGVVGV	581-589 guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	U58855	SEQ ID-Nr. 75

(continuação)

<u>Paciente RCC13</u>				
<b>HLA-A*02</b>				
76.	SLINVGLISV	48-57 acidic protein rich in leucines	BC000476	SEQ ID-Nr. 76
77.	ALADGVQKV	176-184 apolipoprotein L, 1)	AF323540	SEQ ID-Nr. 77
<b>HLA-A*24</b>				
78.	TYGEIFEKF	107-115 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, (B14.5b)	AF070652	SEQ ID-Nr. 78
79.	YYMIGEQKF	203-211 nicotinamide-n-methyltransferase	U08021	SEQ ID-Nr. 79

## LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

&lt;110&gt; Immatics Biotechnologies GmbH

&lt;120&gt; Peptídeos associados a tumores de ligação à molécula MHC

&lt;130&gt; FB15156/A

&lt;160&gt; 81

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile  
1 5

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Ser Val Ala Ser Thr Ile Thr Gly Val  
1 5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 9

**PE1734049**

- 46 -

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Leu Leu Asn Ile Lys Val Lys Leu  
1 5

<210> 4  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Leu Phe Asp Gly Asp Pro His Leu  
1 5

<210> 5  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5

Arg Leu Leu Asp Tyr Val Val Asn Ile  
1 5

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Leu Ala Asn Gly Ile Glu Glu Val  
1 5

<210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Leu Ile Asp Lys Val Trp Gln Leu  
1 5

<210> 8  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8

**PE1734049**

- 47 -

Ala Leu Ser Asp Leu Glu Ile Thr Leu  
1 5

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

<400> 9

Ile Leu Asp Thr Gly Thr Ile Gln Leu  
1 5

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

<400> 10

Ser Leu Leu Gly Gly Asp Val Val Ser Val  
1 5 10

<210> 11  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 11

Phe Leu Asp Gly Asn Glu Leu Thr Leu  
1 5

<210> 12  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 12

Asn Leu Leu Pro Lys Leu His Ile Val  
1 5

<210> 13  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 13

Ala Leu Ala Ser His Leu Ile Glu Ala  
1 5

<210> 14  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Leu Tyr Gly Gly Thr Ile Thr Ile  
1 5

<210> 15  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 15

Phe Leu Leu Asp Lys Lys Ile Gly Val  
1 5

<210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 16

Phe Leu Asp Gly Asn Glu Met Thr Leu  
1 5

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

<400> 17

Ala Ile Val Asp Lys Val Pro Ser Val  
1 5

<210> 18  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 18

Asp Val Ala Ser Val Ile Val Thr Lys Leu  
1 5 10

<210> 19  
<211> 8  
<212> PRT

**PE1734049**

- 49 -

<213> Homo sapiens

<400> 19

Leu Ala Ser Val Ser Thr Val Leu  
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu  
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Leu Leu Phe Asp Arg Pro Met His Val  
1 5

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Thr Ser Ala Leu Pro Ile Ile Gln Lys  
1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val Phe Arg  
1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

