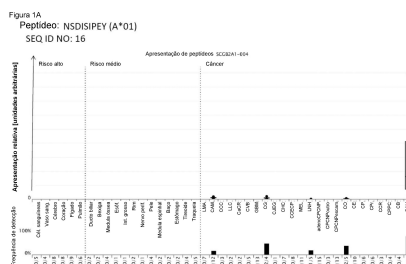


* R R 1 1 2 0 2 1 0 0 3 5 1 1 A 2 7

(43) Data da Publicação Nacional: 18/05/2021

(57) Resumo: PEPTÍDEO, ANTICORPO, RECEPTOR DE CÉLULA T, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO IN VITRO DE PRODUÇÃO DE LINFÓCITOS, LINFÓCITO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE UM PEPTÍDEO E KIT. A presente invenção refere-se a peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos e células para utilização em métodos de imunoterapia. Mais especificamente, a presente invenção refere-se à imunoterapia do câncer. A presente invenção refere-se também a epítopos de peptídeos obtidos de células T associadas a tumores, isoladamente ou combinados com outros peptídeos associados a tumores, que podem, por exemplo, atuar como ingredientes farmacêuticos ativos de composições vacinais que estimulam respostas imunes antitumorais ou que estimulam células T ex vivo, que são depois transferidas a pacientes. Peptídeos, quer ligados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), quer peptídeos como tal, também podem ser alvos de anticorpos, de receptores de células T solúveis e de outras moléculas ligantes.



**“PEPTÍDEO, ANTICORPO, RECEPTOR DE CÉLULA T, CÉLULA
HOSPEDEIRA, MÉTODO IN VITRO DE PRODUÇÃO DE LINFÓCITOS,
LINFÓCITO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODOS DE PRODUÇÃO
DE UM PEPTÍDEO E KIT”**

[001] A presente invenção refere-se a peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos e células para utilização em métodos de imunoterapia. Mais especificamente, a presente invenção refere-se à imunoterapia do câncer. A presente invenção refere-se também a epítopos de peptídeos obtidos de células T associadas a tumores, isoladamente ou combinados com outros peptídeos associados a tumores, que podem, por exemplo, atuar como ingredientes farmacêuticos ativos de composições vacinais que estimulam respostas imunes antitumorais ou que estimulam células T *ex vivo*, que são depois transferidas a pacientes. Peptídeos, quer ligados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), quer peptídeos como tal, também podem ser alvos de anticorpos, de receptores de células T solúveis e de outras moléculas ligantes.

[002] A presente invenção refere-se a diversas novas sequências peptídicas e a variantes das mesmas, ambas derivadas de moléculas de HLA classe I de células tumorais humanas, que podem ser utilizadas em composições vacinais para produzir respostas imunes antitumorais ou como alvos para o desenvolvimento de compostos e células com atividade imunofarmacêutica.

ASPECTOS GERAIS DA INVENÇÃO

[003] Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer foi uma das doenças não transmissíveis mais letais do mundo em 2012. Naquele ano, os cânceres colorretal, de mama e do trato respiratório estiveram entre as dez principais causas de morte em países de renda elevada.

[004] Epidemiologia

[005] Estima-se que, em 2012, houve 14,1 milhões de casos

novos, 32,6 milhões de pacientes com câncer (diagnosticado havia menos de 5 anos) e 8,2 milhões de óbitos por câncer no mundo inteiro (Bray et al., 2013; Ferlay et al., 2013).

[006] Nos grupos formados por câncer cerebral, leucemia e câncer de pulmão, a presente invenção é focada especificamente em glioblastoma (GBM), leucemia linfocítica crônica (LLC), leucemia mieloide aguda (LMA), câncer de pulmão de células não-pequenas ou de pequenas células (CPCNP e CPPC), respectivamente.

[007] O GBM é o tumor maligno mais comum do sistema nervoso central. Nos Estados Unidos, sua incidência ajustada para a idade é de 3,19 por 100.000 habitantes. O prognóstico do GBM é péssimo, com sobrevida de 35% em 1 ano e menos de 5% em 5 anos. Parecem ser fatores de risco para GBM o sexo masculino, idade avançada e etnia(Thakkar et al., 2014).

[008] A LLC é a leucemia mais comum no Ocidente, onde compreende cerca de um terço de todas as leucemias. As taxas de incidência são semelhantes nos EUA e na Europa, e estima-se que haja cerca de 16.000 casos novos por ano. A LLC é mais comum em brancos que em negros, mais rara em hispânicos e descendentes de índios americanos e ainda mais rara em asiáticos. Em indivíduos de origem asiática, a incidência de LLC é três vezes menor que em brancos(Gunawardana et al., 2008). A sobrevida geral em cinco anos de pacientes com LLC é de cerca de 79%.

[009] A LMA é a segunda leucemia mais comum, tanto em adultos como em crianças. Nos Estados Unidos, estima-se que haja cerca de 21.000 novos casos por ano. A sobrevida geral em cinco anos de pacientes com LMA é de aproximadamente 25%.

[010] O câncer de pulmão é o tipo de câncer mais comum do mundo e a principal causa de óbito em vários países. A doença é subdividida em câncer de pulmão de pequenas células e de células não-pequenas. O CPCNP

pode ser de um dos seguintes tipos histológicos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de grandes células. Esses tumores correspondem a cerca de 85% do câncer de pulmão nos Estados Unidos. A incidência de CPCNP se correlaciona com a prevalência de tabagismo (pregresso ou ativo), e a sobrevida em cinco anos da doença foi descrita como 15%(Molina et al., 2008; World Cancer Report, 2014).

[011] Como o tratamento do câncer é dispendioso e produz graves efeitos colaterais, existe uma necessidade de identificação de fatores que possam ser empregados no tratamento do câncer em geral e em particular de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma. Outra necessidade é a de identificar fatores que sirvam como biomarcadores de câncer em geral, e em particular de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma, em indivíduos com o alelo A*01.

[012] A imunoterapia é uma modalidade que age sobre antígenos associados a tumores existentes e serve como opção que age especificamente sobre as células tumorais e, ao mesmo tempo, minimiza os efeitos colaterais.

[013] A classificação atual de antígenos associados a tumores (AATs) compreende os seguintes grupos principais:

[014] a) Antígenos câncer/testículo: Os primeiros AATs reconhecíveis por células T a serem identificados pertencem a essa classe, que foi denominada inicialmente antígenos câncer/testículo (CT) porque seus membros são expressos em tumores humanos histologicamente diferentes ao passo que, em tecidos normais, ocorrem apenas em espermátócitos e espermatogônias nos testículos e, ocasionalmente, na placenta. Como as células testiculares não expressam moléculas de HLA classe I e II, esses antígenos não podem ser reconhecidos pelas células T em tecidos normais e podem, portanto, ser considerados imunologicamente específicos para o tumor. Alguns exemplos bem conhecidos de antígenos CT são os membros da família MAGE e o NY-ESO-1.

[015] b) Antígenos de diferenciação: Estes AATs são compartilhados por tumores e pelos tecidos normais dos quais o tumor se originou, e a maioria dos antígenos de diferenciação conhecidos se concentram em melanomas e em melanócitos normais. Muitas dessas proteínas relacionadas à linhagem melanocitária participam da biossíntese da melanina e, portanto, não são específicas para tumores, embora sejam amplamente utilizadas para imunoterapia do câncer. Alguns exemplos são, sem limitação, tirosinase e Melan-A/MART-1 em melanoma e PSA em câncer de próstata.

[016] c) AATs sobreexpressos: Os genes que codificam AATs amplamente expressos foram detectados tanto em tumores de diversos tipos histológicos como em muitos tecidos normais, geralmente com níveis de expressão mais baixos. É possível que muitos dos epítomos processados e que

podem ser apresentados por tecidos normais estejam abaixo do limiar para reconhecimento por células T, ao passo que sua sobreexpressão em células tumorais pode desencadear uma resposta anticâncer ao quebrar a tolerância estabelecida anteriormente. Alguns exemplos conhecidos dessa classe de AAT são o Her-2/neu, a survivina e a telomerase ou WT1.

[017] d) Antígenos específicos para tumores: Estes AATs únicos se originam de mutações de genes normais (p.ex. β -catenina, CDK4, etc.). Algumas dessas alterações moleculares estão associadas a transformação e/ou progressão neoplásica. Os antígenos específicos para tumores são geralmente capazes de induzir fortes respostas imunológicas sem criar risco de reações imunes contra tecidos normais. Por outro lado, esses AATs são, na maioria dos casos, relevantes apenas ao tumor específico em que foram identificados e geralmente não são compartilhados por vários tumores individuais. Um peptídeo também pode ser específico para tumores (ou associado a tumores) se for originário de um éxon presente em (ou associado a) um tumor no caso de proteínas com isoformas específicas para (ou associadas a) tumores.

[018] e) AATs originários de modificações pós-traducionais anormais: Esses AATs podem se originar de proteínas que não são nem específicas nem sobreexpressas em tumores, mas mesmo assim tornam-se associadas a tumores por processos pós-traducionais que atuam primariamente em tumores. Alguns exemplos dessa classe surgem de alterações de padrões de glicosilação, que produzem novos epítomos em tumores como no MUC1 ou eventos como splicing de proteínas durante a degradação, que podem ou não ser específicos para tumores.

[019] f) Proteínas oncovirais: Esses AATs são proteínas virais que podem desempenhar um importante papel no processo oncogênico e, por serem exógenas (não humanas), podem induzir respostas de células T. São exemplos destas proteínas as proteínas E6 e E7 do papilomavírus humano tipo 16, que

são expressas no carcinoma de colo do útero.

[020] A imunoterapia baseada em células T age contra epítomos peptídicos derivados de proteínas associadas a ou específicas para tumores, que são apresentadas por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Os antígenos reconhecidos por linfócitos T específicos para tumores, ou seja, epítomos dos mesmos, podem ser moléculas derivadas de todas as classes de proteínas, como enzimas, receptores, fatores de transcrição, etc., que são expressas e normalmente apresentam regulação positiva em células do tumor em comparação com células inalteradas da mesma origem.

[021] As moléculas de MHC podem ser de duas classes: MHC classe I e MHC classe II. As moléculas de MHC classe I consistem em uma cadeia pesada alfa e em uma beta-2 microglobulina, As moléculas de MHC classe II consistem em uma cadeia alfa e outra beta. Sua conformação tridimensional produz um sulco de ligação, que é empregado para interação não-covalente com peptídeos.

[022] As moléculas de MHC classe I são encontradas na maioria das células nucleadas. Elas apresentam peptídeos derivados da clivagem proteolítica de proteínas predominantemente endógenas, produtos ribossômicos defeituosos (DRIPs, “defective ribosomal products”) e peptídeos maiores. Entretanto, os peptídeos derivados de compartimentos endossômicos ou de fontes exógenas também são frequentemente encontrados em moléculas de MHC classe I. Na literatura, essa apresentação não-clássica de MHC classe I é denominada apresentação cruzada (Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). As moléculas de MHC classe II são encontradas predominantemente em células apresentadoras de antígenos (CAA) “profissionais” e apresentam sobretudo peptídeos de proteínas exógenas ou de proteínas transmembrana, que são captadas pelas CAA, p.ex., durante a endocitose e depois processadas.

[023] Os complexos formados por peptídeos e MHC classe I são reconhecidos por células T CD8-positivas que apresentam o receptor de célula (TCR) apropriado, ao passo que complexos de peptídeos com moléculas de MHC classe II são reconhecidos por células T auxiliares CD4-positivas que apresentam o TCR apropriado. É bem-sabido que, em razão dessa configuração o TCR, o peptídeo e o MHC estão presentes em proporções estequiométricas 1:1:1.

[024] As células T auxiliares CD4-positivas desempenham um importante papel em induzir e manter respostas eficazes de células T citotóxicas CD8-positivas. A identificação de epítomos CD4-positivos de células T derivados de antígenos associados a tumores (AAT) é de grande importância para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos que visam a desencadear respostas imunes antitumorais (Gnjatic et al., 2003). No sítio do tumor, as células T auxiliares suportam um meio com células T citotóxicas propício para LTC(Mortara et al., 2006) e atraem células efetoras como, p.ex., LTCs, células “natural killer” (NK), macrófagos e granulócitos(Hwang et al., 2007).

[025] Na ausência de inflamação, a expressão de moléculas de MHC classe II restringe-se basicamente a células do sistema imune, especialmente células apresentadoras de antígenos (APC) profissionais, como monócitos, células derivadas de monócitos, macrófagos e células dendríticas. Em pacientes com câncer, constatou-se que as células tumorais expressam moléculas de MHC classe II(Dengjel et al., 2006).

[026] Os peptídeos longos (prolongados) da invenção podem atuar como epítomos ativos de MHC classe II.

[027] As células T auxiliares ativadas por epítomos do MHC classe II desempenham um importante papel em orquestrar a função efetora de LTC na imunidade antitumoral. Os epítomos de células T auxiliares que desencadeiam a resposta de células T auxiliares do tipo TH1 auxiliam as

funções efectoras de células T killer CD8-positivas, incluindo funções citotóxicas dirigidas contra células tumorais cujas superfícies apresentam complexos de peptídeos associados a tumor com MHC. Desse modo, os epítomos peptídicos em células T auxiliares associadas a tumores podem, isoladamente ou em associação com outros peptídeos associados a tumores, atuar como ingredientes farmacêuticos ativos de composições vacinais que estimulam respostas imunes antitumorais.

[028] Mostrou-se em modelos animais mamíferos (p.ex. camundongos) que, mesmo na ausência de linfócitos T CD8-positivos, as células T CD4-positivas são suficientes para inibir a manifestação de tumores por meio da inibição da angiogênese mediada pela secreção de interferon gama (IFN γ) (Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999). Algumas evidências indicam que as células T CD4 exercem efeitos antitumorais diretos (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

[029] Como a expressão constitutiva de moléculas de HLA classe II é geralmente limitada a células imunológicas, a possibilidade de isolar peptídeos de classe II diretamente de tumores primários era considerada implausível. Entretanto, Dengjel et al. conseguiram identificar uma série de epítomos de MHC classe II diretamente em tumores (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).

[030] Como ambos os tipos de resposta (a dependente de CD4 e a dependente de CD8) contribuem conjunta e sinergisticamente para o efeito antitumoral, a identificação e caracterização de antígenos associados a tumores reconhecidos tanto por células T CD8+ (cujo ligante é a molécula de MHC classe I e seu epítomo peptídico) como por células T auxiliares CD4-positivas (cujo ligante é a molécula de MHC classe II e seu epítomo peptídico) são importantes para o desenvolvimento de vacinas antitumorais.

[031] Para que um peptídeo de MHC classe I possa desencadear

(provocar) uma resposta imune celular, ele precisa ligar-se a uma molécula de MHC. O processo depende do alelo da molécula de MHC e de polimorfismos específicos da sequência de aminoácidos do peptídeo. Os peptídeos ligantes de MHC classe I geralmente possuem 8 a 12 resíduos de aminoácidos de comprimento e geralmente contêm dois resíduos conservados (“âncoras”) em suas sequências que interagem com o sulco de ligação correspondente da molécula de MHC. Dessa forma, cada alelo de MHC possui um “motivo de ligação” que determina quais peptídeos podem se ligar especificamente ao sulco de ligação.

[032] Nas reações imunes dependentes do MHC classe I, os peptídeos precisam tanto ser capazes de se ligarem a certas moléculas de MHC classe I expressas em células tumorais como serem posteriormente reconhecidos por células T que apresentam receptores de células T (TCR) específicos.

[033] Para as proteínas serem reconhecidas pelos linfócitos T como antígenos específicos para ou associados a tumores, e serem usadas como tratamentos, alguns pré-requisitos precisam ser atendidos. O antígeno deve ser expresso sobretudo por células tumorais e ser expresso relativamente pouco ou nada por tecidos normais saudáveis. Em uma configuração preferida, o peptídeo deve ser apresentado de maneira exacerbada pelas células tumorais em comparação com os tecidos normais. Ademais, é desejável também que o respectivo antígeno esteja presente apenas em um determinado tipo de tumor, mas também em concentrações elevadas (i.é., números de cópias do respectivo peptídeo por célula). Os antígenos específicos para ou associados a tumores são frequentemente derivados de proteínas que participam diretamente da transformação de uma célula normal em uma célula tumoral devido à sua função; p.ex. controle do ciclo celular ou supressão da apoptose. Além disso, alvos distais da proteína que causa diretamente a transformação podem apresentar

regulação positiva e, portanto, associarem-se indiretamente ao tumor. Tais antígenos associados indiretamente a tumores também podem ser alvos de abordagens vacinais (Singh-Jasuja et al., 2004). É essencial que os epítomos estejam presentes na sequência de aminoácidos do antígeno para garantir que o peptídeo (“peptídeo imunogênico”), que é derivado de um antígeno associado a tumor, produza uma resposta de células T *in vivo* ou *in vitro*.

[034] Basicamente, qualquer peptídeo capaz de se ligar a uma molécula de MHC pode funcionar como epítipo de célula T. Um pré-requisito para indução de resposta de células T *in vitro* ou *in vivo* é a presença de uma célula T com um TCR correspondente e ausência de tolerância imunológica para o epítipo em questão.

[035] Portanto, os AATs servem como ponto de partida para desenvolver tratamentos à base de células T, incluindo, entre outros, vacinas antitumorais. Os métodos utilizados para identificar e caracterizar os AATs normalmente se baseiam na utilização de células T, que podem ser isoladas de pacientes ou de indivíduos saudáveis ou baseadas na geração de perfis diferentes de transcrição ou de expressão peptídica em tumores e em tecidos normais. Entretanto, a identificação de genes sobreexpressos em tecidos tumorais ou em linhagens de tumores humanos ou expressos seletivamente em tais tecidos ou linhagens celulares não proporciona informações precisas sobre a utilização dos antígenos que são transcritos a partir desses genes em imunoterapia. Isso ocorre porque apenas uma determinada subpopulação de epítomos desses antígenos é apropriada para tal aplicação, pois uma célula T com um TCR correspondente precisa estar presente e é preciso que haja pouca ou nenhuma tolerância imunológica ao epítipo em questão. Portanto, é importante, em uma configuração bastante preferida da invenção, selecionar apenas peptídeos sobreexpressos ou apresentados seletivamente contra os quais se possa encontrar células T funcionais e/ou em proliferação. Tais células T

funcionais são definidas como células T que, quando estimuladas por um antígeno específico, podem se expandir de forma clonal e são capazes de executar funções efectoras (“célula T efetora”).

[036] No caso de TCRs específicos contra complexos peptídeo-MHC (p.ex. TCRs solúveis) e anticorpos ou outras moléculas ligantes (suportes) de acordo com a invenção, a imunogenicidade dos peptídeos subjacentes é secundária. Nesses casos, o fator determinante é a apresentação.

[037] Em um primeiro aspecto da presente invenção, a mesma refere-se a um peptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo formado por SEQ N° 1 a SEQ N° 398 ou a uma sequência variante dos mesmos com pelo menos 77% de homologia, e preferivelmente pelo menos 88% de homologia (preferivelmente pelo menos 77% ou pelo menos 88% idêntica) com SEQ N° 1 a SEQ N° 398, caracterizada pelo fato de que a referida variante se liga ao MHC e/ou induz reação cruzada de células T com o referido peptídeo, ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas no qual o referido peptídeo não corresponde ao polipeptídeo completo original.

[038] A presente invenção refere-se também a um peptídeo da presente invenção que compreende uma sequência selecionada do grupo formado por SEQ N° 1 a SEQ N° 398 ou uma variante das mesmas que seja pelo menos 77%, e preferivelmente pelo menos 88%, homóloga (preferivelmente pelo menos 77% ou pelo menos 88% idêntica) a SEQ N° 1 a SEQ N° 398, sendo que cada um dos peptídeos referidos ou variantes dos mesmos possui comprimento total de 8 a 100, preferivelmente de 8 a 30 e, o mais preferido, de 8 a 14 aminoácidos.

[039] As tabelas a seguir mostram os peptídeos de acordo com a presente invenção, seus respectivos números de SEQ e os genes que podem originá-los (genes subjacentes). Na Tabela 1, os peptídeos com SEQ N° 1 a SEQ N° 385 se ligam ao HLA-A*01. Os peptídeos da Tabela foram revelados

anteriormente em grandes listas geradas por triagens de alto rendimento, mas com altas taxas de erro, ou calculados por algoritmos mas nenhum deles havia sido associado com câncer até agora. Na Tabela 2, os peptídeos com SEQ N° 386 a SEQ N° 398 se ligam ao HLA-A*01. Os peptídeos na Tabela são peptídeos adicionais que podem ser úteis em associação com outros peptídeos da invenção. Na Tabela 3, os peptídeos com SEQ N° 399 a SEQ N° 431 se ligam ao HLA-A*01.

[040] Tabela 1: Peptídeos de acordo com a presente invenção.

N° SEQ	Sequência	Gene(s)	Alótipo de HLA
1	TLDSTRTLY	TRPM8	A*01
2	VDPIGHLY	MAGEA3	A*01
3	FGTTPAAEYF	SLC6A3	A*01
4	RIEAIRAEY	TRIM51,TRIM51EP,TRIM51GP,TRIM51HP	A*01
5	FMVIAGMPLFY	SLC6A3	A*01
6	ARDPITFSF	UMODL1	A*01
7	ASDDVRIEVGLY	UMODL1	A*01
8	TSRAANIPGY	C7orf72	A*01
9	QLDSTLDSY	CYP4Z1,CYP4Z2P	A*01
10	VSERTGISY	ITIH6	A*01
11	ASDHWRGRY	SLC45A3	A*01
12	YTDFVGEGLY	SLC45A3	A*01
13	NTHTGTRPY	CTCFL	A*01
14	QSEKEPGQQY	RHOXF2,RHOXF2B	A*01
15	YLDSSKPAVY	ESR1	A*01
16	NSDISIPEY	SCGB2A1	A*01
17	ASWAVLCYY	ANO7	A*01
18	RSDPVSLRY	COL20A1	A*01
19	LTEGHSGNY	FCRL5	A*01
20	LSAQHRMLA	EML6	A*01
21	LSSAVNPIIY	NMUR2	A*01
22	VMDTLGLFY	TRPM8	A*01
23	DTDPLKAAGL	SOX14	A*01
24	NLDHYTNAY	GLYATL3	A*01
25	AMMQEAQLAY	SOX1	A*01
26	ASDDFRSKY	KRT34,LOC100653049	A*01
27	PSEVPVDSHY	LOXL4	A*01
28	PSEVPVDSHYY	LOXL4	A*01
29	TLEDLDNLYNY	EPYC	A*01
30	VTTDKPRAY	ITIH6	A*01

Nº SEQ	Sequência	Gene(s)	Alótipo de HLA
31	VSDHLQAGMLGQY	HEPHL1	A*01
32	GTDKQNSTLRY	HMCN1	A*01
33	SMDPVTGYQY	PAX3	A*01
34	SSWSAGENDSY	HRNR	A*01
35	SWSAGENDSYS	HRNR	A*01
36	MTSTEQSLY	GREB1	A*01
37	MTSTEQSLYY	GREB1	A*01
38	KWSQSSSLMY	F5	A*01
39	WSQSSSLMY	F5	A*01
40	TSDQLGYSY	DCT	A*01
41	HSDLLEDISKY	NAT1	A*01
42	ASDVDTLK	PTPRZ1	A*01
43	ETEPERHLGSY	NKX3-1	A*01
44	IPSFNEMVY	PTPRZ1	A*01
45	NLDPNKIY	STK31	A*01
46	RSDPGGGGLAYAA	MEX3B	A*01
47	WSDGVPLLY	BCAN	A*01
48	FTTQDELLVY	SEMG2	A*01
49	GSFSIQHTY	SEMG2	A*01
50	ITDEDEDMLSY	TSPY1,TSPY10,TSPY2,TSPY3,TSPY4,TSPY8,TSPY9P	A*01
51	STEERRLNY	SEMG2	A*01
52	TTQDELLVY	SEMG2	A*01
53	YLEDRLSQLY	LOXL4	A*01
54	EVDIHTIHY	HEPHL1	A*01
55	ATEGDVLNY	COL19A1	A*01
56	VTEYAEIYQY	CCNA1	A*01
57	ASDPASSTSCY	CYP1A1	A*01
58	YLENSASWY	DLX5	A*01
59	FTDSQGNDIK	SLC45A2	A*01
60	MTEKFLFLY	ERVV-1,ERVV-2	A*01
61	SSDIVALGGFLY	KLHDC7B	A*01
62	VSELVTTGHY	VCAN	A*01
63	TSEISQNALMY	ROS1	A*01
64	TSEISQNALMY	ROS1	A*01
65	SSDFDPLVY	RNF43,SUPT4H1	A*01
66	IATVIQLFY	HAS2,HAS3	A*01
67	NVDQNQNSY	HMCN1	A*01
68	QSLPEFGLTY	FERMT1	A*01
69	QSLPEFGLTY	FERMT1	A*01
70	YTELVEEKY	CAPN6	A*01
71	LTDSTTRTTY	MUC3A	A*01
72	VDSTTKIAY	LOC101060740	A*01
73	STDSASY	APOB	A*01

Nº SEQ	Sequência	Gene(s)	Alótipo de HLA
74	EMEQQSQEY	KRT13,KRT16	A*01
75	FTDYELKAY	ABCB11	A*01
76	QTDVERIKDTY	LAMA3	A*01
77	FTSDTGLEY	DNMT3B	A*01
78	QLDSAVKNLY	ZNF215	A*01
79	ASDLEPRELLSY	PCDHGB1	A*01
80	ELCPLPGTSAY	FBN3	A*01
81	YSDLHTPGRY	PTCHD4	A*01
82	LTEKSHIRY	C8orf48	A*01
83	DTEFHGGLHY	LOC100124692	A*01
84	ESEMIKFASY	ABCB11	A*01
85	SSDNYEHWLY	SFMBT1	A*01
86	VDPASNTY	MAGEA4	A*01
87	AFDDIATYF	SSX1	A*01/ C*04
88	KEVDPAGHSYI	MAGEA8,MAGEA9,MAGEA9B	A*01/ B*49
89	EVYDGREHSAY	MAGEA1	A*01/ A*25
90	YEDHFPLLF	MAGEA10	A*01/ B*18
91	CLVLVIVLLY	SLC6A3	A*01
92	TTDDTTAMASAS	MAGEA10	A*01
93	HLKILSPIY	UMODL1	A*01
94	KPSAVKDSIY	MMP26	A*01/ A*26
95	SSDPKAVMF	MMP12	A*01/ C*05
96	TATLLIVRY	UMODL1	A*01
97	FPAPPAHWFY	CYP4Z1,CYP4Z2P	A*01
98	NFSDLVFTY	SOX11	A*01/ A*29
99	AADSNPSEL	RLN1	A*01/ C*05
100	TTSSAISWILY	CYP4Z1	A*01
101	SITDVDFIY	DNAH8	A*01
102	STIRGELFF	MMP11	A*01/ B*57
103	ITDTLIHLM	ESR1	A*01/ C*05
104	ITDTLIHL	ESR1	A*01/ C*05
105	VVFDKSDLAKY	SLC45A3	A*01/ A*29
106	EVVEGKEWGSFY	NPSR1	A*01/ A*26

Nº SEQ	Sequência	Gene(s)	Alótipo de HLA
107	TTENSGNYY	FCRL5	A*01
108	NSNLKFLEV	NLRP7	A*01
109	ISEDKSISF	LOC100996718,OR9G1,OR9G9	A*01/ B*15
110	IGDKVDAVY	MMP13	A*01
111	TPIPFDKILY	COL10A1	A*01/ B*35
112	KASSVSAEDGY	TTC6	A*01/ B*57
113	ASCRSSAEY	LAMC2	A*01
114	AVAAAAGASLY	MSX1	A*01
115	NEIDIHSIYFY	HEPHL1	A*01/ B*18
116	RSDIGEFEW	FAM111B	A*01/ B*58
117	SPAKQFNIY	FAM111B	A*01/ B*35
118	LTWAHSAKY	LOXL4	A*01
119	TVFDENLSRY	HEPHL1	A*01/ C*12
120	LVDENQSWY	HEPHL1	A*01
121	SADEAHGLL	NFE2L3	A*01/ C*05
122	ISEAPLTEV	SLC45A2	A*01/ C*08
123	LLKAKDILY	ACSM1	A*01
124	FLKVTGYDKDDY	HMCN1	A*01
125	FQYELRELY	HMCN1	A*01/ B*15
126	TTDPKKFQY	HMCN1	A*01
127	VPFNLITEY	SLC45A2	A*01/ B*35
128	YTEFVDATFTK	HEPHL1	A*01
129	STIDFRAGF	HMCN1	A*01/ B*57
130	YIGLKGLYF	SLC45A2	A*01/ A*23
131	LEDGIEQSAY	G2E3	A*01
132	RTHIGYKVY	HMCN1	A*01
133	ITDVGPNGY	LOXL4	A*01
134	SAPSSSGSPLY	T	A*01
135	TFDKQIVLL	F5	A*01/ C*04
136	RRLNFSGFGY	ASCL1	A*01/ B*27
137	EAYLERIGY	NAT1,NAT2	A*01/ B*15

Nº SEQ	Sequência	Gene(s)	Alótipo de HLA
138	IPVHDSVGVITY	PTPRZ1	A*01/ B*35
139	PVHDSVGVITY	PTPRZ1	A*01
140	SQHIFTVSY	PTPRZ1	A*01/ B*15
141	DAVAPGREY	F5	A*01/ B*35
142	IEKFAVLY	PTPRZ1	A*01/ B*18
143	HVSGQMLYF	PGR	A*01/ A*29
144	RTIEGDFLW	BCAN	A*01/ A*32
145	LSDAVHVEF	FCRL3	A*01/ C*05
146	LCATVCGTEQY	MMP16	A*01
147	AQVQDTGRY	HMCN1	A*01
148	GTKQVWHARY	FCER2	A*01/ A*30
149	PIMSSSQALY	HMCN1	A*01
150	FTTSLDLQTNMA	MEIOB	A*01
151	YEVDTKLLSL	MEIOB	A*01
152	YLEDRLPSQ	LOXL4	A*01
153	HSIEVFTHY	LOXL4	A*01
154	SIEVFTHY	LOXL4	A*01
155	HTMEVTVY	PMEL	A*01/ B*15
156	STALSILL	BCAN	A*01
157	GLIEVVTGY	IGF1R	A*01/ B*15
158	EVTDRNMLAF	TRPS1	A*01/ A*25
159	RQAPGPARDY	KRT13,KRT17	A*01/ B*15
160	EVLGEEMYAY	LOC101060117,TTC6	A*01
161	EAAPDIMHY	GREB1	A*01/ B*35
162	IADNPQLSFY	ABCC11	A*01
163	KIRAEVLSHY	RALGPS2	A*01/ A*30
164	KLAGTVFQY	ADAMTS12	A*01
165	VSVYNSYPY	NKX3-1	A*01
166	YHRICELSDY	POTEE,POTEF	A*01
167	RAVQPGETY	F5	A*01/ B*15
168	VQPGETYTY	F5	A*01/ B*35

Nº SEQ	Sequência	Gene(s)	Alótipo de HLA
169	TVDNANILL	JUP,KRT13,KRT17	A*01/ C*05
170	VQIAKGMNY	EGFR	A*01/ B*15
171	ITDFGLAKL	EGFR	A*01/ C*05
172	FSEPFHLIV	FCRLA	A*01/ C*12
173	QSTTGVSHY	VCAN	A*01
174	TSEVEGLAFVSY	VCAN	A*01
175	GLEYEAPKLY	DNMT3B	A*01
176	HTDLESPSAVY	BTBD16	A*01
177	LVDGKWQEF	BTBD16	A*01
178	TQRTSFQFY	ROS1	A*01/ B*15
179	SSTDFTFASW	FERMT1	A*01/ A*25
180	AQISDTGRY	HMCN1	A*01
181	SVTDLIGGKW	HTR7,HTR7P1	A*01/ B*57
182	TQPELSSRY	ADAMTS12	A*01/ B*15
183	LADTDLGMTF	OR51B4	A*01/ C*12
184	KTIQEVAGY	EGFR	A*01/ B*57
185	NSDESADSEPHKY	PRDM15	A*01
186	AVSSGLFFY	CTLA4	A*01/ A*29
187	TQKSVQVLAY	PTPRZ1	A*01/ B*15
188	DIPDYLLQY	ELL3	A*01/ A*26
189	FRGVFVHRY	STAG3	A*01/ C*07
190	VSSTVHNLY	GREB1	A*01/ B*57
191	FTRAFDQLRM	TKTL2	A*01/ A*26
192	LAFYYGMY	SLC7A11	A*01/ B*15
193	SQNGQLIHY	SLC5A4	A*01
194	CYTADNEMGY	ROS1	A*01
195	YTADNEMGY	ROS1	A*01
196	RLAQYTIERY	GABRP	A*01/ B*15
197	NDEIDKLTGY	PDE11A	A*01

Nº SEQ	Sequência	Gene(s)	Alótipo de HLA
198	KLTDYINANY	PTPRZ1	A*01/ B*15
199	LCAAVLAKY	UGT1A3,UGT1A5	A*01
200	SLPEFGLTY	FERMT1	A*01/ B*15
201	SLPEFGLTTY	FERMT1	A*01/ B*46
202	QTDINGGSLK	GPR143	A*01
203	LSQDELSKF	NLRP2,PYDC2	A*01
204	NVKEAPTEY	BTLA	A*01/ C*12
205	RMQEGSEVY	BTLA	A*01/ B*15
206	RVFVAVTLY	ABCC4	A*01/ B*15
207	LLEGEDAHLTQY	JUP,KRT13,KRT17	A*01
208	LLISKAEDY	IGF1R	A*01/ B*35
209	EADPFLKYL	CCNA1	A*01/ B*35
210	LLEADPFLKY	CCNA1	A*01
211	YLNEWGSRF	CDH3	A*01
212	MMTDLTSVY	LOC101060622,MUC3A	A*01/ A*29
213	VSDSTTEITY	MUC3A	A*01
214	VQDPSLPVY	SOX30	A*01
215	DTLEAATSLY	PLEKHG4B	A*01
216	NSMLDPLVY	HCAR1	A*01
217	LMDEGAVLTL	L1TD1	A*01/ C*17
218	FTAQLQLY	ROS1	A*01
219	KTELETALYY	GOLGA6L2	A*01
220	DVERIKDTY	LAMA3	A*01
221	TDVERIKDTY	LAMA3	A*01
222	GSPDAVVSY	MAGEB6	A*01/ B*35
223	NAVDRVPSF	NLRP2	A*01
224	RTDEGDNRVW	LY6K	A*01/ B*57
225	STDPNIVRK	TAF7L	A*01/ A*11
226	QITPKHNGLY	PSG11	A*01/ B*15
227	ESAPKEVSRY	PDE10A	A*01/ A*26
228	KSFDDIAKY	SSX7	A*01/ B*15

Nº SEQ	Sequência	Gene(s)	Alótipo de HLA
229	MTDVFIDY	ABCB11	A*01
230	CVIETFHKY	TCHHL1	A*01
231	LLPLLVMAY	CXCR3	A*01
232	RYLNIVHATQLY	CXCR3	A*01
233	RINSATGQY	CLNK	A*01/ A*30
234	YTDLTTIQV	LRRC15	A*01
235	SIEIDHTQY	MYH4	A*01
236	VLDSLLAQY	IGF2BP1	A*01
237	AQEAAVFLTY	DNAH8	A*01
238	ETDWGLLKGHY	CAPN6	A*01
239	SSERGSPIEKY	TRPS1	A*01
240	EVLDSLLAQY	IGF2BP1	A*01/ A*25
241	SLMVASLTY	TNFSF4	A*01/ B*15
242	GTNLPTLLW	CDKAL1	A*01/ B*57
243	LTSEDGAY	CDKAL1	A*01
244	VTKYIAGPY	PSG4,PSG5,PSG6,PSG7,PSG9	A*01
245	LSDNAANRY	MED12L	A*01
246	ARLEGEIATY	KRT36	A*01
247	SMIRVGTTY	RCOR2	A*01/ B*15
248	VTIDELGK	CDK6	A*01
249	GVGFTELEY	C9orf57	A*01
250	GYVCNACGLY	TRPS1	A*01
251	GIEMTYETY	SYCP2	A*01
252	DTTSHTYLQY	ADCY8	A*01/ A*25
253	YLESHGLAY	CPA5	A*01
254	FLFNDALLY	FGD6	A*01/ A*29
255	WELDSLEY	KIF26B	A*01
256	HAFESNNFIY	MET	A*01/ B*35
257	KSEMNVNMKY	MET	A*01
258	RPSSVLTIIY	SLC44A5	A*01/ B*15
259	APDEVVALL	KLHL35	A*01
260	KPTEDSANVY	DCC	A*01
261	MTEGSTVNTEY	TEX15	A*01
262	NVKHFLNDLY	TEX15	A*01
263	DCMDTEGSYM	FBN3	A*01
264	YRDPVVFVSL	CYP2W1	A*01/ B*39

Nº SEQ	Sequência	Gene(s)	Alótipo de HLA
265	LSDIDSRVI	PRAMEF20,PRAMEF21	A*01
266	LTDSFLLRF	TTPA	A*01/ B*57
267	IVADDTVY	ADAM7	A*01
268	AILHHLYFY	ABCC4	A*01/ A*29
269	LPSPAATIWDY	MACC1	A*01/ B*35
270	DLKIDLAAQY	DNAH17	A*01/ A*25
271	VAEPPVCSY	LOC730110,ZNF492,ZNF98	A*01
272	IPQDECLRY	PRAMEF1,PRAMEF13,PRAMEF14,PRAMEF2	A*01
273	CGPNEINHFI	OR5M8	A*01
274	YADIHGDLI	PARD6B	A*01/ C*05
275	ESDEMENLLTY	SERHL,SERHL2	A*01
276	QITSFASGTSY	MED12L	A*01
277	LPAPGFLFY	GDPGP1	A*01/ B*35
278	AATVKSDIY	TEX14	A*01
279	LMTVLLKY	SLC16A14	A*01
280	TTEMVSNESVDY	MET	A*01
281	YPDLSSELLM	NUP155	A*01/ B*35
282	QAMPSWPTAAY	NRG3	A*01
283	ETILVSSSY	SLC10A5	A*01
284	TCSHTFVYY	VWDE	A*01
285	VLPFHSEGACVY	FRAS1	A*01/ B*15
286	ATDMEGNLNY	CDH4	A*01
287	ENSIEDLQY	CCDC83	A*01
288	TEEKFVSY	TSPEAR	A*01
289	YTSHEDIGY	SLC16A14	A*01
290	GQFTGTAGACRY	WT1	A*01/ B*15
291	TSDVTGSLTY	GPR31	A*01
292	VLDFAPPGASAY	WT1	A*01
293	IISVLIAIY	SLC6A5	A*01
294	MMEMEGMY	DNAH8	A*01
295	GQRLDEAMISY	MYO3B	A*01/ B*15
296	HMLAAMAY	OR8G1,OR8G2,OR8G5	A*01
297	RLDEAMISY	MYO3B	A*01
298	KFDVINHYF	OR8G5	A*01
299	EVDSVALSL	VRTN	A*01
300	VSINPNSGDIY	PCDH19	A*01

Nº SEQ	Sequência	Gene(s)	Alótipo de HLA
301	ESQTCASDY	DCBLD1	A*01
302	FYLSTPENYHY	MYO10	A*01/ A*29
303	GFGGLSSQGVYY	NKX6-3	A*01
304	FSENLITYI	MYO1H	A*01
305	YADLLITYY	MYO3B	A*01
306	KSFETTVRY	FMN1	A*01/ C*12
307	DTDDRELRY	FREM2	A*01
308	ELAAGQVVY	FREM2	A*01/ B*18
309	EVDRNLIQY	FREM2	A*01
310	KAFQELGVRY	FREM2	A*01/ B*57
311	TVTDGHTDFY	FREM2,FREM3	A*01
312	VTDGINPLI	FREM2	A*01
313	VTDGHTDFY	FREM2,FREM3	A*01
314	PPEANSLQGALY	DBX2	A*01
315	VLKIELETY	CCDC6	A*01/ B*15
316	YTCEECGQAF	ZNF479,ZNF679,ZNF727,ZNF733P,ZNF734P	A*01
317	EDLLEVLDY	KCNH7	A*01/ B*18
318	YMTSMALNY	ITGAE	A*01
319	FTDPHIITF	VWDE	A*01/ C*04
320	QALQDKLQTFY	VWDE	A*01
321	DGIADASNLSYY	LOC100124692,LOC93432	A*01
322	FSELNPLALY	TDRD5	A*01
323	KTLQKPVLPY	DNMBP	A*01/ A*30
324	RTGIFPYRF	DNMBP	A*01/ B*57
325	LQKPVLPY	DNMBP	A*01/ B*15
326	STSRLTLFS	DMXL1	A*01
327	IMLSVDQHLY	RAPGEF5	A*01
328	LLDEDNNIKL	HUNK	A*01
329	NTDSMTLNNTAY	EFCAB5	A*01
330	EGELSEGEHWY	ZNF827	A*01
331	YLYQAPGSLALY	IRX2	A*01
332	SLISFKYTSY	FRAS1	A*01
333	LSDPQAEQLFY	PCDHGB6	A*01
334	PSSMPECLSY	SOX30	A*01
335	PSSMPECLSY	SOX30	A*01
336	ATNIQLNIDTY	CCDC175	A*01

Nº SEQ	Sequência	Gene(s)	Alótipo de HLA
337	FTESNQYNIY	FSTL4	A*01
338	YSPDSFNVSW	USH2A	A*01
339	ESMDIFPLGW	SFMBT1	A*01/ A*25
340	SVDSNLVAY	DMXL1	A*01
341	PANYLGKMTY	ARHGEF38	A*01/ B*15
342	QTYMDGLLHY	LAMA3	A*01/ B*15
343	YFGNYFTYY	C5orf34	A*01
344	AVNALQSVY	CPA6	A*01/ B*15
345	NTMDAVPRIDHY	SLC12A2	A*01
346	VAGLEAGVLY	UMODL1	A*01
347	SADHPGLTF	FREM2	A*01/ C*05
348	DSTDGCLLSF	TBC1D16	A*01
349	HLLSVSLYY	OR5AC2,OR5H14,OR5H2,OR5H6	A*01
350	LTDPQVSYV	FARP2	A*01
351	VLDPMLDFY	FAM46D	A*01
352	YPVVVAESMY	FAM46D	A*01
353	RLNGSVASY	FAM46D	A*01
354	EIIRYIFAY	HPGDS	A*01/ A*26
355	MADRGEARL	RMI2	A*01/ C*04
356	NSENHILKY	C12orf56	A*01
357	MSPDIALLYL	OVCH1	A*01
358	YMSPDIALLY	OVCH1	A*01
359	NKEINYFMY	ADCY10	A*01/ A*32
360	RFDDINQEF	DNAH17	A*01/ C*04
361	FTAEEGQLY	AR	A*01
362	SGALDEAAAY	AR	A*01
363	LTDRDVSFY	MROH2B	A*01
364	DTGYLQLYY	STON2	A*01
365	FVDTKVPEH	ABCC12	A*01
366	ITVDVRDEF	STON2	A*01/ B*57
367	LTDGTYLQLY	STON2	A*01
368	ESAATGQLDY	TNR	A*01
369	AVMEAAFVY	TXNDC16	A*01/ A*29
370	RLSTIRHLY	MXRA5	A*01/ A*32

Nº SEQ	Sequência	Gene(s)	Alótipo de HLA
371	WSDSTSQTIY	SH3PXD2A	A*01
372	SRSDFEWVY	DEGS2	A*01/ C*07
373	FHADSDDES F	CDCA7	A*01/ B*38
374	LTSVVVTLW	CDK6	A*01/ B*57
375	ASSLDSLHY	PTPRT	A*01
376	EDDEDEDLY	HSD17B4	A*01
377	YADPSANRDLL	ST8SIA5	A*01/ B*35
378	TAKAPSTEY	GALNT5	A*01/ B*15
379	SLIIDDTEY	FSIP2	A*01/ B*35
380	VACGNNPVY	FSIP2	A*01/ B*15
381	ETSFSTSHY	NRG1	A*01/ A*26
382	YEPATMEQY	MYO10	A*01
383	PPDHAVGRTKY	GCNT2	A*01
384	RFRSITQSY Y	RAB30	A*01/ A*30
385	SANALILTY	RAB30	A*01/ B*35

[041] Tabela 2: Outros peptídeos de acordo com a presente invenção que não apresentavam associação prévia conhecida com câncer.

Nº SEQ	Sequência	Gene(s)	Alótipo de HLA
386	NSALNPLLY	KISS1R	A*01
387	LMEKEDYHSLY	TYR, TYRL	A*01
388	YTAHVGYSMY	MSX1	A*01
389	YYDLVESTF	DNTT	A*01
390	FSEPFHLIVSY	FCRLA	A*01
391	GSNPARYEF	MAGEA4	A*01/ B*57
392	TQHFVQENY	MAGEA3	A*01/ B*15
393	QVWGGQPVY	PMEL	A*01/ B*35
394	QVPLDCVLY	PMEL	A*01
395	ILKGGSGTY	PMEL	A*01/ B*15
396	LPDPNVQKY	PRDM15	A*01/ C*04
397	NSAINPLIY	NPSR1	A*01
398	YYYDTHNTY	SLC12A2	A*01/ C*14

Tabela 3: Peptídeos úteis para, p.ex., tratamentos anticâncer personalizados.

Nº SEQ	Sequência	Gene(s)	Alótipo de HLA
399	YVGKEHMFY	MAGEA9,MAGEA9B	A*01
400	NTDNNLAVY	CXorf61	A*01
401	VWSNVTPPKF	MMP12	A*01
402	VLYPVPLESY	PRAME	A*01
403	SADDIRGIQSLY	MMP12	A*01
404	FVDNQYWRV	MMP12	A*01
405	STDIGALMY	MMP1	A*01
406	SDVTPLTF	MMP11	A*01
407	VSIRNTLLY	FLT3	A*01
408	VWSDVTPLTF	MMP11	A*01
409	YTFRYPLSL	MMP11	A*01
410	KTWAHCMSY	KISS1R	A*01
411	LLDAEPPILY	ESR1	A*01
412	AAAANAQVY	ESR1	A*01
413	TDTLIHLM	ESR1	A*01
414	LTEGHSGNYY	FCRL5	A*01
415	VWSDVTPLNF	MMP13	A*01
416	LSSPVHLDF	FCRL5	A*01
417	KLDRSVFTAY	FAM111B	A*01
418	LLDEGAMLLY	NLRP7	A*01
419	FPTEVTPHAF	PTPRZ1	A*01
420	VTDLEMPHY	PTPRZ1	A*01
421	RSDPGGGGLA	MEX3B	A*01

Nº SEQ	Sequência	Gene(s)	Alótipo de HLA
	Y		
422	ALNPYQYQY	DLX5	A*01
423	LLDEGAKLLY	NLRP2	A*01
424	NVDPVQHTY	AGRN	A*01
425	VTEEPQRLFY	BMF	A*01
426	RSFNGLLTMY	LAMB3	A*01
427	LTDYINANY	PTPRZ1	A*01
428	IINESLLFY	GPR143	A*01
429	VSDSECLSR Y	LAMA1	A*01
430	NTDPTAPPY	CDH3	A*01
431	ASSTDSASY Y	APOB	A*01
432	LQSSGLTLL	MSLNL	A*01

[042] Como se pode ver nas tabelas anteriores, muitos dos peptídeos preferidos da invenção possuem, surpreendentemente, capacidade de ligação a pelo menos dois alótipos de HLA. Especificamente, isso permite estender a aplicabilidade desses peptídeos.