**PE1734049**

- 50 -

Glu Thr Ile Pro Leu Thr Ala Glu Lys Leu  
1 5 10

<210> 25  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 25

Asp Val Met Val Gly Pro Phe Lys Leu Arg  
1 5 10

<210> 26  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 26

Thr Ile Ile Asp Ile Leu Thr Lys Arg  
1 5

<210> 27  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 27

Thr Ile Val Asn Ile Leu Thr Asn Arg  
1 5

<210> 28  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 28

Thr Ile Ile Asp Ile Ile Thr His Arg  
1 5

<210> 29  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 29

Ser Ile Phe Asp Gly Arg Val Val Ala Lys  
1 5 10

**PE1734049**

- 51 -

<210> 30  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 30

Ser Thr Ile Glu Tyr Val Ile Gln Arg  
1 5

<210> 31  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 31

Glu Leu Ile Lys Pro Pro Thr Ile Leu Arg  
1 5 10

<210> 32  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 32

Glu Ile Ala Met Ala Thr Val Thr Ala Leu Arg  
1 5 10

<210> 33  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 33

Glu Thr Ile Gly Glu Ile Leu Lys Lys  
1 5

<210> 34  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 34

Ser Leu Ala Asp Ile Met Ala Lys Arg  
1 5

<210> 35  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 35

Glu Glu Ile Ala Phe Leu Lys Lys Leu  
1 5

<210> 36

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

<400> 36

Asp Glu Ala Ala Phe Leu Glu Arg Leu  
1 5

<210> 37

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

<400> 37

Asp Glu Met Lys Val Leu Val Leu  
1 5

<210> 38

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

<400> 38

Asp Glu Val Lys Phe Leu Thr Val  
1 5

<210> 39

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

<400> 39

Asn Glu Asn Ser Leu Phe Lys Ser Leu  
1 5

<210> 40

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

<400> 40

Asp Glu Phe Lys Val Val Val Val

**PE1734049**

- 53 -

1 5

<210> 41  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 41

Glu Glu Val Lys Leu Ile Lys Lys Met  
1 5

<210> 42  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 42

Asp Glu Val Lys Leu Pro Ala Lys Leu  
1 5

<210> 43  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 43

Thr Glu Arg Glu Leu Lys Val Ala Tyr  
1 5

<210> 44  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 44

Asn Glu Phe Ser Leu Lys Gly Val Asp Phe  
1 5 10

<210> 45  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 45

Asn Glu Gln Asp Leu Gly Ile Gln Tyr  
1 5

<210> 46

**PE1734049**

- 54 -

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

<400> 46

Glu Glu Arg Ile Val Glu Leu Phe  
1 5

<210> 47  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 47

Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe  
1 5 10

<210> 48  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 48

Asp Glu Tyr Ile Tyr Arg His Phe Phe  
1 5

<210> 49  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 49

Asp Glu Leu Glu Leu His Gln Arg Phe  
1 5

<210> 50  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 50

Ser Glu Val Lys Phe Thr Val Thr Phe  
1 5

<210> 51  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

**PE1734049**

- 55 -

<400> 51

Ile Glu Thr Ile Ile Asn Thr Phe  
1 5

<210> 52  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 52

Lys Glu Asn Pro Leu Gln Phe Lys Phe  
1 5

<210> 53  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 53

Asp Glu Val Arg Thr Leu Thr Tyr  
1 5

<210> 54  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 54

Gly Glu Ala Val Val Asn Arg Val Phe  
1 5

<210> 55  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 55

Glu Glu Val Leu Ile Pro Asp Gln Lys Tyr  
1 5 10

<210> 56  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 56

Asp Glu Gly Arg Leu Val Leu Glu Phe  
1 5

<210> 57  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 57

Asp Glu Val Glu Leu Ile His Phe  
1 5

<210> 58  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 58

Val Glu Val Leu Leu Asn Tyr Ala Tyr  
1 5

<210> 59  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 59

Thr Glu Asn Asp Ile Arg Val Met Phe  
1 5

<210> 60  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 60

Leu Glu Gly Leu Thr Val Val Tyr  
1 5

<210> 61  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 61

Asn Glu Leu Pro Thr Val Ala Phe  
1 5

<210> 62  
<211> 9

**PE1734049**

- 57 -

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 62

Glu Glu Phe Gly Gln Ala Phe Ser Phe  
1 5

<210> 63  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 63

Val Glu Ala Ile Phe Ser Lys Tyr  
1 5

<210> 64  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 64

Asp Glu Arg Thr Phe His Ile Phe Tyr  
1 5

<210> 65  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 65

Thr Glu Lys Val Leu Ala Ala Val Tyr  
1 5

<210> 66  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 66

Val Glu Ser Pro Leu Ser Val Ser Phe  
1 5

<210> 67  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 67

**PE1734049**

- 58 -

Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln Trp  
1 5 10

<210> 68  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 68

Asp Glu Gly Lys Val Ile Arg Phe  
1 5

<210> 69  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 69

Ala Leu Ala Ala Val Val Thr Glu Val  
1 5

<210> 70  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 70

Thr Leu Ile Glu Asp Ile Leu Gly Val  
1 5

<210> 71  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 71

Ala Leu Phe Gly Ala Leu Phe Leu Ala  
1 5

<210> 72  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 72

Val Leu Ala Thr Leu Val Leu Leu Leu  
1 5

<210> 73  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 73

Thr Leu Asp Asp Leu Ile Ala Ala Val  
1 5

<210> 74  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 74

Tyr Leu Asp Asn Gly Val Val Phe Val  
1 5

<210> 75  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 75

Ser Val Phe Ala Gly Val Val Gly Val  
1 5

<210> 76  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 76

Ser Leu Ile Asn Val Gly Leu Ile Ser Val  
1 5 10

<210> 77  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 77

Ala Leu Ala Asp Gly Val Gln Lys Val  
1 5

<210> 78  
<211> 9  
<212> PRT

**PE1734049**

- 60 -

<213> Homo sapiens

<400> 78

Thr Tyr Gly Glu Ile Phe Glu Lys Phe  
1 5

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Tyr Tyr Met Ile Gly Glu Gln Lys Phe  
1 5

<210> 80

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

<400> 80

Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu  
1 5 10

<210> 81<211> 9<212> PRT<213> Humanes Immundefizienz Virus

<400> 81

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val  
1 5

Lisboa, 15 de Dezembro de 2008

**REIVINDICAÇÕES**

1. Peptídeo associado a tumores com a sequência de aminoácidos SVASTITGV (SEQ ID No. 2), sendo que este peptídeo possui a capacidade de se unir com uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade humano (MHC) da classe I.

2. Peptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de que um aminoácido tenha sido substituído por um outro aminoácido com características similares.

3. Peptídeo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que no terminal N e/ou C há mais um aminoácido.

4. Peptídeo de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que um aminoácido tenha sido detectado.

5. Peptídeo de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que no mínimo um aminoácido tenha sido modificado quimicamente.

6. Utilização do peptídeo de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, para fabricação de um remédio para o tratamento de doenças tumorais e/ou doenças adenomatosas.

7. Utilização do peptídeo de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, para fabricação de uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças tumorais e/ou doenças adenomatosas.

8. Utilização de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizada pelo fato de incluir o cancro renal, o cancro mamário, o cancro de pâncreas, cancro do estômago, o cancro vesicular e/ou o cancro de testículo.

9. Utilização de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizada pelo fato de que o peptídeo é utilizado com um excipiente.

10. Utilização de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizada pelo fato de que o peptídeo é utilizado de modo unido com uma célula que apresenta抗génios.

11. Utilização do peptídeo de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, para a fabricação de um anticorpo.

12. Composição farmacêutica contendo o peptídeo de acordo com uma das reivindicações 1 a 5.

13. Molécula de ácido nucleico, codificando o peptídeo de acordo com uma das reivindicações 1 a 5.

14. Vector abrangendo a molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 13.

15. Célula que foi alterada geneticamente com a ajuda da molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 13 ou com ajuda do vector de acordo com a reivindicação 14, de tal modo que a célula alterada produz um peptídeo de acordo com uma das reivindicações 1 a 5.

Lisboa, 15 de Dezembro de 2008

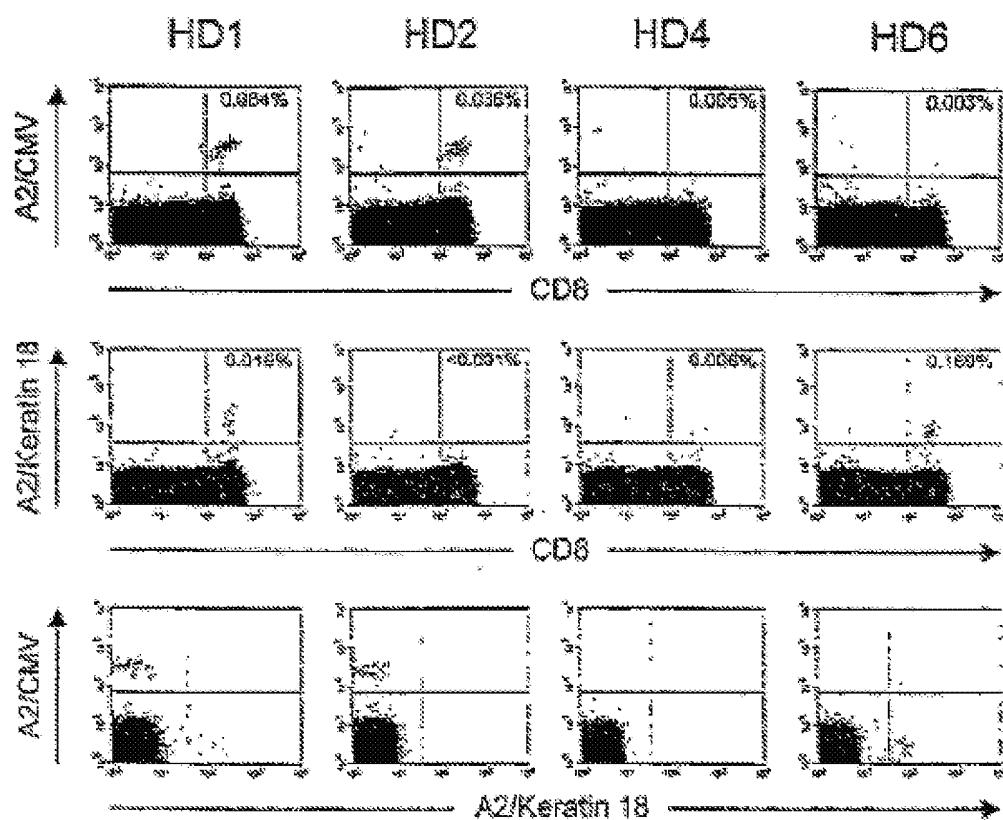
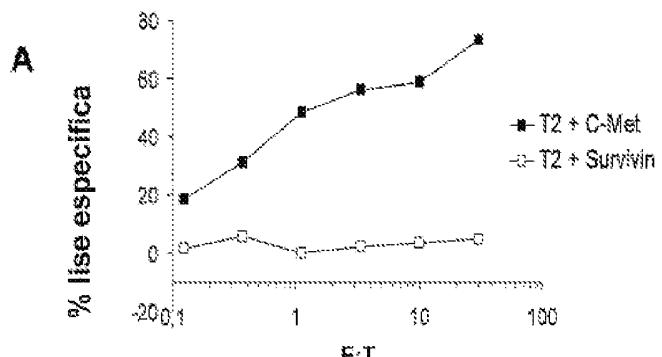
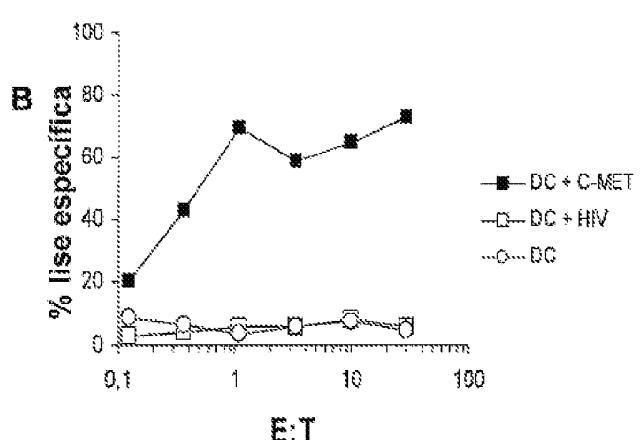
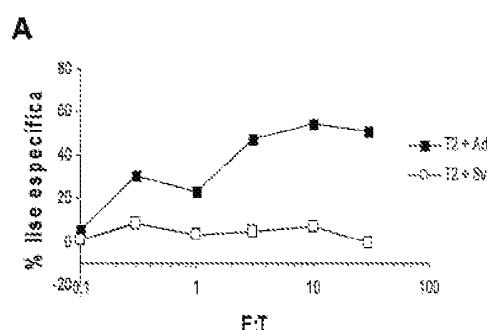
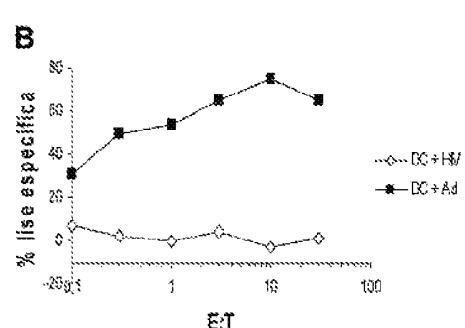