[043] A presente invenção refere-se também aos peptídeos de acordo com a presente invenção para uso no tratamento de doenças proliferativas como o câncer, incluindo, por exemplo, carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio

uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma.

[044] São particularmente preferidos, isoladamente ou em combinações, os peptídeos de acordo com a presente invenção selecionados do grupo formado por SEQ N° 1 a SEQ N° 398. Os peptídeos mais preferidos são aqueles, isoladamente ou em associações, selecionados do grupo formado por SEQ N° 1 a SEQ N° 21 (ver Tabela) e uso dos mesmos na imunoterapia de câncer colorretal, câncer do endométrio uterino, câncer de esôfago, câncer gástrico, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de pâncreas, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer da vesícula biliar, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma colangiocelular, carcinoma hepatocelular, glioblastoma, melanoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda e linfoma não-Hodgkin e, preferivelmente, de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma.

[045] Portanto, outro aspecto da presente invenção se refere ao uso dos peptídeos de acordo com a presente invenção, preferivelmente combinados, para tratamento de doenças proliferativas selecionadas do grupo formado por carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de

células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma.

[046] A presente invenção refere-se também aos peptídeos de acordo com a presente invenção que possuem a capacidade de se ligarem a uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano classe I ou, em uma forma alongada, a uma variante de comprimento diferente do MHC classe II.

[047] A presente invenção refere-se também aos peptídeos de acordo com a presente invenção, onde cada um de tais peptídeos consiste ou consiste principalmente em uma sequência de aminoácidos de acordo com SEQ N° 1 a SEQ N° 398.

[048] A presente invenção refere-se também aos peptídeos de acordo com a presente invenção nos quais os referidos peptídeos são modificados e/ou incluem ligações não-peptídicas.

[049] A presente invenção refere-se também aos peptídeos de acordo com a presente invenção, nos quais os referidos peptídeos constituem parte de uma proteína de fusão, em particular fusão com aminoácidos N-terminais da cadeia invariante associada ao antígeno do HLA-DR (Ii) ou fundido a (ou incorporado à sequência de) um anticorpo, tal como, por exemplo, um anticorpo específico para células dendríticas.

[050] A presente invenção refere-se também a um ácido nucleico que codifica os peptídeos de acordo com a presente invenção. A presente

invenção refere-se também ao ácido nucleico de acordo com a presente invenção que consista em DNA, cDNA, PNA, RNA ou combinações destes.

[051] A presente invenção refere-se também a um vetor de expressão capaz de expressar e/ou que expresse um ácido nucleico de acordo com a presente invenção.

[052] A presente invenção refere-se também a um peptídeo de acordo com a presente invenção, um ácido nucleico de acordo com a presente invenção ou um vetor de expressão de acordo com a presente invenção para emprego no tratamento de doenças e em medicina, em especial para o tratamento de câncer.

[053] A presente invenção refere-se também aos anticorpos específicos contra os peptídeos de acordo com a presente invenção ou complexos de tais peptídeos de acordo com a presente invenção com MHC e métodos para produzi-los.

[054] A presente invenção refere-se ainda a receptores de células T (TCR, "T-cell receptors") e em particular a TCRs solúveis (sTCR) e a TCRs clonados introduzidos por engenharia genética em células T autólogas ou alogênicas, assim como a métodos de produzi-las, além de células NK ou outras células que apresentam o referido TCR ou que participem de reações cruzadas com os referidos TCRs.

[055] Os anticorpos e os TCRs são configurações adicionais do uso imunoterapêutico dos peptídeos de acordo com a invenção ora em pauta.

[056] A presente invenção refere-se também a células hospedeiras que compreendem um ácido nucleico de acordo com a presente invenção ou um vetor de expressão conforme descrito anteriormente. A presente invenção refere-se também as células hospedeiras de acordo com a presente invenção, que são células apresentadoras de antígenos e, preferivelmente, células dendríticas.

[057] A presente invenção refere-se também a um método de produção de um peptídeo de acordo com a presente invenção, sendo que o referido método compreende o cultivo da célula hospedeira de acordo com a presente invenção e o isolamento do peptídeo da referida célula hospedeira ou do respectivo meio de cultura.

[058] A presente invenção refere-se também ao referido método de acordo com a presente invenção, sendo que o antígeno é carregado em moléculas de MHC classe I ou II expressas na superfície de uma célula apresentadora de antígenos apropriada ou de uma célula apresentadora de antígenos artificial colocando-se uma quantidade suficiente do antígeno em contato com uma célula apresentadora de antígenos.

[059] A presente invenção refere-se também a um método de acordo com a presente invenção, no qual a célula apresentadora de antígenos compreende um vetor de expressão capaz de expressão ou expressar o referido peptídeo contendo SEQ Nº 1 a SEQ Nº 398, preferivelmente contendo SEQ Nº 1 a SEQ Nº 21 ou uma sequências de aminoácidos variante.

[060] A presente invenção refere-se também a células T ativadas produzidas de acordo com o método da presente invenção, sendo que as referidas células T reconhecem seletivamente células que expressam um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos de acordo com a presente invenção.

[061] A presente invenção refere-se também a um método para destruir células-alvo em um paciente no qual as células-alvo apresentam expressão aberrante de um polipeptídeo que compreende qualquer sequência de aminoácidos de acordo com a presente invenção, sendo que o método compreende a administração ao paciente de um número eficaz de células T produzidas de acordo com a presente invenção.

[062] A presente invenção refere-se também ao uso de qualquer

peptídeo conforme descrito, ao ácido nucleico de acordo com a presente invenção, ao vetor de expressão de acordo com a presente invenção, à célula de acordo com a presente invenção, ao linfócito T ativado, ao receptor de célula T ou ao anticorpo ou a outro peptídeo e/ou a moléculas ligantes de peptídeo e MHC de acordo com a presente invenção como medicamento ou para fabricação de um medicamento. Preferivelmente, o medicamento possui atividade anticâncer.

[063] Preferivelmente, o referido medicamento destina-se a terapia celular, uma vacina ou proteína à base de um TCR solúvel ou anticorpo.

[064] A presente invenção se refere também a uma aplicação de acordo com a presente invenção, na qual as referidas células de câncer são de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma e, preferivelmente, células de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma.

[065] A presente invenção refere-se também aos biomarcadores baseados nos peptídeos de acordo com a presente invenção, doravante denominados “alvos”, para uso no diagnóstico de câncer, preferivelmente carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma. O marcador pode ser a sobreapresentação do(s) peptídeo(s) em si ou a sobreexpressão do(s) gene(s) correspondente(s). Os marcadores também podem ser empregados para prever a possibilidade de sucesso de um determinado tratamento, preferivelmente uma imunoterapia, sendo mais preferida uma imunoterapia que atue sobre os alvos identificados pelo biomarcador. Pode-se, por exemplo, usar um anticorpo ou TCR solúvel para corar cortes de um tumor para detectar um peptídeo relevante em complexo com MHC.

[066] Opcionalmente, o anticorpo exerce outra função efetora, como um domínio de estimulação imunológica ou uma toxina.

[067] A presente invenção refere-se também ao uso desses novos alvos no âmbito do tratamento do câncer.

[068] A estimulação de uma resposta imune depende da presença de antígenos reconhecidos como estranhos pelo sistema imune do hospedeiro. A descoberta da existência de antígenos associados a tumores levantou a possibilidade de usar o sistema imune do hospedeiro para intervir no crescimento tumoral. Vários mecanismos para acionar tanto a imunidade humoral como a

celular vêm sendo explorados para imunoterapia do câncer.

[069] Alguns elementos específicos da resposta imune celular são capazes de reconhecer e destruir especificamente células tumorais. O isolamento de células T de populações de células infiltrantes de tumor ou do sangue periférico sugere que tais células podem desempenhar um papel importante nas defesas imunes naturais contra o câncer. Em particular, as células T CD8-positivas capazes de reconhecer moléculas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), que normalmente possuem 8 a 10 resíduos de aminoácidos derivados de proteínas ou proteínas produtos de defeitos ribossômicos (DRIPS, “defect ribosomal products”) localizadas no citossol, desempenham um papel importante nessa resposta. As moléculas de MHC humanas também são designadas antígenos leucocitários humanos (HLA, “human leucocyte antigen”).

[070] Conforme aqui utilizados, e exceto onde indicado o contrário, todos os termos são definidos conforme segue.

[071] O termo “resposta de célula T” significa a proliferação específica e a ativação das funções efetoras induzidas por peptídeos *in vitro* ou *in vivo*. No caso de células T citotóxicas restritas por MHC classe I, as funções efetoras podem consistir em lise de células alvo que foram pulsadas com peptídeos ou com precursores de peptídeos ou que apresentam os peptídeos naturalmente; em secreção de citocinas induzida por peptídeos, preferivelmente interferon-gama, TNF- α ou IL-2; em secreção induzida por peptídeos de moléculas efetoras, preferivelmente granzimas ou perforinas; ou em desgranulação.

[072] O termo “peptídeo” é aqui utilizado para designar uma série de resíduos de aminoácidos conectados uns aos outros, tipicamente por ligações peptídicas entre os grupamentos alfa-amino e carbonila de aminoácidos adjacentes. Preferivelmente, os peptídeos possuem 9 aminoácidos de

comprimento mas podem ter apenas 8 aminoácidos de comprimento ou até 10, 11, 12, 13 ou 14 ou mais; os peptídeos de MHC classe II (variantes alongadas dos peptídeos da invenção) podem ter comprimento de até 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais aminoácidos de comprimento.

[073] O termo “peptídeo” designa também sais de uma série de resíduos de aminoácidos conectados uns aos outros, tipicamente por ligações peptídicas entre os grupamentos alfa-amino e carbonila de aminoácidos adjacentes. Preferivelmente, tais sais são sais farmacologicamente aceitáveis de peptídeos como, por exemplo, sais de cloreto ou acetato (trifluoracetato). Cabe notar que os sais dos peptídeos de acordo com a presente invenção diferem substancialmente dos peptídeos em seu estado *in vivo*, pois esses peptídeos não se apresentam como sais *in vivo*.

[074] O termo “peptídeo” abrange também “oligopeptídeo”. O termo “oligopeptídeo” é aqui utilizado para designar uma série de resíduos de aminoácidos conectados uns aos outros, tipicamente por ligações peptídicas entre os grupamentos alfa-amino e carbonila de aminoácidos adjacentes. O comprimento do oligopeptídeo não é essencial para a invenção, conquanto o epítipo ou epítipos corretos sejam nele mantidos. Os oligopeptídeos tipicamente possuem mais de cerca de 15 e menos de cerca de 30 resíduos de aminoácidos de comprimento.

[075] O termo “polipeptídeo” designa uma série de resíduos de aminoácidos conectados uns aos outros, tipicamente por ligações peptídicas entre os grupamentos alfa-amino e carbonila de aminoácidos adjacentes. O comprimento do polipeptídeo não é essencial para a invenção, conquanto os epítipos corretos sejam nele mantidos. Ao contrário dos termos peptídeo e oligopeptídeo, o termo polipeptídeo designa apenas moléculas com mais de cerca de 30 resíduos de aminoácidos.

[076] Um peptídeo, oligopeptídeo, proteína ou polinucleotídeo

que codifica tal molécula é “imunogênico” (e, portanto, “imunogênico” no escopo da presente invenção) se for capaz de induzir uma resposta imune. No caso da presente invenção, a imunogenicidade é definida mais especificamente como a capacidade de induzir uma resposta de células T. Portanto, um “imunogênio” seria uma molécula capaz de induzir uma resposta imune e, no caso da presente invenção, uma molécula capaz de induzir uma resposta de células T. Em outro aspecto, o imunogênio pode ser o peptídeo, o complexo formado pelo peptídeo com MHC, o oligopeptídeo e/ou proteína empregada para produzir anticorpos específicos ou TCRs contra ele.

[077] Um “epítipo” de células T classe I requer um peptídeo curto ligado a um receptor de MHC classe I formando um complexo ternário (cadeia alfa de MHC classe I, beta-2 microglobulina e peptídeo), que pode ser reconhecido por receptores de células T que se ligam com afinidade apropriada ao complexo de MHC com peptídeo. Os peptídeos que se ligam a moléculas de MHC classe I geralmente possuem 8-14 aminoácidos de comprimento, e mais tipicamente 9 aminoácidos de comprimento.

[078] Em seres humanos, três loci genéticos diferentes codificam as moléculas de MHC classe I. (As moléculas de MHC de seres humanos também são designadas antígenos leucocitários humanos (HLA, “human leukocyte antigens”). O HLA-A, HLA-B e HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 e HLA-B*07 são exemplos de alelos de MHC classe I diferentes que podem ser expressos a partir desses loci.

[079] Tabela 4: Frequências de expressão (F) dos sorotipos de HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 e HLA-B*44. As frequências dos haplótipos (Gf) são derivadas de um estudo que usou dados de tipagem de HLA de um registro com mais de 6,5 milhões de doadores voluntários nos EUA (Gragert et al., 2013). A frequência de haplótipos é a frequência de um alelo distinto em um cromossomo individual. Como as células

mamíferas possuem um conjunto diploide de cromossomos, a frequência de ocorrência genotípica deste alelo será maior e pode ser calculada empregando-se o princípio de Hardy-Weinberg ($F = 1 - (1 - Gf)^2$).

Alelo	População	Fenótipo calculado a partir da frequência de alelos (F)
A*02	Africano (N=28557)	32,3%
	Caucasiana europeia (N=1242890)	49,3%
	Japonesa (N=24582)	42,7%
	Hispanica (América do Sul e Central) (N=146714)	46,1%
	Sudeste Asiático (N=27978)	30,4%
A*01	Africano (N=28557)	10,2%
	Caucasiana europeia (N=1242890)	30,2%
	Japonesa (N=24582)	1,8%
	Hispanica (América do Sul e Central) (N=146714)	14,0%
	Sudeste Asiático (N=27978)	21,0%
A*03	Africano (N=28557)	14,8%
	Caucasiana europeia (N=1242890)	26,4%
	Japonesa (N=24582)	1,8%
	Hispanica (América do Sul e Central) (N=146714)	14,4%
	Sudeste Asiático (N=27978)	10,6%
A*24	Africano (N=28557)	2,0%
	Caucasiana europeia (N=1242890)	8,6%
	Japonesa (N=24582)	35,5%
	Hispanica (América do Sul e Central) (N=146714)	13,6%
	Sudeste Asiático (N=27978)	16,9%
B*07	Africano (N=28557)	14,7%
	Caucasiana europeia (N=1242890)	25,0%
	Japonesa (N=24582)	11,4%
	Hispanica (América do Sul e Central) (N=146714)	12,2%
	Sudeste Asiático (N=27978)	10,4%
B*08	Africano (N=28557)	6,0%
	Caucasiana europeia (N=1242890)	21,6%
	Japonesa (N=24582)	1,0%
	Hispanica (América do Sul e Central)	7,6%

Alelo	População	Fenótipo calculado a partir da frequência de alelos (F)
	(N=146714)	
	Sudeste Asiático (N=27978)	6,2%
B*44	Africano (N=28557)	10,6%
	Caucasiana europeia (N=1242890)	26,9%
	Japonesa (N=24582)	13,0%
	Hispanica (América do Sul e Central) (N=146714)	18,2%
	Sudeste Asiático (N=27978)	13,1%

[080] Os peptídeos da invenção, preferivelmente quando incluídos em uma vacina da invenção conforme aqui descrita, ligam-se a A*01. Uma vacina também pode apresentar ligação a todos os peptídeos de MHC classe II. Portanto, a vacina da invenção pode ser empregada para tratar o câncer em pacientes positivos para A*01, ao passo que nenhuma seleção de alótipos de MHC classe II é necessária porque esses peptídeos se ligam a todos os MHC classe II.

[081] Se os peptídeos A*01 da invenção forem combinados com peptídeos que se ligam a outro alelo (p.ex. A*24), uma porcentagem maior de qualquer população de pacientes poderá ser tratada que com a abordagem de apenas um dos alelos de MHC classe I. Enquanto na maioria das populações menos de 50% dos pacientes poderia ser tratada com qualquer desses alelos isoladamente, uma vacina compreendendo epítomos de HLA-A*02 e HLA-A*24 pode tratar pelo menos 60% dos pacientes em qualquer população relevante. Mais especificamente, os seguintes percentuais de pacientes serão positivos para pelo menos um desses alelos em várias regiões: EUA 61%, Europa Ocidental 62%, China 75%, Coreia do Sul 77%, Japão 86% (porcentagens calculadas a partir de www.allelefrequencies.net).

[082] Tabela 5: Cobertura de alelos de HLA em uma população caucasiana europeia (calculada segundo (Gragert et al., 2013)).

	cobertura (pelo menos um alelo A)	combinado com B*07	combinado com B*44	combinado com B*07 e B*44
A*02 / A*01	70%	78%	78%	84%
A*02 / A*03	68%	76%	76%	83%
A*02 / A*24	61%	71%	71%	80%
A*01 / A*03	52%	64%	65%	75%
A*01 / A*24	44%	58%	59%	71%
A*03 / A*24	40%	55%	56%	69%
A*02 / A*01 / A*03	84%	88%	88%	91%
A*02 / A*01 / A*24	79%	84%	84%	89%
A*02 / A*03 / A*24	77%	82%	83%	88%
A*01 / A*03 / A*24	63%	72%	73%	81%
A*02 / A*01 / A*03 / A*24	90%	92%	93%	95%

[083] Em uma configuração preferida, o termo “sequência de nucleotídeos” refere-se a um heteropolímero de desoxirribonucleotídeos.

[084] A sequência de nucleotídeos que codifica um determinado peptídeo, oligopeptídeo ou polipeptídeo pode ocorrer naturalmente ou ser construída por meios sintéticos. Em geral, os segmentos de DNA que codificam peptídeos, polipeptídeos e proteínas desta invenção são construídos a partir de fragmentos de cDNA e ligantes oligonucleotídeos curtos ou de uma série de oligonucleotídeos de modo a fornecer um gene sintético capaz de ser expresso em uma unidade de transcrição recombinante que compreende elementos regulatórios derivados de um operon microbiano ou viral.

[085] Conforme aqui utilizado, o termo “nucleotídeo codificador [ou que codifica] um peptídeo” refere-se a uma sequência de nucleotídeos que codifica o peptídeo, incluindo códons de início e parada artificiais (produzidos pelo homem) compatíveis com o sistema biológico que será expresso, por exemplo, por uma célula dendrítica ou por outro sistema celular útil para a produção de TCRs.

[086] Conforme aqui utilizadas, referências a uma sequência de ácido nucleico abrangem tanto ácidos nucleicos de fita única como de fita dupla.

Portanto, por exemplo, para DNA, a sequência específica refere-se, salvo indicação em contrário no contexto, ao DNA de fita única de tal sequência, à forma dúplice de tal sequência com o respectivo complemento (DNA de fita dupla) e ao complemento de tal sequência.

[087] O termo “região codificadora” refere-se à porção do gene que, natural ou normalmente, codifica o produto expresso pelo gene em questão em seu ambiente genômico natural, i.é., a região codificadora *in vivo* do produto de expressão nativo do gene em questão.

[088] A região codificadora pode ser derivada de um gene não-mutante (“normal”), mutante ou alterado e pode até mesmo ser derivada de uma sequência de DNA ou gene sintetizado inteiramente em laboratório empregando métodos bem conhecidos dos versados na técnica de síntese de DNA.

[089] O termo “produto de expressão” significa o polipeptídeo ou proteína que é o produto de tradução natural do gene e de quaisquer sequências de ácidos nucleicos que produzam codificação equivalente resultantes da natureza degenerada do código genético produzindo o(s) mesmo(s) aminoácido(s).

[090] O termo “fragmento” significa, quando se refere a uma sequência codificante, uma porção do DNA que compreende menos que a região codificadora completa, cujo produto de expressão retém basicamente a mesma função ou atividade biológica que o produto de expressão da região codificante completa.

[091] O termo “segmento de DNA” refere-se a um polímero de DNA, seja como fragmento separado ou como componente de uma estrutura de DNA maior, derivado do DNA isolado pelo menos uma vez de forma basicamente pura, i.é., livre de materiais contaminantes endógenos e em quantidade ou concentração suficientes para permitir identificação, manipulação e recuperação do segmento e das sequências de nucleotídeos componentes empregando-se

métodos bioquímicos padrão como, por exemplo, um vetor de clonagem. Tais segmentos são fornecidos como um “frame” (matriz) de leitura aberto sem interrupções de sequências internas não traduzidas, denominadas íntrons, que geralmente estão presentes em genes eucarióticos. As sequências de DNA não traduzido podem estar presentes em posição distal à matriz de leitura aberta, onde a mesma não interfere na manipulação nem na expressão das regiões codificantes.

[092] O termo “primer” significa uma sequência curta de ácidos nucleicos que pode ser pareada com uma fita de DNA e fornece uma terminação 3'OH livre na qual a DNA polimerase inicia a síntese de uma cadeia de desoxirribonucleotídeos.

[093] O termo “promotor” significa uma região do DNA envolvida em ligar a RNA polimerase para iniciar a transcrição.

[094] O termo “isolado” significa que o material foi retirado de seu ambiente original (p.ex. o ambiente original em que ocorria naturalmente). Por exemplo, polinucleotídeos que ocorrem na natureza ou que estão presentes em um animal vivo não são considerados isolados, mas o mesmo polinucleotídeo ou polipeptídeo é considerado isolado quando é separado de alguns ou de todos os materiais que com ele coexistem em um sistema natural. Tais polinucleotídeos podem formar parte de um vetor e/ou tais polinucleotídeos ou polipeptídeos podem ser parte de uma composição e mesmo assim ser isolados, mesmo que tal vetor ou composição não seja parte de seu ambiente natural.

[095] Os polinucleotídeos e os polipeptídeos recombinantes ou imunogênicos revelados de acordo com a presente invenção também podem estar em forma “purificada”. O termo “purificado” não requer pureza absoluta; é uma definição relativa e abrange tanto preparações altamente purificadas como preparações apenas parcialmente purificadas, conforme tais termos são compreendidos pelos versados na técnica relevante. Por exemplo, clones

individuais isolados de uma biblioteca de cDNA foram purificados empregando-se técnicas convencionais para se obter homogeneidade eletroforética. A purificação de um material inicial ou de material natural em pelo menos uma ordem de grandeza, e preferivelmente em duas ou três ordens, e mais preferivelmente em quatro a cinco ordens de magnitude é expressamente contemplada. Ademais, o polipeptídeo reivindicado que possui pureza de, preferivelmente 99,999% ou pelo menos 99,99% ou 99,9% e, ainda desejavelmente, 99% por peso ou mais, fica expressamente incluído.

[096] Os ácidos nucleicos e produtos da expressão de polipeptídeos revelados de acordo com a presente invenção, assim com os vetores de expressão que contêm tais ácidos nucleicos e/ou tais polipeptídeos, podem estar presentes em “forma enriquecida”. Conforme aqui utilizado, o termo “enriquecido” significa que a concentração do material é de pelo menos 2, 5, 10, 100 ou 1000 vezes sua concentração natural (por exemplo), vantajosamente 0,01% por peso e preferivelmente pelo menos 0,1% por peso. Preparações enriquecidas de cerca de 0,5%, 1%, 5%, 10% e 20% por peso também são contempladas. As sequências, produtos de construção, vetores, clones e outros materiais que compreendem a presente invenção podem, vantajosamente, estar em forma enriquecida ou isolada. O termo “fragmento ativo” significa um fragmento, normalmente de um peptídeo, polipeptídeo ou sequência de ácido nucleico, que gera uma resposta imune (i.é, possui atividade imunogênica) quando administrado — isolado ou, opcionalmente, com um adjuvante apropriado ou em um vetor — a um animal como um mamífero (p.ex. coelho, camundongo) ou a um ser humano. A resposta imune assume a forma de estimulação da resposta de células T em um animal receptor como, por exemplo, um ser humano. Alternativamente, o “fragmento ativo” também pode ser empregado para induzir uma resposta de células T *in vitro*.

[097] Conforme aqui utilizados, os termos “porção”, “segmento” e

“fragmento” referem-se, quando usados em relação a peptídeos, a uma sequência contínua de resíduos, como resíduos de aminoácidos, que forma um subconjunto de uma sequência maior. Por exemplo, se um polipeptídeo for sujeito a tratamento com qualquer uma das endopeptidases comuns como a tripsina ou a quimotripsina, os oligopeptídeos resultantes de tal tratamento representariam porções, segmentos ou fragmentos do polipeptídeo inicial. Quando utilizados em relação a polinucleotídeos, esses termos referem-se a produtos produzidos pelo tratamento dos referidos nucleotídeos com qualquer uma das endonucleases.

[098] De acordo com a presente invenção, os termos “porcentual de identidade” e “porcentagem de idênticos” significam, quando usados em referência a uma sequência, que uma sequência é comparada com uma sequência reivindicada ou descrita após alinhamento da sequência a ser comparada (“Sequência de Comparação”) com a sequência descrita ou reivindicada (“Sequência de Referência”). O porcentual de identidade é então determinado de acordo com a seguinte fórmula:

$$[099] \text{ Porcentual de identidade} = 100 [1 - (C/R)]$$

[0100] Onde C é o número de diferenças entre a Sequência de Referência e a Sequência de Comparação ao longo do alinhamento entre a Sequência de Referência e a Sequência de Comparação, onde:

[0101] (i) Cada base ou aminoácido da Sequência de Referência que não possui uma base ou aminoácido alinhado correspondente na Sequência de Comparação; e

[0102] (ii) Cada lacuna na sequência; e

[0103] (iii) Cada base ou aminoácido da Sequência de Referência diferente da base ou aminoácido alinhado correspondente na Sequência de Comparação constitui uma diferença; e

[0104] (iv) O alinhamento deve começar na posição 1 das

sequências alinhadas;

[0105] e R é o número de bases ou aminoácidos na Sequência de Referência ao longo do comprimento do alinhamento com a Sequência de Comparação, sendo que quaisquer lacunas criadas na Sequência de Referência também são consideradas como uma base ou aminoácido.

[0106] Se existir um alinhamento entre a Sequência de Comparação e a Sequência de Referência para o qual o percentual de identidade calculado acima for igual ou superior a um percentual de identidade mínimo especificado, a Sequência de Comparação possui o percentual de identidade mínimo especificado em relação à Sequência de Referência, mesmo que possa haver alinhamentos em que o percentual de identidade calculado acima seja inferior à identidade percentual especificada.

[0107] Conforme mencionado anteriormente, a presente invenção refere-se, portanto, a um peptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo formado por SEQ N° 1 a SEQ N° 398 ou a uma variante dos mesmos com 88% de homologia com SEQ N° 1 a SEQ N° 398 ou uma variante da mesma que induz reação cruzada de células T com o referido peptídeo. Os peptídeos da presente invenção possuem capacidade de ligação com uma das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade humano (MHC) de classe I ou com versões alongadas dos referidos peptídeos a moléculas de classe II.

[0108] Na presente invenção, o termo “homólogo” refere-se ao grau de identidade (ver o conceito de percentual de identidade descrito anteriormente) entre duas sequências de aminoácidos, i.é., sequências de peptídeos ou de polipeptídeos. A “homologia” mencionada anteriormente é determinada comparando-se duas sequências alinhadas sob condições ideais com as sequências a serem comparadas. Tal homologia entre sequências pode ser calculada criando-se um alinhamento utilizando-se, por exemplo, o algoritmo

ClustalW. Alguns softwares de análise de sequências comumente disponíveis, mais especificamente o Vector NTI, o GENETYX e outras ferramentas de análise, são disponibilizados por bancos de dados abertos ao público.

[0109] Os versados na técnica poderão avaliar se as células T induzidas por um peptídeo variante de um peptídeo específico podem apresentar reação cruzada com o peptídeo original(Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).

[0110] Por “variante” de uma determinada sequência de aminoácidos, os inventores entendem que as cadeias laterais de, por exemplo, um ou dois resíduos de aminoácidos são alterados (por exemplo, substituindo-os pela cadeia lateral de outro resíduo de aminoácido encontrado na natureza ou alguma outra cadeia lateral) de modo que o peptídeo continue sendo capaz de se ligar a uma molécula de HLA basicamente da mesma maneira que um peptídeo com a mesma sequência de aminoácidos que as SEQ Nº 1 a SEQ Nº 398. Pode-se, por exemplo, modificar um peptídeo de modo a melhorar ou pelo menos manter sua capacidade de interagir com e se ligar a um sulco de ligação em uma molécula de MHC apropriada, tal como HLA-A*02 ou -DR, e dessa forma pelo menos manter, ou até melhorar, a capacidade de ligar-se ao TCR de células T ativadas.

[0111] Em seguida, essas células T ativadas podem participar de reação cruzada com outras células e destruir células que expressam um polipeptídeo que contém a sequência natural de aminoácidos do peptídeo cognato, conforme definido nos aspectos da invenção. Como se pode depreender da literatura e de bancos de dados científicos(Godkin et al., 1997; Rammensee et al., 1999), determinadas posições em peptídeos ligantes de HLA são geralmente resíduos de ancoragem que formam uma sequência central que se fixa ao motivo ligante do receptor de HLA, que é definido por propriedades de polaridade, eletrofísicas, hidrofóbicas e espaciais das cadeias polipeptídicas que

constituem o sulco de ligação. Assim, os versados na técnica saberão modificar as sequências de aminoácidos apresentadas em SEQ Nº 1 a SEQ Nº 398 mantendo os resíduos de ancoragem conhecidos e serão capazes de determinar se tais variantes preservam sua capacidade de ligação com moléculas de MHC classe I ou classe II. As variantes da presente invenção preservam a capacidade de ligação ao TCR de células T ativadas, que podem participar posteriormente de reações cruzadas e destruir células que expressam um polipeptídeo contendo a sequência natural de aminoácidos do peptídeo cognato, conforme definido nos aspectos da invenção.

[0112] Os peptídeos originais (não modificados) aqui revelados podem ser modificados por substituição de um ou mais resíduos em sítios diferentes, e possivelmente seletivos, dentro da cadeia peptídica, salvo indicação em contrário. Preferivelmente, essas substituições se encontram no final da cadeia de aminoácidos. Tais substituições podem ser de natureza conservadora, substituindo-se, por exemplo, um aminoácido por outro de estrutura e características semelhantes, como, por exemplo, substituir um aminoácido hidrofóbico por outro aminoácido hidrofóbico. Ainda mais conservador seria substituir aminoácidos de tamanho e natureza química semelhantes ou idênticos, como substituir leucina por isoleucina. Em estudos de variações de sequências em famílias de proteínas homólogas que ocorrem naturalmente, determinadas substituições de aminoácidos são toleradas com muito mais frequência que outras, e estas frequentemente mostram correlação com semelhanças de tamanho, carga, polaridade e hidrofobicidade entre o aminoácido original e seu substituto, sendo esta a base para definição de “substituições conservadoras”.

[0113] As substituições conservadoras são aqui definidas como trocas dentro de um dos seguintes grupos: Grupo 1: Resíduos pequenos alifáticos, apolares ou ligeiramente polares (Ala, Ser, Tre, Pro, Gli); Grupo 2:

Resíduos polares com carga negativa e as respectivas amidas (Asp, Asn, Glu, Gln); Grupo 3: Resíduos polares com carga positiva (His, Arg, Lis); Grupo 4: Resíduos alifáticos grandes e apolares (Met, Leu, Ile, Val, Cis); e Grupo 5: resíduos aromáticos grandes (Fen, Tir, Trp).

[0114] Em um aspecto, as substituições conservadoras podem incluir aquelas descritas por Dayhoff em “The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5”, *Natl. Biomedical Research*, cujo conteúdo fica integralmente incorporado ao presente pedido mediante esta referência. Por exemplo, em um aspecto pode-se substituir um aminoácido pertencente a um dos seguintes grupos por outro do mesmo grupo, o que caracteriza uma troca conservadora: Grupo 1: alanina (A), prolina (P), glicina (G), asparagina (N), serina (S) e treonina (T); Grupo 2: cisteína (C), serina (S), tirosina (Y) e treonina (T); Grupo 3: valina (V), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), alanina (A) e fenilalanina (F); Grupo 4: lisina (K), arginina (R) e histidina (H); Grupo 5: fenilalanina (F), tirosina (Y), triptofano (W) e histidina (H); e Grupo 6: ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E). Em um aspecto, pode-se selecionar uma substituição de aminoácidos conservadora do grupo formado por T→A, G→A, A→I, T→V, A→M, T→I, A→V, T→G e T→S.

[0115] Em um aspecto, uma substituição conservadora de aminoácido pode incluir a substituição de um aminoácido por outro da mesma classe, sendo a classe, p.ex., (1) apolar (ala, val, leu, ile, pro, met, fen, trp), (2) polar neutro (gli, ser, tre, cis, tir, asn, gln), (3) ácido (asp, glu) ou (4) básico (lis, arg, his). Outras substituições conservadoras de aminoácidos também podem ser efetuadas da seguinte maneira: (1) aromático (fen, tir, his), (2) doador de próton (asn, gln, lis, arg, his, trp) e (3) aceitador de próton (glu, asp, tre, ser, tir, asn, gln). Vide, p.ex., a patente dos EUA nº 10.106.805, cujo conteúdo fica integralmente incorporado ao presente pedido mediante esta referência.

[0116] Em outro aspecto, podem-se realizar substituições

conservadoras de acordo com a Tabela A. Métodos preditivos da tolerância a modificação proteica são descritos em, p.ex., Guo et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(25):9205-9210 (2004), cujo conteúdo fica integralmente incorporado ao presente pedido mediante esta referência.

[0117] Tabela A

Substituições conservadoras de aminoácidos	
Aminoácido	Substituições (entre outras conhecidas na técnica)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

[0118] Em outro aspecto, as substituições conservadoras podem ser aquelas mostradas na Tabela B sob o título “substituições conservadoras”. Quando tais substituições acarretam modificação da atividade biológica, podem-se introduzir modificações mais significativas, denominadas “substituições exemplares” na Tabela B, e os produtos podem ser avaliados se necessário.

[0119] Tabela B

Substituições de aminoácidos		
Resíduo original (aminoácido encontrado na natureza)	Substituições conservadoras	Substituições exemplares
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina :
Leu (L)	Ile	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

[0120] Algumas substituições menos conservadoras podem consistir em substituição de um aminoácido por outro com características semelhantes mas algo diferente em tamanho, como substituição de uma alanina por um resíduo de isoleucina. Substituições pouquíssimo conservadoras podem consistir em substituir um aminoácido ácido por outro polar ou até mesmo por outro básico. Entretanto, tais substituições “radicais” não podem ser descartadas como possivelmente ineficazes, pois seus efeitos químicos não são totalmente previsíveis e as substituições radicais podem produzir efeitos fortuitos que não podem ser previstos de outra forma a partir de princípios químicos simples.

[0121] Evidentemente, tais substituições podem envolver outras estruturas que não os L-aminoácidos comuns. Portanto, os D-aminoácidos podem ser substituídos pelos L-aminoácidos comumente encontrados em peptídeos antigênicos da invenção, não deixando de ser contemplados pela presente revelação. Além disso, aminoácidos não-padrão (i.é., outros aminoácidos que não os aminoácidos proteinogênicos encontrados na natureza) também podem ser empregados para finalidades de substituição de modo a produzir imunogênios e polipeptídeos imunogênicos de acordo com a presente invenção.

[0122] Se for constatado que substituições em mais de uma posição produzem peptídeos com atividade antigênica substancialmente equivalente ou maior conforme definido a seguir, combinações dessas substituições serão testadas para determinar se as substituições combinadas produzem efeitos aditivos ou sinérgicos sobre a antigenicidade do peptídeo. No máximo, não mais de quatro posições no peptídeo devem ser substituídas simultaneamente.

[0123] Um peptídeo que consiste essencialmente na sequência de aminoácidos aqui indicada pode possuir um ou dois aminoácidos não-âncoras (o motivo âncora é descrito mais detalhadamente a seguir), que são trocados sem que a capacidade de ligação a uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano classe I ou II seja modificada significativamente ou prejudicada em comparação com o peptídeo não modificado. Em outra configuração, que consiste essencialmente na sequência de aminoácidos aqui indicada, um ou dois aminoácidos podem ser trocados por elementos de troca conservadores (ver adiante) sem que a capacidade de ligação a uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano classe I ou II seja modificada significativamente ou prejudicada em comparação com o peptídeo não modificado.

[0124] Os resíduos de aminoácidos que não contribuem significativamente para as interações com o receptor de células T podem ser modificados substituindo-se com outro aminoácido, cuja incorporação não afeta significativamente a reatividade de células T nem elimina a ligação ao MHC relevante. Assim, considerando-se a condição acima, o peptídeo da invenção pode ser qualquer peptídeo (termo sob o qual os inventores incluem oligopeptídeo e polipeptídeo), incluindo sequência de aminoácidos ou uma porção ou variante das mesmas conforme apresentadas.

[0125] Tabela 6: Variantes e motivos dos peptídeos de acordo com as SEQs Nº 1, 4, 9, 10 e 12.

Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SEQ Nº 1	T	L	D	S	T	R	T	L	Y	
Variante		S								
		S							A	
		S	E							
		S	E						A	
		T								
		T							A	
		T	E							
		T	E						A	
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SEQ Nº 4	R	I	E	A	I	R	A	E	Y	
Variante		S	D							
		S	D						A	
		S								
		S							A	
		T	D							
		T	D						A	
		T								
		T							A	
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SEQ Nº 9	Q	L	D	S	T	L	D	S	Y	
Variante		S								

Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
		S							A	
		S	E							
		S	E						A	
		T								
		T							A	
		T	E							
		T	E						A	
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SEQ Nº 10	V	S	E	R	T	G	I	S	Y	
Variante			D							
			D						A	
									A	
		T	D							
		T	D						A	
		T								
		T							A	
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SEQ Nº 12	Y	T	D	F	V	G	E	G	L	Y
Variante		S								
		S								A
		S	E							
		S	E							A
										A
			E							
			E							A

[0126] Peptídeos mais longos (alongados) também podem ser apropriados. Também é possível que epítomos de MHC classe I, embora normalmente tenham de 8 a 11 aminoácidos de comprimento, sejam gerados pelo processamento de peptídeos mais longos ou por proteínas que incluam o epítomo real. É preferível que os resíduos que flanqueiam o epítomo sejam resíduos que não afetem significativamente a clivagem proteolítica necessária para expor o epítomo durante o processamento.

[0127] Os peptídeos da invenção podem ser alongados em até

quatro aminoácidos, ou seja, podem-se adicionar 1, 2, 3 ou 4 aminoácidos a qualquer extremidade em qualquer combinação entre 4:0 e 0:4. A Tabela 7 apresenta combinações de alongamentos de acordo com a invenção.

[0128] Tabela 7: Algumas combinações de peptídeos alongados da presente invenção

C terminal	N terminal
4	0
3	0 ou 1
2	0, 1 ou 2
1	0, 1, 2 ou 3
0	0, 1, 2, 3 ou 4
N terminal	C terminal
4	0
3	0 ou 1
2	0, 1 ou 2
1	0, 1, 2 ou 3
0	0, 1, 2, 3 ou 4

[0129] Os aminoácidos do alongamento/extensão podem ser os peptídeos da sequência original da proteína ou quaisquer outros aminoácidos. O alongamento pode ser utilizado para tornar os peptídeos mais estáveis ou mais solúveis.

[0130] Portanto, os epítomos da presente invenção podem ser idênticos a epítomos que ocorrem naturalmente e que são associados a ou específicos para tumores, ou podem incluir epítomos que diferem em no máximo quatro resíduos do peptídeo de referência, conquanto apresentem atividade antigênica substancialmente idêntica.

[0131] Em uma configuração alternativa, o peptídeo é alongado em mais de quatro aminoácidos em um ou ambos os lados, preferivelmente até atingir um comprimento total de até 30 aminoácidos. Assim, podem-se criar peptídeos ligantes de MHC classe II. A ligação ao MHC classe II pode ser testada por métodos conhecidos na técnica.

[0132] Dessa forma, a presente invenção fornece peptídeos e

variantes de epítomos de MHC classe I nas quais o peptídeo ou variante tem comprimento total entre 8 e 100, preferivelmente entre 8 e 30 ou, o mais preferido, entre 8 e 14, especificamente, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14 aminoácidos; no caso de peptídeos ligantes de classe II prolongados o comprimento também pode ser de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 aminoácidos.

[0133] Evidentemente, o peptídeo ou variante de acordo com a presente invenção terá a capacidade de se ligar a uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I ou II. A ligação de um peptídeo ou variante a um complexo de MHC pode ser testada por métodos conhecidos na técnica.

[0134] Preferivelmente, quando células T específicas para um peptídeo de acordo com a presente invenção são testadas contra os peptídeos substituídos, a concentração de peptídeos em que os peptídeos substituídos produzem metade do aumento máximo de lise em relação aos níveis basais é de não mais que cerca de 1 mM, preferivelmente não mais que cerca de 1 μ M, mais preferivelmente não mais que cerca de 1 nM e ainda mais preferivelmente não mais que cerca de 100 pM e, o mais preferido, não mais que 10 pM. É preferível também que o peptídeo substituído possa ser reconhecido por células T citotóxicas de mais de um indivíduo, de pelo menos dois e, mais preferivelmente, de três indivíduos.

[0135] Em uma configuração especialmente preferida da invenção, o(s) peptídeo(s) consiste(m) basicamente em uma sequência de aminoácidos de acordo com SEQ N° 1 a SEQ N° 398.

[0136] “Consiste essencialmente em” significa que um peptídeo de acordo com a presente invenção contém, além da sequência de acordo com qualquer sequência de SEQ N° 1 a SEQ N° 398 ou variante das mesmas, outros prolongamentos formados por segmentos aminoácidos N- e/ou C-terminais, que não necessariamente formam parte do peptídeo que funciona como epítopo para

epítomos que possuem moléculas de MHC.

[0137] Contudo, esses segmentos podem ser importantes para tornar eficiente a introdução do peptídeo de acordo com a presente invenção em células. Em uma configuração da presente invenção, o peptídeo é parte de uma proteína de fusão que compreende, por exemplo, os aminoácidos N-terminais da cadeia invariante associada ao antígeno HLA-DR (p33, no seguinte "li") conforme derivado do NCBI, GenBank número de acesso X00497. Em outras fusões, os peptídeos da presente invenção podem, conforme aqui descrito, ser fundidos com um anticorpo ou com uma parte funcional do mesmo, e em particular com uma sequência de um anticorpo, de modo a criar um alvo específico para o referido anticorpo ou, por exemplo, contra um anticorpo ou parte de um anticorpo específico para células dendríticas, conforme aqui descrito.

[0138] Além disso, o peptídeo ou variante pode ser modificado ainda mais para melhorar a estabilidade e/ou a ligação a moléculas de MHC a fim de produzir uma resposta imune mais forte. Os métodos de otimização de tais sequências peptídicas são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, a introdução de ligações peptídicas reversas ou de ligações não peptídicas.

[0139] Em uma ligação peptídica reversa, os aminoácidos não se ligam por meio de ligações peptídicas ($-\text{CO}-\text{NH}-$), mas por uma ligação peptídica invertida. Tal peptideomimetismo retroinvertido pode ser produzido usando-se métodos conhecidos na técnica, como, por exemplo, os descritos por Mezière et al (1997)(Mezière et al., 1997), que fica aqui incorporado por referência. Esta abordagem inclui criar pseudopeptídeos contendo alterações na cadeia básica e não na orientação das cadeias laterais. Mezière et al. (Mezière et al., 1997) demonstraram que esses pseudopeptídeos podem ser úteis para respostas de ligação de MHC e de células T auxiliares. Os peptídeos

retroinvertidos, que contêm ligações NH–CO em vez de CO–NH, são muito mais resistentes à proteólise.

[0140] São exemplos de ligações não peptídicas –CH₂ –NH, –CH₂S–, –CH₂CH₂–, –CH=CH–, –COCH₂–, –CH(OH)CH₂– e –CH₂SO–. US 4.897.445 fornece um método para síntese em fase sólida de ligações não-peptídicas (–CH₂–NH–) em cadeias polipeptídicas envolvendo polipeptídeos sintetizados por procedimentos padrão, onde a ligação não peptídica é sintetizada pela reação de um aminoaldeído com um aminoácido na presença de NaCNBH₃.

[0141] Os peptídeos que compreendem as sequências descritas acima podem ser sintetizados com outros grupamentos químicos presentes em suas terminações amina ou carboxila para melhorar a estabilidade, biodisponibilidade e/ou afinidade dos peptídeos. Por exemplo, grupamentos hidrofóbicos como a carbobenzoxila, dansila ou t-butiloxicarbonila podem ser adicionados à amina terminal dos peptídeos. Da mesma forma, um grupamento acetila ou um grupamento 9-fluorenilmetóxi-carbonila pode ser adicionado à amina terminal dos peptídeos. Além disso, o grupamento hidrofóbico t-butiloxicarbonila ou um grupamento amida podem ser adicionados às carboxilas terminais dos peptídeos.

[0142] Ademais, os peptídeos descritos podem ser sintetizados de forma a alterar suas configurações estéricas. Por exemplo, o D-isômero de um ou mais resíduos de aminoácidos do peptídeo pode ser utilizado em vez do L-isômero. Ainda mais, um ou mais resíduos de aminoácidos dos peptídeos da invenção podem ser substituídos por um dos resíduos de aminoácidos bem conhecidos e que não ocorrem naturalmente. Alterações como essas podem contribuir para aumentar a estabilidade, a biodisponibilidade ou a ação ligante dos peptídeos da invenção.

[0143] Da mesma forma, um peptídeo da invenção ou variante do

mesmo pode ser modificado quimicamente por meio de reações com aminoácidos específicos antes ou depois da síntese do peptídeo. Alguns exemplos de tais modificações são bem conhecidos na técnica e resumidos em, p.ex., R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. CRC Press, 2004 (Lundblad, 2004), que fica aqui incorporado por referência. A modificação química de aminoácidos inclui, entre outras, modificação por acilação, amidinação, piridoxilação de lisina, alquilação redutora, trinitrobenzilação de grupamentos amina com ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), modificação amídica de grupamentos carboxila e modificações sulfidrilas mediante oxidação por ácido perfórmico de cisteína formando ácido cisteico, formação de derivados mercuriais, formação de dissulfetos mistos com outros compostos de tiol, reação com maleimida, carboximetilação com ácido iodoacético ou iodoacetamida e carbamoilação com cianato em pH alcalino, sem limitar-se a estes. Em relação a isso, os versados na técnica podem referir-se ao Capítulo 15 de *Current Protocols In Protein Science*, Eds. Coligan et al. (John Wiley & Sons NY 1995-2000) (Coligan et al., 1995) para obter mais detalhes sobre as metodologias de modificação química de proteínas.

[0144] Resumidamente, a modificação de, p.ex., resíduos de arginila em proteínas baseia-se muitas vezes na reação de compostos com dicarbonilas vicinais como o fenilglioal, o 2,3-butanediona e o 1,2-ciclohexanediona para formar um adutor. Outro exemplo é a reação de metilglioal com resíduos de arginina. A cisteína pode ser modificada sem alteração concomitante de outros sítios nucleofílicos como a lisina e a histidina. Com isso, muitos reagentes estão disponíveis para modificar a cisteína. Os websites de empresas como a Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>) apresentam informações sobre reagentes específicos.

[0145] A redução seletiva de ligações dissulfeto em proteínas também é comum. As ligações dissulfeto podem ser encontradas e oxidadas

durante o tratamento térmico de produtos biofarmacêuticos. O Reagente K de Woodward pode ser empregado para modificar resíduos específicos de ácido glutâmico. A N-(3-(dimetilamino)propil)-N'-etilcarbodiimida pode ser empregada para formar ligações cruzadas intramoleculares entre resíduos de lisina e um resíduo de ácido glutâmico. Por exemplo, o dietilpirocarbonato é um reagente para modificação de resíduos histidil em proteínas. A histidina também pode ser modificada usando-se 4-hidroxi-2-nonenal. A reação de resíduos de lisina e outros grupamentos α -amino é útil, por exemplo, para ligar peptídeos a superfícies ou para ligação cruzada de proteínas ou peptídeos. A lisina é o local de fixação do poli(etileno)glicol e é o principal sítio de modificação na glicosilação de proteínas. Os resíduos de metionina das proteínas podem ser modificados por, p.ex., iodoacetamida, bromoetilamina e cloramina T.

[0146] O tetranitrometano e o N-acetilimidazol podem ser usados para modificar os resíduos de tirosila. A ligação cruzada por meio da formação de ditirosina pode ser efetuada com peróxido de hidrogênio e íons de cobre.

[0147] Estudos recentes sobre a modificação do triptofano vem empregando a N-bromosuccinimida, 2-hidróxi-5-nitrobenzil brometo ou 3-bromo-3-metil-2-(2-nitrofenilmercapto)-2H-indol (BPNS-escatol).

[0148] A modificação bem-sucedida de proteínas e peptídeos terapêuticos com PEG frequentemente prolonga a meia-vida na circulação, e a ligação cruzada de proteínas com glutaraldeído, polietilenoglicol diacrilato e formaldeído é empregada para preparar hidrogéis. Muitos alergênicos são modificados para imunoterapia por carbamilação com cianato de potássio.

[0149] Um peptídeo ou variante onde o peptídeo é modificado ou inclui ligações não peptídicas é uma configuração preferida da invenção.

[0150] Outra configuração da presente invenção se refere a um peptídeo que não é encontrado naturalmente, sendo que o referido peptídeo consiste ou consiste essencialmente em uma sequência de aminoácidos de

acordo com SEQ Nº 1 a SEQ Nº 398 e foi produzido sinteticamente (p.ex. sintetizado) na forma de um sal farmaceuticamente aceitável. Os métodos de produção sintética de peptídeos são bem conhecidos na técnica. Os sais dos peptídeos de acordo com a presente invenção diferem substancialmente dos peptídeos em seu estado *in vivo*, pois esses peptídeos não se apresentam como sais *in vivo*. O peptídeo em forma de sal não-natural medeia a solubilidade do peptídeo, sobretudo no âmbito de composições farmacêuticas que compreendem os peptídeos (p.ex. as vacinas peptídicas aqui reveladas). Para fornecer eficientemente os peptídeos ao indivíduo a ser tratado, requer-se uma solubilidade suficiente e pelo menos substancial do(s) peptídeo(s). Preferivelmente, os sais são sais farmaceuticamente aceitáveis dos peptídeos. Os referidos sais de acordo com a invenção incluem sais alcalinos e alcalino-terrosos, tais como os sais da série de Hofmeister, que compreendem os ânions PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^- e os cátions NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} e Ba^{2+} . Sais específicos são selecionados entre $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, NH_4Cl , NH_4Br , NH_4NO_3 , NH_4ClO_4 , NH_4I , NH_4SCN , Rb_3PO_4 , Rb_2HPO_4 , RbH_2PO_4 , Rb_2SO_4 , $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$, Rb_4Cl , Rb_4Br , Rb_4NO_3 , Rb_4ClO_4 , Rb_4I , Rb_4SCN , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , KCH_3COO , KCl , KBr , KNO_3 , KClO_4 , KI , KSCN , Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2SO_4 , NaCH_3COO , NaCl , NaBr , NaNO_3 , NaClO_4 , NaI , NaSCN , ZnCl_2 , Cs_3PO_4 , Cs_2HPO_4 , CsH_2PO_4 , Cs_2SO_4 , CsCH_3COO , CsCl , CsBr , CsNO_3 , CsClO_4 , CsI , CsSCN , Li_3PO_4 , Li_2HPO_4 , LiH_2PO_4 , Li_2SO_4 , LiCH_3COO , LiCl , LiBr , LiNO_3 , LiClO_4 , LiI , LiSCN , Cu_2SO_4 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, Mg_2HPO_4 , $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, Mg_2SO_4 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, MgCl_2 , MgBr_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, MgI_2 , $\text{Mg}(\text{SCN})_2$, MnCl_2 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Ca_2HPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CaCl_2 , CaBr_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$, CaI_2 , $\text{Ca}(\text{SCN})_2$, $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$, Ba_2HPO_4 , $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, BaSO_4 , $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, BaCl_2 , BaBr_2 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$, BaI_2 e $\text{Ba}(\text{SCN})_2$. São particularmente preferidos o

acetato de NH, MgCl₂, KH₂PO₄, Na₂SO₄, KCl, NaCl e CaCl₂, tais como, por exemplo, sais cloreto ou acetato (trifluoroacetato).

[0151] Geralmente, os peptídeos e variantes (pelo menos aquelas que contêm ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos) podem ser sintetizadas pelo método Fmoc-poliamida ou por síntese de peptídeos em fase sólida, conforme revelado por Lukas et al. (Lukas et al., 1981) e nas respectivas referências. O grupamento 9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc) protege temporariamente o grupamento N-amino. A clivagem repetitiva do grupo protetor altamente base-lábil é efetuada usando-se 20% piperidina em N, N-dimetilformamida. Os grupamentos em cadeias laterais podem ser protegidos mediante formação dos respectivos éteres butílicos (para treonina e tirosina), ésteres butílicos (para ácido glutâmico e ácido aspártico), derivados butiloxycarbonila (para lisina e histidina), derivados tritila (para cisteína) e derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzenossulfonil (para arginina). Se houver resíduos C-terminais de glutamina ou asparagina, o grupamento 4,4'-dimetoxibenzidríla é usado para proteger os grupamentos amido das cadeias laterais. O suporte de fase sólida é baseado em um polímero de polidimetilacrilamida constituído a partir de três monômeros: dimetilacrilamida (monômero da cadeia básica), bisacriloiletileno diamina (ligante cruzado) e acrilóilsarcosina metil éster (agente funcionalizante). O agente clivável da ligação peptídeo-resina empregado é um derivado ácido-lábil do ácido 4-hidroximetil-fenoxiacético. Todos os derivados de aminoácidos são adicionados na forma de anidridos simétricos pré-formados, com exceção de asparagina e glutamina, que são adicionadas usando-se um procedimento de acoplamento reverso mediado por N, N-dicicloexilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol. Todas as reações de acoplamento e desproteção são monitoradas por procedimentos de teste com ninhidrina, ácido trinitrobenzenossulfônico ou isotina. Ao final da síntese, os peptídeos são clivados da resina de suporte e, ao mesmo tempo, os

grupamentos protetores das cadeias laterais são removidos por tratamento com ácido trifluoracético a 95% contendo uma mistura de 50% de captantes. Alguns captantes comumente utilizados são etanoditiol, fenol, anisol e água, e a escolha exata depende dos aminoácidos constituintes do peptídeo que está sendo sintetizado. Também é possível combinar metodologias de fase sólida e fase em solução para sintetizar peptídeos (ver, por exemplo, (Bruckdorfer et al., 2004), e referências nele citadas).

[0152] O ácido trifluoracético é removido por evaporação a vácuo seguida de trituração com éter dietílico para produzir o peptídeo bruto. Quaisquer captantes que ainda estiverem presentes serão retirados por um procedimento de extração simples, no qual a liofilização da fase aquosa produz o peptídeo bruto livre de captantes. Os reagentes para síntese de peptídeos são geralmente fornecidos por, p.ex., Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, Reino Unido).

[0153] A purificação pode ser realizada por qualquer uma ou por uma combinação de técnicas como recristalização, cromatografia de exclusão por tamanho, cromatografia de troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica e (geralmente) cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa empregando, p.ex., um gradiente de separação de acetonitrilo e água.

[0154] A análise dos peptídeos pode ser realizada empregando-se cromatografia em camada fina, eletroforese — sobretudo a eletroforese capilar com extração em fase sólida (CSPE, “capillary solid phase extraction”) —, cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa, análise de aminoácidos após hidrólise ácida e por espectrometria de massa com bombardeio por átomos rápidos (FAB, “fast atom bombardment”), assim como análise espectrométrica de massa usando as técnicas MALDI e ESI-Q-TOF.

[0155] Para selecionar peptídeos apresentados de forma exacerbada, um perfil de apresentação é calculado para mostrar a apresentação mediana da amostra e a variação entre réplicas. O perfil justapõe amostras da

entidade tumoral relevante a uma base de tecidos tumorais normais. Em seguida, cada um desses perfis pode ser consolidado em um escore de sobreapresentação calculando-se o p-valor de um modelo misto de efeitos lineares (Pinheiro et al., 2015) com ajuste para testes múltiplos pelo método da taxa de falsas descobertas (Benjamini and Hochberg, 1995) (cf. Exemplo 1 na Figura 1).

[0156] Para identificação e quantificação relativa de ligantes de HLA por espectrometria de massa, moléculas de HLA de amostras de tecido congeladas criogenicamente foram purificadas e peptídeos associados ao HLA foram isolados. Os peptídeos isolados foram separados e suas sequências foram identificadas por ensaios de cromatografia líquida com espectrometria de massa (LC-MS) com ionização por nanoeletrospray (nanoESI). As sequências peptídicas resultantes foram verificadas comparando-se o padrão de fragmentação dos peptídeos associados a tumores (TUMAPs) identificados em amostras (N=155) de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma, onde os padrões de fragmentação eram idênticos aos dos peptídeos sintéticos de referência. Como os peptídeos foram identificados diretamente como ligantes de moléculas de HLA de tumores primários, esses resultados constituem uma evidência direta de que os peptídeos identificados são processados naturalmente e apresentados em tecidos cancerosos primários obtidos de 155 pacientes com carcinoma

colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma.

[0157] O pipeline de descoberta XPRESIDENT® v2.1 (ver, por exemplo, US 2013-0096016, que fica aqui integralmente incorporada por referência) permite identificar e selecionar peptídeos sobrepresentados relevantes candidatos a uso vacinal com base na quantificação relativa direta dos níveis de peptídeo restrito por HLA em tecidos cancerosos em comparação com diversos outros tecidos e órgãos não-cancerosos. Isso foi obtido mediante desenvolvimento de quantificação diferencial sem marcadores com emprego dos dados adquiridos por cromatografia líquida com espectrometria de massa (LC-MS), que foram processados por um pipeline de dados exclusivo. O pipeline combina algoritmos de identificação de sequências, agregação espectral, contagem de íons, alinhamento de tempos de retenção e desconvolução e normalização de estados de carga.

[0158] Os níveis de apresentação, que incluem estimativas de erro para cada peptídeo, foram estabelecidos. Foram identificados peptídeos apresentados exclusivamente em tecidos tumorais e peptídeos apresentados de forma aumentada em tumores em comparação com tecidos e órgãos não-cancerosos.

[0159] Complexos de peptídeos com HLA derivados de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer

colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma foram purificados e os peptídeos associados a HLA foram isolados e analisados por LC-MS (ver Exemplo 1). Todos os TUMAPs constantes do presente pedido de patente foram identificados por meio dessa abordagem em amostras de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma.

[0160] Os TUMAPs identificados em tecidos normais e em várias amostras de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais,

carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma foram quantificados a partir de dados de ensaios de contagem de íons sem marcação em LC-MS. O método pressupõe que as áreas de sinal de LC-MS de um peptídeo se correlacionam com sua abundância na amostra. Todos os sinais quantitativos de um peptídeo em vários experimentos de LC-MS foram normalizados com base na tendência central, e as médias por amostra foram calculadas e consolidadas em um gráfico de barras para criar o perfil de apresentação. O perfil de apresentação consolida vários métodos de análise diferentes, como buscas em bancos de dados de proteínas, agregação espectral, desconvolução do estado de carga (eliminação da carga) e alinhamento e normalização do tempo de retenção.

[0161] Além da sobreapresentação do peptídeo, a expressão do mRNA do gene subjacente também foi testada. Os dados de mRNA foram obtidas por meio de análises de sequenciamento de RNA de tecidos normais e de tecidos cancerosos (cf. Exemplo 2 na Figura 2). Também foi usada como fonte de dados de tecidos normais um banco de dados disponível publicamente de dados de expressão de RNA de cerca de 3000 amostras de tecidos normais (Lonsdale, 2013). Preferivelmente, foram incluídos na presente invenção peptídeos derivados de proteínas codificadas por mRNAs com expressão acentuada em tecidos cancerosos e pouca ou nenhuma expressão em tecidos normais.

[0162] A presente invenção fornece peptídeos úteis no tratamento de cânceres e tumores que apresentem os peptídeos da invenção de forma

exacerbada ou exclusiva, preferivelmente carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma. Demonstrou-se por meio de espectrometria de massa que esses peptídeos são apresentados naturalmente por moléculas de HLA em amostras de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma.

[0163] Demonstrou-se que muitos dos genes e proteínas dos quais os peptídeos se originam (também denominadas “proteínas completas” ou “proteínas subjacentes”) são acentuadamente sobreexpressos em câncer em comparação com tecidos normais. Para fins da presente invenção, “tecidos normais” significa células saudáveis originárias de sangue, vasos sanguíneos, cérebro, coração, fígado, pulmão, ducto biliar, bexiga, medula óssea, esôfago, intestino grosso, rim, nervo periférico, pâncreas, pele, medula espinhal, baço, estômago, tireoide, traqueia ou outros tecidos normais que apresentem graus acentuados de associação com os genes fonte (ver Exemplo 2). Ademais, os

peptídeos são fortemente sobreexpressos em tecidos tumorais. Para fins desta invenção, “tecido tumoral” significa uma amostra oriunda de um paciente que apresenta carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma, mas não de tecidos normais (ver Exemplo 1).

[0164] Os peptídeos ligados ao HLA podem ser reconhecidos pelo sistema imunológico, especificamente pelos linfócitos T. As células T podem destruir células que apresentem o complexo HLA/peptídeo reconhecido em células que apresentem tais peptídeos, tais como células de, p.ex., carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma.

[0165] Os peptídeos da presente invenção mostraram-se capazes de estimular respostas de células T e/ou são sobreapresentados; portanto, pode-se usá-los para produzir anticorpos e/ou TCRs, tais como os sTCRs solúveis de acordo com a presente invenção (ver Exemplo 3 e Exemplo 4). Além disso, os peptídeos da presente invenção também podem ser usados, quando formam

complexos com os respectivos MHCs, para produzir anticorpos e/ou sTCRs, sobretudo sTCRs, de acordo com a presente invenção. Os respectivos métodos são bem conhecidos de indivíduos versados na técnica e também podem ser encontrados na respectiva literatura (ver também adiante). Assim, os peptídeos da presente invenção são úteis para gerar uma resposta imune em um paciente, por meio da qual as células tumorais podem ser destruídas. Pode-se induzir uma resposta imune em um paciente administrando-se os peptídeos descritos ou substâncias precursoras apropriadas (p.ex. peptídeos alongados, proteínas ou ácidos nucleicos que codificam tais peptídeos) diretamente ao paciente, idealmente em combinação com agentes que promovem a imunogenicidade (i.é., um adjuvante). Pode-se esperar que a resposta imune originária de tal vacinação terapêutica seja altamente específica contra células tumorais porque os peptídeos-alvo da presente invenção não são apresentados em tecidos normais em números de cópias semelhantes, evitando o risco de reações autoimunes indesejadas contra células normais do paciente.

[0166] A presente descrição refere-se também a receptores de células T (TCRs) que compreendem uma cadeia alfa e uma cadeia beta (TCRs alfa/beta). Também são fornecidos peptídeos de acordo com a invenção capazes de se ligar a TCR e anticorpos quando apresentados por uma molécula de MHC.

[0167] A presente descrição se refere também a fragmentos dos TCRs de acordo com a presente invenção que são capazes de se ligarem a um antígeno peptídico de acordo com a presente invenção quando estes são apresentados por uma molécula de HLA. O termo se refere em particular a fragmentos de TCR solúveis (p.ex. TCRs sem as porções transmembrana e/ou sem as regiões constantes, TCRs de cadeia única e fusões dos mesmos, p.ex., com imunoglobulinas).

[0168] A presente descrição refere-se também a ácidos nucleicos,

vetores e células hospedeiras para expressão de TCRs e peptídeos da presente descrição, assim como a métodos de usar os mesmos.

[0169] O termo “receptor de células T” (abreviatura TCR) refere-se a uma molécula heterodimérica que compreende uma cadeia polipeptídica alfa (cadeia alfa) e uma cadeia polipeptídica beta (cadeia beta), na qual o receptor heterodimérico é capaz de se ligar a um antígeno peptídico apresentado por uma molécula de HLA. O termo também inclui os chamados TCRs gama/delta.

[0170] Em uma configuração, a descrição fornece um método de produção de um TCR conforme aqui descrito, sendo que o método compreende cultivar células hospedeiras capazes de expressar o TCR em condições apropriadas para promover a expressão do TCR.

[0171] Em outro aspecto, a descrição refere-se a métodos de acordo com a descrição, sendo que o antígeno é carregado em moléculas de MHC classe I ou II expressas na superfície de uma célula apresentadora de antígenos apropriada ou de uma célula apresentadora de antígenos artificial colocando-se uma quantidade suficiente do antígeno em contato com uma célula apresentadora de antígenos ou o antígeno é carregado em tetrâmetros de MHC classe I ou II por meio da tetramerização de monômeros de complexos de MHC classe I ou II com antígenos.

[0172] As cadeias alfa e beta dos TCRs alfa/beta e as cadeias gama e delta dos TCRs gama/delta são geralmente consideradas como possuindo dois “domínios” cada: o domínio variável e o domínio constante. O domínio variável consiste na concatenação de uma região variável (V) com uma região juncional (J). O domínio variável também pode incluir uma região líder (L), e as cadeias beta e delta também podem apresentar uma região de diversidade (D). Os domínios constantes das cadeias alfa e beta também podem incluir domínios transmembrana (TM) C-terminais que ancoram as cadeias alfa e beta à membrana celular.

[0173] Em relação aos TCRs gama/delta, o termo “domínio variável do TCR gama” conforme aqui utilizado refere-se à concatenação da região gama V do TCR (TRGV) sem região líder (L) com a região TCR gama J (TRGJ), e o termo TCR gama de domínio constante refere-se à região extracelular do TRGC ou a uma sequência de TRGC com truncamento C-terminal. Da mesma forma, o termo “domínio variável de TCR delta” refere-se à concatenação da região TCR delta V (TRDV) sem região líder (L) com a região TCR delta D/J (TRDD/TRDJ), e o termo “domínio constante do TCR delta” refere-se à região extracelular do TRDC ou a uma sequência de TRDC com truncamento C-terminal.

[0174] Os TCRs da presente invenção se ligam preferivelmente a um complexo de peptídeo com HLA com afinidade de ligação (K_D) de cerca de 100 μ M ou menos, cerca de 50 μ M ou menos, cerca de 25 μ M ou menos ou cerca de 10 μ M ou menos. São mais preferíveis os TCRs de alta afinidade cujas afinidades de ligação sejam de aproximadamente 1 μ M ou menos, cerca de 100 nM ou menos, cerca de 50 nM ou menos ou cerca de 25 nM ou menos. São exemplos não limitantes dos intervalos de afinidade de ligação preferidos de TCRs da presente invenção cerca de 1 nM a cerca de 10 nM; cerca de 10 nM a cerca de 20 nM; cerca de 20 nM a cerca de 30 nM; cerca de 30 nM a cerca de 40 nM; cerca de 40 nM a cerca de 50 nM; cerca de 50 nM a cerca de 60 nM; cerca de 60 nM a cerca de 70 nM; cerca de 70 nM a cerca de 80 nM; cerca de 80 nM a cerca de 90 nM; e cerca de 90 nM a cerca de 100 nM.

[0175] Conforme aqui utilizado em relação aos TCRs da presente descrição, “ligação específica” e variações gramaticais do termo são usados para designar um TCR com afinidade de ligação (K_D) de 100 μ M ou menos para um complexo de HLA com peptídeo.

[0176] As TCRs alfa/beta heterodiméricas da presente descrição podem ter uma ligação dissulfeto introduzida entre seus domínios constantes. Os TCRs preferidos deste tipo incluem aqueles com uma sequência de domínio

TRAC constante e uma sequência de TRBC1 ou TRBC2 constante, exceto que a Tre 48 do TRAC e a Ser 57 do TRBC1 ou TRBC2 são substituídas por resíduos de cisteína, e essas cisteínas formam uma ponte dissulfeto entre a sequência de domínio constante do TRAC e a sequência de domínio constante do TRBC1 ou TRBC2 do TCR.

[0177] Com ou sem a introdução da ligação entre cadeias mencionada anteriormente, os TCRs alfa/beta heterodiméricos da presente descrição podem apresentar um domínio com sequência constante codificado pelo gene TRAC e um domínio TRBC1 ou TRBC2 com sequência constante, e as sequências do domínio constante TRAC e dos domínios constantes TRBC1 ou TRBC2 do TCR podem ser ligadas uma à outra pela ligação dissulfeto nativa entre a Cis4 do éxon 2 da TRAC e a Cis2 do éxon 2 da TRBC1 ou da TRBC2.

[0178] Os TCRs da presente descrição podem compreender um marcador detectável, selecionado do grupo formado por um radionuclídeo, um fluoróforo e biotina. Os TCRs da presente descrição podem ser conjugados com um agente terapeuticamente ativo, como um radionuclídeo, um agente quimioterápico ou uma toxina.

[0179] Em uma configuração, um TCR da presente descrição que apresenta pelo menos uma mutação na cadeia alfa e/ou apresenta pelo menos uma mutação na cadeia beta exibe glicosilação modificada em comparação com o TCR sem mutação.

[0180] Em uma configuração, um TCR que compreende pelo menos uma mutação na cadeia alfa do TCR e/ou a cadeia beta do TCR possui afinidade de ligação por e/ou meia-vida de ligação para um complexo de peptídeo com molécula de HLA que corresponde a pelo menos o dobro do de um TCR que compreende a cadeia alfa não-mutante do TCR e/ou a cadeia beta não-mutante do TCR. A melhora da afinidade de TCRs específicas para tumores e sua exploração depende da existência de uma janela na qual o TCR apresenta

máxima afinidade. A existência dessa janela baseia-se em observações de que TCRs específicos para patógenos restritos por HLA-A1 geralmente possuem valores de K_D 10 vezes menores que os de TCRs específicos para autoantígenos associados a tumor restritos por HLA-A*01. (Isso também vale para outros alelos.) Sabe-se atualmente que, embora os antígenos tumorais tenham potencial imunogênico, apenas proteínas mutantes ou cujo processamento pós-tradução foi alterado serão consideradas estranhas pelo sistema imune; afinal, os tumores se originam das células do próprio indivíduo. Os antígenos sobreexpressos ou sobreexpressos (os chamados autoantígenos) nem sempre induzem uma resposta imune funcional contra o tumor. As células T que expressam TCRs reativos a esses antígenos são selecionadas negativamente no timo por um processo conhecido como tolerância central, no qual apenas células T com TCRs de baixa afinidade para autoantígenos permanecem. Portanto, a afinidade dos TCRs ou de variantes da presente descrição para os peptídeos pode ser melhorada por métodos bem conhecidos na técnica.

[0181] A presente descrição se refere também a um método de identificação de isolamento de um TCR de acordo com a presente invenção, sendo que o referido método compreende a incubação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de doadores negativos para HLA-A*01 com monômeros de peptídeoA*01, incubação das CMSPs com ficoeritrina tetramérica (PE) e isolamento das células T que apresentam avidéz elevada por separação celular ativada por fluorescência (FACS)-Calibur.

[0182] A presente descrição refere-se também a um método de identificação e isolamento de TCR de acordo com a presente descrição, sendo que o referido método compreende a obtenção de um camundongo transgênico com a totalidade dos loci do gene TCR $\alpha\beta$ humano (1,1 e 0,7 Mb), no qual as células T expressam um repertório diversificado de TCR humano que compensa a deficiência de TCR de camundongo e imuniza o animal com o peptídeo de

interesse; refere-se ainda à incubação de CMSP obtidas de camundongos transgênicos com ficoeritrina tetramérica (PE) e isolamento de células T de alta avides por separação de células ativadas por fluorescência segundo FACS-Calibur.

[0183] Em um aspecto, para obter células T que expressem TCRs da presente descrição, realiza-se a clonagem de ácidos nucleicos que codificam as cadeias TCR-alfa e/ou TCR-beta da presente descrição em vetores de expressão, como retrovírus gama ou lentivírus. Uma vez gerados, os vírus recombinantes têm sua funcionalidade testada, incluindo especificidade para antígenos e avides funcional. Em seguida, uma alíquota do produto final é utilizada para transdução da população de células T alvo (geralmente purificada de CMSP do paciente), que é então expandida antes de ser infundida no paciente.

[0184] Em outro aspecto, para se obter TCRs que expressam células T da presente descrição, RNAs de TCR são sintetizados por meio de procedimentos conhecidos na técnica, p.ex. sistemas de transcrição *in vitro*. Os RNAs de TCRs sintetizados *in vitro* são então introduzidos em células T CD8+ primárias obtidas de doadores saudáveis por eletroporação para que reexpressem as cadeias TCR-alfa e/ou TCR-beta específicas para tumores.

[0185] Para aumentar a expressão, os ácidos nucleicos que codificam os TCRs da presente descrição podem ser ligados operacionalmente a promotores fortes, tais como repetição terminal longa (LTRs) em retrovírus, citomegalovírus (CMV), vírus de células tronco murinas (MSCV) U3, fosfoglicerato quinase (PGK), β -actina, ubiquitina e um promotor composto de vírus símio 40 (SV40)/CD43, fator de alongamento (EF)-1a e o promotor do vírus formador de foco esplênico (SFFV). Em uma configuração preferida, o promotor é heterólogo em relação ao ácido nucleico expresso.

[0186] Além dos promotores fortes, os cassetes de expressão de

TCR da presente descrição podem conter outros elementos que podem incentivar a expressão de transgenes, tais como um trato central de polipurina (cPPT), que promove a translocação central de estruturas lentivirais (Follenzi et al., 2000), e o elemento regulatório pós-transcricional do vírus da hepatite da marmota (wPRE), que aumenta os níveis da expressão do transgene ao melhorar a estabilidade do RNA (Zufferey et al., 1999).

[0187] As cadeias alfa e beta de um TCR da presente invenção podem ser codificadas por ácidos nucleicos localizados em vetores separados ou por polinucleotídeos localizados no mesmo vetor.

[0188] Para obter níveis elevados de expressão superficial de TCR, tanto a cadeia TCR-alfa como a TCR-beta do TCR introduzido precisam ser transcritas em volumes elevados. Isso requer que as cadeias TCR-alfa e TCR-beta da presente descrição sejam clonadas com formação de estruturas bicistrônicas em um único vetor, o que se mostrou suficiente para superar esse obstáculo. O uso de um sítio de entrada intra-ribossômico viral (IRES) entre as cadeias TCR-alfa e TCR-beta induz a expressão coordenada das duas cadeias, pois as cadeias TCR-alfa e TCR-beta são ambas geradas a partir de um único produto de transcrição, que é clivado em duas proteínas durante a tradução, garantindo que as cadeias TCR-alfa e TCR-beta sejam produzidas em proporção equimolar (Schmitt et al., 2009).

[0189] Os ácidos nucleicos que codificam os TCRs da presente descrição podem ser otimizados ao nível de seus códons para aumentar a expressão em uma célula hospedeira. O código genético é redundante e permite que alguns aminoácidos sejam codificados por mais de um códon, mas alguns códons são menos adequados que outros devido a fatores como, por exemplo, a disponibilidade relativa de tRNAs correspondentes (Gustafsson et al., 2004). Demonstrou-se que a modificação das sequências dos genes TCR-alfa e TCR-beta de modo que cada aminoácido seja codificado pelo códon ideal para

expressão de genes de mamíferos e de modo que a instabilidade de motivos ou de sítios de splicing crípticos seja eliminada aumenta significativamente a expressão de genes de TCR-alfa e TCR-beta (Scholten et al., 2006).

[0190] Além disso, erros de pareamento entre a cadeia de TCR endógena e a introduzida podem criar especificidades que acarretam risco significativo de autoimunidade. Por exemplo, a formação de dímeros mistos de TCR pode reduzir o número de moléculas CD3 disponíveis para formar complexos TCR devidamente pareados, o que diminui significativamente a avidéz funcional das células que expressam o TCR introduzido (Kuball et al., 2007).

[0191] Para reduzir erros de pareamento, o domínio C-terminal das cadeias do TCR introduzidas na presente descrição pode ser modificado para promover afinidade entre cadeias e, ao mesmo tempo, tornar as cadeias introduzidas menos capazes de emparelhar com o TCR endógeno. Essas estratégias podem consistir em substituição dos domínios C-terminais de TCR-alfa e TCR-beta humanos por seus correspondentes murinos (domínio C-terminal murinizado), geração de uma segunda ponte dissulfeto entre as cadeias no domínio C-terminal introduzindo-se um segundo resíduo de cisteína tanto na cadeia TCR-alfa como na cadeia TCR-beta do TCR introduzido (modificação por cisteína), troca de resíduos que interagem nos domínios C-terminais das cadeias TCR-alfa TCR-beta ("knob in hole") e fusão dos domínios variáveis das cadeias TCR-alfa e TCR-beta diretamente no CD3 ζ (fusão de CD3 ζ) (Schmitt et al., 2009).

[0192] Em uma configuração, uma célula hospedeira é modificada para expressar um TCR da presente descrição. Em algumas configurações preferidas, a célula hospedeira é uma célula T humana ou um progenitor de célula T. Em algumas configurações, a célula T ou a célula progenitora de célula T é obtida de um paciente com câncer. Em outras configurações, a

célula T ou a célula progenitora de célula T é obtida de um doador saudável. As células hospedeiras da presente descrição podem ser alogênicas ou autólogas em relação ao paciente a ser tratado. Em uma configuração a célula hospedeira é uma célula T gama/delta transformada para expressar um TCR alfa/beta.

[0193] Uma “composição farmacêutica” significa uma composição apropriada para administração a um ser humano em um ambiente clínico. Preferivelmente, a composição farmacêutica é estéril e produzida de acordo com as diretrizes de Boas Práticas de Fabricação.

[0194] As composições farmacêuticas compreendem os peptídeos tanto em forma livre como na forma de um sal farmaceuticamente aceitável (ver também o texto anterior). Conforme aqui utilizado, “sal farmaceuticamente aceitável” refere-se a um derivado dos peptídeos revelados onde o peptídeo é modificado elaborando-se sais ácidos ou básicos do agente. Por exemplo, os sais ácidos são preparados a partir da base livre (geralmente onde a forma neutra da droga possui um grupamento $-NH_2$ neutro) envolvendo reação com um ácido apropriado. Entre os ácidos apropriados para preparar sais ácidos estão tanto ácidos orgânicos (p.ex. ácido acético, ácido propiônico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malônico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinâmico, ácido mandélico, ácido metanossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido p-toluenossulfônico, ácido salicílico e assemelhados) como ácidos inorgânicos (p.ex. ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico e assemelhados). Por outro lado, a preparação de sais básicos de grupamentos ácidos que podem estar presentes em um peptídeo são preparados usando-se uma base farmaceuticamente aceitável como hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de amônia, hidróxido de cálcio, trimetilamina ou assemelhados.

[0195] Em uma configuração especialmente preferida, as

composições farmacêuticas compreendem os peptídeos na forma de sais do ácido acético (acetatos), de trifluoracetatos ou do ácido clorídrico (cloretos).

[0196] Preferivelmente, o medicamento da presente invenção é um imunoterápico como uma vacina. Ela pode ser administrada ao paciente, seja no órgão afetado ou por via sistêmica i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. ou aplicada *ex vivo* em células derivadas do paciente ou de linhagens celulares humanas que são posteriormente administradas ao paciente ou usadas *in vitro* para selecionar uma subpopulação de células imunes derivadas do paciente, que são então readministradas ao paciente. Se o ácido nucleico for administrado a células *in vitro*, pode ser útil que as células sejam transfectadas para que coexpressem citocinas imunoestimulatórias como a interleucina 2. O peptídeo pode ser basicamente puro ou associado a um adjuvante imunoestimulatório (ver adiante) ou usado em associação com citocinas imunoestimulatórias ou ser administrado por um sistema de administração apropriado como, por exemplo, lipossomos. O peptídeo também pode ser conjugado com um transportador apropriado, como a hemocianina de lapa (KLH, “keyhole limpet hemocyanin”) ou manana (ver WO 95/18145 e (Longenecker et al., 1993)). O peptídeo também pode ser marcado por uma proteína de fusão ou ser uma molécula híbrida. Espera-se que os peptídeos cujas sequências são mostradas na presente invenção sejam capazes de estimular células T CD4 ou CD8. Entretanto, a estimulação de células T CD8 é mais eficiente na presença do auxílio proporcionado por células T auxiliares CD4. Portanto, para epítomos de MHC classe I que estimulam células T CD8, o elemento de fusão ou seções de uma molécula híbrida proporcionam epítomos de maneira apropriada, que estimulam células T CD4-positivas. Os epítomos estimulantes de CD4 e CD8 são bem conhecidos na técnica e incluem aqueles identificados na presente invenção.

[0197] Em um aspecto, a vacina compreende pelo menos um peptídeo cuja sequência de aminoácidos é apresentada em SEQ N° 1 a

SEQ Nº 398 e pelo menos um outro peptídeo, preferivelmente de 2 a 50, mais preferivelmente de 2 a 25, ainda mais preferivelmente de 2 a 20 e, o mais preferido, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 peptídeos. Os peptídeos podem ser derivados de um ou mais AATs específicos e podem se ligar a moléculas de MHC classe I.

[0198] Outro aspecto da invenção proporciona um ácido nucleico (por exemplo, um polinucleotídeo) que codifica um peptídeo ou variante de um peptídeo da invenção. O polinucleotídeo pode ser, por exemplo, DNA, cDNA, PNA, RNA ou combinações dos mesmos, tanto de fita única como de fita dupla, ou formas nativas ou estabilizadas de polinucleotídeos como, por exemplo, polinucleotídeos com uma cadeia básica de fosforotioato, e pode ou não conter íntrons, contanto que codifique o peptídeo. Evidentemente, apenas peptídeos que contenham os resíduos de aminoácidos que ocorrem naturalmente e unidos por ligações peptídicas que ocorrem naturalmente podem ser codificados por um polinucleotídeo. Outro aspecto da invenção fornece um vetor de expressão capaz de expressar um polipeptídeo de acordo com a invenção.

[0199] Diversos métodos foram desenvolvidos para ligar polinucleotídeos, sobretudo de DNA, a vetores empregando, por exemplo, terminações coesivas complementares. Por exemplo, trechos de homopolímeros complementares podem ser adicionados ao segmento de DNA a ser inserido no DNA do vetor. Em seguida, o vetor e o segmento de DNA são unidos pela ponte de hidrogênio entre as caudas homopoliméricas complementares para formar moléculas de DNA recombinante.

[0200] Ligantes sintéticos que contêm um ou mais sítios de restrição constituem um método alternativo de unir o segmento de DNA aos vetores. Ligantes sintéticos contendo diversos sítios de endonucleases de restrição estão disponíveis comercialmente de diversas fontes, tais como a International Biotechnologies Inc. New Haven, CN, EUA.

[0201] Um método desejável de modificação do DNA que codifica o peptídeo da invenção emprega a reação em cadeia de polimerase conforme revelada por Saiki RK, et al. (Saiki et al., 1988). Esse método pode ser usado introduzindo-se DNA em um vetor apropriado, por exemplo, mediante engenharia de sítios de restrição apropriados, ou pode-se usá-lo para modificar o DNA de outras formas úteis, como é conhecido na técnica. Se forem usados vetores virais, são preferidos os vetores de varíola ou adenovírus.

[0202] O DNA (ou RNA, no caso de vetores retrovirais) pode então ser expresso em um hospedeiro apropriado para produzir um polipeptídeo que compreende um peptídeo da invenção ou variante do mesmo. Portanto, o DNA que codifica o peptídeo da invenção ou variante do mesmo pode ser usado de acordo com técnicas conhecidas e modificado apropriadamente conforme os ensinamentos aqui apresentados para construir um vetor de expressão, que é então utilizado para transformar uma célula hospedeira apropriada e produzir o polipeptídeo da invenção. Tais técnicas incluem as reveladas nas, por exemplo, em US 4.440.859, 4.530.901, 4.582.800, 4.677.063, 4.678.751, 4.704.362, 4.710.463, 4.757.006, 4.766.075 e 4.810.648.

[0203] O DNA (ou, no caso de vetores retrovirais, RNA) que codifica o polipeptídeo que constitui o composto da invenção pode ser unido a várias outras sequências de DNA para introdução em um hospedeiro apropriado. O DNA acompanhante dependerá da natureza do hospedeiro, do modo como o DNA é introduzido no hospedeiro e em se o desejado é a manutenção epissômica ou a integração.

[0204] Em geral, o DNA é inserido em um vetor de expressão como um plasmídeo na orientação correta e no “frame” de leitura correto para expressão. Se necessário, o DNA pode ser ligado às sequências de nucleotídeos de controle regulatória da transcrição e tradução reconhecidas pelo hospedeiro desejado, embora tais controles geralmente estejam disponíveis no vetor de

expressão. Em seguida, o vetor é introduzido no hospedeiro por meio de técnicas padrão. Em geral, nem todos os hospedeiros serão transformados pelo vetor. Portanto, é necessário selecionar as células transformadas do hospedeiro. Uma técnica de seleção consiste em incorporar ao vetor de expressão uma sequência de DNA, junto com os elementos de controle necessários, que codifique uma característica selecionada na célula transformada, como resistência a um antibiótico.

[0205] Como alternativa, o gene para tal característica selecionável pode estar em outro vetor, que é usado conjuntamente para transformar a célula hospedeira desejada.

[0206] As células hospedeiras transformadas pelo DNA recombinante da invenção são então cultivadas por um período de tempo suficiente e sob condições apropriadas, bem conhecidas dos versados na técnica em vista dos ensinamentos aqui revelados, para permitir a expressão do polipeptídeo, que poderá então ser recuperado.

[0207] Muitos vetores de expressão são conhecidos, incluindo bactérias (p.ex. *E. coli* e *Bacillus subtilis*), leveduras (p.ex. *Saccharomyces cerevisiae*), fungos filamentosos (p.ex. *Aspergillus sp.*), células vegetais, células animais e células de insetos. Preferivelmente, o sistema pode consistir em células mamíferas como células CHO disponibilizadas pela ATCC Cell Biology Collection.

[0208] Um vetor plasmídeo típico para expressão constitutiva em célula mamífera compreende o promotor de CMV ou SV40 com uma cauda poli-A apropriada e um marcador de resistência como a neomicina. Um exemplo é o pSVL, disponibilizado pela Pharmacia, Piscataway, NJ, EUA. Um exemplo de vetor de expressão induzível para células mamíferas é o pMSG, também fornecido pela Pharmacia. O pRS403-406 e o pRS413-416 são vetores plasmídicos úteis, que são geralmente disponibilizados pela Stratagene Cloning

Systems, La Jolla, CA 92037, EUA. Os plasmídios pRS403, pRS404, pRS405 e pRS406 são plasmídios de integração a leveduras (YIps, “Yeast Integrating plasmids”) e incluem os marcadores selecionáveis de leveduras HIS3, TRP1, LEU2 e URA3. Os plasmídios pRS413-416 são plasmídios de centrômeros de leveduras (Ycps, “yeast centromere plasmids”). Os vetores à base de promotor de CMV (p.ex. os fornecidos pela Sigma-Aldrich) proporcionam expressão transitória ou estável, expressão citoplasmática ou secreção, e a marcação N-terminal ou C-terminal em várias combinações de FLAG, 3xFLAG, c-myc ou MAT. Essas proteínas de fusão permitem detectar, purificar e analisar a proteína recombinante, e as proteínas de fusão com marcação dupla aumentam a flexibilidade de detecção.

[0209] A região regulatória promotora forte do citomegalovírus humano (CMV) promove a expressão de níveis constitutivos de proteína de até 1 mg/L em células COS. Em linhagens celulares menos potentes, os níveis proteicos são geralmente ~0,1 mg/L. A presença da origem de replicação do SV40 proporciona níveis elevados de replicação de DNA em células COS que permitem a replicação de SV40. Os vetores de CMV podem conter, por exemplo, a origem pMB1 (derivada de pBR322) para permitir a replicação em células bacterianas, o gene de β -lactamase para seleção de resistência à ampicilina em bactérias, poli-A de hGH e a origem f1. Os vetores que contêm a sequência líder de preprotipsina (PPT) podem direcionar a secreção de proteínas de fusão FLAG no meio de cultura para purificação mediante o uso de anticorpos anti-FLAG, resinas e placas. Outros vetores e sistemas de expressão são bem conhecidos na técnica para emprego com diversas células hospedeiras.

[0210] Em outra configuração, dois ou mais peptídeos ou variantes de peptídeos da invenção são codificados e, portanto, expressos em ordem sucessiva, numa estrutura semelhante a “contas em um colar”. Ao fazê-lo, os peptídeos ou variantes de peptídeos podem ser ligados ou fundidos por trechos

de aminoácidos ligantes, como, por exemplo, LLLLLL, ou podem ser ligados um ao outro sem nenhum outro peptídeo entre eles. Essas estruturas podem ser usadas para tratamento do câncer e podem induzir respostas imunes que envolvem tanto MHC I como MHC II.

[0211] A presente invenção refere-se também a uma célula hospedeira transformada por uma estrutura de vetor polinucleotídeo da presente invenção. A célula hospedeira pode ser procariota ou eucariota. As células bacterianas, que podem ser, preferivelmente, procariotas em algumas situações e normalmente são uma cepa de *E. coli* como, por exemplo, as cepas de *E. coli* DH5 fornecidas por Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EUA e RR1, fornecidas pela American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, MD, EUA (ATCC N° 31343). As células eucariotas preferidas são as de levedura, inseto e mamífero, preferivelmente células de vertebrados como camundongo, rato, macaco ou linhagens celulares de fibroblastos ou cólon humano. São células hospedeiras de levedura YPH499, YPH500 e YPH501, que são geralmente disponibilizadas por Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EUA. São células preferidas de hospedeiros mamíferos as de ovário de hamster chinês (CHO) fornecidas pela ATCC sob o número CCL61, células embrionárias NIH/3T3 de camundongo suíço do NIH fornecidas pela ATCC sob o número CRL 1658, células COS-1 derivadas de rim de macaco fornecidas pela ATCC sob o número CRL 1650 e células HEK-293 derivadas de rim embrionário humano. As células de inseto preferidas são as células Sf9, que podem ser transfectadas por vetores de expressão baseados em baculovírus. Uma visão geral da escolha de células hospedeiras apropriadas para expressão é apresentada, por exemplo, no livro-texto de Paulina Balbás e Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols, Part One, Second Edition," ISBN 978-1-58829-262-9 e em outras publicações conhecidas dos versados na técnica.

[0212] A transformação de células hospedeiras apropriadas por uma estrutura de DNA da presente invenção é realizada por métodos bem conhecidos na técnica, que normalmente dependem do tipo de vetor utilizado. Em relação à transformação de células hospedeiras procariotas, ver, por exemplo, Cohen et al.(Cohen et al., 1972) e(Green and Sambrook, 2012). A transformação de células de levedura foi descrita por Sherman et al. (Sherman et al., 1986). O método de Beggs(Beggs, 1978) também é útil. A Stratagene Cloning Systems e a Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EUA fornecem reagentes úteis para transfectar células de vertebrados (p.ex. fosfato de cálcio, DEAE-dextrana e formulações de lipossomos). A eletroporação também pode ser empregada para transformar e/ou transfectar células e é bem conhecida na técnica como processo para transformação de células de leveduras, células de bactérias, células de insetos e células de vertebrados.

[0213] As células cuja transformação foi bem-sucedida, i.é., células contendo uma estrutura de DNA da presente invenção, podem ser identificadas por técnicas bem conhecidas, como PCR. Alternativamente, a presença de proteínas no sobrenadante pode ser detectada usando-se anticorpos.

[0214] Perceber-se-á que algumas células hospedeiras da invenção são úteis na preparação dos peptídeos da invenção, como, por exemplo, células bacterianas, de levedura e de inseto. Entretanto, outras células hospedeiras podem ser úteis em determinados métodos terapêuticos. Por exemplo, células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, podem ser utilizadas com proveito para expressar os peptídeos da invenção de forma que possam ser carregados em moléculas de MHC apropriadas. Portanto, a presente invenção fornece uma célula hospedeira que compreende um ácido nucleico ou um vetor de expressão de acordo com a invenção.

[0215] Em uma configuração preferida, a célula hospedeira é uma célula apresentadora de antígenos, podendo ser uma célula dendrítica ou outra

célula apresentadora de antígenos. Em 29 de abril de 2010, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou o sipuleucel-T, que consiste em CAAs carregadas com uma proteína de fusão recombinante que contém fosfatase ácida prostática (PAP), para tratamento de CPRC assintomático ou minimamente sintomático(Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

[0216] Outro aspecto da invenção fornece um método de produção de um peptídeo ou de uma variante do mesmo, sendo que o método compreende o cultivo de uma célula hospedeira descrita e isolamento do peptídeo da célula hospedeira ou do meio de cultura da mesma.