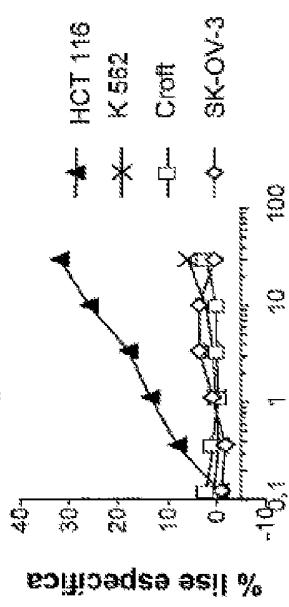
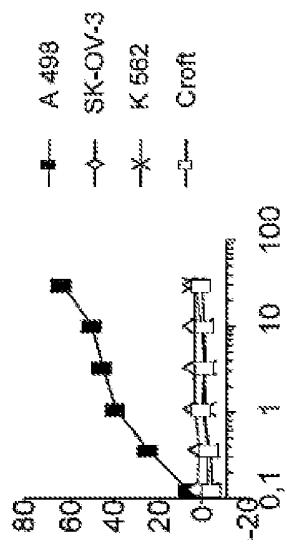
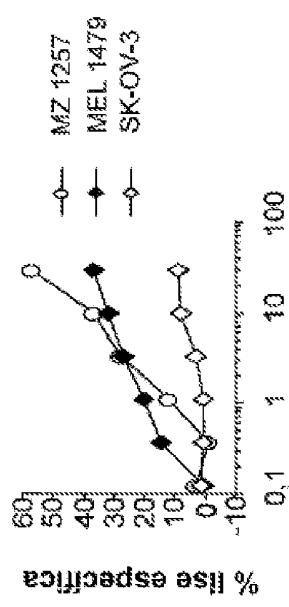
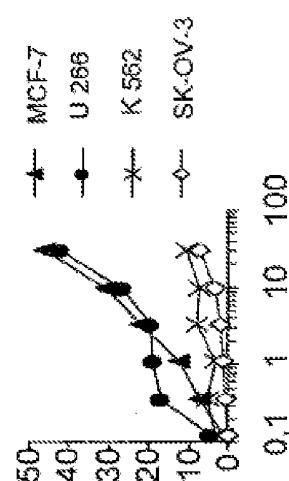
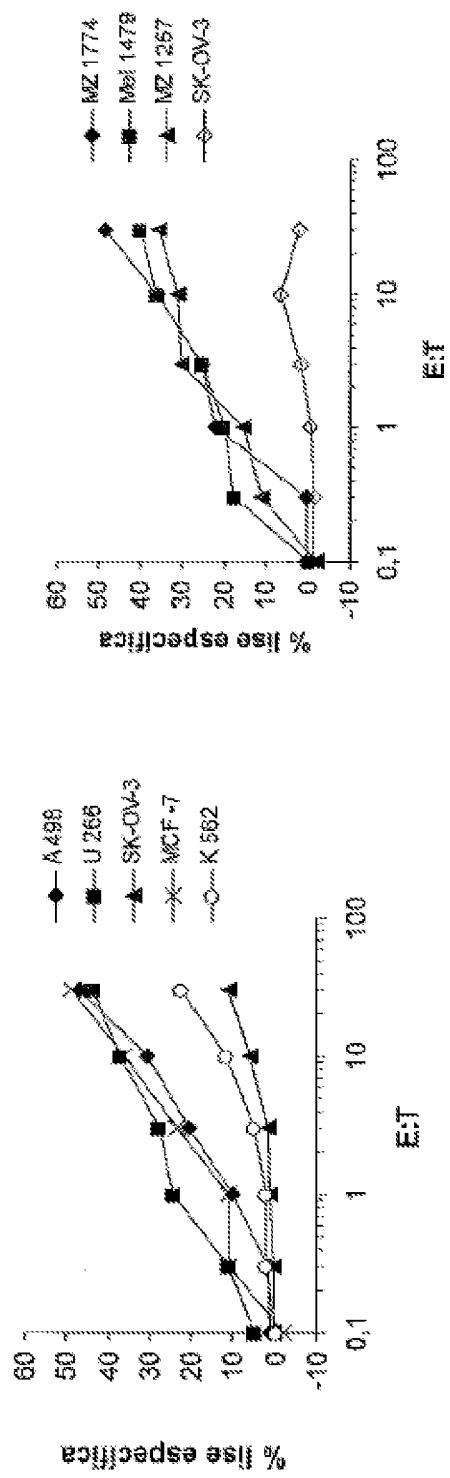


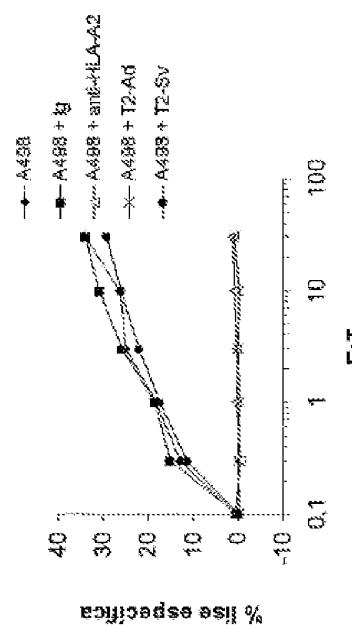
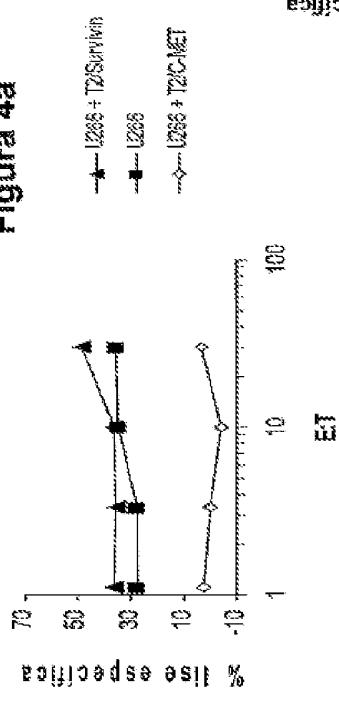
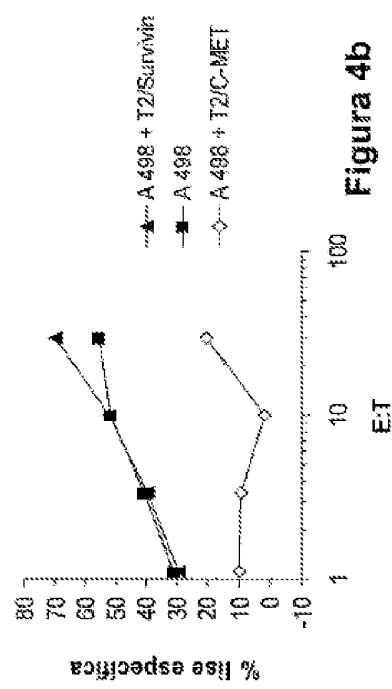
Figura 1