[0217] Em outra configuração, o peptídeo, o ácido nucleico ou o vetor de expressão da invenção são usados em medicina. Por exemplo, o peptídeo ou uma variante do mesmo podem ser preparados para injeção intravenosa (i.v.), injeção subcutânea (s.c.), injeção intradérmica (i.d.), injeção intraperitoneal (i.p.) ou injeção intramuscular (i.m.). Os métodos preferidos de injeção de peptídeos são s.c., i.d., i.p., i.m. e i.v. Os métodos preferidos de injeção de DNA são i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. Doses de, p.ex., 50 µg a 1,5 mg e, preferivelmente 125 µg a 500 µg de peptídeo ou DNA, podem ser administradas, dependendo do peptídeo ou do DNA em questão. O uso de doses nesse intervalo já foi bem-sucedido em ensaios clínicos(Walter et al., 2012).

[0218] O polinucleotídeo usado para vacinação ativa pode ser basicamente puro ou contido em um sistema apropriado de vetor ou de transporte. Os ácidos nucleicos podem ser DNA, cDNA, PNA, RNA ou uma combinação dos mesmos. Os métodos usados para projetar e introduzir tais ácidos nucleicos são bem conhecidos na técnica. Uma visão geral é apresentada em, p.ex., Teufel et al. (Teufel et al., 2005). Vacinas de polinucleotídeos são fáceis de preparar, mas o modo de ação pelo qual esses vetores induzem uma resposta imune não é totalmente compreendido. Os vetores e sistemas de administração apropriados utilizam DNA e/ou RNA viral, tais como sistemas

baseados em adenovírus, vírus da vacínia, retrovírus, herpesvírus, vírus associados ao adenovírus ou híbridos contendo elementos de mais de um vírus. Alguns sistemas não virais consistem em lipídios catiônicos e polímeros catiônicos, que são bem conhecidos na técnica de administração de DNA. A administração física por dispositivos como o “gene gun” (canhão gênico) também pode ser empregada. O(s) peptídeo(s) codificados pelos ácidos nucleicos pode(m) ser uma proteína de fusão, por exemplo, com um epítipo que estimula as células T do respectivo CDR oposto, conforme descrito anteriormente.

[0219] O medicamento da invenção também pode incluir um ou mais adjuvantes. Os adjuvantes são substâncias que promovem ou potencializam de maneira inespecífica a resposta imune (p.ex. a resposta imune mediada por células T CD8-positivas e células T auxiliares (TH)) contra um antígeno e que, portanto, seriam consideradas úteis no medicamento da presente invenção. Alguns adjuvantes apropriados são, entre outros, 1018 ISS, sais de alumínio, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870.893, CpG7909, CyaA, dSLIM, flagelina ou ligantes TLR5 derivados da flagelina, ligante FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod (ALDARA®), resiquimod, ImuFact IMP321, interleucinas como IL-2, IL-13, IL-21, interferon alfa ou beta ou derivados peguizados dos mesmos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, monofosforil lipídio A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsões de água-em-óleo ou óleo-em-água, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vetor PepTel®, micropartículas à base de poli(lactídeo coglicolídeo) [PLG] e dextrana, talactoferrina, SRL172, virossomas e outras partículas semelhantes a vírus, YF-17D, armadilha de VEGF, R848, beta-glucana, Pam3Cys, estimulon QS21 de Águila (derivado da saponina), extratos micobacterianos e simuladores da parede celular bacteriana e outros adjuvantes exclusivos como Ribi's Detox, Quil ou Superfos. São preferidos adjuvantes como o de Freund ou GM-CSF. Vários

adjuvantes imunológicos (p.ex. MF59) específicos para células dendríticas e suas preparações já foram descritos anteriormente (Allison and Krummel, 1995). Citoquinas também podem ser usadas. Várias citoquinas (p.ex. TNF) foram associadas diretamente à influência sobre a migração de células dendríticas para tecidos linfoides, acelerando a maturação de células dendríticas de modo a formar células apresentadoras de antígenos que interagem de forma eficiente com linfócitos T (p.ex. GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Pat. EUA Nº 5.849.589, que fica específica e integralmente incorporada por referência) e que possuam atividade imunoadjuvante (p.ex. IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa e IFN-beta) (Gabrilovich et al., 1996).

[0220] Descreveu-se também que os oligonucleotídeos CpG imunoestimulatórios podem potencializar os efeitos dos adjuvantes em situações vacinais. Sem restringir-se a nenhuma teoria, os oligonucleotídeos CpG agem ativando o sistema imune inato (não adaptativo) por meio de receptores do tipo Toll (TLR, "Toll-like receptors"), especialmente o TLR9. A ativação de TLR9 desencadeada pelo CpG promove respostas humorais e celulares específicas contra diversos antígenos, incluindo antígenos peptídicos ou proteicos, vírus vivos ou mortos, vacinas de células dendríticas, vacinas celulares autólogas e conjugados de polissacarídeos, em vacinas tanto profiláticas como terapêuticas. Ainda mais importante, o CpG promove a maturação e diferenciação de células dendríticas, produzindo ativação de células TH1 e forte geração de linfócitos T citotóxicos (LTC), mesmo na ausência de auxílio de células T CD4. O viés para TH1 induzido pela estimulação por TLR9 se mantém mesmo na presença de adjuvantes vacinais, tais como o alúmen ou o adjuvante incompleto de Freund (IFA), que normalmente promovem um viés para TH2. Os oligonucleotídeos CpG apresentam atividade adjuvante ainda mais acentuada quando formulados ou coadministrados com outros adjuvantes ou em formulações como micropartículas, nanopartículas, emulsões lipídicas ou formulações

semelhantes, que são especialmente necessárias para induzir uma resposta acentuada a antígenos relativamente fracos. Eles também aceleram a resposta imune, permitindo reduzir as doses de antígenos em cerca de duas ordens de grandeza e obter uma resposta de anticorpos comparável à obtida com a dose plena da vacina sem CpG em alguns experimentos (Krieg, 2006). US 6.406.705 B1 descreve a utilização combinada dos oligonucleotídeos CpG, adjuvantes que não consistem em ácidos nucleicos e um antígeno para induzir uma resposta imune antígeno-específica. Um antagonista de CpG TLR9 é o dSLIM (“double Stem Loop Immunomodulator”), produzido pela Mologen (Berlim, Alemanha), que é o componente preferido para a composição farmacêutica da presente invenção. Outras moléculas ligantes de TLR como o TLR 7, TLR 8 e/ou TLR 9 ligantes de RNA também podem ser utilizadas.

[0221] Outros exemplos de adjuvantes úteis são, entre outros, CpGs modificados quimicamente (p.ex. CpR, Idera), análogos de dsRNA como o Poli(I:C) e derivados do mesmo (p.ex. AmpliGen®, Hiltonol®, poli-(ICLC), poli(IC-R), poli(I:C12U), DNA ou RNA bacteriano sem CpG e moléculas pequenas ou anticorpos com atividade imunológica como a ciclofosfamida, sunitinibe, inibidores de ‘checkpoint’ imune como ipilimumabe, nivolumabe, pembrolizumabe, atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe e cemiplimabe, Bevacizumabe®, Celebrex, NCX-4016, sildenafila, tadalafila, vardenafila, sorafenibe, temozolomida, temsirolimus, XL-999, CP-547632, pazopanibe, armadilha de VEGF, ZD2171, AZD2171 e anti-CTLA4, outros anticorpos contra estruturas-chave do sistema imune (p.ex. anti-CD40, anti-TGF-beta e antirreceptor de TNF- α) e SC58175, que podem exercer ação terapêutica ou como adjuvantes. As quantidades e concentrações de adjuvantes e aditivos úteis no contexto da presente invenção podem ser determinadas facilmente e sem experimentação excessiva por indivíduos praticantes da técnica.

[0222] São adjuvantes preferidos o anti-CD40, imiquimod,

resiquimod, GM-CSF, ciclofosfamida, sunitinibe, atezolizumabe, oligonucleotídeos CpG e derivados, poli-(I:C) e derivados, RNA, sildenafil e formações particuladas PLG, virossomos, interleucina (IL)-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21 e IL-23.

[0223] Em uma configuração preferida da composição farmacêutica de acordo com a invenção, o adjuvante é selecionado de um grupo formado por fatores estimuladores de colônias como o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamida, imiquimod, resiquimod e interferon- α .

[0224] Em uma configuração preferida da composição farmacêutica de acordo com a invenção, o adjuvante é selecionado de um grupo formado por fatores estimuladores de colônias como o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamida, imiquimod e resiquimod. Em uma configuração preferida da composição farmacêutica de acordo com a invenção, o adjuvante é a ciclofosfamida, o imiquimod ou o resiquimod. São adjuvantes ainda mais preferidos o Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poli-ICLC (Hiltonol®) e anticorpos monoclonais anti-CD40 ou combinações dos mesmos.

[0225] Esta composição é usada para administração parenteral, como por via subcutânea, intradérmica, intramuscular ou oral. Para esse fim, os peptídeos e, opcionalmente, outras moléculas, são dissolvidos ou suspensos em um veículo farmacêuticamente aceitável, preferivelmente um veículo aquoso. A composição também pode conter excipientes como tampões, agentes de ligação, agentes abrasivos, diluentes, flavorizantes, lubrificantes, etc. Os peptídeos também podem ser administrados conjuntamente com substâncias estimuladoras do sistema imune, como as citocinas. Uma ampla lista de excipientes que podem ser empregados em tais composições pode ser encontrada em, por exemplo, A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients

(Kibbe, 2000). A composição pode ser usada para prevenção, profilaxia e/ou tratamento de doenças adenomatosas ou cancerosas. Podem-se encontrar formulações exemplares em, por exemplo, EP2112253.

[0226] Cabe ressaltar que a resposta imune produzida pela vacina de acordo com a invenção ataca o câncer em diferentes estágios celulares e em vários estágios de desenvolvimento. Além disso, outras vias de sinalização associadas com o câncer também são atacadas. Isso constitui uma vantagem em relação às vacinas que agem apenas sobre um ou poucos alvos, pois o tumor pode se adaptar a esse tipo de ataque (escape tumoral) e nem todos os tumores expressam o mesmo padrão de antígenos. Por isso, uma combinação de vários peptídeos associados a tumores garante que todos os tumores apresentarão pelo menos alguns dos alvos. A composição foi projetada para tumores que expressem vários dos antígenos e age sobre diversas vias independentes necessárias para o crescimento e a manutenção do tumor. Portanto, a vacina pode ser usada sem individualização em uma população maior de pacientes. Isso significa que os pacientes a serem tratados com a vacina podem ser selecionados apenas por tipagem de HLA e não requerem análise de outros biomarcadores de expressão antigênica. Mesmo assim, a resposta imune induzida ataca vários alvos ao mesmo tempo, o que é importante para a eficácia (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

[0227] Conforme aqui utilizado, o termo “scaffold” (arcabouço) designa uma molécula que se liga especificamente a um determinante (p.ex. antigênico). Em uma configuração, o arcabouço é capaz de direcionar a entidade à qual está vinculado (p.ex. um (segundo) grupamento ligante de antígeno) a um sítio alvo como, por exemplo, um tipo específico de célula tumoral ou estroma tumoral que apresenta um determinante antigênico (p.ex. um complexo de peptídeo com MHC de acordo com a aplicação ora contemplada). Em outra configuração, o arcabouço é capaz de ativar a sinalização por meio de seu

antígeno alvo, que pode ser, por exemplo, um antígeno de um complexo receptor de células T. Os arcabouços incluem, entre outros, anticorpos e fragmentos dos mesmos, domínios ligantes de antígenos em um anticorpo, que compreendem uma região de cadeia pesada do anticorpo e uma região de cadeia leve do anticorpo, proteínas ligantes que compreendem pelo menos um motivo repetitivo de anquirina e molécula ligantes de antígenos de domínio único (SDAB), aptâmeros, TCRs (solúveis) e células (modificadas) como, por exemplo, células T alogênicas ou autólogas. Para avaliar se uma molécula funciona como arcabouço e se liga a um alvo, podem ser realizados ensaios de ligação.

[0228] Por ligação “específica”, entende-se uma ligação na qual o arcabouço se liga ao complexo de peptídeo com MHC relevante melhor que a outros complexos de peptídeo com MHC, de modo que um arcabouço dotado de uma molécula ativa capaz de destruir uma célula portadora de um alvo específico não seja capaz de destruir outra célula que não possui o alvo específico mas apresenta outros complexos de peptídeo com MHC. A ligação a outros complexos de peptídeo com MHC é irrelevante quando o peptídeo do complexo de peptídeo com MHC que produz reação cruzada não ocorre naturalmente, i.é., não é derivado do peptidoma do HLA humano. Os ensaios de avaliação da morte de células-alvo são bem conhecidos na técnica e devem ser realizados usando células-alvo (células primárias ou linhagens celulares) nas quais o complexo de peptídeo com MHC seja apresentado inalterado ou células carregadas com peptídeos de modo que se atinjam os níveis observados naturalmente de complexos de peptídeo com MHC.

[0229] Um arcabouço pode incluir uma marcação que permite detectá-lo por meio da determinação da presença ou não do sinal fornecido pelo marcador. Por exemplo, o arcabouço pode ser marcado por um corante fluorescente ou qualquer outra molécula marcadora celular pertinente. Tais moléculas marcadoras são bem conhecidas na técnica. Por exemplo, a

marcação fluorescente proporcionada, por exemplo, por um corante fluorescente, pode permitir a visualização do aptâmero ligado por meio de microscopia de fluorescência ou de varredura a laser ou detecção por citometria de fluxo.

[0230] Os arcabouços podem ser conjugados com uma segunda molécula ativa como, por exemplo, IL-21, anti-CD3 e anti-CD28.

[0231] Para mais informações sobre arcabouços polipeptídicos, ver, por exemplo, a seção geral de WO 2014/071978A1 e as referências nela citadas.

[0232] A presente invenção refere-se também a aptâmeros. Os aptâmeros (ver, por exemplo, WO 2014/191359 e a literatura nela citada) são moléculas curtas de ácido nucleico de fita única, que podem se dobrar formando estruturas tridimensionais e reconhecer estruturas-alvo específicas. Eles parecem ser opções apropriadas para o desenvolvimento de terapias direcionadas. Os aptâmeros se mostraram capazes de se ligar seletivamente e com alta afinidade e especificidade a diversos alvos complexos.

[0233] Na última década, foram identificados aptâmeros que reconhecem moléculas da superfície celular e proporcionam meios para o desenvolvimento de abordagens diagnósticas e terapêuticas. Como são praticamente atóxicos e não imunogênicos, os aptâmeros são candidatos promissores para aplicações biomédicas. Com efeito, aptâmeros como aqueles que reconhecem o antígeno prostático específico na membrana celular foram empregados com sucesso como terapias direcionadas e demonstraram sua funcionalidade em modelos de xenoenxerto *in vivo*. Também foram identificados aptâmeros que reconhecem linhagens específicas de células tumorais.

[0234] Podem-se selecionar aptâmeros de DNA que revelem propriedades de reconhecimento de amplo espectro para várias células oncológicas, sobretudo aquelas derivadas de tumores sólidos, e que não

reconheçam células não-tumorigênicas nem células saudáveis primárias. Se os aptâmeros identificados, em vez de reconhecer um subtipo tumoral específico, interagissem com diversos tumores, isso os tornaria úteis para o diagnóstico e tratamento dito de amplo espectro.

[0235] Além disso, pesquisas sobre o comportamento de ligação celular, realizadas por citometria de fluxo, também mostraram que os aptâmeros apresentaram excelentes afinidades aparentes na faixa de nanomoles.

[0236] Os aptâmeros podem ter aplicações diagnósticas e terapêuticas. Também foi demonstrado que alguns aptâmeros são captados por células tumorais e, portanto, podem funcionar como veículos moleculares para administração dirigida de agentes anticâncer (p.ex. siRNA) a células tumorais.

[0237] Podem-se selecionar aptâmeros contra alvos complexos como células e tecidos e complexos de peptídeos que compreendem ou, preferivelmente, que consistem em uma sequência de acordo com SEQ Nº 1 a SEQ Nº 398 da invenção ora em pauta com a molécula de MHC empregando a técnica de seleção cell-SELEX ("Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment").

[0238] Os peptídeos da presente invenção podem ser empregados para gerar e desenvolver anticorpos específicos contra complexos de MHC com peptídeo, que podem ser usados para tratamentos nos quais toxinas ou substâncias radioativas são guiadas até o tecido patológico. Outra aplicação desses anticorpos é guiar radionuclídeos ao tecido patológico para exames de imagem como o PET. Esta aplicação pode ajudar a detectar metástases pequenas ou determinar o tamanho e a localização exata dos tecidos patológicos.

[0239] Portanto, constitui outro aspecto da invenção o fornecimento de um método de produção de um anticorpo recombinante que se ligue especificamente a um complexo principal de histocompatibilidade (MHC)

humano classe I ou II que forme um complexo com um antígeno restrito por HLA (preferivelmente um peptídeo de acordo com a presente invenção), sendo que o método compreende imunizar um mamífero não-humano submetido à engenharia genética com células que expressam o referido complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano classe I ou II com uma forma solúvel de uma molécula de MHC classe I ou II que forme complexo com o referido antígeno restrito por HLA; isolar moléculas de mRNA de células produtoras de anticorpo do referido mamífero não-humano; produzir uma biblioteca de exposição em fagos que exiba as moléculas de proteína codificadas pelas referidas moléculas de mRNA; e isolar ao menos um fago da referida biblioteca de exposição em fagos, sendo que o pelo menos um fago referido expõe o referido anticorpo e se liga especificamente ao referido complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano classe I ou II em complexo com o referido antígeno restrito por HLA.

[0240] Constitui portanto outro aspecto da presente invenção o fornecimento de um anticorpo que se ligue especificamente a um complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano classe I ou II em complexo com um antígeno restrito por HLA, no qual o anticorpo é preferivelmente um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo biespecífico ou um anticorpo quimérico.

[0241] Os respectivos métodos usados para produzir tais anticorpos e complexos principais de histocompatibilidade classe I de cadeia única, assim como outras ferramentas empregadas para produzir tais anticorpos, são revelados em WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 e em publicações (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003) que, para as finalidades da presente invenção, ficam aqui integralmente incorporadas por referência.

[0242] Preferivelmente, o anticorpo se liga ao complexo com

afinidade inferior a 20 nanomolares, e preferivelmente inferior a 10 nanomolares, o que é também considerado “específico” no contexto da presente invenção.

[0243] A presente invenção refere-se a um peptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo formado por SEQ N° 1 a SEQ N° 398 ou a uma variante dos mesmos com pelo menos 88% de homologia (preferivelmente idêntico) com SEQ N° 1 a SEQ N° 398 ou uma variante da mesma que induz reação cruzada de células T com o referido peptídeo, sendo que o referido peptídeo não é o peptídeo completo subjacente.

[0244] A presente invenção refere-se também a um peptídeo que compreende uma sequência selecionada do grupo formado por SEQ N° 1 a SEQ N° 398 ou uma variante das mesmas, que seja pelo menos 88% homóloga (preferivelmente idêntica) a SEQ N° 1 a SEQ N° 398, sendo que cada um dos peptídeos referidos ou variantes dos mesmos possui comprimento total de 8 a 100, preferivelmente de 8 a 30 e, o mais preferido, de 8 a 14 aminoácidos.

[0245] A presente invenção refere-se também aos peptídeos de acordo com a invenção que possuem a capacidade de se ligarem a uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano classe I ou II.

[0246] A presente invenção refere-se também aos peptídeos de acordo com a presente invenção, nos quais o referido peptídeo consiste ou consiste essencialmente em uma sequência de aminoácidos de acordo com SEQ N° 1 a SEQ N° 398.

[0247] A presente invenção refere-se também aos peptídeos de acordo com a invenção, sendo que o peptídeo é modificado quimicamente e/ou inclui ligações não-peptídicas.

[0248] A presente invenção refere-se também aos peptídeos de acordo com a invenção, nos quais o peptídeo constitui parte de uma proteína de fusão, compreendendo em particular aminoácidos N-terminais da cadeia

invariante associada ao antígeno do HLA-DR (II), ou nos quais o peptídeo é fundido a (ou incorporado à sequência de) um anticorpo, tal como, por exemplo, um anticorpo específico para células dendríticas.

[0249] A presente invenção refere-se também a um ácido nucleico que codifica os peptídeos de acordo com a invenção, conquanto tal peptídeo não seja uma proteína humana completa (total).

[0250] A presente invenção refere-se também ao ácido nucleico de acordo com a invenção que consista em DNA, cDNA, PNA, RNA ou combinações dos mesmos.

[0251] A presente invenção refere-se também a um vetor de expressão capaz de expressar um ácido nucleico de acordo com a presente invenção.

[0252] A presente invenção se refere também a um peptídeo de acordo com a presente invenção, um ácido nucleico de acordo com a presente invenção ou um vetor de expressão de acordo com a presente invenção para uso em medicina, em particular para o tratamento de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma.

[0253] A presente invenção refere-se também a uma célula hospedeira que compreende um ácido nucleico de acordo com a invenção ou um vetor de expressão de acordo com a invenção.

[0254] A presente invenção refere-se também a células

hospedeiras de acordo com a presente invenção, que sejam células apresentadoras de antígenos e, preferivelmente, células dendríticas.

[0255] A presente invenção refere-se também a um método de produção de um peptídeo de acordo com a presente invenção, sendo que o referido método compreende o cultivo da célula hospedeira de acordo com a presente invenção e o isolamento do peptídeo da referida célula hospedeira ou do meio de cultura da mesma.

[0256] A presente invenção refere-se também ao método de acordo com a presente invenção, sendo que o referido antígeno é carregado em moléculas de MHC classe I ou II expressas na superfície de uma célula apresentadora de antígenos apropriada colocando-se uma quantidade suficiente do antígeno em contato com uma célula apresentadora de antígenos.

[0257] A presente invenção refere-se também a um método de acordo com a invenção, no qual a célula apresentadora de antígenos compreende um vetor de expressão capaz de expressar o referido peptídeo contendo SEQ Nº 1 a SEQ Nº 398 da referida sequência variante de aminoácidos.

[0258] A presente invenção relaciona-se também com células T ativadas produzidas de acordo com o método da presente invenção, sendo que as referidas células T reconhecem seletivamente células com expressão aberrante de um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos de acordo com a presente invenção.

[0259] Em um aspecto, as células T ativadas podem ser produzidas colocando-se em contato células T com moléculas de MHC classe I ou II humanas apresentadas na superfície de células apresentadoras de antígeno adequadas ou uma estrutura artificial que mimetiza uma célula apresentadora de antígeno por um período suficientemente longo para ativar as referidas células T.

[0260] A presente invenção refere-se também a um método para destruir células-alvo em um paciente no qual as células-alvo expressam de forma aberrante um polipeptídeo que compreende qualquer sequência de aminoácidos de acordo com a presente invenção, sendo que o método compreende a administração ao paciente de um número eficaz de células T produzidas de acordo com a presente invenção.

[0261] A presente invenção refere-se também a um método de tratamento de um paciente com câncer, no qual as células alvos apresentam expressão aberrante de um polipeptídeo que compreende qualquer sequência de aminoácidos de acordo com a presente invenção, sendo que o método compreende a administração ao paciente de um número eficaz de células T produzidas de acordo com a presente invenção.

[0262] A presente invenção refere-se também a um método de indução de resposta imune em um paciente com câncer, no qual as células cancerosas expressam de forma aberrante um polipeptídeo que compreende qualquer sequência de aminoácidos de acordo com a presente invenção, sendo que o método compreende a administração ao paciente de um número eficaz de células T produzidas de acordo com a presente invenção.

[0263] Em um aspecto, as células T podem ser autólogas em relação ao paciente. Em outro aspecto, as células T podem ser obtidas de um doador saudável. Em outro aspecto, as células T podem ser derivadas de linfócitos infiltrantes de tumores ou de células mononucleares do sangue periférico. Em outro aspecto, a resposta imune pode incluir uma resposta citotóxica de células T..

[0264] A presente invenção refere-se também à utilização de qualquer um dos peptídeos descritos, de um ácido nucleico de acordo com a presente invenção, de um vetor de expressão de acordo com a presente invenção, de uma célula de acordo com a presente invenção ou de um linfócito T

citotóxico ativado de acordo com a presente invenção como medicamento ou para fabricação de um medicamento. A presente invenção refere-se também a uma utilização de acordo com a presente invenção, onde o medicamento possui atividade anticâncer.

[0265] A presente invenção refere-se também a uma utilização de acordo com a invenção, na qual o medicamento é uma vacina. A presente invenção refere-se também a uma utilização de acordo com a invenção, onde o medicamento possui atividade anticâncer.

[0266] A presente invenção se refere também a um uso de acordo com a invenção, no qual as referidas células de câncer são de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma.

[0267] A presente invenção se refere também a proteínas marcadoras e biomarcadores específicos, baseados nos peptídeos de acordo

com a presente invenção e doravante denominados “alvos”, que podem ser usados para diagnóstico ou determinação do prognóstico de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma. A presente invenção refere-se também ao uso desses novos agentes para tratamento do câncer.

[0268] O termo “anticorpo” ou “anticorpos” é aqui utilizado em sentido amplo e inclui tanto anticorpos policlonais como monoclonais. O termo anticorpo abrange tanto moléculas de imunoglobulina integrais (completas) como fragmentos (p.ex. CDRs, Fv, Fab e Fc) ou polímeros de tais moléculas de imunoglobulinas e versões humanizadas de moléculas de imunoglobulina, conquanto apresentem quaisquer das propriedades desejadas (p.ex. ligação específica a um peptídeo ou polipeptídeo marcador de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin ou melanoma, carregamento de uma toxina a uma célula de carcinoma colangiocelular,

carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin ou melanoma que sobreexpresse um gene marcador de câncer e/ou apresente atividade inibidora, conforme definida pela invenção, sobre um peptídeo de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma de acordo com a invenção.

[0269]

[0270] Sempre que possível, os anticorpos da invenção podem ser adquiridos de fontes comerciais. Os anticorpos da invenção também podem ser gerados usando-se métodos bem conhecidos. Os versados na técnica perceberão que os anticorpos da invenção podem ser gerados a tanto a partir de peptídeos marcadores de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não

pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma como de fragmentos dos mesmos. Um polipeptídeo para uso na geração de um anticorpo da invenção pode ser total ou parcialmente purificado a partir de uma fonte natural ou pode ser produzido usando-se técnicas de DNA recombinante.

[0271] Pode-se, por exemplo, expressar um cDNA que codifica um peptídeo de acordo com a presente invenção (p.ex. um polipeptídeo de acordo com SEQ Nº 1 a SEQ Nº 398 ou uma variante ou fragmento do mesmo) em células procariotas (p.ex. bactérias) ou eucariotas (p.ex. células de leveduras, insetos ou mamíferos). Em seguida, pode-se purificar a proteína recombinante e usá-la para gerar um preparado de anticorpos monoclonais ou policlonais que se ligam especificamente aos polipeptídeos marcadores de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin ou melanoma usados para gerar o anticorpo de acordo com a invenção.

[0272] Os versados na técnica perceberão que a geração de dois ou mais conjuntos diferentes de anticorpos monoclonais ou policlonais maximiza a possibilidade de obter um anticorpo com a especificidade e a afinidade necessárias para o uso pretendido (p.ex. ELISA, imunohistoquímica, imagem *in vivo*, imunoterapia com toxinas). Os anticorpos foram testados para avaliar se

possuíam a atividade desejada usando-se métodos conhecidos de acordo com o propósito para o qual os anticorpos serão empregados (p.ex. ELISA, imunohistoquímica, imunoterapia, etc.; para mais informações sobre a geração e teste de anticorpos, consulte, p.ex., Greenfield, 2014(Greenfield, 2014)). Por exemplo, os anticorpos podem ser testados em ensaios ELISA, western blot ou coloração imunohistoquímica de cânceres fixados em formalina ou cortes de tecido congelado. Após serem caracterizados inicialmente *in vitro*, os anticorpos destinados a emprego terapêutico ou diagnóstico *in vivo* são testados de acordo com métodos de ensaio clínico bem conhecidos.

[0273] Conforme aqui utilizado, o termo “anticorpo monoclonal” refere-se a um anticorpo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, i.é., os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos, exceto por mutações que podem ocorrer naturalmente e estar presentes em pequenas quantidades. Os anticorpos monoclonais aqui descritos incluem especificamente anticorpos “quiméricos” nos quais uma parte das cadeias leves e/ou pesadas é idêntica ou homóloga às sequências correspondentes de anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencentes a uma classe ou subclasse de anticorpos específicos, ao passo que o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo às sequências correspondentes de anticorpos derivados de outra espécie ou pertencentes a outra classe ou subclasse de anticorpos, assim como fragmentos de tais anticorpos, conquanto apresentem a atividade antagonista desejada (Pat. US 4.816.567, que fica aqui integralmente incorporada).

[0274] Os anticorpos monoclonais da invenção podem ser preparados usando métodos com hibridomas. Em um método com hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado é tipicamente imunizado com um agente imunizante para produzir linfócitos que produzam ou sejam capazes de produzir anticorpos que se ligam especificamente ao agente

imunizante. Como alternativa, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*.

[0275] Os anticorpos monoclonais também podem ser produzidos por métodos de DNA recombinante, tais como os descritos em US 4.816.567. O DNA que codifica os anticorpos monoclonais da invenção pode ser prontamente isolado e sequenciado mediante procedimentos convencionais (p.ex. usando sondas de oligonucleotídeos capazes de se ligar especificamente aos genes que codificam as cadeias leves e pesadas de anticorpos murinos).

[0276] Os métodos *in vitro* também são apropriados para preparar anticorpos monovalentes. A digestão de anticorpos para produzir fragmentos dos mesmos, sobretudo fragmentos Fab, pode ser realizada usando-se técnicas rotineiras conhecidas na técnica. Por exemplo, a digestão pode ser realizada usando-se papaína. Alguns exemplos de digestão por papaína são descritos em WO 94/29348 e Pat. US 4.342.566. A digestão de anticorpos por papaína geralmente produz dois fragmentos idênticos ligantes de antígenos denominados fragmentos Fab, cada um dos quais com um único sítio de ligação de antígenos e um fragmento Fc residual. O tratamento com pepsina produz um fragmento F(ab')₂ e um fragmento pFc'.

[0277] Sejam ou não conectados a outras sequências, os fragmentos de anticorpos podem incluir inserções, deleções, substituições ou outras modificações selecionadas de regiões específicas ou de resíduos de aminoácidos específicos, com a condição de que a atividade do fragmento não seja significativamente alterada ou prejudicada em comparação com o anticorpo ou fragmento de anticorpo não modificado. Essas modificações podem proporcionar novas propriedades, como a retirada ou inclusão de aminoácidos capazes de formar pontes dissulfeto para aumentar a biolongoevidade, alterar as características secretórias, etc. Em qualquer caso, o fragmento de anticorpos deve possuir uma propriedade bioativa, como atividade de ligação, regulação da ligação no domínio de ligação, etc. As regiões funcionais ou ativas do anticorpo

podem ser identificadas por mutagênese de uma região específica da proteína, seguida de expressão e teste do polipeptídeo expresso. Tais métodos, que serão prontamente evidentes para os versados na técnica, podem incluir mutagênese em sítios específicos do ácido nucleico codificador do fragmento de anticorpo.

[0278] Os anticorpos da invenção também podem compreender anticorpos humanizados ou anticorpos humanos. As formas humanizadas de anticorpos não-humanos (p.ex. murinos) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou fragmentos das mesmas (como Fv, Fab, Fab' ou outra subsequência ligante de antígeno de um anticorpo) que contêm a sequência mínima derivada de uma imunoglobulina não-humana. Os anticorpos humanizados incluem imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) nas quais os resíduos de uma região determinante complementar (CDR, “complementary determining region”) do receptor são substituídos por resíduos do CDR de uma espécie não-humana (anticorpo doador) como camundongo, rato ou coelho, que tenha especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, resíduos da estrutura Fv (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não-humanos correspondentes. Os anticorpos humanizados também podem compreender resíduos que não são encontrados nem no anticorpo recipiente nem no CDR importado ou nas sequências da estrutura. Em geral, os anticorpos humanizados compreendem basicamente ao menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis nos quais todas ou substancialmente todas as regiões do CDR correspondem às de uma imunoglobulina não-humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são de uma sequência de consenso de imunoglobulina humana. Idealmente, o anticorpo humanizado compreende também ao menos parte de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente uma região de imunoglobulina humana.

[0279] Os métodos de humanização de anticorpos não-humanos são bem conhecidos na técnica. De forma geral, um anticorpo humanizado

recebe um ou mais resíduos de aminoácidos obtidos de uma fonte não-humana. Esses resíduos de aminoácidos não-humanos são frequentemente denominados resíduos “importados”, pois são obtidos de um domínio variável “importado”. Essencialmente, a humanização pode ser realizada usando-se CDRs ou sequências de CDR de roedores para substituir sequências correspondentes de um anticorpo humano. Portanto, tais anticorpos “humanizados” são anticorpos quiméricos (Pat. US 4.816.567) nos quais uma porção substancialmente menor que um domínio variável humano intacto foi substituída pela sequência correspondente de uma espécie não-humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos de CDR e talvez alguns resíduos de FR foram substituídos por resíduos de sítios análogos de anticorpos de roedores.

[0280] Podem ser empregados animais transgênicos (p.ex. camundongos) capazes de, quando imunizados, produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigota do gene na região juncional da cadeia pesada dos anticorpos em camundongos quiméricos com mutação germinativa inibe completamente a produção endógena de anticorpos. Nesses camundongos com mutação germinativa, a transferência do conjunto de genes de imunoglobulina de linhagem germinativa humana leva à produção de anticorpos humanos após exposição antigênica. Também é possível produzir anticorpos humanos usando bibliotecas de exposição de fagos.

[0281] Preferivelmente, os anticorpos da invenção devem ser administrados a indivíduos em um veículo farmacêuticamente aceitável. Em geral, usa-se uma formulação contendo uma quantidade apropriada de um sal farmacêuticamente aceitável para tornar a formulação isotônica. Alguns exemplos de veículos farmacêuticamente aceitáveis são solução salina, solução de Ringer e solução de dextrose. O pH da solução é preferivelmente de cerca de

5 a cerca de 8, e mais preferivelmente de cerca de 7 a cerca de 7,5. Outros veículos possíveis são preparações de liberação prolongada como matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo, sendo que as matrizes possuem o formato de artigos moldados (p.ex. filmes, lipossomos ou micropartículas). Os versados na técnica perceberão que alguns veículos podem ser mais preferíveis, dependendo, por exemplo, da via de administração e da concentração do anticorpo a ser administrado.

[0282] Os anticorpos podem ser administrados ao indivíduo, paciente ou célula por injeção (p.ex. intravenosa, intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular) ou por outros métodos, como a infusão, para garantir a introdução na circulação de forma eficaz. Os anticorpos também podem ser administrados pelas vias intra ou peritumoral para que produzam efeitos terapêuticos locais e sistêmicos. A injeção local ou intravenosa é preferida.

[0283] As doses efetivas e cronogramas de administração dos anticorpos podem ser determinados empiricamente, e a realização dessas determinações é contemplada pelas habilidades conhecidas na técnica. Os versados na técnica compreenderão que a dose de anticorpos que precisa ser administrada variará dependendo, por exemplo, do indivíduo que receberá o anticorpo, da via de administração, do tipo específico de anticorpo utilizado e de outras drogas administradas. Uma dose diária típica do anticorpo usado isoladamente pode variar de cerca de 1 µg/kg até 100 mg/kg de peso corporal por dia, dependendo dos fatores mencionados anteriormente. Após administração de um anticorpo, preferivelmente para tratamento de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não

pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin ou melanoma, pode-se avaliar a eficácia terapêutica do mesmo de diversas maneiras conhecidas dos versados na técnica. Por exemplo, o tamanho, o número e/ou a distribuição do câncer em um indivíduo em tratamento podem ser monitorados por técnicas padrão de imagem tumoral. Um anticorpo administrado com finalidade terapêutica que detenha o crescimento tumoral, faça o tumor encolher e/ou impeça que surjam novos tumores (em relação a como a doença evoluiria se não se administrasse o anticorpo) constitui um anticorpo eficaz para tratamento de câncer.

[0284] Outro aspecto da invenção é o fornecimento de um método de produção de um receptor de células T solúvel (sTCR) que reconheça um complexo peptídeo-MHC específico. Esses receptores de células T solúveis podem ser gerados a partir de clones específicos de células T, e sua afinidade pode ser aumentada por mutagênese nas regiões determinantes de complementaridade. Para selecionar receptores de células T, pode-se empregar a exibição em fagos (US 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). Para estabilizar os receptores de células T durante a exibição em fagos e em aplicações práticas envolvendo sua utilização como droga, podem-se ligar as cadeias alfa e beta uma à outra por, p.ex., ligações dissulfeto não-nativas, outras ligações covalentes (receptor de células T de cadeia única) ou domínios de dimerização (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). O receptor de célula T pode ser ligado a toxinas, drogas, citocinas (ver, p.ex., US 2013/0115191), domínios de recrutamento de células efectoras (p.ex. domínio anti-CD3), etc., para executar funções específicas em células-alvo. O receptor também pode ser expresso em células T usadas para transferência adotiva. Para mais informações, consulte WO 2004/033685A1 e WO 2004/074322A1. Uma

combinação de sTCRs é descrita em WO 2012/056407A1. Outros métodos para sua produção são revelados em WO 2013/057586A1.

[0285] Os peptídeos e/ou TCRs ou anticorpos ou outras moléculas ligantes da presente invenção podem ser usadas também para verificar o diagnóstico de câncer de um patologista a partir de uma amostra de biópsia.

[0286] Os anticorpos ou TCRs também podem ser usados para ensaios diagnósticos *in vivo*. Geralmente, o anticorpo é marcado por um radionuclídeo (como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P ou ^{35}S) para que se possa localizar o tumor por imunocintigrafia. Em uma configuração, anticorpos ou fragmentos dos mesmos se ligam aos domínios extracelulares de dois ou mais alvos de uma proteína selecionada do grupo formado pelas proteínas supramencionadas, e o coeficiente de afinidade (K_D) é menor que $1 \times 10 \mu\text{M}$.

[0287] Os anticorpos para uso diagnóstico podem ser marcados com sondas apropriadas para detecção por vários métodos de imagem. São métodos para detecção de sondas, entre outros, fluorescência, microscopia óptica, confocal ou eletrônica; imagem e espectroscopia de ressonância magnética; fluoroscopia; tomografia computadorizada; e tomografia por emissão de pósitrons. São sondas apropriadas, entre outras, fluoresceína, rodamina, eosina e outros fluoróforos, radioisótopos, ouro, gadolínio e outros lantanídeos, ferro paramagnético, flúor-18 e outros radionuclídeos emissores de pósitrons. As sondas também podem ser bi ou multifuncionais e os métodos de detecção podem incluir mais de um dos métodos listados anteriormente. Esses anticorpos podem ser marcados direta ou indiretamente pelas referidas sondas. A conexão das sondas aos anticorpos requer ligação covalente da sonda, incorporação da sonda ao anticorpo e ligação covalente de um composto quelante para ligação da sonda, entre outros procedimentos bem conhecidos na técnica. Para imunohistoquímica, a amostra de tecido patológico pode ser fresca, congelada ou emblocada em parafina e fixada com um conservante como a formalina. O

corte fixado ou emblocado contendo a amostra é colocado em contato com um anticorpo primário marcado e com um anticorpo secundário, sendo que o anticorpo é usado para detectar a expressão de proteínas *in situ*.

[0288] Outro aspecto da presente invenção inclui um método *in vitro* de produção de células T ativadas, sendo que o método compreende colocar células T em contato *in vitro* com moléculas de MHC humano expressas na superfície de uma célula apresentadora de antígenos por um período suficientemente longo para ativar a célula T de forma específica para o antígeno, sendo que o antígeno é um peptídeo de acordo com a invenção. Preferivelmente, emprega-se uma quantidade de antígeno apropriada junto com uma célula apresentadora de antígeno.

[0289] Preferivelmente, as células de mamíferos não possuem ou apresentam níveis reduzidos de função do transportador de peptídeos TAP. Algumas células apropriadas, que não possuem o transportador de peptídeos TAP, são as células T2, RMA-S e células de drosófila. O TAP é o transportador associado ao processamento de antígenos.

[0290] A linhagem celular T2, que é deficiente em carregamento de peptídeos humanos, está disponível na American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EUA, sob o nº de catálogo CRL 1992; a linhagem celular de drosófila Schneider 2 está disponível na ATCC sob o nº de catálogo CRL 19863; e a linhagem celular de camundongo RMA-S é descrita em Ljunggren et al. (Ljunggren and Karre, 1985).

[0291] Preferivelmente, antes da transfecção a célula hospedeira praticamente não expressa moléculas de MHC classe I. Também é preferível que a célula estimulatória expresse uma molécula importante para o fornecimento de um sinal coestimulatório para células T, tais como qualquer um entre B7.1, B7.2, ICAM-1 e LFA 3. As sequências de ácidos nucleicos de várias moléculas de MHC classe I e de moléculas coestimulatórias estão disponíveis

publicamente nos bancos de dados GenBank e EMBL.

[0292] No caso de epítomos de MHC classe I usados como antígeno, as células T são células T CD8-positivas.

[0293] Se uma célula apresentadora de antígeno for transfectada para expressar um desses epítomos, a célula deve compreender, preferivelmente, um vetor de expressão capaz de expressar um peptídeo contendo SEQ Nº 1 a SEQ Nº 398 ou uma sequência de aminoácidos variante dos mesmos.

[0294] Diversos outros métodos podem ser usados para gerar células T *in vitro*. Por exemplo, linfócitos autólogos infiltrantes de tumores podem ser usados para geração de LTC. Plebanski et al. (Plebanski et al., 1995) utilizaram linfócitos autólogos de sangue periférico (PLBs) para preparar células T. Pode-se produzir células T citotóxicas autólogas pulsando células dendríticas com peptídeos ou polipeptídeos ou mediante infecção por um vírus recombinante. As células B também podem ser usadas para produzir células T autólogas. Macrófagos pulsados com peptídeos ou polipeptídeos ou infectados com vírus recombinantes também podem ser usados para preparar células T autólogas. S. Walter et al. (Walter et al., 2003) descreveram a preparação ("priming") *in vitro* de células T por meio de células apresentadoras de antígenos (aCAAs) artificiais, que também são uma maneira apropriada de gerar células T contra o peptídeo escolhido. Na presente invenção, as aCAAs foram geradas acoplando-se complexos MHC-peptídeo pré-formados à superfície de partículas de poliestireno (microesférulas) por bioquímica de biotina:estreptavidina. Esse sistema permite controlar exatamente a densidade de MHC sobre as aCAAs, permitindo induzir, de forma seletiva e altamente eficiente, respostas de células T específicas para antígenos de avidéz baixa ou elevada em amostras de sangue. Além dos complexos de MHC com peptídeo, as aCAAs devem transportar outras proteínas com atividade coestimulatória como anticorpos anti-

CD28 acoplados à sua superfície. Além disso, tais sistemas à base de aCAA frequentemente requerem adição de fatores solúveis apropriados, como, p.ex., citocinas como a interleucina 12.

[0295] Células alogênicas também podem ser usadas para preparar células T, e um método é descrito detalhadamente em WO 97/26328, que fica aqui incorporada por referência. Por exemplo, além de células de drosófila e células T2, podem-se usar outras células para apresentar antígenos, tais como células CHO, células de inseto infectadas por baculovírus, bactérias, leveduras e células-alvo infectadas por vacínia. Também podem ser usados vírus de plantas (ver, por exemplo, Porta et al. (Porta et al., 1994), que descreve o desenvolvimento do vírus do mosaico de caupi como um sistema de alto rendimento para apresentação de peptídeos exógenos).

[0296] As células T ativadas direcionadas contra os peptídeos da invenção possuem utilidade terapêutica. Portanto, outro aspecto da invenção fornece células T ativadas que podem ser obtidas pelos métodos da invenção apresentados anteriormente.

[0297] As células T ativadas produzidas pelo método descrito anteriormente reconhecem seletivamente células com expressão aberrante de um polipeptídeo que compreende qualquer sequência de aminoácidos do grupo SEQ Nº 1 a SEQ Nº 398.

[0298] Preferivelmente, a célula T reconhecerá a célula ao interagir através de seu TCR com o complexo HLA-peptídeo (p.ex., ligação). As células T são úteis em um método de destruição células-alvo em um paciente cujas células-alvo apresentem expressão aberrante de um polipeptídeo que compreenda uma sequência de aminoácidos da invenção, sendo que o paciente recebe um número eficaz de células T ativadas. As células T administradas ao paciente podem ser derivadas do próprio paciente e ativadas conforme descrito anteriormente (i.é., são células T autólogas). Alternativamente, as células T não

são do paciente, mas de outro indivíduo. Evidentemente, prefere-se que o indivíduo seja um indivíduo saudável. Por “indivíduo saudável”, os inventores designam um indivíduo com boa saúde geral, preferivelmente com um sistema imune competente e, mais preferivelmente, que não apresente nenhuma doença que possa ser facilmente detectada por exames.

[0299] *In vivo*, as células-alvo das células T CD8-positivas de acordo com a presente invenção podem ser células tumorais (que às vezes expressam MHC classe II) e/ou células estromais que circundam o tumor (células tumorais) (que às vezes também expressam MHC classe II (Dengjel et al., 2006)).

[0300] As células T da presente invenção podem ser utilizadas como ingredientes ativos de uma composição terapêutica. Portanto, a invenção fornece também um método de destruição de células-alvo em um paciente cujas células-alvo apresentam expressão aberrante de um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos da invenção, sendo que o método compreende administrar ao paciente um número eficaz de células T, conforme definido anteriormente.

[0301] Com o termo “expressão aberrante”, os inventores também querem dizer que o polipeptídeo é sobreexpresso em comparação com os níveis de expressão em tecidos normais ou que o gene é expresso no tumor apesar de permanecer silencioso no tecido do qual o tumor é derivado. Com o termo “sobreexpresso”, os autores querem dizer que o peptídeo está presente em níveis pelo menos 1,2 vez o nível encontrado no tecido normal, preferivelmente pelo menos 2 vezes e, mais preferivelmente pelo menos 5 ou 10 vezes o nível encontrado no tecido normal.

[0302] As células T podem ser obtidas por métodos conhecidos na técnica, p.ex. os métodos descritos anteriormente.

[0303] Os protocolos para a chamada transferência adotiva de

células T são bem conhecidos na técnica. São apresentadas revisões em Gattioni et al. e Morgan et al. (Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006)

[0304] Outro aspecto da presente invenção inclui o uso de peptídeos em complexo com MHC para gerar um receptor de células T cujo ácido nucleico seja clonado e introduzido na célula hospedeira, preferivelmente uma célula T. Essa célula T modificada pode então ser introduzida em um paciente para tratamento do câncer.

[0305] Qualquer molécula da invenção, i.é., o peptídeo, ácido nucleico, anticorpo, vetor de expressão, célula, célula T ativada, receptor de célula T ou ácido nucleico que o codifique, é útil no tratamento de distúrbios caracterizados por células que escapam de uma resposta imune. Portanto, qualquer molécula da presente invenção pode ser empregada como medicamento ou na fabricação de um medicamento. A molécula pode ser empregada isoladamente ou combinada com outras moléculas da invenção ou com moléculas conhecidas.

[0306] A presente invenção refere-se também a um kit que compreende:

[0307] (a) um recipiente que contém uma composição farmacêutica conforme descrito anteriormente, em solução ou em forma liofilizada;

[0308] (b) opcionalmente, um segundo recipiente contendo um diluente ou solução para reconstituição de uma formulação liofilizada; e

[0309] (c) opcionalmente, instruções de (i) uso da solução ou (ii) reconstituição e/ou uso da formulação liofilizada.

[0310] O kit pode compreender também um ou mais dentre (iii) um tampão, (iv) um diluente, (v) um filtro, (vi) uma agulha ou (v) uma seringa. O recipiente é preferivelmente um frasco, uma ampola, uma seringa ou um tubo de ensaio e pode ser um recipiente multiuso. A composição farmacêutica é preferivelmente liofilizada.

[0311] Kits da presente invenção, compreendendo preferivelmente uma formulação liofilizada da presente invenção em um recipiente apropriado e instruções para sua reconstituição e uso. São recipientes adequados, por exemplo, frascos, ampolas (p.ex. ampolas de câmara dupla), seringas (como seringas de câmara dupla) e tubos de ensaio. O recipiente pode ser constituído de diversos materiais como vidro ou plástico. Preferivelmente, o kit e/ou o recipiente contém instruções no ou associadas ao recipiente que apresentam instruções para reconstituição e/ou utilização. Por exemplo, o rótulo pode indicar que a formulação liofilizada pode ser reconstituída até atingir as concentrações peptídicas descritas anteriormente. O rótulo também pode indicar que a formulação é útil ou destina-se a administração subcutânea.

[0312] O recipiente contendo a formulação pode ser um frasco multiuso, que permite administrações repetidas (p.ex. de 2 a 6 administrações) da formulação reconstituída. O kit pode compreender também um segundo recipiente que contém um diluente apropriado (p.ex. solução de bicarbonato de sódio).

[0313] Ao misturar o diluente e a formulação liofilizada, a concentração final do peptídeo na formulação reconstituída é preferivelmente pelo menos 0,15 mg/mL/peptídeo (75 µg) e preferivelmente não mais que 3 mg/mL/peptídeo (1500 µg). O kit pode incluir também outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do usuário, como outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e bulas com instruções de uso.

[0314] Os kits da presente invenção podem conter um único recipiente que contém a formulação das composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção, com ou sem outros componentes (p.ex. outros compostos ou composições farmacêuticas desses outros compostos) ou pode possuir recipientes distintos para cada componente.

[0315] Preferivelmente, os kits da presente invenção contêm uma

formulação farmacêutica embalada para uso em associação com a coadministração de um segundo composto (como os adjuvantes (p.ex. GM-CSF), um agente quimioterápico, um produto natural, um hormônio ou antagonista, um agente antiangiogênese ou inibidor, um agente indutor de apoptose ou um quelante) ou uma composição farmacêutica dos mesmos. Os componentes do kit podem ser pré-complexados ou cada componente pode ser fornecido em um recipiente diferente e separado antes da administração a um paciente. Os componentes do kit podem ser fornecidos em uma ou mais soluções líquidas, preferivelmente soluções aquosas e, mais preferivelmente, soluções aquosas estéreis. Os componentes do kit também podem ser fornecidos no estado sólido e serem convertidos em líquido adicionando-se solventes apropriados, que são preferivelmente fornecidos em outro recipiente separado.

[0316] O recipiente de um kit terapêutico pode ser uma ampola, tubo de ensaio, frasco, garrafa, seringa ou qualquer outro meio de envasar um sólido ou líquido. Usualmente, quando existe mais de um componente, o kit conterá um segundo frasco ou outro recipiente, que permitirá administração separada. O kit também pode conter outro recipiente para um líquido farmaceuticamente aceitável. Preferivelmente, um kit terapêutico contém um aparato (p.ex. uma ou mais agulhas, seringas, conta-gotas, pipetas, etc.), que permite administrar os agentes da invenção que são componentes do presente kit.

[0317] A presente formulação é de um tipo apropriado para administração de peptídeos por qualquer via aceitável, como a oral (entérica), nasal, oftálmica, subcutânea, intradérmica, intramuscular, intravenosa ou transdérmica. A administração deve ser preferivelmente s.c. e, o mais preferido, i.d., podendo também ser realizada por uma bomba de infusão.

[0318] Como os peptídeos da invenção foram isolados de

carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma, o medicamento da invenção é preferivelmente usado no tratamento de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin ou melanoma.

[0319] A presente invenção refere-se também a método de produção de um medicamento personalizado para um paciente individual, que compreende a fabricação de uma composição farmacêutica que compreende pelo menos um peptídeo selecionado de um depósito de TUMAPs pré-selecionados, no qual pelo menos um peptídeo empregado na composição farmacêutica é selecionado conforme seja mais apropriado para o paciente individual. Em uma configuração, a composição farmacêutica é uma vacina. O método também pode ser adaptado para produzir clones de células T para aplicações subsequentes, tais como isolamento de TCR, ou anticorpos solúveis e outras opções terapêuticas.

[0320] “Medicamento personalizado” significa tratamentos adaptados especificamente a um paciente e que serão usados apenas para tratamento desse paciente, incluindo vacinas anticâncer personalizadas ativamente e terapias adotivas com células usando tecido autólogo do paciente.

[0321] Conforme aqui utilizado, o termo “depósito” refere-se a um grupo ou conjunto de peptídeos pré-selecionados por sua imunogenicidade e apresentação aumentada em um determinado tipo de tumor. O termo “depósito” não pretende sugerir que os peptídeos específicos incluídos na vacina foram pré-fabricados e armazenados em uma instalação física, embora se contemple essa possibilidade. Contempla-se expressamente que os peptídeos podem ser fabricados *de novo* para cada vacina individualizada fabricada ou podem ser pré-fabricados e armazenados. O depósito (p.ex. na forma de um banco de dados) consiste em peptídeos associados a tumores e sobreexpressos em tecidos tumorais de pacientes com carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma, associados a diversos alelos de HLA-A HLA-B e HLA-C. O depósito pode conter peptídeos de MHC classe I ou MHC classe II ou peptídeos alongados de MHC classe I. Além dos peptídeos associados a tumores colhidos de diversos tecidos de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer

de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma, o depósito pode conter também peptídeos marcadores de HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 e HLA-B*44. Esses peptídeos permitem comparar quantitativamente a magnitude da imunidade mediada por células T induzida por TUMAPs, permitindo assim tirar importantes conclusões sobre a capacidade da vacina de produzir respostas antitumorais. Segundo, os peptídeos funcionam como importantes controles positivos derivados de um antígeno “não-próprio” (“não-self”) nos casos em que não se observam respostas de células T induzidas pela vacina a TUMAPs derivados de antígenos “próprios” (“self”) em um paciente. Terceiro, eles podem permitir tirar conclusões sobre o nível de imunocompetência do paciente.

[0322] Os TUMAPs usados para constituir o depósito foram identificados por meio de uma abordagem de genômica funcional integrada que combina análise de expressão gênica, espectrometria de massa e imunologia de células T (XPresident®). Essa abordagem garante que apenas TUMAPs que estejam realmente presentes em uma porcentagem elevada de tumores e sejam minimamente ou nada expressos em tecidos normais sejam selecionados para análises posteriores. Para seleção inicial de peptídeos, amostras de pacientes com carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas

células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin ou melanoma e sangue de doadores saudáveis foram analisados de acordo com a sequência detalhada a seguir:

[0323] 1. Ligantes de HLA do material maligno foram identificados por espectrometria de massa.

[0324] 2. A análise de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) em genoma inteiro foi utilizada para identificar genes sobreexpressos em tecidos malignos como carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin ou melanoma em relação a uma série de órgãos e tecidos normais.

[0325] 3. Os ligantes de HLA identificados foram comparados com os dados de expressão gênica. Os peptídeos apresentados de forma exacerbada ou seletivamente em tecidos tumorais, preferivelmente codificados por genes expressos seletivamente ou expressos de forma excessiva conforme detectados na etapa 2, foram considerados candidatos a TUMAPs apropriados para uma vacina multipeptídica.

[0326] 4. Uma busca na literatura foi realizada para identificar mais evidências indicativas da relevância dos peptídeos identificados como TUMAPs.

[0327] 5. A relevância da sobreexpressão ao nível de mRNA foi confirmada pela detecção dos TUMAPs selecionados na etapa 3 em tecido

tumoral e pela detecção baixa ou ausente em tecidos saudáveis.

[0328] 6. A fim de avaliar se a indução de respostas de células T in vivo pelos peptídeos selecionados é factível, foram realizados ensaios de imunogenicidade in vitro com células T humanas de doadores saudáveis e com células de pacientes portadores de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma.

[0329] Em um aspecto, os peptídeos são pré-selecionados por sua imunogenicidade antes de serem incluídos no depósito. A título exemplificativo e não limitante, a imunogenicidade dos peptídeos incluídos no depósito é determinada por um método que compreende a preparação (“priming”) *in vitro* de células T mediante estimulações repetidas de células T CD8+ de doadores saudáveis com células apresentadoras de antígenos artificiais carregadas com complexos de peptídeo com MHC e anticorpo anti-CD28.

[0330] Esse método é preferido para cânceres raros e pacientes com perfis de expressão raros. Ao contrário dos coquetéis multipeptídicos com composição fixa desenvolvidos atualmente, o depósito permite obter correspondências significativamente melhores entre a vacina e a expressão efetiva de antígenos do tumor. Peptídeos selecionados disponíveis comercialmente ou combinações dos mesmos serão usados para cada paciente em uma abordagem multialvo. Teoricamente, uma abordagem baseada na seleção de, p.ex., 5 peptídeos antigênicos diferentes de uma biblioteca de 50

proporcionaria cerca de 17 milhões de possíveis composições de produtos medicamentosos (PM).

[0331] Em um aspecto, os peptídeos são selecionados para inclusão na vacina com base em sua adequação ao paciente individual baseado no método de acordo com a presente invenção conforme aqui descrito ou conforme apresentado a seguir.

[0332] Os dados de fenótipo de HLA, transcriptoma e peptidoma são coligidos do material obtido do tumor do paciente e de amostras de sangue para identificar os peptídeos mais apropriados para cada paciente contendo TUMAPs do depósito específicos para o paciente (i.é., mutantes). Serão selecionados peptídeos expressos de forma excessiva ou seletiva nos tumores dos pacientes e que, sempre que possível, mostrem forte imunogenicidade *in vitro* quando testados com células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) do paciente.

[0333] Preferivelmente, os peptídeos incluídos na vacina são identificados por um método que compreende: (a) identificação de peptídeos associados ao tumor (TUMAPs) apresentados por uma amostra tumoral de um paciente individual; (b) comparação dos peptídeos identificados em (a) com um depósito (banco de dados) de peptídeos conforme descrito anteriormente; e (c) seleção de pelo menos um peptídeo do depósito (banco de dados) que se correlacione com um peptídeo associado ao tumor identificado no paciente. Por exemplo, os TUMAPs apresentados em amostras tumorais são identificados da seguinte maneira: (a1) comparação dos dados de expressão da amostra tumoral com os dados de expressão de uma amostra de tecido normal correspondente ao tipo de tecido da amostra tumoral para identificar proteínas que são sobreexpressas ou apresentam expressão aberrante na amostra tumoral; e (a2) correlação dos dados de expressão com sequências de ligantes de MHC ligados a moléculas de MHC classe I e/ou classe II na amostra tumoral para identificar

ligantes de MHC derivados de proteínas sobreexpressas ou expressas de forma aberrante pelo tumor. Preferivelmente, as sequências dos ligantes de MHC são identificadas eluindo-se os peptídeos ligados das moléculas de MHC isoladas da amostra tumoral e sequenciando-se os ligantes eluídos. Preferivelmente, a amostra de tumor e a amostra de tecido normal devem ser obtidas do mesmo paciente.

[0334] Além de, ou como alternativa a, selecionar peptídeos usando um modelo de depósito (banco de dados), os TUMAPs podem ser identificados em pacientes *de novo* e incluídos na vacina. Como exemplo, os TUMAPs candidatos podem ser identificados no paciente da seguinte maneira: (a1) comparação dos dados de expressão da amostra tumoral com os dados de expressão de uma amostra de tecido normal correspondente ao tipo de tecido da amostra tumoral para identificar proteínas que são sobreexpressas ou apresentam expressão aberrante na amostra tumoral; e (a2) correlação dos dados de expressão com sequências de ligantes de MHC ligados a moléculas de MHC classe I e/ou classe II na amostra tumoral para identificar ligantes de MHC derivados de proteínas sobreexpressas ou expressas de forma aberrante pelo tumor. Como outro exemplo, podem-se identificar proteínas que contêm mutações específicas para a amostra tumoral em relação ao tecido normal correspondente de um paciente individual, e podem-se identificar TUMAPs que atuam especificamente sobre a mutação. Por exemplo, os genomas do tumor e do tecido normal correspondente podem ser sequenciados por sequenciamento de genoma inteiro. Para descobrir mutações não-sinônimas nas regiões codificadoras de proteínas dos genes, o DNA e o RNA genômicos são extraídos de tecidos tumorais e o DNA germinativo não-mutante do genoma normal é extraído de células mononucleares do sangue periférico (CMSPs). A abordagem NGS aplicada restringe-se ao ressequenciamento de regiões codificadoras de proteínas (ressequenciamento do exoma). Para essa finalidade, o DNA exônico

de amostras humanas é capturado usando kits de enriquecimento fornecidos comercialmente seguido por sequenciamento usando, por exemplo, um instrumento HiSeq2000 (Illumina). O mRNA tumoral também é sequenciado para quantificação direta da expressão gênica e validação do fato de que os tumores dos pacientes expressam os genes mutantes. As milhões de leituras de sequências assim produzidas são processadas por algoritmos em software. A lista produzida contém mutações e expressão gênica. As mutações somáticas específicas para tumores são determinadas comparando-se as variações germinativas derivadas de CMSP, e essas derivações recebem prioridade. Os peptídeos identificados *de novo* podem então ter sua imunogenicidade testada conforme descrito anteriormente em relação ao depósito, e os TUMAPs candidatos que possuem imunogenicidade apropriada são selecionados para inclusão na vacina.

[0335] Em uma configuração exemplar, os peptídeos incluídos na vacina são identificados pelo seguinte procedimento: (a) identificação de peptídeos associados a tumor (TUMAPs) apresentados por uma amostra tumoral de um paciente individual usando o método descrito anteriormente; (b) comparação dos peptídeos identificados na etapa a) com um depósito de peptídeos pré-selecionados de acordo com a imunogenicidade e apresentação aumentada em tumores em comparação com os tecidos normais correspondentes; (c) seleção de pelo menos um peptídeo do depósito que se correlaciona com um peptídeo associado a tumores identificado no paciente; e (d) opcionalmente, seleção de pelo menos um peptídeo identificado *de novo* em (a) para confirmar sua imunogenicidade.

[0336] Em uma configuração exemplar, os peptídeos incluídos na vacina são identificados pelo seguinte procedimento: (a) identificação de peptídeos associados a tumor (TUMAPs) apresentados por uma amostra tumoral de um paciente individual; e (b) seleção de pelo menos um peptídeo

identificado de novo em (a) para confirmar sua imunogenicidade.

[0337] Uma vez selecionados os peptídeos para uma vacina peptídica personalizada, a vacina é produzida. Preferivelmente, a vacina é uma formulação líquida que consiste em peptídeos individuais dissolvidos em 20% a 40% de DMSO, preferivelmente de 30% a 35% de DMSO, como cerca de 33% de DMSO.

[0338] Todos os peptídeos a serem incluídos em um produto são dissolvidos em DMSO. A concentração das soluções de peptídeo único deve ser escolhida em função do número de peptídeos a serem incluídos no produto. Soluções de um peptídeo em DMSO são misturadas em partes iguais para criar uma solução contendo todos os peptídeos a serem incluídos no produto a uma concentração de ~2,5 mg/ml por peptídeo. A solução misturada é então diluída 1:3 em água para injeção de modo a atingir uma concentração de 0,826 mg/ml por peptídeo em DMSO a 33%. A solução diluída é filtrada por um filtro estéril de 0,22 µm. A solução bruta final é obtida.

[0339] A solução bruta final é acondicionada em ampolas e armazenada a -20°C até o momento do uso. Cada ampola contém 700 µL de uma solução que contém 0,578 mg de cada peptídeo. Destes, 500 µL (cerca de 400 µg por peptídeo) serão administrados por injeção intradérmica.

[0340] Além de serem úteis para o tratamento do câncer, os peptídeos da presente invenção também têm aplicações diagnósticas. Como os peptídeos foram gerados a partir de células de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio

uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma.

[0341] A presença dos peptídeos reivindicados em biópsias de tecidos ou em amostras de sangue pode ajudar um patologista a diagnosticar câncer. A detecção de determinados peptídeos por anticorpos, espectrometria de massa ou outros métodos conhecidos na técnica pode indicar para o patologista que a amostra de tecido é maligna, inflamatória ou geralmente patológica ou pode ser usada como biomarcador de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma. A presença de grupos de peptídeos pode permitir a classificação ou subclassificação de tecidos patológicos.

[0342] A detecção de peptídeos em amostras de tecido doente pode permitir a decisão sobre o benefício de tratamentos que envolvem o sistema imune, sobretudo se os linfócitos T participarem ou se esperar que participem do mecanismo de ação. A perda da expressão de MHC é um mecanismo bem descrito pelo qual células malignas infectadas escapam da imunovigilância. Portanto, a presença de peptídeo mostra que esse mecanismo não é explorado pelas células analisadas.

[0343] Os peptídeos da presente invenção podem ser empregados para analisar respostas linfocitárias contra esses peptídeos, tais como respostas de células T ou de anticorpos contra o peptídeo ou contra o peptídeo em

complexo com moléculas de MHC. Essas respostas podem ser usadas como marcadores prognósticos para tomar decisões sobre as próximas etapas do tratamento. Essas respostas também podem ser empregadas como marcadores de resposta sucedâneos em abordagens imunoterápicas que visam a induzir respostas linfocitárias por outros meios (p.ex. vacinação com proteínas, ácidos nucleicos, materiais autólogos e transferência adotiva de linfócitos). No âmbito de terapias gênicas, as respostas linfocitárias contra peptídeos podem ser consideradas na avaliação dos efeitos colaterais. O monitoramento das respostas linfocitárias também pode ser um valioso recurso para exames de acompanhamento de tratamentos envolvendo transplantes; p.ex. para detectar doença enxerto-versus-hospedeiro ou hospedeiro-versus-enxerto.

[0344] A presente invenção será agora descrita nos seguintes exemplos, que descrevem configurações preferidas da mesma, com referência às figuras apresentadas a seguir, mas sem limitar-se aos exemplos. Para os fins da presente invenção, todas as referências aqui citadas ficam integralmente incorporadas por referência.

[0345] FIGURAS

[0346] As Figuras 1A a 1N mostram a sobreapresentação de vários peptídeos em diferentes tecidos de câncer (pontos pretos). Parte superior: As intensidades medianas dos sinais de espectrometria de massa (MS) obtidos a partir de mensurações de réplicas técnicas aparecem como pontos para um HLA-A*01 positivo normal (pontos cinza, lado esquerdo da figura) e as amostras de tumor (pontos pretos, lado direito da figura) nas quais o peptídeo foi detectado. As caixas representam a mediana e o 25º e o 75º percentis da intensidade normalizada do sinal, o ponto mais baixo dos bigodes indica o valor mais baixo que ainda está dentro de 1,5 do intervalo interquartis (IIQ) do quartil inferior e o ponto mais alto dentro de 1,5 do IIQ do quartil superior. Os órgãos normais são ordenados segundo categorias de risco. Células sanguíneas, vasos

sanguíneos, cérebro, fígado e pulmão são marcados com pontos cinza (risco alto); órgãos reprodutores, mama, próstata com pontos cinza (risco baixo); e todos os outros órgãos com pontos cinza (risco médio). Parte inferior: A frequência relativa de detecção de peptídeos em cada órgão é mostrada em um gráfico de espinha de peixe. Os números embaixo do painel indicam o número de amostras nas quais o peptídeo foi detectado em relação ao total de amostras analisadas para cada órgão ($n = 72$ para amostras normais e $n = 155$ para amostras tumorais). Se o peptídeo for encontrado na amostra mas não puder ser quantificado por motivos técnicos, a amostra será incluída nesta representação de frequência de detecção, mas não será mostrado um ponto na parte superior da figura. Tecidos (da esquerda para a direita) Amostras normais: *células sanguíneas*; *vsang* (vasos sanguíneos); *cérebro*; *coração*; *fígado*; *pulmão*; *ducto biliar*; *bexiga*; *medula óssea*; *esôf.* (esôfago); *int. grosso* (intestino grosso); *rim*; *nervo perif.* (nervo periférico); *pele*; *medula espinhal*; *baço*; *estômago*; *tireoide*; *traqueia*; Amostras de tumores: *adenoCPCNP* (adenocarcinoma de pulmão de células não-pequenas); *CaCR* (câncer colorretal); *CAM* (câncer de mama); *CAU* (câncer de útero e endométrio); *CB* (carcinoma de bexiga); *CCC* (carcinoma colangiocelular); *CCECP* (carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço); *CCR* (carcinoma de células renais); *CE* (câncer de esôfago); *CG* (câncer gástrico); *CHC* (carcinoma hepatocelular); *CJEG* (câncer da junção esofagogástrica); *CO* (câncer de ovário); *CP* (câncer de pâncreas); *CPCNPescam* (câncer de pulmão de células não-pequenas do tipo escamoso); *CPPC* (câncer de pulmão de pequenas células); *CPr* (câncer de próstata); *CVB* (câncer da vesícula biliar); *GBM* (glioblastoma); *LLC* (leucemia linfocítica crônica); *LMA* (leucemia mieloide aguda); *LNH* (linfoma não-Hodgkin); *MEL* (melanoma); *outroCPCNP* (amostras de CPCNP que não podem ser caracterizadas com certeza como adenoCPCNP ou CPCNP escamoso).

[0347] Figura 1A) Peptídeo NSDISIPEY (SEQ Nº 16). Figura 1B)

Peptídeo TSDQLGYSY (SEQ Nº 40), Figura 1C) Peptídeo HSDLLEDSKY (SEQ Nº 41), Figura 1D) Peptídeo SSDFDPLVY (SEQ Nº 65), Figura 1E) Peptídeo YTELVEEKY (SEQ Nº 70), Figura 1F) Peptídeo QTDVERIKDTY (SEQ Nº 76), Figura 1G) Peptídeo QLDSAVKNLY (SEQ Nº 78), Figura 1H) Peptídeo HMLAAMAY (SEQ Nº 296), Figura 1I) Peptídeo YTCEECGQAF (SEQ Nº 316), Figura 1J) Peptídeo NTDSMTLNNTAY (SEQ Nº 329), Figura 1K) Peptídeo TLDSTRTLY (SEQ Nº 1), Figura 1L) Peptídeo YLDSSKPAVY (SEQ Nº 15), Figura 1M) Peptídeo PSEVPVDSHYY (SEQ Nº 28) e Figura 1N) Peptídeo LMEKEDYHSLY (SEQ Nº 387).

[0348] As Figuras 2A a 2P mostram perfis de expressão exemplares de genes fonte da presente invenção, que são sobreexpressos em várias amostras de câncer. As amostras tumorais (pontos pretos) e normais (pontos cinza) são agrupadas de acordo com o órgão de origem. As caixas de bigodes representam o valor mediano de FPKM, o 25º e o 75º percentis (caixa), o ponto mais baixo dentro de 1,5 do intervalo interquartis (IIQ) do quartil inferior e o ponto mais alto dentro de 1,5 do IIQ do quartil superior. Os órgãos normais aparecem ordenados por categoria de risco. FPKM: Fragmentos por quilobase por milhão de leituras mapeadas. Amostras normais: *Células sanguíneas*; *vsang* (vasos sanguíneos); *cérebro*; *coração*; *fígado*; *pulmão*; *adiposo* (tecido adiposo); *glsuprarr* (glândula suprarrenal); *ducto biliar*; *bexiga*; *medula óssea*; *esôf* (esôfago); *olho*; *ves bil* (vesícula biliar); *cabeça&pescoço*; *intest. gr* (intestino grosso); *intest. del* (intestino delgado); *rim*; *linfonodo*; *nervo perif* (nervo periférico); *pâncreas*; *paratir* (glândula paratireoide); *perit* (peritônio); *hipóf* (hipófise); *pleura*; *mus esquel.* (Músculo esquelético); *pele*; *baço*; *estômago*; *tireoide*; *traqueia*; *ureter*; *mama*; *ovário*; *placenta*; *próstata*; *testículo*; *timo*; *útero*. Amostras tumorais: *adenoCPCNP* (adenocarcinoma de pulmão de células não-pequenas); *CaCR* (câncer colorretal); *CAM* (câncer de mama); *CAU* (câncer de útero e endométrio); *CB* (carcinoma de bexiga); *CCC* (carcinoma

colangiocelular); *CCECP* (carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço); *CCR* (carcinoma de células renais); *CE* (câncer de esôfago); *CG* (câncer gástrico); *CHC* (carcinoma hepatocelular); *CO* (câncer de ovário); *CP* (câncer de pâncreas); *CPCNPescam* (câncer de pulmão de células não-pequenas do tipo escamoso); *CPPC* (câncer de pulmão de pequenas células); *CPr* (câncer de próstata); *CVB* (câncer da vesícula biliar); *GBM* (glioblastoma); *LLC* (leucemia linfocítica crônica); *LMA* (leucemia mieloide aguda); *LNH* (linfoma não-Hodgkin); *MEL* (melanoma); *outro* (outros cânceres; p.ex., mieloma múltiplo); *outroCPCNP* (amostras de CPCNP que não podem ser caracterizadas com certeza como adenoCPCNP ou CPCNP escamoso).

[0349] Figura 2A) Símbolo do gene: MAGEA3; peptídeo: VDPIGHL Y (SEQ Nº 2). Figura 2B) Símbolo do gene: SLC6A3; peptídeo FGTPAAEYF (SEQ Nº 3). Figura 2C) Símbolo do gene: UMODL1; peptídeo ARDPITFSF (SEQ Nº 6). Figura 2D) Símbolo do gene: SLC45A3; peptídeo ASDHWRGRY (SEQ Nº 11). Figura 2E) Símbolo do gene: MAGEA4; peptídeo VDPASNTY (SEQ Nº 86). Figura 2F) Símbolo do gene: SSX1; peptídeo AFDDIATYF (SEQ Nº 87). Figura 2G) Símbolo do gene: MAGEA1; peptídeo EVYDGREHSAY (SEQ Nº 89). Figura 2H) Símbolo do gene: MMP12; peptídeo SSDPKAVMF (SEQ Nº 95). Figura 2I) Símbolo do gene: UMODL1; peptídeo ASDDVRIEVL Y (SEQ Nº 7). Figura 2J) Símbolo do gene: C7orf72; peptídeo TSRAANIPGY (SEQ Nº 8). Figura 2K) Símbolo do gene: CTCFL; peptídeo NTHGTGRPY (SEQ Nº 13). Figura 2L) Símbolo do gene: SOX14; peptídeo DTDPLKAAGL (SEQ Nº 23). Figura 2M) Símbolos dos genes: HAS2, HAS3; peptídeo: IATVIQLFY (SEQ Nº 66). Figura 2N) Símbolo do gene: SLC6A3; peptídeo CLVLVIVLL Y (SEQ Nº 91). Figura 2O) Símbolo do gene: UMODL1; peptídeo TATLLIVRY (SEQ Nº 96) e Figura 2P) Símbolo do gene: CDK6; peptídeo LTSVVVTLW (SEQ Nº 374).

[0350] A Figura 3 mostra exemplos de resultados de respostas de

células T CD8+ *in vitro* em doadores saudáveis HLA-A*01+. As células T CD8+ foram preparadas usando-se células apresentadoras de antígenos artificiais revestidas por anticorpos monoclonais anti-CD28 e HLA-A*01 em complexo com o peptídeo SEQ Nº 417 (KLDRSVFTAY) (A, painel esquerdo), peptídeo SEQ Nº 429 (VSDSECLSRV) (B, painel esquerdo), peptídeo SEQ Nº 19 (LTEGHSGNY) (C, painel esquerdo), peptídeo SEQ Nº 33 (SMDPVTGYQY) (D, painel esquerdo), peptídeo SEQ Nº 61 (SSDIVALGGFLY) (E, painel esquerdo), peptídeo SEQ Nº 77 (FTSDTGLEY) (F, painel esquerdo) ou peptídeo SEQ Nº 83 (DTEFHGGLHY) (G, painel esquerdo). Depois de três ciclos de estimulação, as células que reagiram a peptídeos foram detectadas por coloração multimérica 2D com A*01/SEQ Nº 417 (A), A*01/SEQ Nº 429 (B), A*01/SEQ Nº 19 (C), A*01/SEQ Nº 33 (D), A*01/SEQ Nº 61 (E), A*01/SEQ Nº 77 (F) ou A*01/SEQ Nº 83 (G). Os painéis à direita mostram a coloração de células estimuladas por complexos não relevantes de A*01 com peptídeos. As células single viáveis foram triadas para detecção de linfócitos CD8+. Portas booleanas ajudaram a descartar falsos positivos detectados por múltiplos específicos para peptídeos diferentes. As frequências de células específicas positivas para múltiplos em linfócitos CD8+ estão indicadas.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Identificação e quantificação de peptídeos associados a tumores

apresentados na superfície celular

Amostras de tecido

[0351] Os tecidos tumorais de pacientes foram obtidos de Asterand (Detroit, MI, EUA e Royston, Herts, Reino Unido), Bio-Options Inc. (Brea, CA, EUA), BioServe (Beltsville, MD, EUA), Geneticist Inc. (Glendale, CA, EUA), Centro Médico da Universidade de Leiden (LUMC) (Leiden, Países Baixos), ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EUA), Hospital de São Savas (Atenas,

Grécia), Stanford Cancer Center (Stanford, CA, EUA), Tissue Solutions Ltd (Glasgow, Reino Unido), Hospital Universitário de Bonn (Bonn, Alemanha), Hospital Universitário de Genebra (Genebra, Suíça), Hospital Universitário de Heidelberg (Heidelberg, Alemanha), Universidade da Cidade de Osaka (Osaka, Japão) e Hospital Universitário de Tübingen (Tübingen, Alemanha)

[0352] Os tecidos normais foram obtidos de Asterand (Detroit, MI, EUA & Royston, Herts, Reino Unido), BioServe (Beltsville, MD, EUA), Capital BioScience Inc. (Rockville, MD, EUA), Centro de Medicina Clínica Transfusional Tuebingen (Tübingen, Alemanha), Geneticist Inc. (Glendale, CA, EUA), , ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EUA), Tissue Solutions Ltd (Glasgow, Reino Unido), Hospital Universitário de Heidelberg (Heidelberg, Alemanha) e Hospital Universitário de Tübingen (Tübingen, Alemanha)

[0353] Todos os pacientes deram consentimento livre e esclarecido antes da cirurgia ou autópsia. Os tecidos foram criocongelados logo após a excisão e armazenados a -70°C ou menos até o isolamento dos TUMAPs.

[0354] Isolamento de peptídeos de HLA de amostras de tecido

[0355] Misturas de peptídeos HLA de amostras de tecido sujeitas a congelamento criogênico foram obtidas por imunoprecipitação de tecidos sólidos de acordo com um protocolo ligeiramente modificado (Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999) empregando o anticorpo BB7.2, que é específico para HLA-A*02; o anticorpo W6/32, que é específico para HLA-A, B ou C; o anticorpo L243, que é específico para HLA-DR; e o anticorpo B7/21, que é específico para HLA DP em geral. Foram usadas sefarose ativada por CNBr, tratamento com ácido e ultrafiltração.

[0356] Análises por espectrometria de massa

[0357] As misturas de peptídeos de HLA foram obtidas e separados de acordo com sua hidrofobicidade por cromatografia de fase reversa (sistema de UPLC nanoAcquity, Waters) e os peptídeos eluídos foram analisados por um

espectrômetro de massa híbrido LTQ Velos (ThermoElectron) equipado com uma fonte ESI. Os agregados de peptídeos foram carregados diretamente na coluna analítica microcapilar de sílica fundida (75 µm d.i. x 250 mm) preenchida com material de fase reversa C18 de 1,7 µm (Waters) a uma taxa de fluxo de 400 nL por minuto. Em seguida, os peptídeos foram separados usando-se um gradiente binário com duas etapas de 180 minutos de 10% a 33% B a taxas de fluxo de 300 nL por minuto. O gradiente era composto do Solvente A (ácido fórmico a 0,1% em água) e do solvente B (ácido fórmico a 0,1% em acetonitrilo). Um capilar de vidro revestido de ouro (PicoTip, New Objective) foi empregado para introdução na fonte nano-ESI. Os espectrômetros de massa LTQ Orbitrap foram operados no modo dependente de dados usando-se uma estratégia TOP5. Resumidamente, um ciclo de varredura foi iniciado com uma varredura completa com alta precisão para massa no Orbitrap ($R = 30.000$), seguida de varreduras MS/MS realizadas também no Orbitrap ($R = 7.500$) para os cinco íons precursores mais abundantes com exclusão dinâmica de íons pré-selecionados. Os espectros de massa em tandem foram interpretados por SEQUEST com uma taxa fixa de descobertas falsas ($q \leq 0,05$) e suplementadas com controle manual. Em casos onde a sequência de peptídeos identificada era incerta, ela foi submetida a mais uma etapa de validação, na qual se comparou o padrão de fragmentação do peptídeo gerado naturalmente com o padrão de fragmentação de um peptídeo de referência sintético com a mesma sequência.

[0358] A quantificação relativa por LC-MS sem marcadores foi realizada por contagem de íons, i.é., extração e análise de características de LC-MS (Mueller et al., 2007). O método pressupõe que as áreas de sinal de LC-MS do peptídeo se correlacionam com sua abundância na amostra. As características extraídas foram também processadas por desconvolução por estado de carga e alinhamento dos tempos de retenção (Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). Finalmente, todas as características do LC-MS foram

submetidas a referência cruzada com os resultados da identificação das sequências para combinar dados quantitativos de várias amostras e tecidos com os perfis de apresentação de peptídeos. Os dados quantitativos foram normalizados em duas sequências de acordo com a tendência central para compensar as variações entre os produtos de replicação técnicos e biológicos. Portanto, pode-se associar cada peptídeo identificado com dados quantitativos, que permitem uma quantificação relativa entre amostras e tecidos. Todos os dados quantitativos adquiridos para peptídeos candidatos também foram inspecionados manualmente para garantir a consistência dos dados e verificar a precisão da análise automatizada. Para cada peptídeo, um perfil de apresentação foi calculado para mostrar a apresentação média da amostra e a variação entre réplicas. Os perfis justapõem amostras de tecidos normais com amostras de carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma.

[0359] Os perfis de apresentação dos peptídeos com apresentação exacerbada exemplares são mostrados na Figura 1.

[0360] A Tabela 8 mostra a apresentação de peptídeos selecionados em diversas entidades tumorais, ilustrando a relevância dos mesmos para diagnóstico e/ou tratamento dos cânceres indicados (p.ex. peptídeo SEQ Nº 21 para câncer de mama e câncer de próstata e peptídeo SEQ Nº 47 para melanoma, câncer de pulmão de células não-pequenas e

câncer ovário).

[0361] Tabela 8: Apresentação de alguns peptídeos associados a tumores da presente invenção em diversas entidades.

[0362] adenoCPCNP (adenocarcinoma de pulmão de células não-pequenas); CaCR (câncer colorretal); CAM (câncer de mama); CAU (câncer de útero e endométrio); CB (carcinoma de bexiga); CCC (carcinoma colangiocelular); CCECP (carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço); CCR (carcinoma de células renais); CE (câncer de esôfago); CG (câncer gástrico); CHC (carcinoma hepatocelular); CO (câncer de ovário); CP (câncer de pâncreas); CPCNPescam (câncer de pulmão de células não-pequenas do tipo escamoso); CPPC (câncer de pulmão de pequenas células); CPr (câncer de próstata); CVB (câncer da vesícula biliar); GBM (glioblastoma); LLC (leucemia linfocítica crônica); LMA (leucemia mieloide aguda); LNH (linfoma não-Hodgkin); MEL (melanoma); outroCPCNP (amostras de CPCNP que não podem ser caracterizadas inequivocamente como adenoCPCNP ou CPCNP escamoso).

Nº SEQ	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
		CPr
		CHC
		CE
		MEL
		CPCNPescam
		CCECP, adenoCPCNP
		LMA, CPCNPoutro
		MEL
		CAM
		MEL
		CPr
		CAM, CPr
		CPCNPescam
		CHC

Nº SEQ	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
		CAM, CAU
		CAM, CAU, CG, CO, CPPC, LNH
		CPCNPescam
		GBM
		LNH
		GBM
		MEL
		CAM, CPr, MEL
		CAU, CE, CG, CO, adenoCPCNP, CPCNPescam, CVB, GBM, MEL
		CAU
		CAU, CPPC, adenoCPCNP, CPCNPoutro
		CE
		GBM, MEL
		CCC, CCECP, CHC, CO, CPCNPoutro, MEL, adenoCPCNP
		adenoCPCNP
		CCECP
		CCECP, CE
		adenoCPCNP, MEL
		MEL
		CAM, CAU, CCC, CCECP, CE, CG, CO, CP, CPCNPescam, CVB, GBM, MEL
		CAM, CAU, adenoCPCNP, CPCNPescam
		CHC, MEL
		MEL
		CCECP, CHC, MEL
		CG, CHC, CPCNPescam, CVB, LMA
		MEL
		CAM, CAU, CB, CCECP, CE, CG, CHC, CO, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, LLC, LMA, LNH, MEL
		GBM
		CPr
		adenoCPCNP, CPCNPescam, GBM
		CE, MEL
		CAM, LMA
		GBM, MEL
		CHC

Nº SEQ	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
		CO, MEL
		CCECP, CE, CVB
		CPCNPescam, LNH, MEL
		LMA
		CHC
		CAU
		MEL
		CCECP, CE
		CAM, CPCNPescam, LMA
		CE, CO, adenoCPCNP, CPCNPescam, CVB, CaCR, GBM, LMA
		adenoCPCNP, CPCNPescam, CPCNPoutro
		adenoCPCNP
		CAM, CAU, CG, CHC, adenoCPCNP, CPCNPescam, CVB, GBM, MEL
		CCECP, adenoCPCNP, GBM, MEL
		CCC, CE
		CE
		CAM, CAU, CCC, CCECP, CCR, CE, CG, CHC, CO, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPr, CaCR, LNH, MEL
		CG, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, CaCR
		CG, CP, CPCNPescam, CPPC
		CHC
		CCECP, CE
		CHC
		CAU, CCC, CCECP, CE, CG, CHC, CO, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPr, CVB, CaCR, LNH
		adenoCPCNP, LMA
		CAM, CAU, CB, CCECP, CE, CG, CHC, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, CPPC, CVB, CaCR, LNH, MEL
		CAM
		CCECP, CG, CHC, CVB, GBM
		CPPC, LMA
		CAM, adenoCPCNP, CPCNPescam, GBM, MEL
		CAM, CE, CG, CP
		CHC
		CAM, adenoCPCNP, MEL
		CPPC

Nº SEQ	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
		LNH
		CE, MEL
		CE, MEL
		adenoCPCNP
		CPCNPescam, CVB, MEL
		CAM
		CaCR
		LMA
		CAM
		CAM
		CPr
		CAM
		CAU
		CAM
		CAM
		CAM
		LLC
		CPPC
		CaCR
		CE
		CAU, GBM
		CO
		CE, LMA, MEL
		CE
		LMA
		CVB
		CE
		LNH
		MEL
		MEL
		CCECP
		CHC
		CO
		CO, CPCNPescam, MEL
		MEL
		CCECP

Nº SEQ	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
		MEL
		LNH
		CPCNPescam
		CPCNPescam
		CPCNPoutro
		CPPC
		CAM
		MEL
		CAU, CG, CPPC
		CPCNPescam, GBM
		CVB
		CCECP
		CAM
		GBM
		LLC
		CCECP
		MEL
		LLC
		CPCNPescam
		CCECP, LNH, MEL
		MEL
		MEL
		MEL
		CO, MEL
		CCECP, CE, CO
		CPCNPescam
		CPr
		CE, MEL
		CAM
		LLC
		CPCNPescam
		CAM
		CG
		CPCNPoutro, CPCNPescam
		CVB
		CB

Nº SEQ	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
		CPCNPescam
		adenoCPCNP
		MEL
		CCC
		CPCNPescam
		GBM
		CB, CHC
		CO, adenoCPCNP, CPCNPescam
		CCECP, CE, CO
		MEL
		CE
		adenoCPCNP
		CE
		CCECP, GBM
		CAM
		CAM
		GBM
		MEL
		CAM
		adenoCPCNP
		CAU, CCR, CG, CO, CPCNPescam, CPr, LNH, MEL
		CO
		CHC
		adenoCPCNP, CPCNPoutro
		CHC
		MEL
		GBM
		MEL
		CCR, GBM
		CE
		MEL
		CPCNPescam
		CPCNPoutro
		MEL
		CO, CPr
		CCECP

Nº SEQ	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
		MEL
		LMA
		LMA
		adenoCPCNP
		MEL
		CP
		CPCNPescam
		CHC
		CAM, CB, CCECP, CPCNPescam
		CCECP
		CVB
		CHC
		CPCNPescam
		CHC, CPCNPescam
		CPCNPescam
		CVB
		CE
		CPCNPescam, CO
		CO
		CPCNPescam
		CVB
		CO
		LLC
		LLC
		CCECP
		CCC, MEL, adenoCPCNP
		CG
		CPPC
		CAM
		CE
		CE
		CO
		CE, CHC
		adenoCPCNP
		CAM
		LMA

Nº SEQ	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
		CPCNPescam
		CPCNPescam, CO
		GBM
		CG
		CCECP
		CVB
		CE
		CPCNPescam
		CAM
		GBM
		CVB
		CAM, CAU, CPCNPescam, CPr, CVB
		CPCNPescam, GBM, MEL
		MEL
		CE
		CG, CVB
		CAU
		CO
		CHC
		adenoCPCNP, CPCNPoutro
		CAM
		CVB
		CE
		CHC
		CCECP, CVB
		CPCNPescam
		CCR
		CAM
		CG
		CVB
		CPCNPescam
		CAM
		CVB
		CAU, CCR, LMA
		CPCNPescam
		adenoCPCNP

Nº SEQ	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
		CPPC, adenoCPCNP
		CO, adenoCPCNP
		CAM, adenoCPCNP, GBM
		CHC
		adenoCPCNP
		CO, adenoCPCNP
		CAM, CCECP, adenoCPCNP, CPCNPoutro, LNH, MEL
		CO
		CAM
		CPCNPescam
		CO
		CAM, CCR, CO, adenoCPCNP, CPCNPescam, CPCNPoutro, LNH, MEL
		CB
		CAM
		MEL
		CG
		CPCNPoutro, CVB
		CAM
		CCC, CCECP
		MEL
		CB, adenoCPCNP
		CE, MEL
		CAU, CHC, GBM
		CE, LLC
		CAU
		CPCNPescam
		CE
		MEL
		CCC, CO
		CCR, CG, CO, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, CPr, GBM
		CAM, CAU, CCECP, CE, CG, CHC, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, GBM, LNH
		CAU
		CPCNPescam
		CAM
		CAM

Nº SEQ	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
		adenoCPCNP, CPCNPescam, MEL
		CCECP, CE, CG, CPCNPescam
		LLC
		CVB
		CPCNPescam, LLC
		CCECP, GBM
		CCECP, MEL
		CVB
		CAM, CB, CCECP, CE, adenoCPCNP, CPCNPescam, CVB
		adenoCPCNP
		CO
		GBM
		CPCNPescam
		adenoCPCNP
		CO
		CAM, adenoCPCNP, CPCNPescam, MEL
		CE
		CCECP, CE, CO
		adenoCPCNP
		CO, CPr, MEL, adenoCPCNP
		CAM
		CAU, CG, CO, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPr, CVB, GBM, LMA
		CG, CVB
		CAM, CAU, CB, CHC, CO, GBM, MEL
		CaCR
		CPCNPescam
		MEL
		CHC
		MEL
		CO
		LMA
		CE, CG
		CHC, GBM, adenoCPCNP
		CCC
		CCECP
		CAM, CAU, CB, CCR, CHC, CP, adenoCPCNP,

Nº SEQ	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
		CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, GBM
		adenoCPCNP, CPr, GBM
		CHC
		CAM
		CHC, CPCNPescam, LNH
		GBM
		CB, CCECP, CE, CO, GBM
		CO
		CAM
		CCECP, MEL
		CE
		CAM, CE
		LNH
		CHC
		CAM
		CPCNPescam
		CO
		adenoCPCNP, CPCNPescam, CPCNPoutro, CVB
		CPCNPescam, CVB
		adenoCPCNP
		CCECP
		CPCNPescam
		CB
		LLC
		CAM, MEL
		CAM, adenoCPCNP
		MEL
		adenoCPCNP
		LMA
		LLC, MEL
		MEL
		MEL
		CCECP, CE
		MEL
		MEL
		CAU, CCR, adenoCPCNP

Nº SEQ	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
		CCECP, CPr

EXEMPLO 2

Perfil da expressão de genes que codificam peptídeos da invenção

[0363] A apresentação exacerbada ou apresentação específica de um peptídeo em células tumorais em comparação com células normais é suficiente para demonstrar a utilidade dos peptídeos para imunoterapia, e alguns peptídeos são específicos para tumores, mesmo que a proteína da qual se originaram também esteja presente em tecidos normais. Contudo, o perfil de expressão de mRNA cria um nível adicional de segurança para selecionar peptídeos para uso em imunoterapia. Sobretudo para opções de tratamento mais arriscadas, como TCRs maturados por afinidade, o peptídeo-alvo ideal é derivado de uma proteína específica para o tumor e que não é encontrada em tecidos normais.