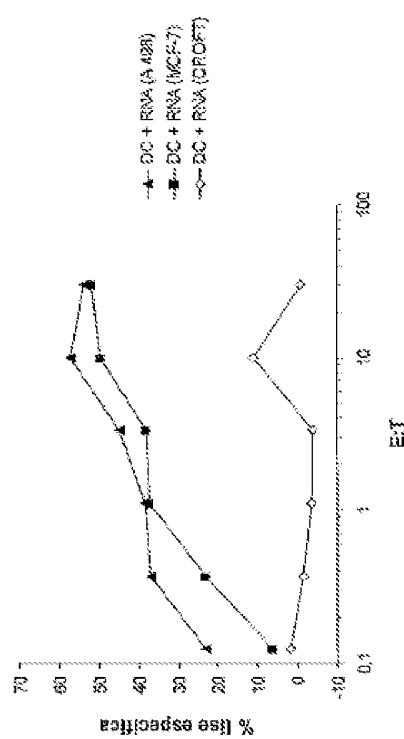
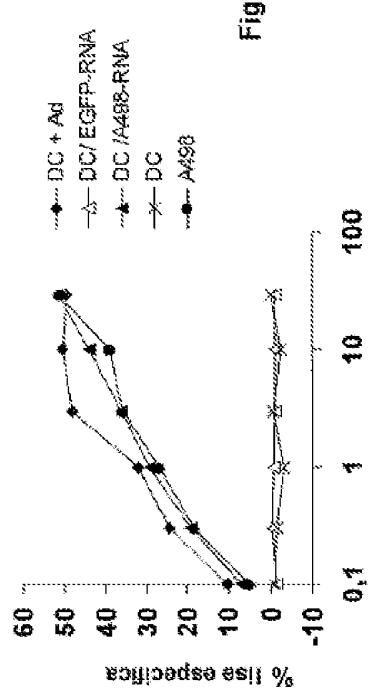
**Figura 2 a****Figura 2 b****Figura 2c****Figura 2d**

**Figura 3a****Figura 3b****Figura 3c****Figura 3d**

**Figura 3d**



**Figura 4a****Figura 4c****Figura 4b**

**Figura 5a****Figura 5b**

E:T

PE1734049

7/7

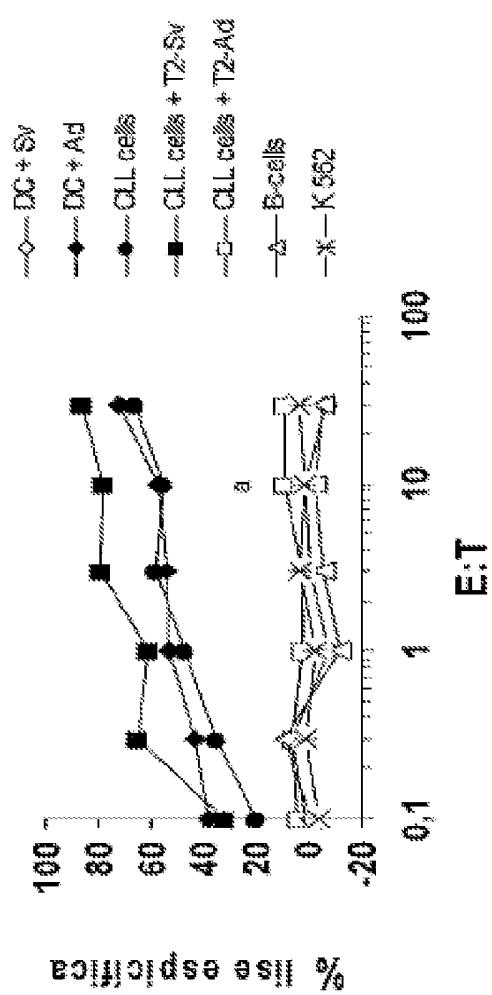


Figura 6

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

**Literatura que não é de patentes citada na Descrição**

- \* HEINZEL et al. The self peptide annexin II (208 - 223) presented by dendritic cells sensitizes autologous CD4+ T lymphocytes to recognize melanoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2001, vol. 49, 671-678
- \* YOUNG et al. Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. *Am. J. Pathol.*, 2001, vol. 168, 1639-1651
- \* TAKAHASHI et al. Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, vol. 98, 9754-9749
- \* TIGHE et al. Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. *Immuno. Today*, 1998, vol. 19 (2), 89-97
- \* MELIEF et al. Peptide-based cancer vaccines. *Curr. Opin. Immunol.*, 1996, vol. 8, 651-657
- \* *Methods Enzymol.*, 1986, 121
- \* A. KIRBEE. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press, 2000
- \* SCHIRLE, M. et al. Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *European Journal of Immunology*, 2000, vol. 30, 2216-2225
- \* BARNSTABLE, C.J. et al. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cas.*, 1978, vol. 14, 9-20
- \* PARHAM, P.; BRODSKY, F.M. Partial purification and some properties of BB7.2, A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28. *Hum. Immunol.*, 1981, vol. 3, 277-288
- \* SCHIRLE, M. et al. Identification of tumor-associated MHC class I Ligands by a novel T cell-independent approach. *European Journal of Immunology*, 2000, vol. 30, 2216-2225
- \* PHD. Harvard Apparatus, Inc, 2000
- \* HEINZEL et al. The self peptide annexin II (208 - 223) presented by dendritic cells sensitizes autologous CD4+ T lymphocytes to recognize melanoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2001, vol. 49, 671-678