Fontes de RNA e preparação

[0364] Amostras de tecido retiradas cirurgicamente foram fornecidas conforme descrito anteriormente (ver Exemplo 1) após obtenção de consentimento livre e esclarecido de cada paciente. As amostras de tecido congeladas foram criocongeladas imediatamente após a cirurgia e depois homogeneizadas em cadinho com pistilo sob nitrogênio líquido. O RNA total foi preparado a partir dessas amostras usando-se o reagente TRI (Ambion, Darmstadt, Alemanha) seguido de limpeza com RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Ambos os métodos foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante.

[0365] O RNA total de tecidos humanos saudáveis de experimentos de sequenciamento de RNA foi obtido de Asterand (Detroit, MI, EUA e Royston, Herts, Reino Unido), Bio-Options Inc. (Brea, CA, EUA); Geneticist Inc. (Glendale, CA, EUA), ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EUA) e

Tissue Solutions Ltd (Glasgow, Reino Unido).

[0366] O RNA total de tecidos tumorais para experimentos de sequenciamento de RNA foi obtido de Asterand (Detroit, MI, EUA e Royston, Herts, Reino Unido), BioCat GmbH (Heidelberg, Alemanha, BioServe (Beltsville, MD, EUA), Geneticist Inc. (Glendale, CA, EUA), Istituto Nazionale Tumori “Pascale” (Nápoles, Itália), ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EUA) e Hospital Universitário de Heidelberg (Heidelberg, Alemanha).

[0367] A qualidade e a quantidade de todas as amostras de RNA foram analisadas em um bioanalisador Agilent 2100 (Agilent, Waldbronn, Alemanha) usando um kit RNA 6000 Pico LabChip (Agilent).

Experimentos de sequenciamento de DNA

[0368] A análise de expressão gênica em amostras de RNA de tumores e tecidos normais foi realizada por sequenciamento de próxima geração (RNAseq) da CeGaT (Tübingen, Alemanha). Resumidamente, bibliotecas de sequenciamento foram preparadas usando o kit de reagentes Illumina HiSeq v4 de acordo com o protocolo do fornecedor (Illumina Inc., San Diego, CA, Estados Unidos), que inclui fragmentação de RNA, conversão em cDNA e adição de adaptadores de sequenciamento. Bibliotecas derivadas de várias amostras são misturadas em proporção equimolar e sequenciadas em um sequenciador Illumina HiSeq 2500 de acordo com as instruções do fabricante, gerando leituras de extremidade única com 50 bp cada. As leituras processadas foram mapeadas em relação ao genoma humano (GRCh38) usando-se o software STAR. Os dados de expressão ao nível de transcrição são fornecidos em RPKM (leituras por quilobase por milhões de leituras mapeadas, geradas pelo software Cufflinks) e ao nível de éxon (leituras totais, geradas pelo software Bedtools), baseado nas anotações do banco de dados Ensembl⁷⁷. As leituras de éxons foram normalizadas para o comprimento e alinhamento dos éxons para gerar valores de RKPM.

[0369] A Figura 2 mostra alguns perfis de expressão exemplares de genes-fonte da presente invenção, cuja expressão é acentuada ou exclusiva em carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma. Os escores de expressão para outros genes exemplificativos são mostrados na Tabela 9.

[0370] Tabela 9: Escores de expressão. A tabela apresenta uma lista de peptídeos derivados de genes cuja expressão é, quando comparada com um painel de tecidos normais, fortemente acentuada (+++), acentuada (++) ou sobreexpressa (+). O nível basal para essa pontuação foi calculado a partir de mensurações realizadas nos seguintes tecidos normais: tecido adiposo, glândula suprarrenal, ducto biliar, células sanguíneas, vasos sanguíneos, medula óssea, cérebro, esôfago, olho, vesícula biliar, coração, cabeça e pescoço, rim, intestino grosso, fígado, pulmão, linfonodo, nervo, paratireoide, pâncreas, hipófise, pleura, músculo esquelético, pele, intestino delgado, baço, estômago, tireoide, traqueia, ureter e bexiga. Em casos para os quais existiam dados para várias amostras de um mesmo tipo de tecido, a média aritmética de todas as respectivas amostras foi usada para o cálculo. LMA: leucemia mieloide aguda; CAM: câncer de mama; CCC: carcinoma colangiocelular; LLC: leucemia linfocítica crônica; CaCR: câncer colorretal; CVB: câncer da vesícula biliar; GBM: glioblastoma; CG: câncer gástrico; CHC: carcinoma hepatocelular; CCECP: carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço; MEL: melanoma; LNH: linfoma não-Hodgkin;

adenoCPCNP: adenocarcinoma de pulmão de células não-pequenas; outroCPCNP: amostras de CPCNP que não puderam ser classificadas definitivamente como adenoCPCNP ou CPCNPescam; CPCNPescam: câncer de pulmão de células não-pequenas do tipo escamoso; CO: câncer de ovário; CE: câncer de esôfago; CP: câncer de pâncreas; CPr: câncer de próstata; CCR: carcinoma de células renais; CPPC: câncer de pulmão de pequenas células; CB: carcinoma de bexiga; CAU: câncer do endométrio uterino.

SEQ N°	Sequência	Expressão gênica em amostras tumorais		
		Sobreexpressão (+)	Sobreexpressão acentuada (++)	sobreexpressão muito acentuada (+++)
			GBM	CPr
		CO, CP, CaCR, LNH	CAU, adenoCPCNP, CVB	CB, CCECP, CE, CG, CHC, CPCNPescam, CPPC, MEL
		adenoCPCNP, CPCNPescam, CPPC		CCR
				MEL
		adenoCPCNP, CPCNPescam		CCR
		CAM, CaCR, CO, CPPC	adenoCPCNP, CPCNPoutro	LMA
		CAM, CaCR, CO, CPPC	adenoCPCNP, CPCNPoutro	LMA
		CAM, LLC		LNH
		CO		CAM
				MEL
				CPr
				CPr
		CVB, LNH, MEL	CO	
		CVB	CHC	
			CAM, CAU, CO	
			CAU, CO	
			CPr	
			GBM	
			LLC, LNH	
		CPPC, LLC	LNH	
		CPCNPescam, CAU	CG, CP	
		CHC	CPr	

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica em amostras tumorais		
		Sobreexpressão (+)	Sobreexpressão acentuada (++)	sobreexpressão muito acentuada (+++)
		CAU, CB, CCECP, CHC, adenoCPCNP, CPCNPoutro, CPPC, CVB	CG, CPr, CaCR	
			CAU, CPPC	
		GBM	CPPC	
		CB, CE, adenoCPCNP	CCECP, MEL	
		CCC	MEL	
		CCC	MEL	
		CAU, CB, CVB, CaCR, LNH	CAM, CCECP, CE, CG, CO, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, MEL	
			MEL	
		CPCNPoutro, CE	CCECP	
			MEL	
			MEL	
		LNH	CCECP, MEL	
		LNH	CCECP, MEL	
		CAM, CAU, CHC, CO, CPPC, MEL	CPr	
		CAM, CAU, CHC, CO, CPPC, MEL	CPr	
		CCC	CHC	
		CCC	CHC	
			MEL	
			CAM	
			GBM	
			CPr	
			GBM	
		CE, CG, CO, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, CaCR, MEL	CVB	
		CPPC, GBM	LMA	
			GBM	
			CPr	
			CPr	

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica em amostras tumorais		
		Sobreexpressão (+)	Sobreexpressão acentuada (++)	sobreexpressão muito acentuada (+++)
			CHC, CVB	
			CPr	
			CPr	
			MEL	
		CE	CCECP	
		LNH	LLC	
		CE, CO	CAU, LMA	
			CPCNPoutro	
			CAU	
			MEL	
		CAM, CCR, LLC, LNH	CB	
		CAM, CB, CE, CPCNPescam	CCECP	
			GBM	
		CPCNPescam, CPCNPoutro	adenoCPCNP	
		CPCNPescam, CPCNPoutro	adenoCPCNP	
		CHC	CaCR	
		CCECP, CE, CPCNPescam	CB	
			MEL	
		CB, CCECP, CE, CG	CaCR	
		CB, CCECP, CE, CG	CaCR	
			CAU	
			CP	
			CP	
			CHC	
		CE	CCECP	
			CHC	
		CB, CCC, CCECP, CG, CPCNPescam, CPCNPoutro	CE	
		LMA		
		CaCR, LNH		
		GBM		

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica em amostras tumorais		
		Sobreexpressão (+)	Sobreexpressão acentuada (++)	sobreexpressão muito acentuada (+++)
		CO, CPPC, GBM		
		MEL, adenoCPCNP, CPPC		
		MEL		
		CG, CP, CVB		
		CHC		
		LLC		
		CAM, CAU, CG, CaCR	CHC, adenoCPCNP	CB, CCECP, CE, CO, CPCNPescam, CPPC, CVB, MEL
		adenoCPCNP, LNH, MEL	CPPC	CHC
		CaCR, CP	CAM, CAU, CG, CHC, CO, adenoCPCNP, LNH	CB, CCECP, CE, CPCNPoutro, CPPC, CVB, MEL
		CAM, CB, CCC, CO	CCECP, CG, adenoCPCNP, CPPC, CVB, LNH	CE, CHC, CPCNPescam, MEL
		CAU, CHC, adenoCPCNP	CCECP, CE, CG, CO, CPCNPescam, CPPC, CVB	CB, MEL
		adenoCPCNP, CPCNPescam		CCR
		CAU, CHC	CCECP, CE, CG, CO, CPCNPescam, CPPC, CVB, adenoCPCNP	CB, MEL
		CAM, CAU, CO, CPPC, CaCR, LNH	adenoCPCNP, CPCNPoutro	LMA
		CO	CPr, CPPC	CAU
		CCR, CHC	CAU, CCC, CG, CO, CP, adenoCPCNP, LNH, MEL	CB, CCECP, CE, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CVB, CaCR
		CAM, CPPC, CaCR	adenoCPCNP, CPCNPoutro	LMA
		CO		CAM
		CB, CCECP, CCR, CO, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, LLC, LNH, MEL	CAM, CPPC	GBM
			CPr	
			CAM	

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica em amostras tumorais		
		Sobreexpressão (+)	Sobreexpressão acentuada (++)	sobreexpressão muito acentuada (+++)
		CPPC, CaCR	CPr	
		CCR, CHC, CO, CPPC	CAM, CAU, CB, CCC, CCECP, CE, CG, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, CVB, CaCR	
			CAM, CAU, CO	
			CAM, CAU, CO	
			CPr	
			CG, CP, CVB, CaCR	
			LLC, LNH	
		CAM, CAU, CE, CG, CP, , adenoCPCNP, CPCNPoutro, CPPC, CaCR, LNH, MEL	CCECP, CO, CPCNPescam	
			MEL	
		CB, adenoCPCNP	CCECP, CE, CPCNPescam	
		CAU, CB, CO, CPCNPescam, CaCR	CAM, CCC, CCECP, CE, CG, CP, adenoCPCNP, CVB	
		CAM, CB, CPPC	CPr	
		CAU, CG, CP, adenoCPCNP, CPCNPoutro, CVB	CB, CCC, CCECP, CE, CPCNPescam	
			CAU	
		CPCNPoutro, CE	CCECP	
		CAM, CAU, CB, CCC, CCECP, CE, CG, CHC, CO, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, CPCNPoutro, CVB, CaCR, GBM, LMA, LNH, MEL	CPPC, LLC	
		CAM, CAU, CB, CCC, CCECP, CE, CG, CHC, CO, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, CPCNPoutro, CVB, CaCR, GBM, LMA, LNH, MEL	CPPC, LLC	
		CCC	MEL	

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica em amostras tumorais		
		Sobreexpressão (+)	Sobreexpressão acentuada (++)	sobreexpressão muito acentuada (+++)
		CPCNPoutro, CE	CCECP	
		CPCNPoutro, CE	CCECP	
		CAM, CAU, CB, CCECP, CCR, CE, CO, CP, adenoCPCNP, CPCNPoutro, CPCNPescam, GC, LNH, MEL	CCC, CVB, CaCR	
			MEL	
			CHC, CPr	
			MEL	
			MEL	
			MEL	
		CHC	MEL	
		CE	CCECP	
			MEL	
		CHC	MEL	
		LMA	LLC	
			MEL	
			MEL	
		LLC	CPPC	
		CCC	CHC	
			CPPC	
			CAM	
			GBM	
			GBM	
			GBM	
		CCC	CHC	
			GBM	
		CAM	CAU	
			GBM	
			LLC, LNH	
		CAM	GBM, MEL	
			MEL	
			LLC, LNH	

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica em amostras tumorais		
		Sobreexpressão (+)	Sobreexpressão acentuada (++)	sobreexpressão muito acentuada (+++)
			MEL	
		CCECP, CE, CHC, CO, adenoCPCNP, CVB, LMA	CPPC, MEL	
		CCECP, CE, CHC, CO, CPCNPescam, CVB, adenoCPCNP	CPPC, MEL	
			MEL	
			MEL	
			MEL	
			MEL	
			GBM	
			CAM	
		CO	CAM	
		CPCNPescam, CB	CCECP, CE	
		CAM	CPr	
		CAM, CHC, CO, MEL	CPr	
		CPr	CAM	
			LLC	
		CAM, CB, CCECP, CE, CG, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CaCR, MEL	CCC, CVB	
			CPr	
		CAM, CE, CO, CP, CPCNPescam, CPPC, CVB	CPr	
		CCC	CHC	
		CCC	CHC	
		CPCNPescam, CB	CCECP, CE	
		CCECP	GBM	
		CCECP	GBM	
		MEL	LLC, LNH	
			GBM	
			GBM	
			LMA	

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica em amostras tumorais		
		Sobreexpressão (+)	Sobreexpressão acentuada (++)	sobreexpressão muito acentuada (+++)
			CB	
			CB	
		CPCNPoutro, CPCNPescam	adenoCPCNP	
		CB, CCECP, CE, CG, CPCNPescam	CaCR	
			MEL	
		CE, CPCNPescam, LMA	CB, CCECP	
		CAM, CB, CCECP, CE, CG, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, CPCNPoutro, CaCR	CCC, CVB	
		CCECP, adenoCPCNP, CPCNPoutro, CPPC, LNH, MEL	CVB	
			GBM	
			LNH	
		LNH	LLC	
			GBM	
			LNH	
		CO, CPPC, MEL, adenoCPCNP	CVB, LNH	
		CAM, CO	CPr	
			LLC	
		CCECP, CE, adenoCPCNP, GBM	CPCNPescam	
			MEL	
		CPCNPoutro, CPCNPescam	adenoCPCNP	
		CPCNPoutro, CPCNPescam	adenoCPCNP	
		CAU, CG, CVB	CP	
			CPr	
			GBM	
			CHC	
		CB, CCECP, CE, CG	CaCR	
		CB, CCECP, CE, CG	CaCR	

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica em amostras tumorais		
		Sobreexpressão (+)	Sobreexpressão acentuada (++)	sobreexpressão muito acentuada (+++)
			MEL	
		CAM, CAU, CB, CCC, CE, CO, CPCNPescam, LNH	CVB	
		LNH	LLC	
		LNH	LLC	
			CPr	
		CPCNPescam, CB	CCECP, CE	
			CAM	
		CAU, CE, CO	LMA	
		CAU, CE, CO	LMA	
		CB, CE, CPCNPescam, CVB, adenoCPCNP	CCECP	
			CP	
			CP	
		CB, CCECP, CE, CG, CO, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, CPPC, CPr, CaCR, GBM, LLC, MEL	LNH	
		CO, CPCNPescam, adenoCPCNP	CPPC	
		CB	CAM	
		LLC, LNH	CaCR	
		CPCNPoutro, CPCNPescam	adenoCPCNP	
		CCECP, CCR, CE, CP, CPCNPescam, GBM	CaCR	
		CB, CCC, CCECP, CG, CPCNPescam, CPCNPoutro	CE	
		CB, CCC, CCECP, CG, CPCNPescam, CPCNPoutro	CE	
		CCC, CCECP, CE, CG, CHC, CO, CP, CPCNPescam, CPPC, CVB, CaCR, MEL		
		CAM, CAU, CB, CCC, CE, CO,		

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica em amostras tumorais		
		Sobreexpressão (+)	Sobreexpressão acentuada (++)	sobreexpressão muito acentuada (+++)
		CPCNPescam, CVB		
		CB, CCECP, CE, CO, adenoCPCNP, CPCNPoutro, CPCNPescam, CVB		
		CPPC, CPr, MEL		
		CCC, MEL		
		CB, CCR		
		CHC, CO, CP, CVB, LNH, adenoCPCNP		
		CHC		
		CCECP, MEL		
		LLC		
		LLC		
		LLC		
		CAM, CCECP, CE, adenoCPCNP, LNH, MEL		
		CHC		
		CCECP, CHC, CPCNPescam, CPPC, CVB		
		CPr		
		CAU		
		CAM		
		CCECP, CHC, CO, CPCNPescam, CPPC, CVB, MEL		
		CAU, CCC, CP, LMA		
		CPPC		
		CPPC		
		CCC		
		LMA		
		CCECP, CE		
		CPPC, GBM		
		LMA		
		CHC		
		CAM		

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica em amostras tumorais		
		Sobreexpressão (+)	Sobreexpressão acentuada (++)	sobreexpressão muito acentuada (+++)
		CAM, CPPC, LLC		
		GBM		
		CHC, CP, CPPC, GBM, MEL		
		CCC, CCECP, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, CVB, LNH		
		CAM, CAU, CB, CCC, CCECP, CE, CG, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, CVB, LNH, MEL		
		CCC, CVB, adenoCPCNP		
		CCC, CVB, adenoCPCNP		
		CB, CCECP, CE, CHC, adenoCPCNP, CPCNPescam, CPPC, GBM		
		CAM, CAU, CCC, CO, MEL		
		GBM		
		CAU, CCC, CCR, CO, CPPC, CVB, MEL		
		CAU, CCC, CCR, CO, CPPC, CVB, MEL		
		CO, CPPC, CPCNPoutro, GBM		
		CaCR		
		CAM, CAU, CCC, CCECP, CHC, CO, CPPC, CVB, LNH, MEL		
		CHC		
		CPr		
		CPr		
		CCR, CG, CP, CaCR, adenoCPCNP		
		CCECP, CE, CPCNPescam		

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica em amostras tumorais		
		Sobreexpressão (+)	Sobreexpressão acentuada (++)	sobreexpressão muito acentuada (+++)
		CO, CPPC		
		CAM, CG, CHC, CPPC		
		CB, MEL		
		CAM, CCC		
		CAM, CPr		
		LMA		
		CAM		
		CAM, CPPC, CPr, LNH		
		CPCNPoutro		
		CCC, CCR, CVB		
		CB, CCC, CE, CPCNPoutro, CPPC, CVB, LNH, MEL		
		MEL		
		CHC		
		CCC, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC		
		CPr		
		GBM		
		CAM, CAU, CPr		
		CP, CPPC, CaCR		
		CPCNPoutro		
		CO		
		CAM, CCC, CCR, CG, CO, CPCNPescam, CPCNPoutro, LNH, MEL		
		CO		
		CPPC		
		CPr		
		CB, CO		
		CB, CCECP, CE, CHC, CO, adenoCPCNP, CPCNPescam, CVB, MEL		

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica em amostras tumorais		
		Sobreexpressão (+)	Sobreexpressão acentuada (++)	sobreexpressão muito acentuada (+++)
		CB, CO		
		CB, CCECP, CE, CHC, CO, adenoCPCNP, CPCNPescam, CVB, MEL		
		CG, CP, LNH		
		CAU, CO, GBM		
		CAU, CB, CCC, CCECP, CE, CG, CPCNPescam, CVB		
		MEL		
		CG		
		CPPC		
		CAU, CB, CCECP, CO		
		MEL		
		CPPC, GBM		
		CPPC, GBM		
		CPPC, GBM		
		CPPC, GBM		
		CPPC, GBM		
		CPPC, GBM		
		GBM		
		CAU, CO		
		LLC		
		CPPC		
		LMA		
		CCC, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC		
		CCC, CPPC		
		CG, CP, CVB		
		CAM, CB, CCECP, CE, CO		
		LLC		
		LLC		
		LLC		

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica em amostras tumorais		
		Sobreexpressão (+)	Sobreexpressão acentuada (++)	sobreexpressão muito acentuada (+++)
		CPr		
		CCC		
		CPPC, CaCR		
		CaCR, LLC, LMA, LNH, MEL		
		CPr		
		CAM, CG		
		CPPC		
		GBM		
		CaCR, LNH		
		CaCR, LNH		
		CAM, CCR, CG, CVB, CaCR		
		CB		
		CO, MEL		
		LLC		
		CPr		
		CPr		
		CCECP, CE		
		CPCNPoutro, CPPC		
		CPr, CaCR		
		CaCR		
		CPPC		
		GBM		
		MEL		
		CHC		
		MEL		
		CAU, CO		
		CAU, CO		
		CAU, CO		
		LMA		
		CVB, LNH		
		CCECP, CPPC		
		CPCNPoutro		
		CPCNPoutro		

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica em amostras tumorais		
		Sobreexpressão (+)	Sobreexpressão acentuada (++)	sobreexpressão muito acentuada (+++)
		CHC		
		CCECP, CE		
		CHC, CPr		
		CHC, CPr		
		CHC		
		CB, CCECP, CE, CO		
		CAM		
		CB, CCECP, CE, CO		
		CB, CCECP, CE, CO		
		GBM		
		CPr		
		CAM, CE, CG, CP, adenoCPCNP, CPCNPescam, CVB		
		CCECP		
		CAM, CB, CG		
		CaCR		
		LMA		
		CAM		
		LLC		
		GBM		
		CG, CP, CaCR, adenoCPCNP		
		CAU, CB, CG, CP		
		CAU, CB, CG, CP		
		CCECP, CE		
		MEL		
		CPr		
		CAM, LLC		
		CAM, LLC		
		CAU, adenoCPCNP	CCR	
			MEL	
			CAU	
			LMA	
		MEL	LLC, LNH	

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica em amostras tumorais		
		Sobreexpressão (+)	Sobreexpressão acentuada (++)	sobreexpressão muito acentuada (+++)
		CAM, CAU, CG, CaCR	CHC, adenoCPCNP	CB, CCECP, CE, CO, CPCNPescam, CPPC, CVB, MEL
		CP, CaCR, LNH	CAU, adenoCPCNP, CVB	CB, CCECP, CE, CG, CHC, CPCNPescam, CPPC, MEL
			MEL	
			MEL	
			MEL	
		LNH		
		CG, CVB, CaCR		
		CaCR		

EXEMPLO 3

Imunogenicidade *in vitro* de peptídeos apresentados por MHC classe I

[0371] Para obter informações sobre a imunogenicidade dos TUMAPs da presente invenção, os investigadores realizaram investigações usando um ensaio de priming *in vitro* de células T baseado em estimulações repetidas de células T CD8+ com células apresentadoras de antígenos artificiais (aCAAs) carregadas com complexos peptídeo/MHC e anticorpo anti-CD28. Assim, os inventores puderam demonstrar a imunogenicidade dos TUMAPs restritos por HLA-A*01 da invenção, demonstrando que esses peptídeos são epítomos de células T contra os quais existem células T CD8+ precursoras em humanos (Tabela 10).

Preparação *in vitro* de células T CD8+

[0372] Para realizar estimulações *in vitro* por células apresentadoras de antígenos artificiais carregadas com complexo peptídeo-MHC (pMHC) e anticorpo anti-CD28, os inventores primeiramente isolaram células T CD8+ de produtos frescos de leucaférese de HLA-A*02 usando seleção positiva com microesférulas de CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha) de doadores saudáveis, obtidas da Clínica Universitária de Mannheim, Alemanha, após consentimento livre e esclarecido.

[0373] As CMSPs e os linfócitos CD8⁺ isolados foram incubados por uma noite em um meio para células T (TCM, “T-cell medium”) que consistia em RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) suplementado com 10% de soro humano AB termoinativado (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemanha), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml (Cambrex, Colônia, Alemanha), piruvato de sódio 1 mM (CC Pro, Oberdorla, Alemanha) e gentamicina 20 µg/ml (Cambrex). Nesta etapa, também foram adicionados ao TCM 2,5 ng/ml de IL-7 (PromoCell, Heidelberg, Alemanha) e 10 U/ml de IL-2 (Novartis Pharma, Nuremberg, Alemanha).

[0374] A geração de esférulas revestidas por pMHC/anti-CD28, a estimulação de células T e a leitura foram realizadas em um sistema *in vitro* muito bem definido, no qual foram usadas 4 moléculas de pMHC diferentes por condição de estimulação e 8 moléculas de pMHC diferentes por condição de leitura.

[0375] A IgG2a de camundongo anti-CD28 humano purificada e co-estimulatória de Ab 9.3(Jung et al., 1987)foi biotinilada quimicamente por sulfo-N-hidroxissuccinimidobiotina conforme recomendado pelo fabricante (Perbio, Bonn, Alemanha). Foram usadas esférulas que consistiam em partículas de poliestireno de 5,6 µm de diâmetro revestidas por estreptavidina (Bangs Laboratories, Illinois, EUA).

[0376] Os pMHCs usados para estimulações de controle positivo e controle negativo foram A*0201/MLA-001 (peptídeo ELAGIGILTV, SEQ N° 433 de Melan-A/MART-1 modificado) e A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5, SEQ N° 474), respectivamente.

[0377] Um total de 800.000 esférulas / 200 µl foram revestidas em placas de 96 cavidades na presença de 4 × 12,5 ng de complexos biotina-pMHC diferentes e lavados. Em seguida, 600 ng de anti-CD28 biotinilado foram adicionados até atingir o volume de 200 µl. As estimulações foram iniciadas em placas de 96 cavidades por incubação conjunta de 1 × 10⁶ células T CD8⁺ com 2 × 10⁵ esférulas

revestidas lavadas em 200 µl TCM suplementado com IL-12 5 ng/ml (PromoCell) por 3 dias a 37°C. Em seguida, metade do meio foi suplementado por TCM fresco suplementado com IL-2 80 U/ml. A incubação foi mantida por 4 dias a 37°C, e o ciclo estimulatório foi realizado um total de três vezes. Para leitura do multímero pMHC com 8 moléculas diferentes de pMHC por condição, uma abordagem de codificação combinatória bidimensional foi empregada conforme descrito anteriormente (Andersen et al., 2012) com pequenas modificações relacionadas ao acoplamento com 5 fluorocromos diferentes. Finalmente, foram realizadas análises multiméricas por coloração das células com um corante quase-infravermelho indicativo de vida ou morte (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha), clone SK1 de anticorpo contra CD8-FITC (BD, Heidelberg, Alemanha) e multímeros fluorescentes de pMHC. Para análise, foi usado um citômetro BD LSRII SORP equipado com lasers e filtros apropriados. As células específicas para peptídeos foram calculadas como porcentagem das células CD8+ totais. A avaliação da análise multimérica foi realizada pelo software FlowJo (Tree Star, Oregon, EUA). A ativação *in vitro* de linfócitos CD8+ específicos e positivos nos multímeros foi detectada por comparação com as estimulações de controles negativos. A imunogenicidade para um determinado antígeno foi detectada quando pelo menos uma cavidade estimulada *in vitro* avaliável de um doador saudável apresentava uma linhagem específica de células T CD8+ após estimulação *in vitro* (i.e. a cavidade continha no mínimo 1% do multímero+ específico entre as células T CD8+, e a porcentagem de células multímero+ positivas era pelo menos 10x a mediana das simulações em controles negativos).

Imunogenicidade *in vitro*

[0378] A imunogenicidade *in vitro* contra carcinoma colangiocelular, carcinoma de bexiga, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, carcinoma hepatocelular, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, câncer de esôfago, câncer de mama, câncer

de ovário, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas, câncer de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), câncer de pâncreas, câncer do endométrio uterino, câncer gástrico, glioblastoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin e melanoma foi avaliada. Para peptídeos de HLA classe I testados, a imunogenicidade *in vitro* pôde ser demonstrada pela geração de linhagens de células T específicas para os peptídeos. As Figuras 2 e 3 mostram resultados exemplares de citometria de fluxo após coloração específica para multímeros TUMAP de dois peptídeos da invenção, junto com os controles negativos correspondentes. A Tabela 10a resume os resultados obtidos com os 13 peptídeos da invenção e a Tabela 10b resume os resultados com outros 28 peptídeos da invenção.

[0379] Tabela 10a: Imunogenicidade *in vitro* de peptídeos de HLA classe I da invenção

[0380] Exemplos de resultados de experimentos de imunogenicidade *in vitro* realizados pelo depositante com os peptídeos da invenção. <20% = +; 20% a 49% = ++; 50% a 69% = +++; ≥ 70% = ++++

SEQ Nº	Sequência	Cavidades positivas [%]
399	YVGKEHMFY	+
400	NTDNNLAVY	+
401	VWSNVTPKF	+
403	SADDIRGIQSLY	+
404	FVDNQYWRY	+
408	VWSDVTPLTF	+
414	LTEGHSGNYY	+
415	VWSDVTPLNF	+
417	KLDRSVFTAY	++++
420	VTDLEMPHY	+
421	RSDPGGGGLAY	+
427	LTDYINANY	+
429	VSDSECLSR	++

[0381] Tabela 10b: Imunogenicidade *in vitro* de peptídeos de HLA classe I da invenção

[0382] Exemplos de resultados de experimentos de imunogenicidade *in vitro* realizados pelo depositante com os peptídeos da invenção. <20% = +; 20% a 49% = ++; 50% a 69% = +++; ≥ 70% = ++++

SEQ Nº.	Sequência	Cavidades positivas [%]
10	VSERTGISY	+
11	ASDHWRGRY	+++
12	YTDFVGEGLY	+
18	RSDPVSLRY	++
19	LTEGHSGNY	+
24	NLDHYTNAY	+
26	ASDDFRSKY	++
27	PSEVPVDSHY	+
33	SMDPVTGYQY	+
37	MTSTEQSLYY	+
42	ASDVDTLLK	+
53	YLEDRLSQLY	+
54	EVDIHTIHY	+
60	MTEKFLFLY	+
61	SSDIVALGGFLY	++
64	TSEISQNALMY	+
70	YTELVEEKY	+
71	LTDSTTRTTY	+
73	STDSASY	+
75	FTDYELKAY	+
77	FTSDTGLEY	+++
79	ASDLEPRELLSY	+
81	YSDLHTPGRY	+
82	LTEKSHIRY	+
83	DTEFHGGLHY	+
84	ESEMIKFASY	+
386	NSALNPLLY	+
387	LMEKEDYHSLY	+

EXEMPLO 4**Síntese de peptídeos**

[0383] Todos os peptídeos foram sintetizados por técnicas padronizadas e bem estabelecidas de síntese de peptídeos em fase sólida empregando a estratégia Fmoc. A identidade e a pureza de cada peptídeo foram determinadas por espectrometria de massa e RP-HPLC analítica. Os peptídeos foram obtidos na forma de liofilizados brancos a esbranquiçados com pureza >50%. Preferivelmente, todos os TUMAPs são administrados como sais de trifluoracetato ou sais acetato, mas outras formas em sal também são possíveis.

EXEMPLO 5**Ensaio de ligação a MHC**

[0384] Os peptídeos candidatos para terapias à base de células T de acordo com a presente invenção foram testados também para sua capacidade (afinidade) de ligação ao MHC. Os complexos individuais de peptídeo com MHC foram produzidos por troca de ligantes induzida por UV, na qual um peptídeo sensível a UV é clivado por irradiação UV e trocado pelo peptídeo de interesse a ser analisado. Entre os peptídeos candidatos, apenas aqueles capazes de se ligar eficazmente e estabilizar as moléculas de MHC receptivas a peptídeos podem impedir a dissociação dos complexos de MHC. Para determinar o rendimento da reação de troca, foi realizado um ELISA baseado na detecção da cadeia leve ($\beta 2m$) de complexos de MHC estabilizados. De forma geral, o ensaio foi realizado conforme descrito por Rodenko et al (Rodenko et al., 2006).

[0385] Placas MAXISorp de 96 cavidades (NUNC) foram revestidas de um dia para outro com estreptavidina 2 μ g/ml em PBS em temperatura ambiente, lavadas 4 vezes e bloqueadas por 1 h a 37°C em BSA 2% contendo tampão bloqueador. Monômeros de HLA-A*02:01/MLA-001 foram usados como

padrões, cobrindo o intervalo de 15 a 500 ng/ml. Os monômeros peptídeo-MHC da reação de troca induzida por UV foram diluídos 100 vezes em um tampão bloqueador. As amostras foram incubadas por 1 h a 37°C, lavadas 4 vezes, incubadas com HRP 2 µg/ml conjugado com anti-β2m por 1 h a 37°C, lavadas novamente e detectadas com solução de TMB, que foi interrompida com NH₂SO₄. A absorbância foi medida a 450 nm. Os peptídeos candidatos que mostram altas taxas de trocas (preferivelmente maior que 50% e, o mais preferido, maior que 75%) são geralmente preferidos para geração e produção de anticorpos ou fragmentos de anticorpos e/ou de receptores de células T ou fragmentos dos mesmos, pois apresentam avides suficiente pelas moléculas de MHC e impedem a dissociação dos complexos de MHC.

[0386] A Tabela 11 resume os resultados de ensaios de ligação de MHC a peptídeo para 391 peptídeos da invenção.

[0387] Tabela 11: Escores de ligação de MHC classe I. A ligação de peptídeos restritos por HLA classe I a HLA-A*01:01 foi determinada em função do rendimento de troca de peptídeos: ≥10% = +; ≥20% = ++; ≥50 = +++; ≥75% = ++++

SEQ Nº	Sequência	Troca de peptídeo
1	TLDSTRTLY	++++
2	VDPIGHLY	++
3	FGTTPAAEYF	++
4	RIEAIRAEY	++
5	FMVIAGMPLFY	+++
6	ARDPITFSF	++
7	ASDDVRIEVGLY	++++
8	TSRAANIPGY	+
9	QLDSTLDSY	+++
10	VSERTGISY	+++
11	ASDHWGRGY	+++
12	YTDFVGEGLY	+++
13	NTHTGTRPY	++
14	QSEKEPGQQY	+++
15	YLDSSKPAVY	+++
16	NSDISIPEY	+++

SEQ N°	Sequência	Troca de peptídeo
17	ASWAVLCYY	+++
18	RSDPVSLRY	++++
19	LTEGHSGNY	++++
20	LSAQHRMLA	++
21	LSSAVNPIIY	++
22	VMDTLGLFY	++++
23	DTDPLKAAGL	+
24	NLDHYTNAY	+++
25	AMMQEAQLAY	+++
26	ASDDFRSKY	+++
27	PSEVPVDSHY	++++
28	PSEVPVDSHYY	+++
29	TLEDLDNLYNY	+++
30	VTTDKPRAY	++
31	VSDHLQAGMLGQY	+++
32	GTDKQNSTLRY	+++
33	SMDPVTGYQY	+++
34	SSWSAGENDSY	+++
35	SWSAGENDSYS	+
36	MTSTEQSLY	+++
37	MTSTEQSLYY	+++
38	KWSQSSSLMY	+++
39	WSQSSSLMY	++++
40	TSDQLGYSY	+++
41	HSDLLEDSKY	+++
42	ASDVTLLK	+++
43	ETEPERHLGSY	+++
44	IPSFNEMVY	++
45	NLDPNKIY	+
46	RSDPGGGGLAYAAAY	++++
47	WSDGVPLLY	++++
48	FTTQDELLVY	+++
49	GSFSIQHTY	++
50	ITDEDEDMLSY	+++
51	STEERRLNY	+++
52	TTQDELLVY	+++
53	YLEDRLPSQLY	++++
54	EVDIHTIHY	+++
55	ATEGDVLNY	+++
56	VTEYAEEIYQY	+++
57	ASDPASSTSCY	+++
58	YLENSASWY	++++
59	FTDSQGNDIK	+++
60	MTEKFLFLY	++++

SEQ N°	Sequência	Troca de peptídeo
61	SSDIVALGGFLY	+++
62	VSELVTTGHY	+++
63	TSEISQNALMY	++++
64	TSEISQNALMY	+++
65	SSDFDPLVY	++++
67	NVDQNQNSY	+++
68	QSLPEFGLTY	++
69	QSLPEFGLTYY	++
70	YTELVEEKY	+++
71	LTDSTTRTTY	+++
72	VTDSTTKIAY	+++
73	STDSASY	++++
74	EMEQQSQEY	++++
75	FTDYELKAY	++++
76	QTDVERIKDTY	+++
77	FTSDTGLE	++++
78	QLDSAVKNLY	+++
79	ASDLEPRELLSY	+++
80	ELCPLPGTSAY	++
81	YSDLHTPGRY	+++
82	LTEKSHIRY	+++
83	DTEFHGGLHY	+++
84	ESEMIKFASY	++++
85	SSDNYEHWLY	++++
86	VDPASNTY	++
87	AFDDIATYF	++
88	KEVDPAGHSYI	++
89	EVYDGREHSAY	++
90	YEDHFPLLF	++
92	TTDDTTAMASAS	++
93	HLKILSPIY	+++
94	KPSAVKDSIY	++
95	SSDPKAVMF	++
97	FPAPPAHWFY	++
98	NFSDLVFTY	++
99	AADSNPSEL	++
100	TTSSAISWILY	+++
101	SITDVDFIY	++
102	STIRGELFF	++
103	ITDTLIHLM	+++
104	ITDTLIHL	++
105	VVFDKSDLAKY	++
106	EVVEGKEWGSFY	+++
107	TTENSGNYY	++++

SEQ Nº	Sequência	Troca de peptídeo
108	NSNLKFLEV	++
109	ISEDKSISF	++
110	IGDKVDAVY	++
111	TPIPFDKILY	++
112	KASSVSAEDGY	++
113	ASCRSSAEY	++++
114	AVAAAAGASLY	++
115	NEIDIHSIYFY	++
116	RSDIGEFEW	++
117	SPAKQFNIY	+++
118	LTWAHSAKY	+++
119	TVFDENLSRY	++
120	LVDENQSWY	+++
121	SADEAHGLL	++
122	ISEAPLTEV	++
123	LLKAKDILY	++
124	FLKVTGYDKDDY	++
125	FQYELRELY	++++
126	TTDPKKFQY	++++
127	VPFNLITEY	+
128	YTEFVDATFTK	++++
129	STIDFRAGF	++
130	YIGLKGLYF	++
131	LEDGIEQSAY	++
132	RTHIGYKVV	+++
133	ITDVGPNGY	+++
134	SAPSSSGSPLY	++
135	TFDKQIVLL	++
136	RRLNFSGFGY	+++
137	EAYLERIGY	+++
138	IPVHDSVGVTY	+++
139	PVHDSVGVTY	++
140	SQHIFTVSY	++
141	DAVAPGREY	++
142	IEKFAVLY	+++
143	HVSGQMLYF	++
144	RTIEGDFLW	++
145	LSDAVHVEF	+++
146	LCATVCGTEQY	++
147	AQVQDTGRY	+++
148	GTKQWVHARY	+
149	PIMSSSQALY	++
150	FTTLSDLQTNMA	++
151	YEVDTKLLSL	++

SEQ Nº	Sequência	Troca de peptídeo
152	YLEDRPLSQ	++
153	HSIEVFTHY	++
154	SIEVFTHY	+++
155	HTMEVTVY	+++
156	STALSILL	++
157	GLIEVVTGY	++++
158	EVTDRNMLAF	+++
159	RQAPGPARDY	++
160	EVLGEEMYAY	++
161	EAAPDIMHY	++
162	IADNPQLSFY	++++
163	KIRAEVLSHY	++
164	KLAGTVFQY	++
165	VSVYNSYPY	++
166	YHRICELLSDY	++++
167	RAVQPGETY	+++
168	VQPGETYTY	+++
169	TVDNANILL	++
170	VQIAKGMNY	+++
171	ITDFGLAKL	++
172	FSEPFHLIV	+++
173	QSTTGVSHY	+++
174	TSEVEGLAFVSY	+++
175	GLEYEAPKLY	++
176	HTDLESPSAVY	+++
177	LVDGKWQEF	++
178	TQRTSFQFY	++
179	SSTDFTFASW	+
180	AQISDTGRY	++
181	SVTDLIGGKW	++
182	TQPELSSRY	++
183	LADTDLGMTF	++
184	KTIQEVAGY	++
185	NSDESADSEPHKY	++++
186	AVSSGLFFY	++
187	TQKSVQVLAY	++
188	DIPDYLLQY	+++
189	FRGVFVHRY	++
190	VSSTVHNLY	++++
191	FTRAFDQLRM	+++
192	LAFYYGMY	++
193	SQNGQLIHY	+++
194	CYTADNEMGY	+++
195	YTADNEMGY	+++

SEQ N°	Sequência	Troca de peptídeo
196	RLAQYTIERY	++
197	NDEIDKLTGY	++++
198	KLTDYINANY	++
199	LCAAVLAKY	++
200	SLPEFGLTY	++
201	SLPEFGLTYT	++
202	QTDINGGSLK	+++
203	LSQDELSKF	++
204	NVKEAPTEY	++
205	RMQEGSEVY	++
207	LLEGDAHLTQY	+++
208	LLISKAEDY	++
209	EADPFLKYL	++
210	LLEADPFLKY	++++
211	YLNEWGSRF	++
212	MMTDLTSVY	+++
213	VSDSTTEITY	+++
214	VQDPSLPVY	++
215	DTLEAATSLY	++
216	NSMLDPLVY	++++
217	LMDEGAVLTL	++
218	FTAQLQLY	+++
219	KTELETALYY	+++
220	DVERIKDTY	++
221	TDVERIKDTY	+++
222	GSPDAVVSF	+
223	NAVDVVPSSF	+
224	RTDEGDNRVW	++
225	STDPNIVRK	+++
226	QITPKHNGLY	++
227	ESAPKEVSRY	++
228	KSFDDIAKY	++
229	MTDVFDY	+++
230	CVIETFHKY	+++
231	LLPLLVMAY	++
232	RYLNIVHATQLY	++
233	RINSATGQY	++
234	YTDLTITQV	++++
235	SIEIDHTQY	++
236	VLDSLLAQY	++++
237	AQEAAVFLTY	+++
238	ETDWGLLKGHY	++++
239	SSERGSPIEKY	+++
240	EVLDSLLAQY	++

SEQ N°	Sequência	Troca de peptídeo
241	SLMVASLTY	++
242	GTNLPTLLW	+
243	LTSED TGAY	+++
244	VTKYIAGPY	++
245	LSDNAANRY	+++
246	ARLEGEIATY	++
247	SMIRVG TNY	++
248	VTDIDELGK	+++
249	GVGFTELEY	+++
250	GYVCNACGLY	++
251	GIEMTYETY	++
252	DTTSHTYLQY	++
253	YLESHGLAY	++++
254	FLFNDALLY	++++
255	WELDSLEY	++
256	HAFESNNFIY	++
257	KSEMNVNMKY	++++
258	RPSSVLT IY	+++
259	APDEVVALL	++
260	KPTEDSANVY	+++
261	MTEGSTVNTEY	++++
262	NVKHFLNDLY	+++
263	DCMDTEGSYM	++
264	YRDPVFVSL	++
265	LSDIDSRYI	++
266	LTDSFLLRF	++++
267	IVADDTVY	+++
268	AILHHLYFY	+
269	LPSPAATIWDY	+++
270	DLKIDLAAQY	++
271	VAEPPVCSY	++
272	IPQDECLRY	+++
273	CGPNEINH FY	++
274	YADIHGDLL	+++
275	ESDEMENLLTY	+++
276	QITSFASGTSY	+++
277	LPAPGFLFY	++
278	AATVKSDIY	++
279	LMTVLLKY	+++
280	TTEMVSNESVDY	++++
281	YPDLS ELLM	++
282	QAMPSWPTAAY	++
283	ETILVSSSY	++
284	TCSHTFVYY	++

SEQ Nº	Sequência	Troca de peptídeo
285	VLP HHSEGACVY	+++
286	ATDMEGNLNY	+++
287	ENSIEDLQY	+++
288	TEEFVSY	+
289	YTSHEDIGY	++++
290	GQFTGTAGACRY	++
291	TSDVTGSLTY	++++
292	VLDFAPPGASAY	++++
294	MMEMEGMY	+++
295	GQRLDEAMISY	+++
296	HMLAAMAY	++
297	RLDEAMISY	+++
298	KFDVINHYF	++
299	EVDSVALSL	++
300	VSINPNSGDIY	+++
301	ESQTCASDY	+++
302	FYLSTPENYHY	+++
303	GFGGLSSQGVYY	+++
304	FSENLITYI	++
305	YADLLITYY	++++
306	KSFETTVRY	++
307	DTDDRELRY	+++
308	ELAAGQVYY	+
309	EVDRNLIQY	+++
310	KAFQELGVRY	++
311	TVTDGTHTDIFY	++
312	VTDGINPLI	++
313	VTDGTHTDIFY	+++
314	PPEANSLQGALY	++
315	VLKIELETY	+++
316	YTCEEQGQAF	++
317	EDLLEVLDY	++
318	YMTSMALNY	+++
319	FTDPHIITF	++++
320	QALQDKLQTFY	++
321	DGIADASNLSYY	++
322	FSELNPLALY	++++
323	KTLQKPVLPLY	++
324	RTGIFPYRF	++
325	LQKPVLPLY	++
326	STSRLTLFS	++
327	IMLSVDQHLY	+++
328	LLDEDNNIKL	++
329	NTDSMTLNNTAY	++++

SEQ Nº	Sequência	Troca de peptídeo
330	EGELSEGEHWY	+++
331	YLYQAPGSLALY	++++
333	LSDPQAELQFY	++++
334	PSSMPECLSY	++++
335	PSSMPECLSY	+++
336	ATNIQLNIDTY	+++
337	FTESNQYNIY	++++
338	YSPDSFNVSW	++
339	ESMDIFPLGW	++
340	SVDSNLVAY	+++
341	PANYLGKMTY	+++
342	QTYMDGLLHY	++++
343	YFGNYFTYY	+
344	AVNALQSVY	++
345	NTMDAVPRIDHY	++++
346	VAGLEAGVLY	++
347	SADHPGLTF	++
348	DSTDGCLLSF	++
349	HLLSVSLYY	+
350	LTDPQVSYV	+++
351	VLDPMLDFY	++++
352	YPVVVAESMY	++
353	RLNGSVASY	++
354	EIIRYIFAY	++
355	MADRGEARL	++
356	NSENHILKY	++++
357	MSPDIALLYL	+++
358	YMSPDIALLY	++++
359	NKEINYFMY	+++
360	RFDDINQEF	+
361	FTAEEGQLY	+++
362	SGALDEAAAY	++
363	LTDRDVSFY	++++
364	DTGYLQLYY	++++
365	FVDTKVPEH	++
366	ITVDVRDEF	+
367	LTDTGYLQLY	++++
368	ESAATGQLDY	+++
369	AVMEAAFVY	+++
370	RLSTIRHLY	+++
371	WSDSTSQTIIY	++++
372	SRSDFEWVY	++
373	FHADSDDES F	+
375	ASSLDSLHY	++++

SEQ Nº	Sequência	Troca de peptídeo
376	EDDEDEDLY	+++
377	YADPSANRDLL	++
378	TAKAPSTEY	++
379	SLIIDDTEY	++
380	VACGNNPVY	+++
381	ETSFSTSHY	++++
382	YEPATMEQY	++
383	PPDHAVGRTKY	++
384	RFRSITQSY	+
385	SANALILTY	++
386	NSALNPLLY	++++
387	LMEKEDYHSLY	+++
388	YTAHVGYSMY	++++
389	YYDLVESTF	+
390	FSEPFHLIVSY	++++
391	GSNPARYEF	++
392	TQHVFQENY	++
393	QVWGGQPVY	+
394	QVPLDCVLY	++
395	ILKGGSGTY	++
396	LPDPNVQKY	++
397	NSAINPLIY	++++
398	YYYDTHTNTY	+

Lista de referências

- Alcoser, S. Y. et al., BMC Biotechnol. **11** (2011): 124
- Allison, J. P. et al., Science. **270** (1995): 932-933
- Andersen, R. S. et al., Nat Protoc. **7** (2012): 891-902
- Anderson, N. L. et al., J Proteome Res. **11** (2012): 1868-1878
- Appay, V. et al., Eur J Immunol. **36** (2006): 1805-1814
- Banchereau, J. et al., Cell. **106** (2001): 271-274
- Beatty, G. et al., J Immunol. **166** (2001): 2276-2282
- Beggs, J. D., Nature. **275** (1978): 104-109
- Benjamini, Y. et al., Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological),. **Vol.57** (1995): 289-300
- Boulter, J. M. et al., Protein Eng. **16** (2003): 707-711

- Braumuller, H. et al., *Nature*.(2013)
- Bray, F. et al., *Int J Cancer*. **132** (2013): 1133-1145
- Brossart, P. et al., *Blood*. **90** (1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., *Curr Pharm Biotechnol*. **5** (2004): 29-43
- Card, K. F. et al., *Cancer Immunol Immunother*. **53** (2004): 345-357
- Cohen, C. J. et al., *J Mol Recognit*. **16** (2003a): 324-332
- Cohen, C. J. et al., *J Immunol*. **170** (2003b): 4349-4361
- Cohen, S. N. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. **69** (1972): 2110-2114
- Coligan, J. E. et al., *Current Protocols in Protein Science*.(1995)
- Colombetti, S. et al., *J Immunol*. **176** (2006): 2730-2738
- Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res*. **12** (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., *J Immunol*. **171** (2003): 2197-2207
- Falk, K. et al., *Nature*. **351** (1991): 290-296
- Ferlay et al., *GLOBOCAN 2012 v1 0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No 11 [Internet]* (2013), <http://globocan.iarc.fr>
- Follenzi, A. et al., *Nat Genet*. **25** (2000): 217-222
- Fong, L. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98** (2001): 8809-8814
- Forsey, R. W. et al., *Biotechnol Lett*. **31** (2009): 819-823
- Gabrilovich, D. I. et al., *Nat Med*. **2** (1996): 1096-1103
- Gattinoni, L. et al., *Nat Rev Immunol*. **6** (2006): 383-393
- Gnjatic, S. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100** (2003): 8862-8867
- Godkin, A. et al., *Int Immunol*. **9** (1997): 905-911
- Gragert, L. et al., *Hum Immunol*. **74** (2013): 1313-1320
- Green, M. R. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. **4th** (2012)
- Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual*. **2nd** (2014)
- Gunawardana, C. et al., *Br J Haematol*. **142** (2008): 606-609
- Gustafsson, C. et al., *Trends Biotechnol*. **22** (2004): 346-353
- Hwang, M. L. et al., *J Immunol*. **179** (2007): 5829-5838

- Jung, G. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **84** (1987): 4611-4615
- Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients. **rd** (2000)
- Krieg, A. M., Nat Rev Drug Discov. **5** (2006): 471-484
- Kuball, J. et al., Blood. **109** (2007): 2331-2338
- Liddy, N. et al., Nat Med. **18** (2012): 980-987
- Ljunggren, H. G. et al., J Exp Med. **162** (1985): 1745-1759
- Longenecker, B. M. et al., Ann N Y Acad Sci. **690** (1993): 276-291
- Lonsdale, J., Nat Genet. **45** (2013): 580-585
- Lukas, T. J. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **78** (1981): 2791-2795
- Lundblad, R. L., Chemical Reagents for Protein Modification. **3rd** (2004)
- Meziere, C. et al., J Immunol. **159** (1997): 3230-3237
- Molina, J. R. et al., Mayo Clin Proc. **83** (2008): 584-594
- Morgan, R. A. et al., Science. **314** (2006): 126-129
- Mortara, L. et al., Clin Cancer Res. **12** (2006): 3435-3443
- Mueller, L. N. et al., J Proteome Res. **7** (2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., Proteomics. **7** (2007): 3470-3480
- Mumberg, D. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. **96** (1999): 8633-8638
- Pinheiro, J. et al., nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models (<http://CRANR-project.org/package=nlme>) (2015)
- Plebanski, M. et al., Eur J Immunol. **25** (1995): 1783-1787
- Porta, C. et al., Virology. **202** (1994): 949-955
- Rammensee, H. et al., Immunogenetics. **50** (1999): 213-219
- Rini, B. I. et al., Cancer. **107** (2006): 67-74
- Rock, K. L. et al., Science. **249** (1990): 918-921
- Rodenko, B. et al., Nat Protoc. **1** (2006): 1120-1132
- Saiki, R. K. et al., Science. **239** (1988): 487-491
- Schmitt, T. M. et al., Hum Gene Ther. **20** (2009): 1240-1248
- Scholten, K. B. et al., Clin Immunol. **119** (2006): 135-145

- Seeger, F. H. et al., Immunogenetics. **49** (1999): 571-576
- Sherman, F. et al., Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics.(1986)
- Silva, L. P. et al., Anal Chem. **85** (2013): 9536-9542
- Singh-Jasuja, H. et al., Cancer Immunol Immunother. **53** (2004): 187-195
- Small, E. J. et al., J Clin Oncol. **24** (2006): 3089-3094
- Sturm, M. et al., BMC Bioinformatics. **9** (2008): 163
- Teufel, R. et al., Cell Mol Life Sci. **62** (2005): 1755-1762
- Thakkar, J. P. et al., Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **23** (2014): 1985-1996
- Tran, T. T. et al., Photochem Photobiol. **90** (2014): 1136-1143
- Walter, S. et al., J Immunol. **171** (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., Nat Med. **18** (2012): 1254-1261
- Willcox, B. E. et al., Protein Sci. **8** (1999): 2418-2423
- World Cancer Report (2014)
- Zaremba, S. et al., Cancer Res. **57** (1997): 4570-4577
- Zufferey, R. et al., J Virol. **73** (1999): 2886-2892

REIVINDICAÇÕES

1. PEPTÍDEO, caracterizado por compreender uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ Nº 1 a SEQ Nº 398, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que o referido peptídeo tem até 16 aminoácidos de comprimento.

2. PEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por possuir a capacidade de se ligar a uma molécula de MHC classe I, e em que referido peptídeo pode, quando ligado ao referido MHC, ser capaz de ser reconhecido por células T CD8.

3. PEPTÍDEO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo referido peptídeo incluir ligações não-peptídicas.

4. ANTICORPO, em particular um anticorpo solúvel ou ligado a membrana, preferivelmente um anticorpo monoclonal ou fragmento do mesmo, caracterizado por reconhecer especificamente o peptídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, ou o peptídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 quando ligado a uma molécula de MHC.

5. RECEPTOR DE CÉLULAS T, preferivelmente solúvel ou ligado à membrana, ou um fragmento do mesmo, caracterizado por ser reativo com o peptídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, ou o peptídeo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 quando ligado a uma molécula de MHC.

6. RECEPTOR, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pela referida sequência de aminoácidos ligante compreender qualquer uma das SEQ Nº 1 a 398.

7. RECEPTOR, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 6, caracterizado pelo referido receptor de células T ser fornecido como uma molécula solúvel e, opcionalmente, realizar outra função

efetora como um domínio de imunoestimulação ou toxina.

8. CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE, caracterizada por compreender o peptídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, o anticorpo ou fragmento do mesmo, conforme definido na reivindicação 4, o receptor de célula T ou fragmento do mesmo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 5 a 7, em que referida célula hospedeira é preferivelmente selecionada a partir de uma célula apresentadora de antígeno, tal como uma célula dendrítica, uma célula T ou uma célula NK.

9. MÉTODO *IN VITRO* DE PRODUÇÃO DE LINFÓCITOS T ativados, caracterizado por compreender colocar em contato células T *in vitro* com moléculas de MHC classe I ou II humanas carregadas com antígeno expressas na superfície de células apresentadoras de antígeno adequadas ou um construto artificial que mimetiza uma célula apresentadora de antígeno por um período de tempo suficiente para ativar as referidas células T de uma forma específica para o antígeno, em que referido antígeno é um peptídeo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

10. LINFÓCITO T ativado, produzido pelo método conforme definido na reivindicação 9, caracterizado por reconhecer seletivamente uma célula que apresenta um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

11. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada por compreender pelo menos um ingrediente ativo selecionado a partir do grupo que consiste no peptídeo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, o anticorpo ou fragmento do mesmo conforme definido na reivindicação 4, o receptor de célula T ou fragmento do mesmo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 5 a 7, a célula hospedeira conforme definida na reivindicação 8, ou o linfócito T ativado conforme definido na reivindicação 10, ou um ingrediente ativo conjugado ou marcado, e um veículo farmacêuticamente

aceitável e, opcionalmente, excipientes e/ou estabilizantes farmacologicamente aceitáveis.

12. MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM PEPTÍDEO, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, o anticorpo ou fragmento do mesmo conforme definido na reivindicação 4, ou o receptor de célula T ou fragmento do mesmo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 5 a 7, em que o método é caracterizado por compreender cultivar a célula hospedeira, conforme definida na reivindicação 8, e isolar o peptídeo, o anticorpo ou fragmento do mesmo ou o receptor de célula T ou fragmento do mesmo da referida célula hospedeira e/ou de seu meio de cultura.

13. PEPTÍDEO, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, o anticorpo ou fragmento do mesmo conforme definido na reivindicação 4, o receptor de célula T ou fragmento do mesmo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 5 a 7, a célula hospedeira conforme definida na reivindicação 8, ou o linfócito T ativado conforme definido na reivindicação 10, caracterizado por ser para uso na fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer.

14. PEPTÍDEO, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo referido câncer ser selecionado a partir do grupo formado por leucemia mieloide aguda, câncer de mama, carcinoma colangiocelular, leucemia linfocítica crônica, câncer colorretal, câncer da vesícula biliar, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, melanoma, linfoma não-Hodgkin, câncer de pulmão (incluindo adenocarcinoma de câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de pulmão de células escamosas de células não pequenas e câncer de pulmão de células pequenas), câncer de ovário, câncer de esôfago, câncer de pâncreas, câncer de próstata, carcinoma de células renais, carcinoma de bexiga, e câncer uterino e endometrial.

15. KIT, caracterizado por compreender:

(a) um recipiente que compreende a composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 11, em solução ou em forma liofilizada;

(b) opcionalmente, um segundo recipiente contendo um diluente ou solução de reconstituição para a formulação liofilizada;

(c) opcionalmente, pelo menos mais um peptídeo selecionado a partir do grupo que consiste em SEQ N° 1 a SEQ N° 398.

16. KIT, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por compreender adicionalmente um ou mais dentre (i) uma solução tampão, (ii) um diluente, (iii) um filtro, (iv) uma agulha ou (v) uma seringa.

Figura 1A

Peptídeo: NSDISIPEY (A*01)

SEQ ID NO: 16

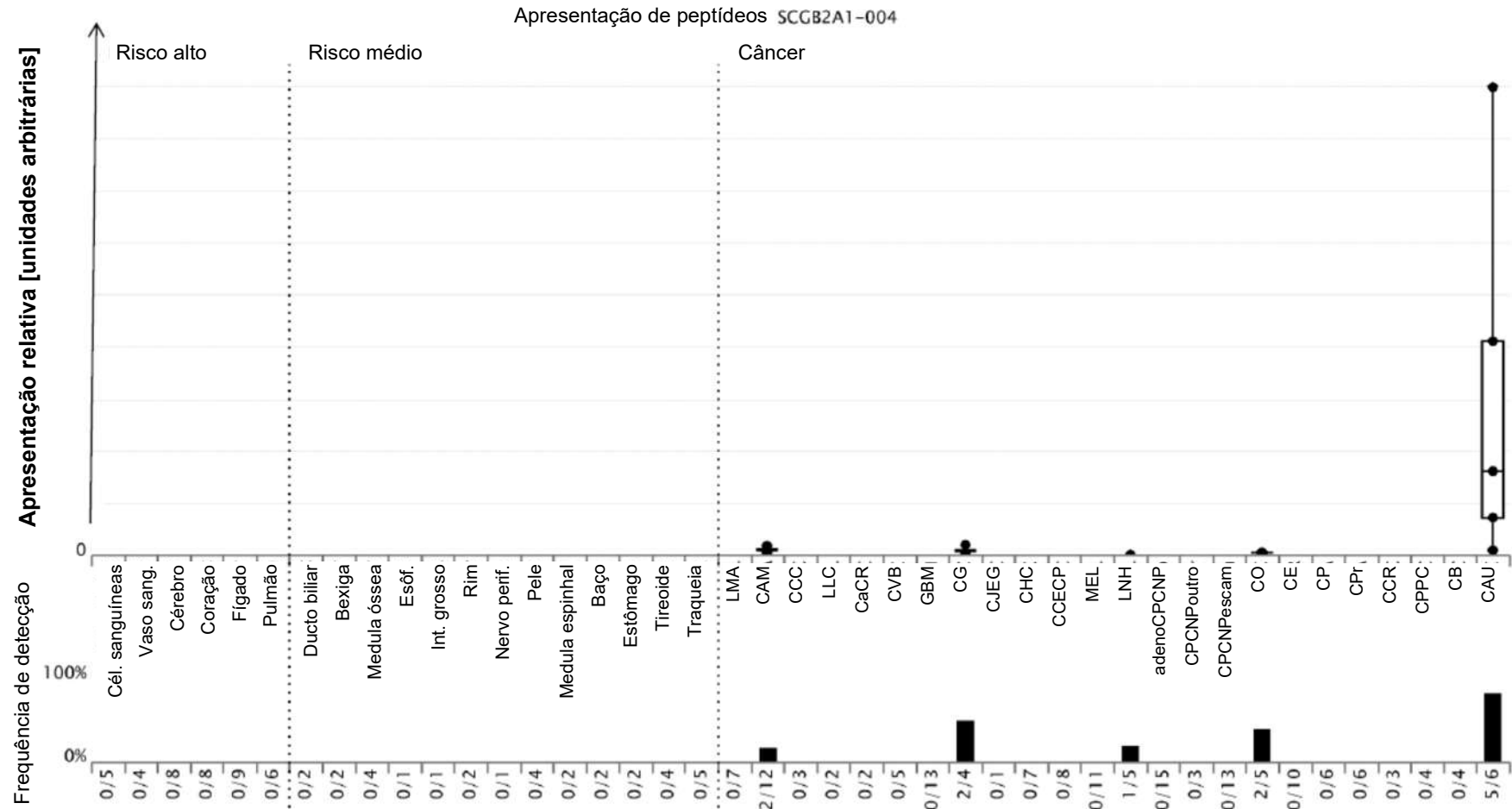


Figura 1B

Peptídeo: TSDQLGYSY (A*01)

SEQ ID NO: 40

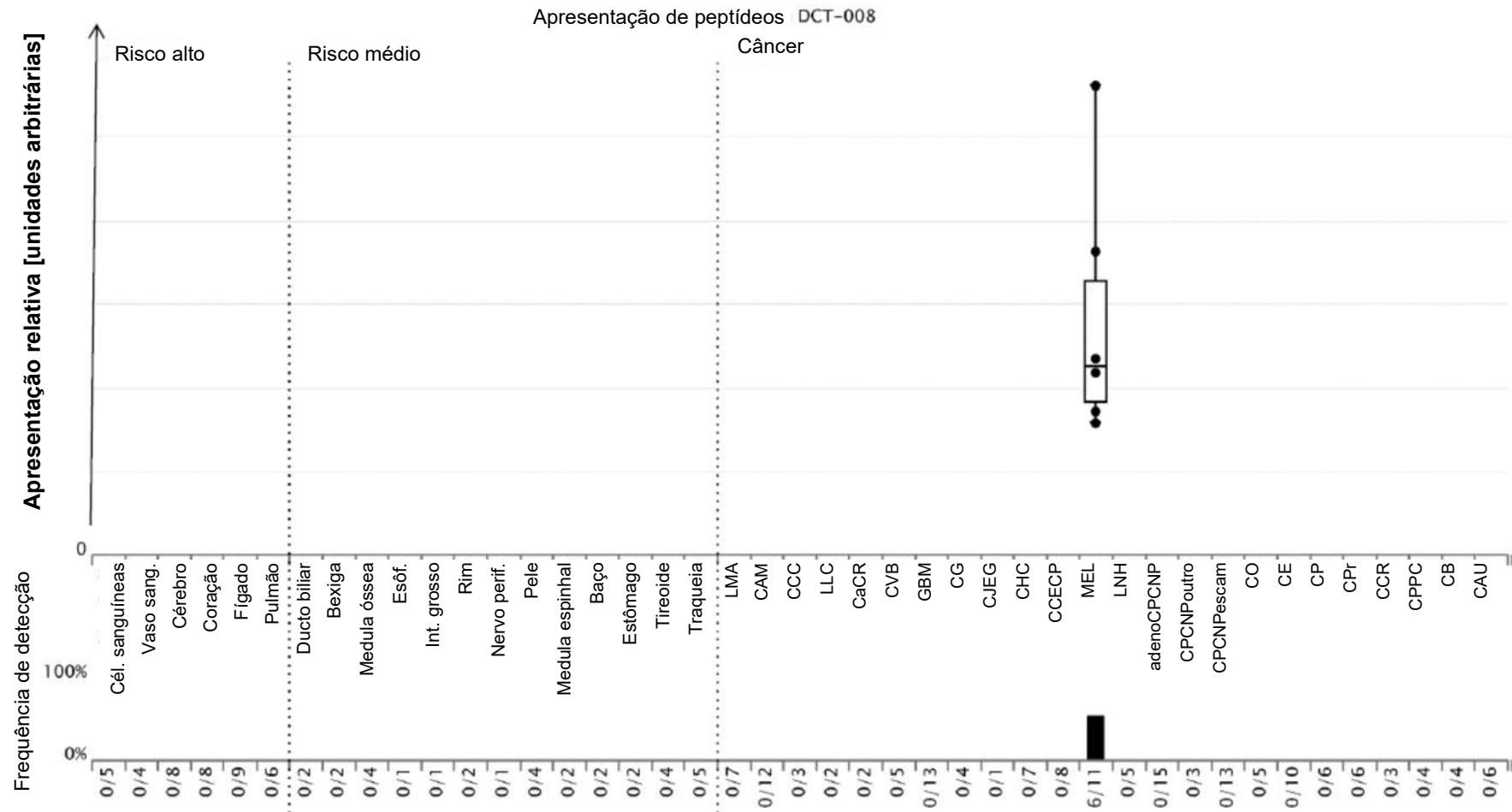


Figura 1C

Peptídeo: HSDLLEDSKY (A*01)

SEQ ID NO: 41

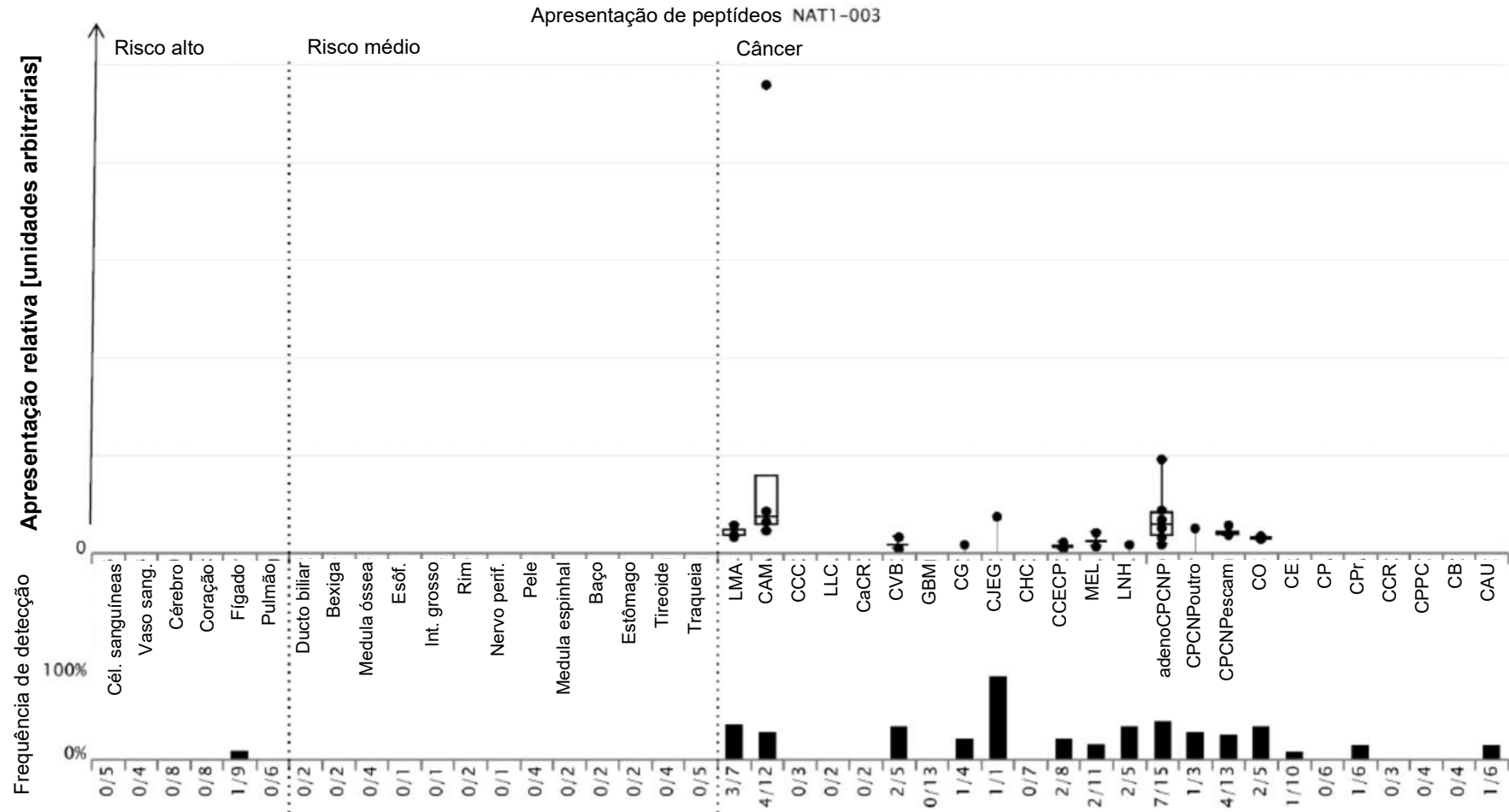


Figura 1D

Peptídeo: SSDFDPLVY (A*01)

SEQ ID NO: 65

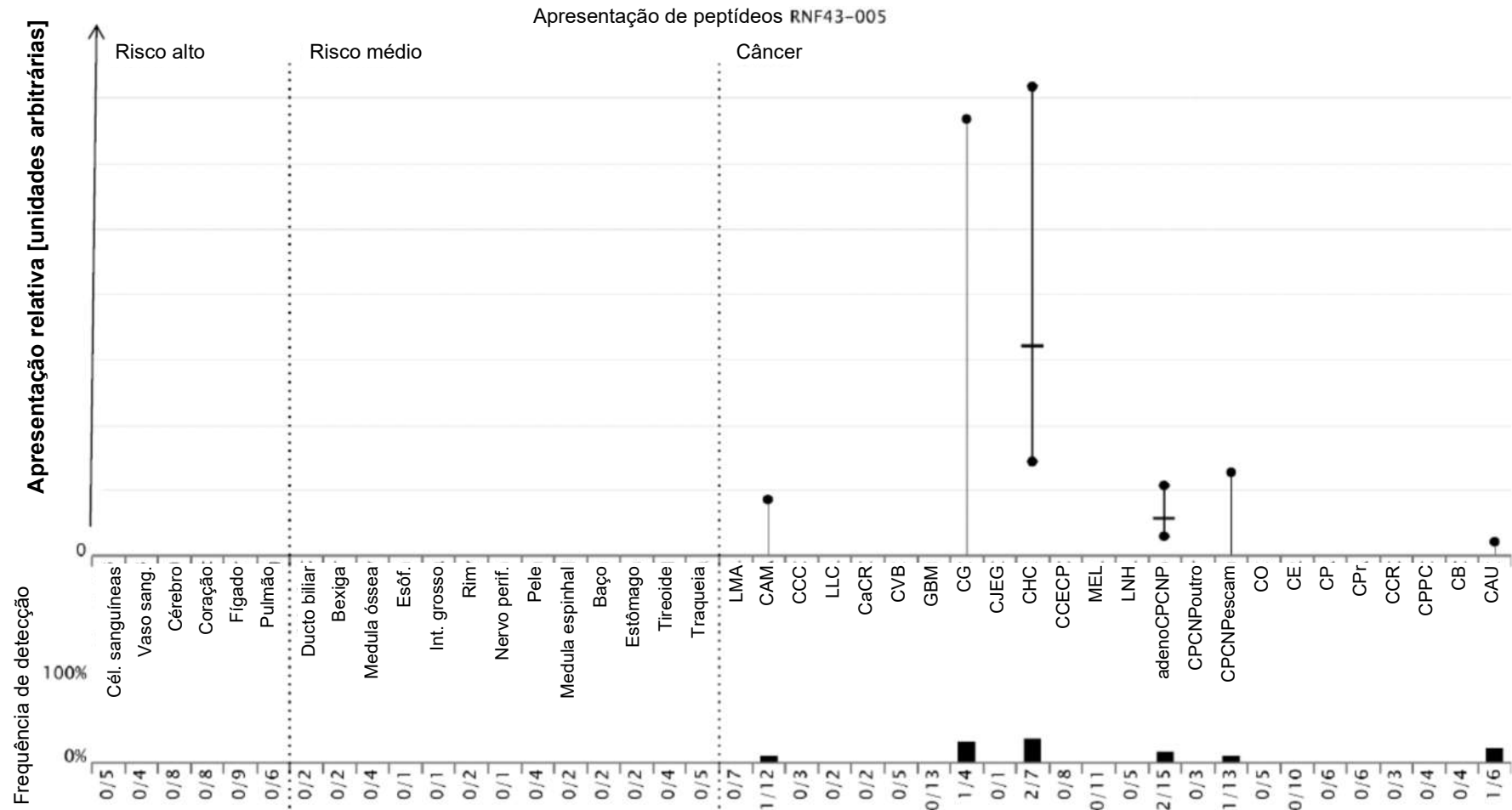


Figura 1E

Peptídeo: YTELVEEKY (A*01)

SEQ ID NO: 70

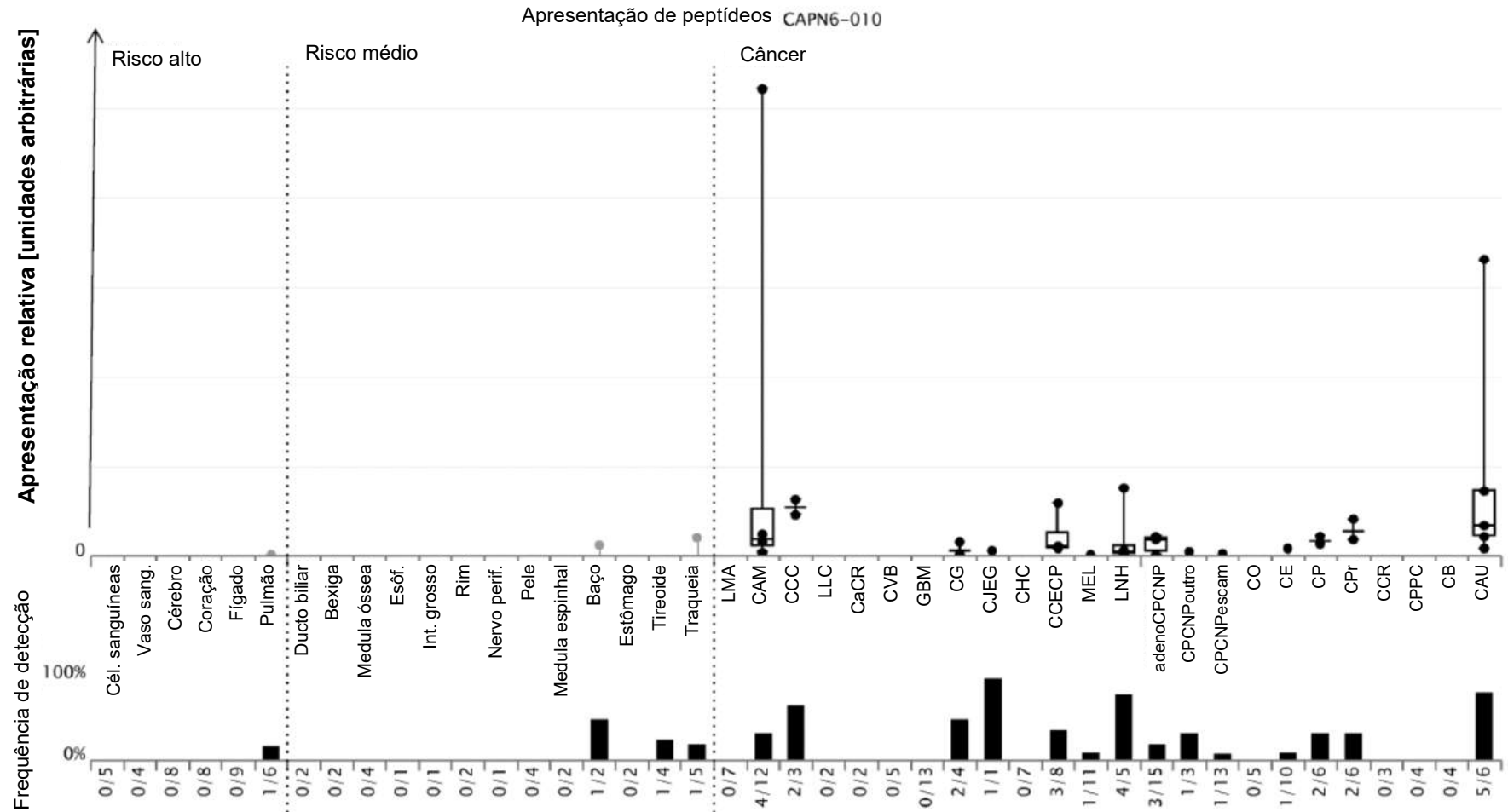


Figura 1F

Peptídeo: QTDVERIKDTY (A*01)

SEQ ID NO: 76

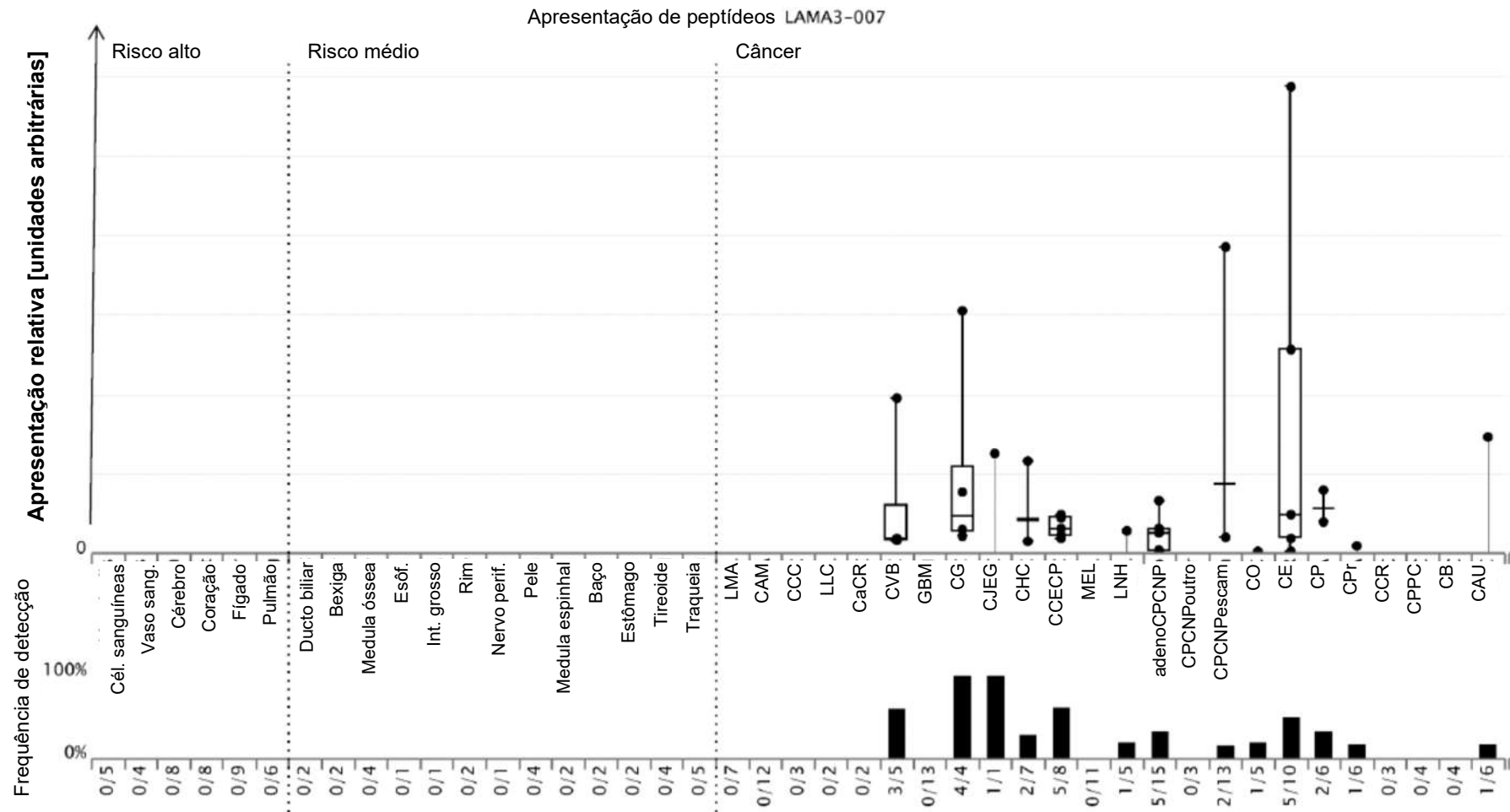


Figura 1G

Peptídeo: QLDSAVKNLY (A*01)
SEQ ID NO: 78

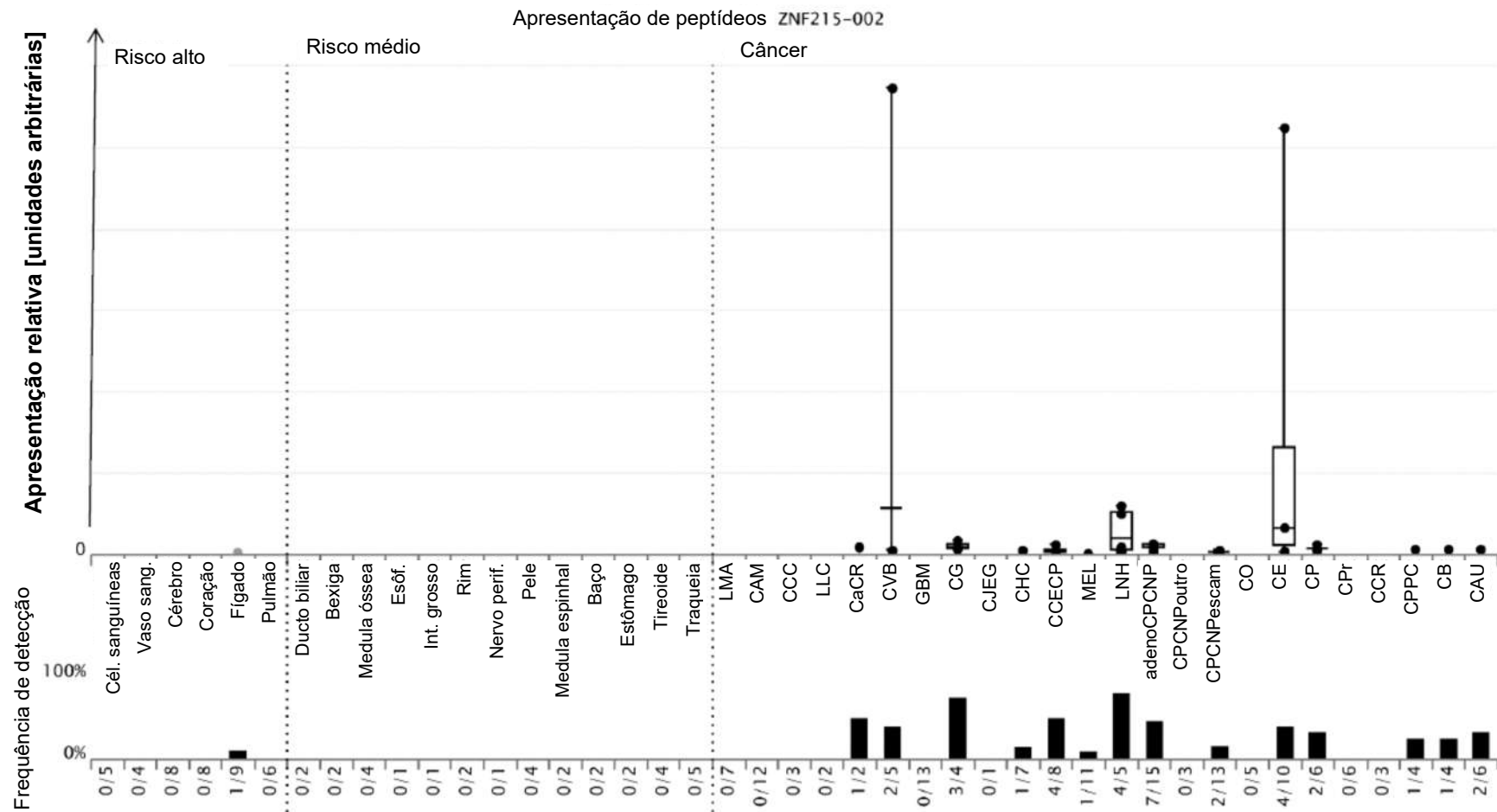


Figura 1H

Peptídeo: HMLAAMAY (A*01)

SEQ ID NO: 296

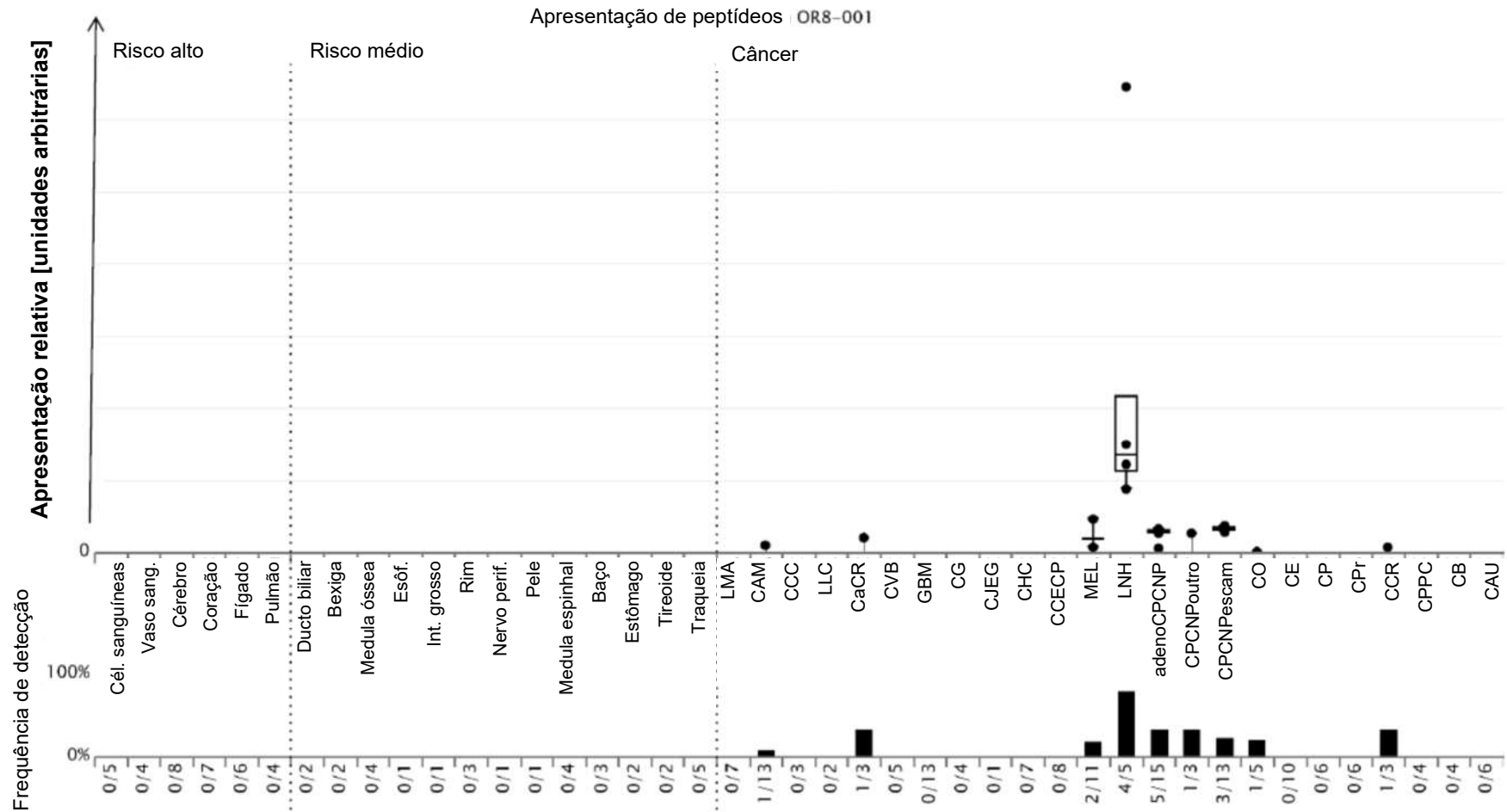


Figura 1I

Peptídeo: YTCEECGQAF (A*01)

SEQ ID NO: 316

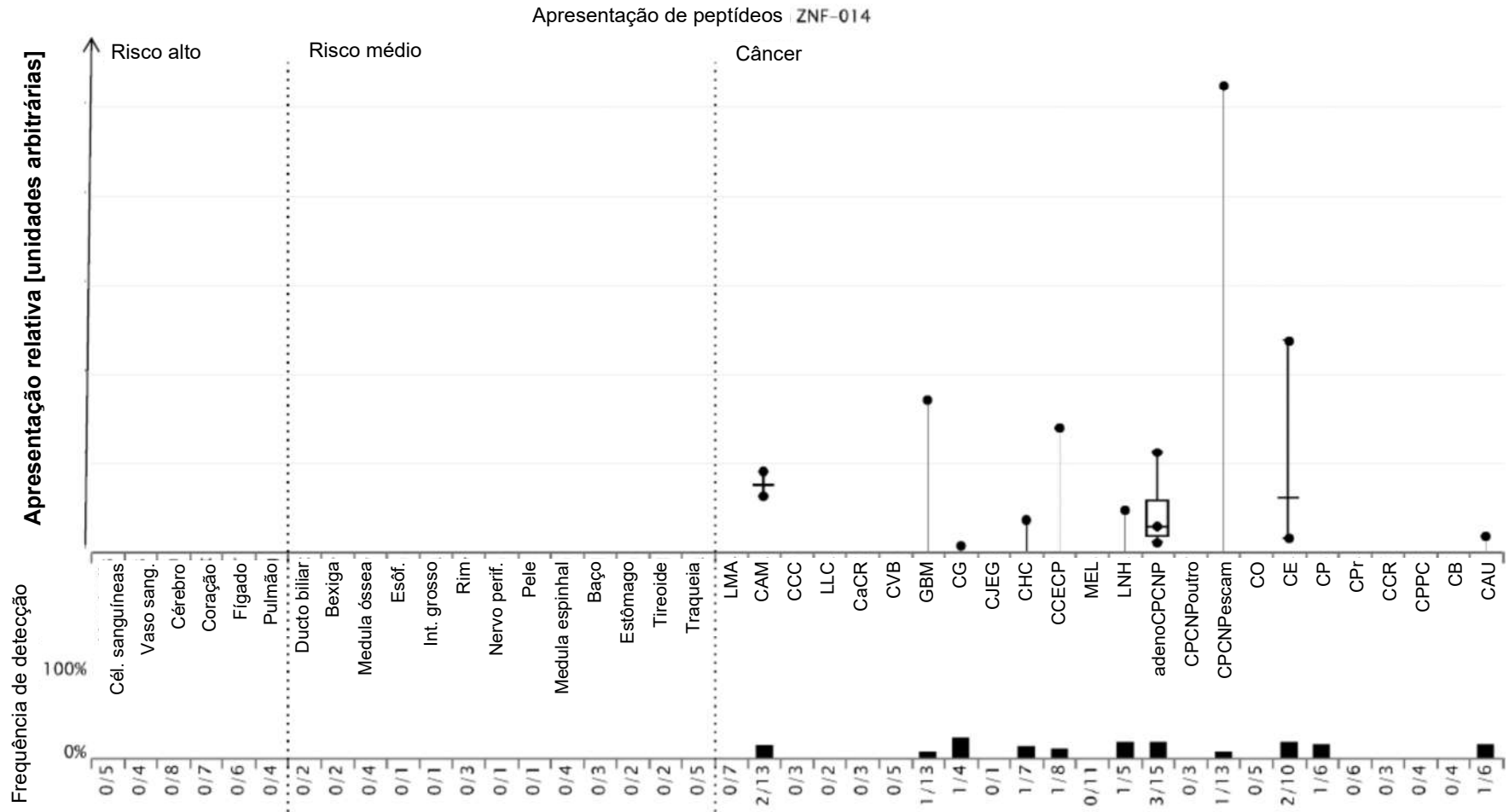


Figura 1J

Peptídeo: NTDSMTLNNTAY (A*01)

SEQ ID NO: 329

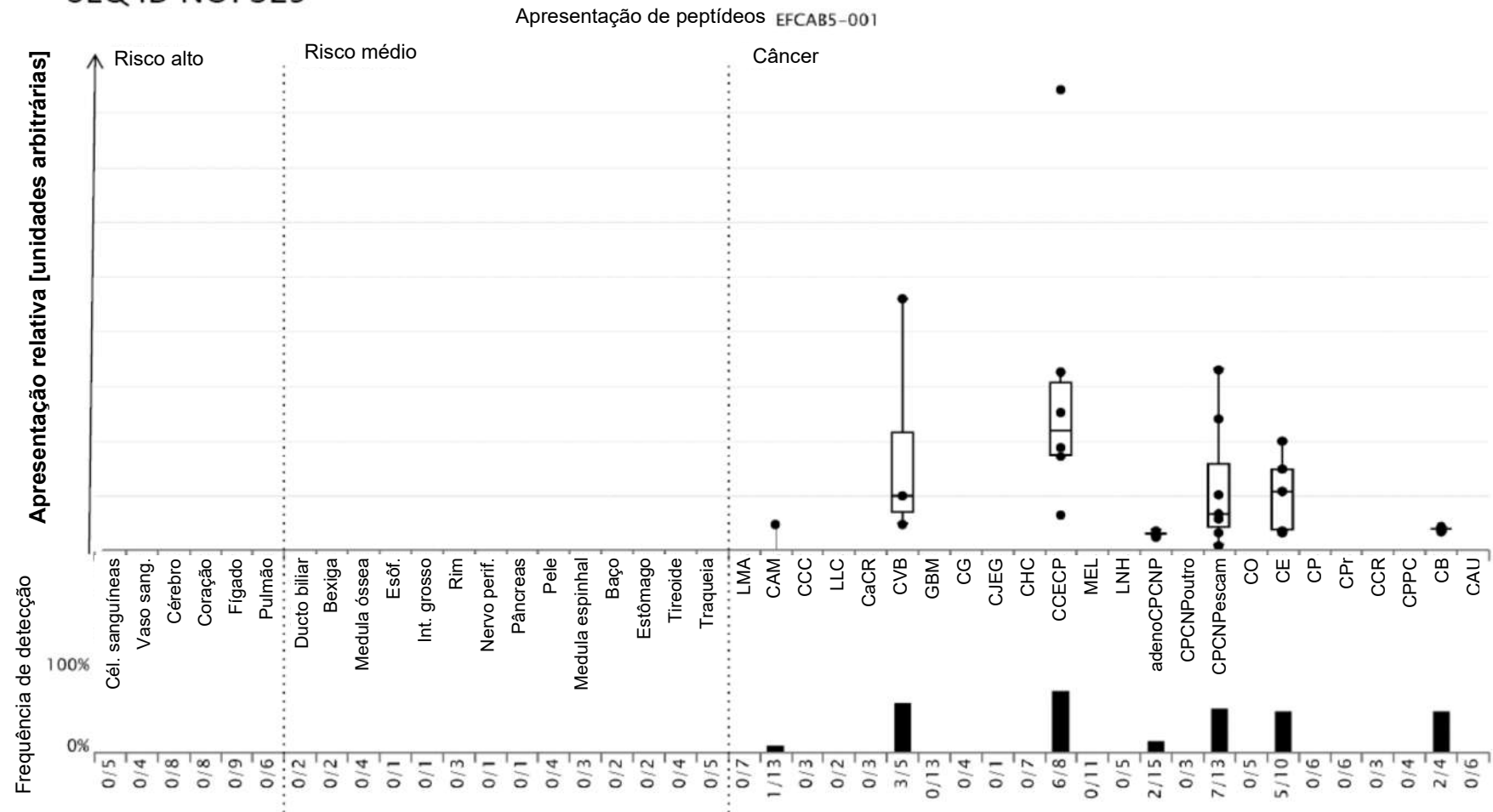


Figura 1K

Peptídeo: TLDSTRTLY (A*01)

SEQ ID NO: 1

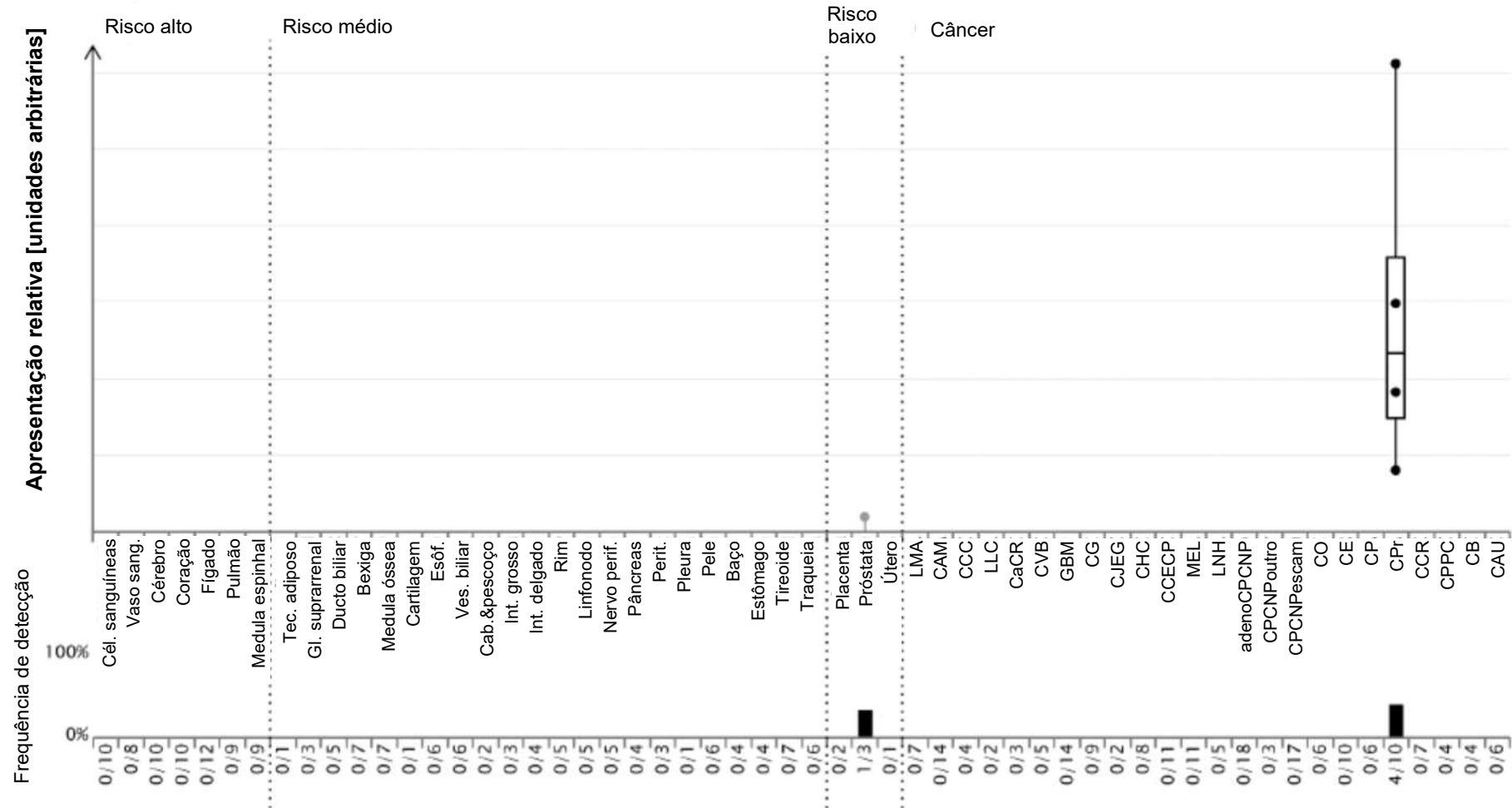


Figura 1L

Peptídeo: YLDSSKPAVY (A*01)

SEQ ID NO: 15

Apresentação de peptídeos ESR1-016

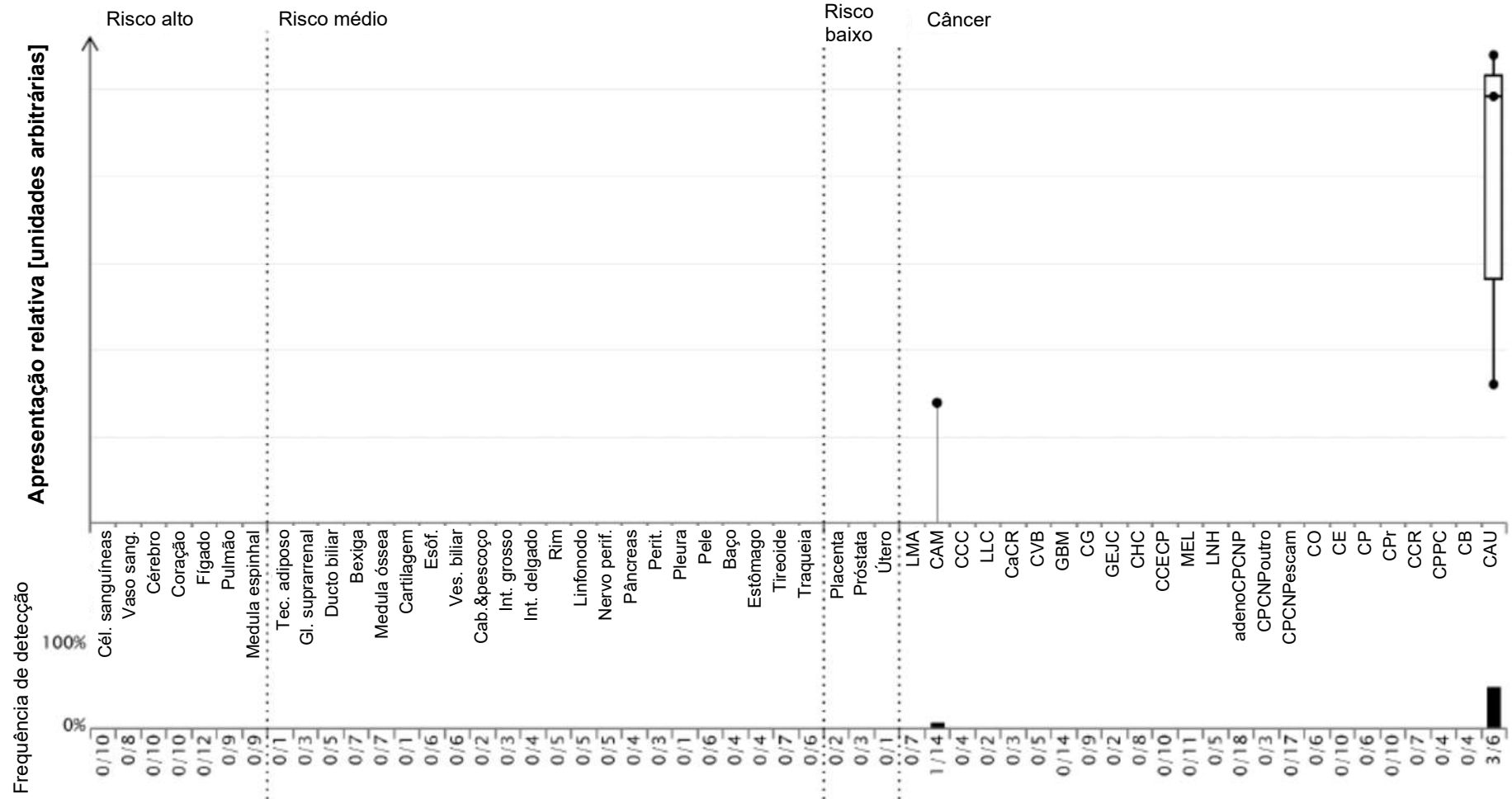


Figura 1M

Peptídeo: PSEVPVDSHYY (A*01)

SEQ ID NO: 28

Apresentação de peptídeos LOXL4-006

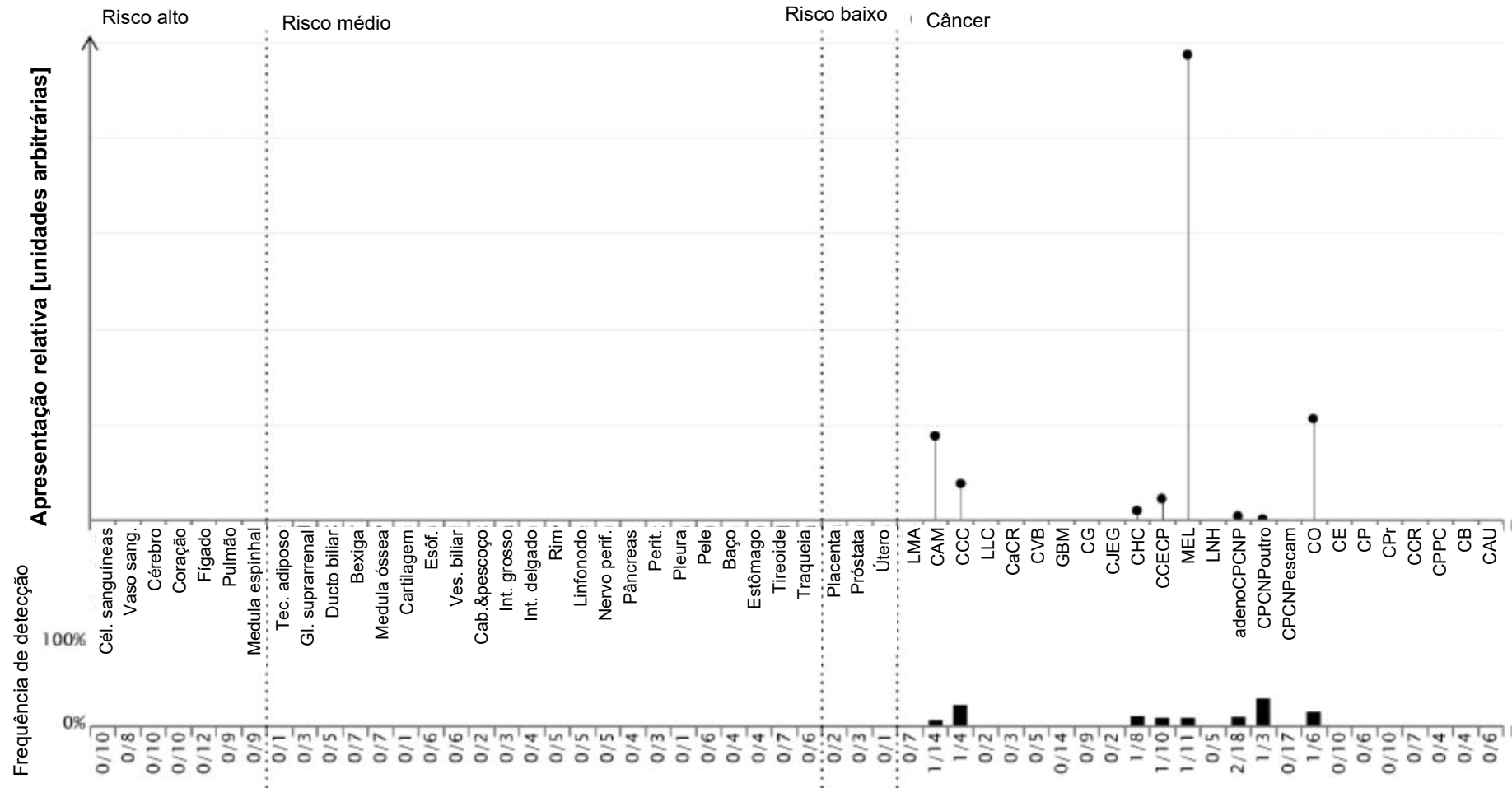


Figura 1N

Peptídeo: LMEKEDYHSLY (A*01)

SEQ ID NO: 387

Apresentação de peptídeos TYR-010

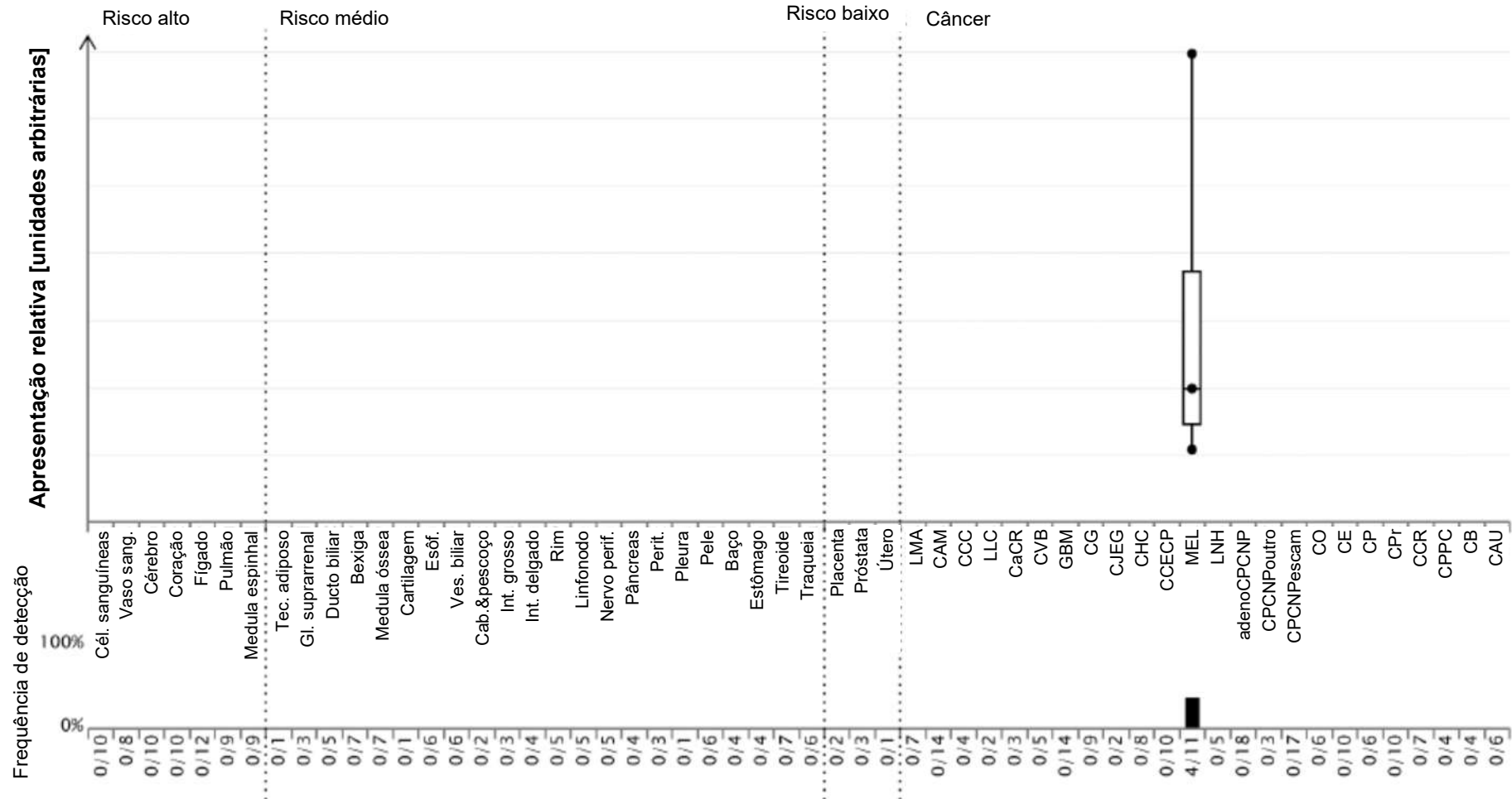


Figura 2A

Gene: MAGEA3
 Peptídeo: VDPIGHLY
 SEQ ID NO: 2

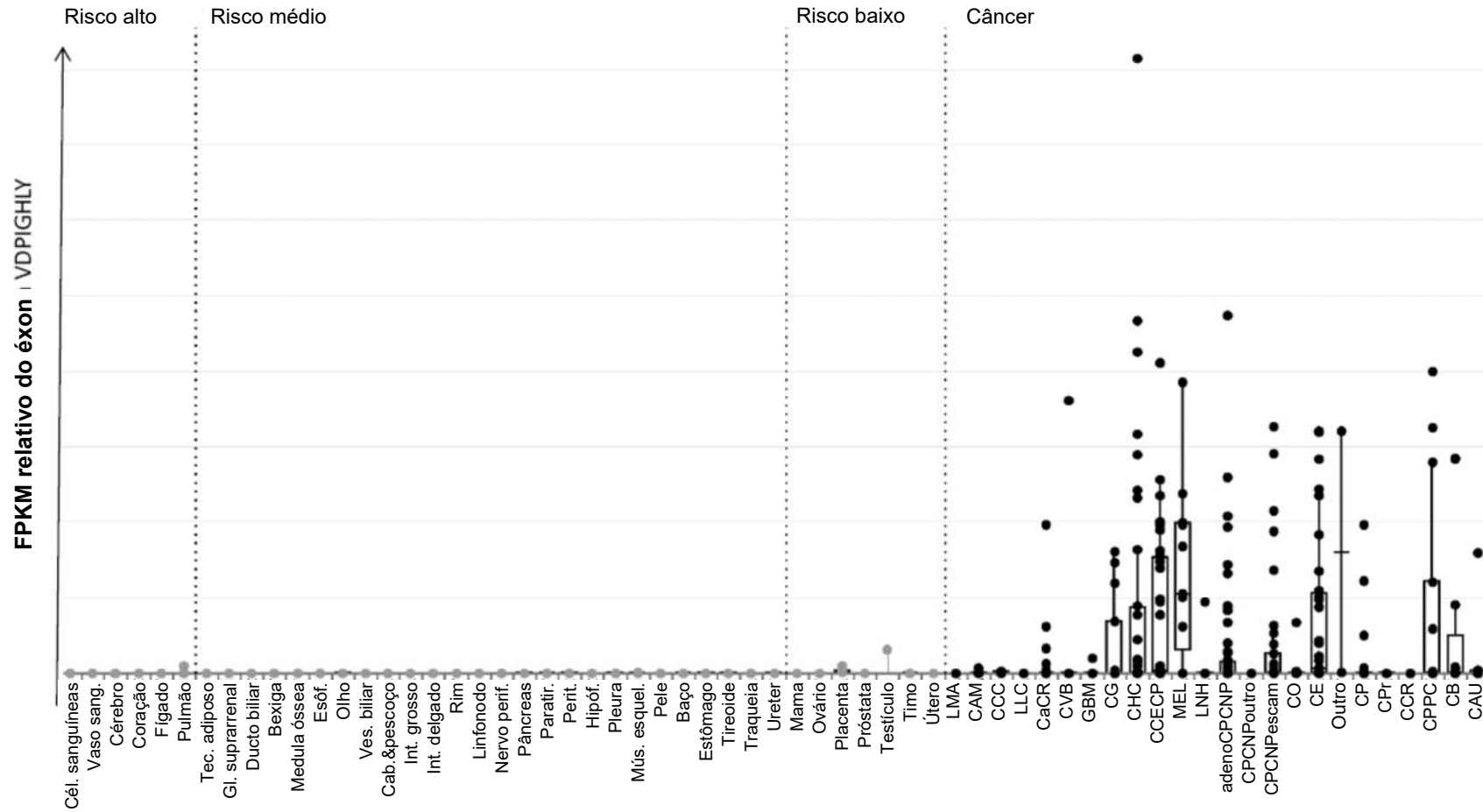


Figura 2B

Gene: SLC6A3

Peptídeo: FGTPAAEYF

SEQ ID NO: 3

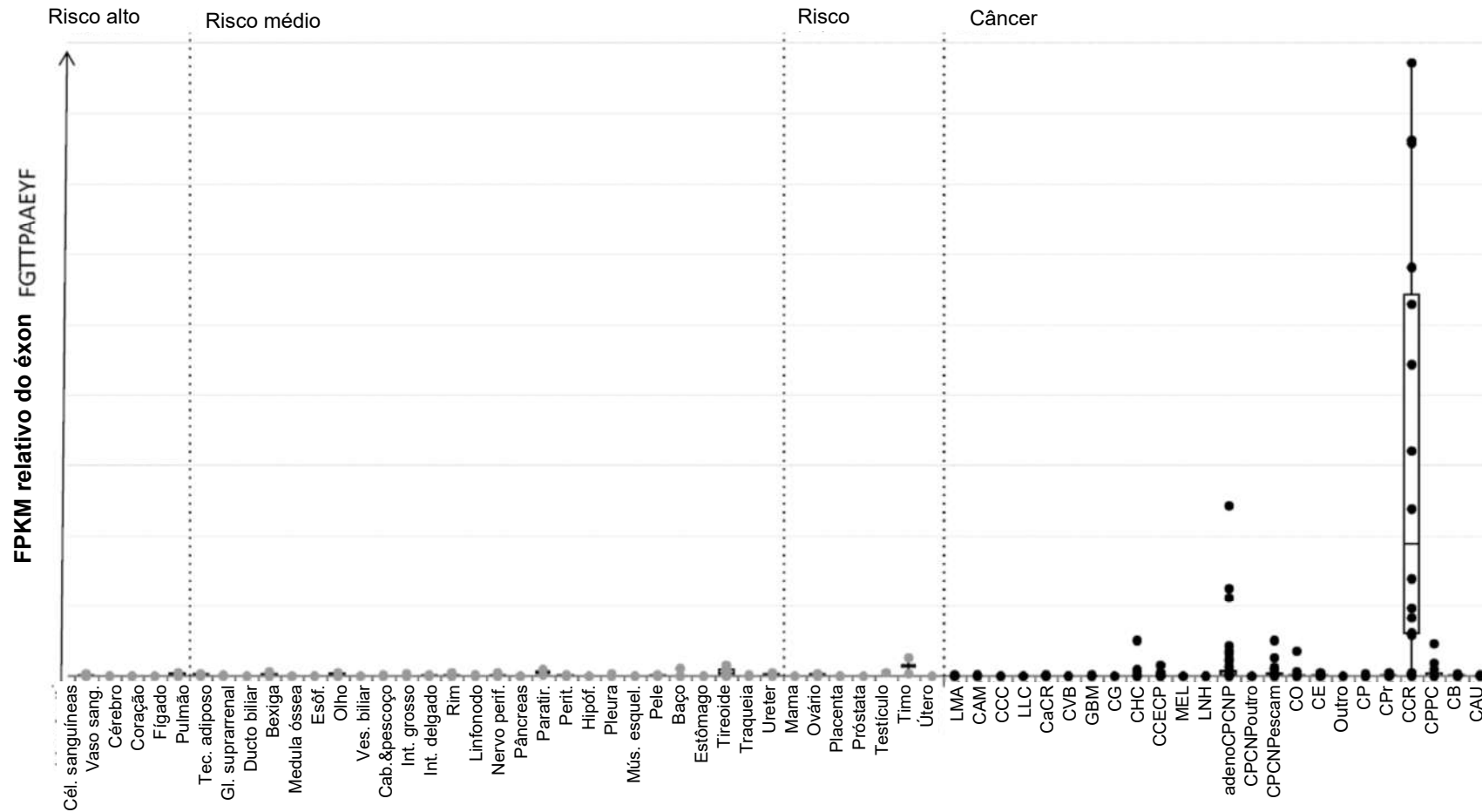


Figura 2C

Gene: UMODL1

Peptídeo: ARDPITFSF

SEQ ID NO: 6

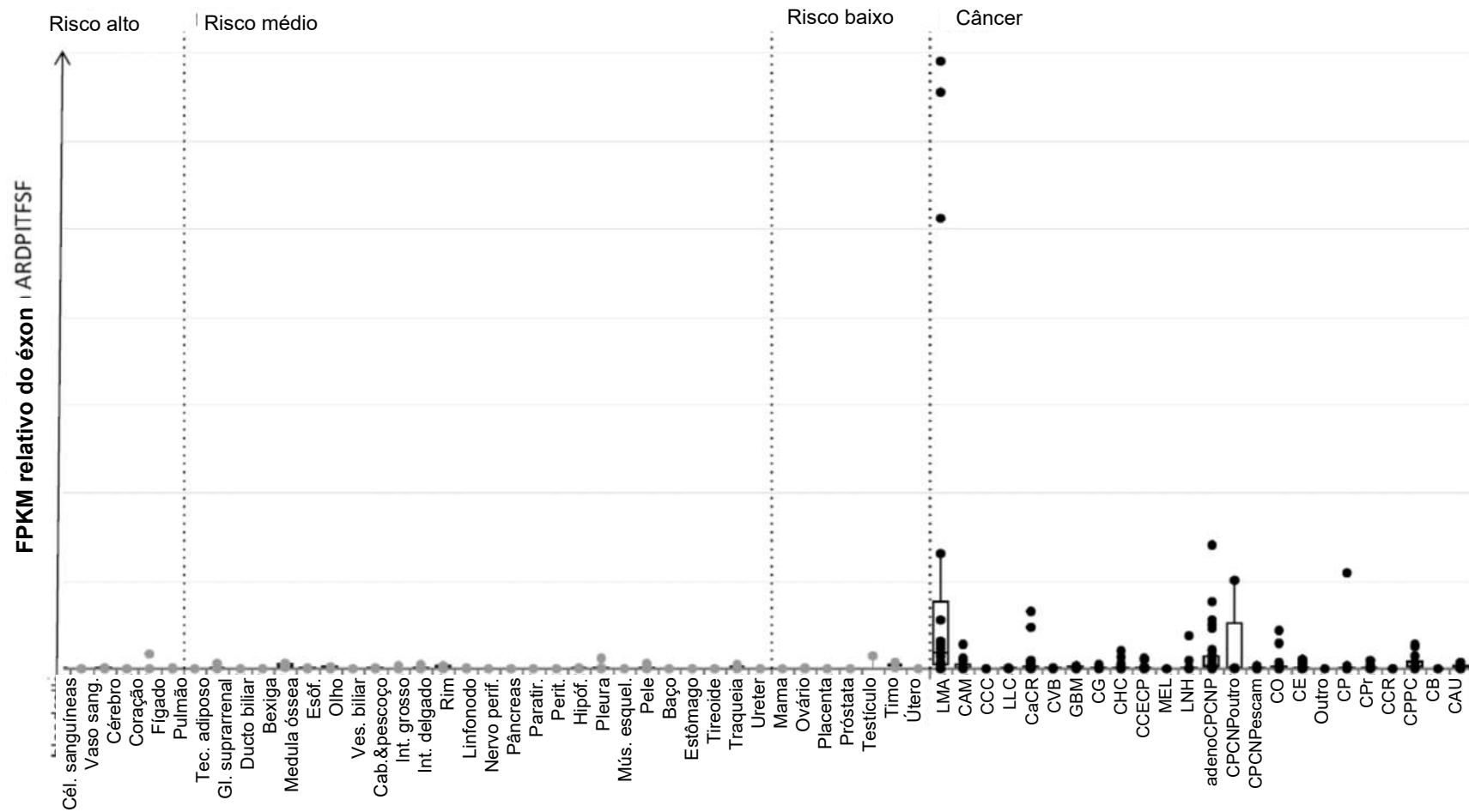


Figura 2D

Gene: SLC45A3

Peptídeo: ASDHWRGRY

SEQ ID NO: 11

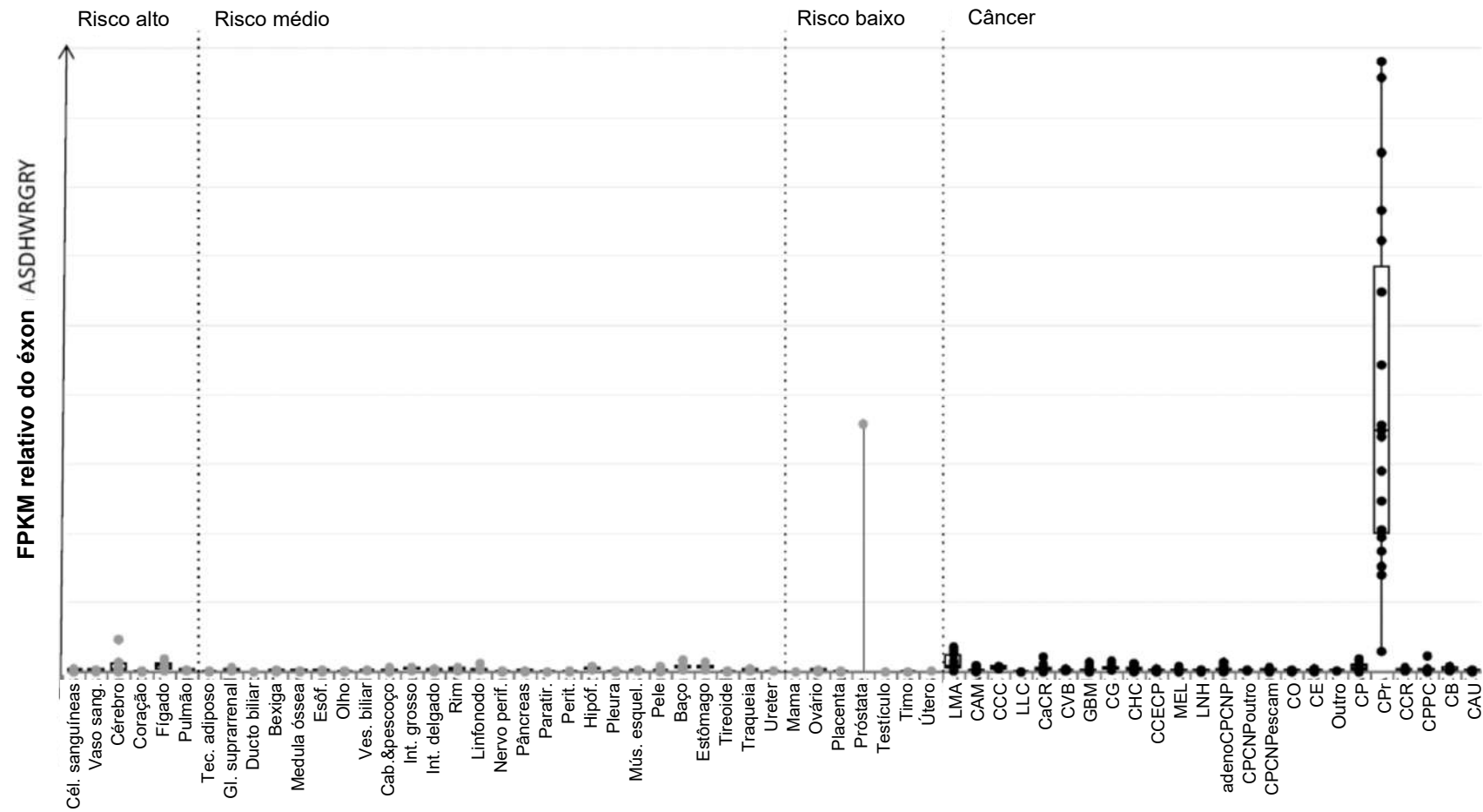


Figura 2E

Gene: MAGEA4

Peptídeo: VDPASNTY

SEQ ID NO: 86

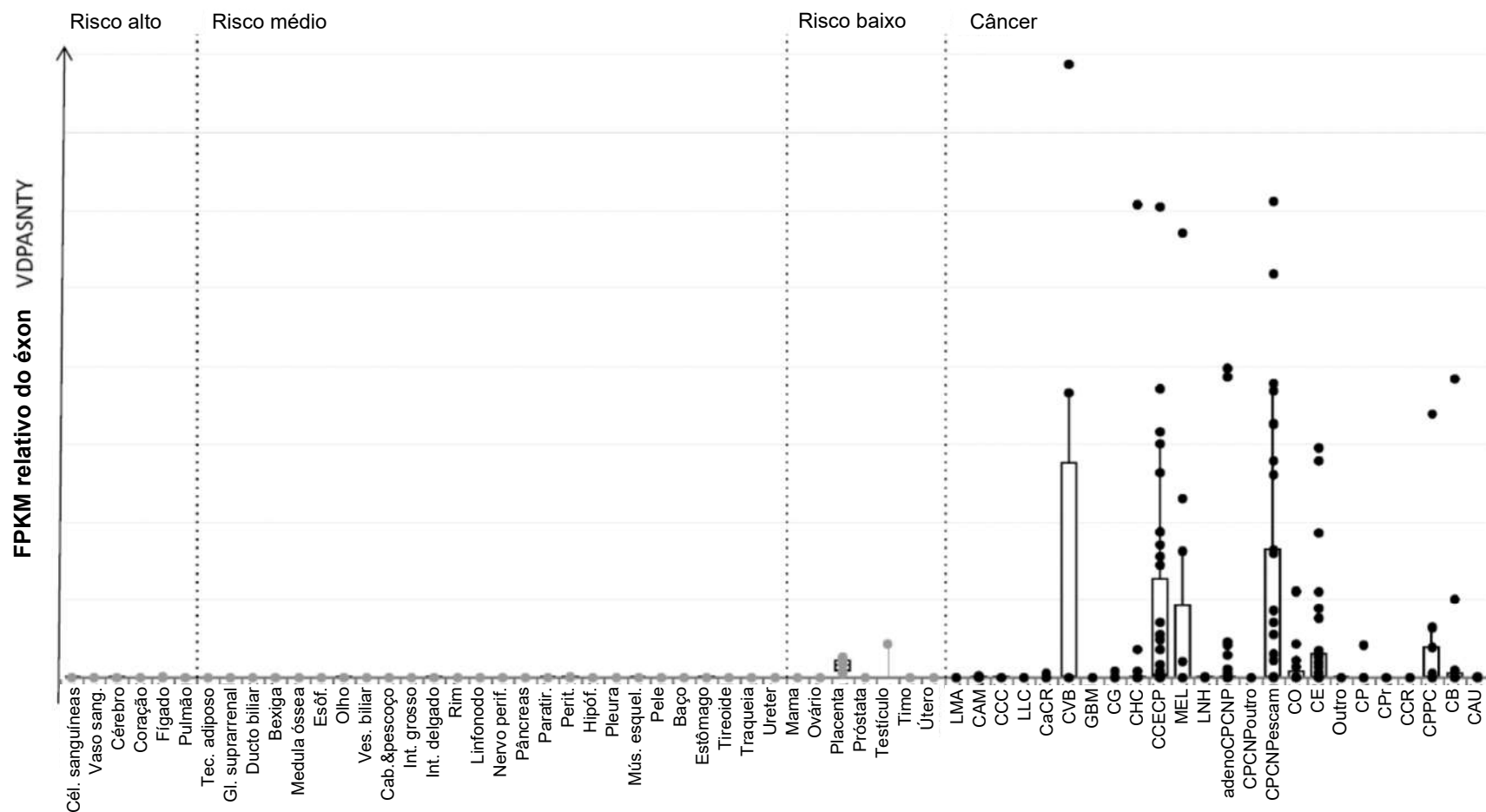


Figura 2F

Gene: **SSX1**Peptídeo: **AFDDIATYF**

SEQ ID NO: 87

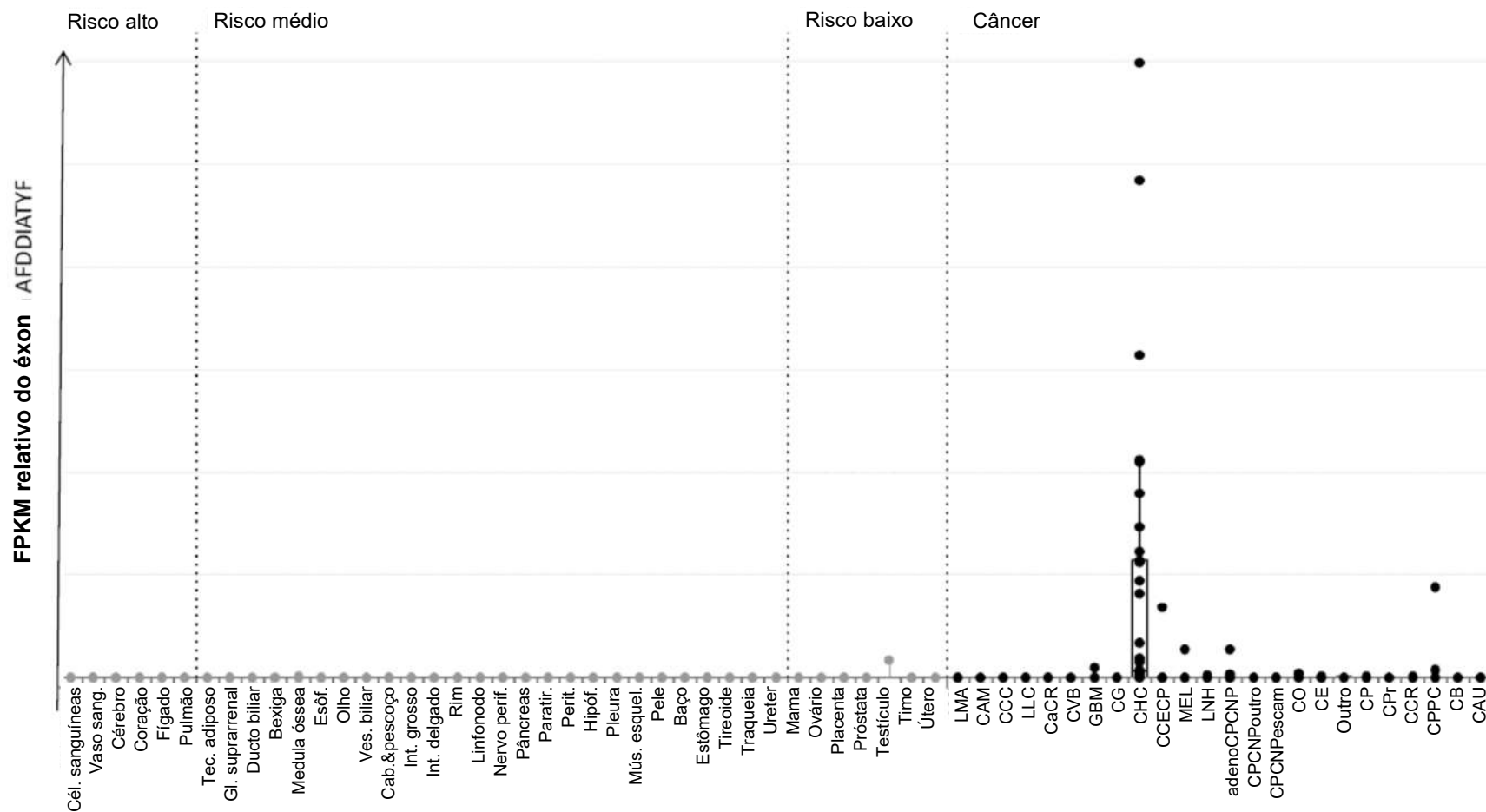


Figura 2G

Gene: MAGEA1

Peptídeo: EVYDGREHSAY

SEQ ID NO: 89

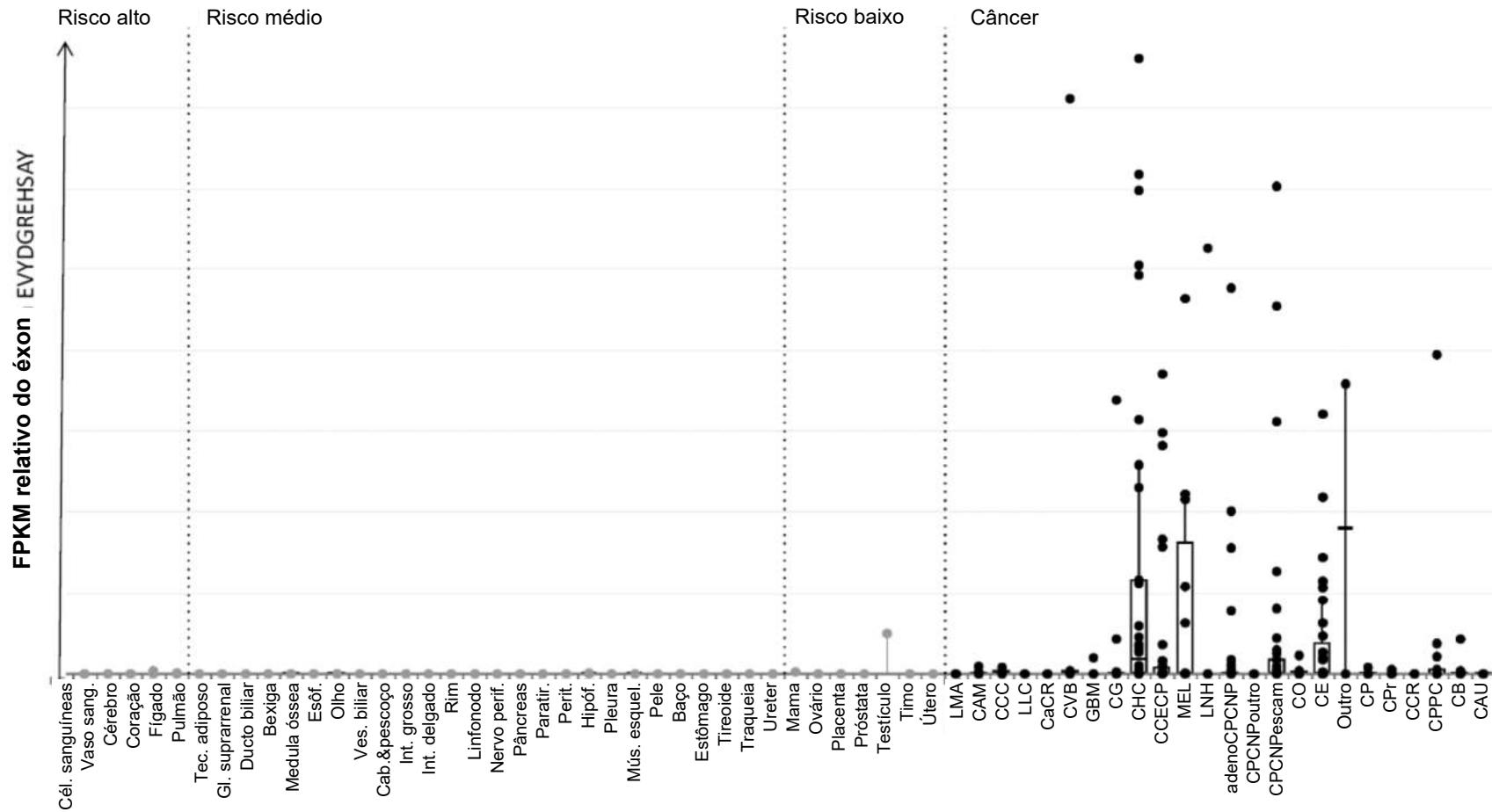


Figura 2H

Gene: MMP12

Peptídeo: SSDPKAVMF

SEQ ID NO: 95

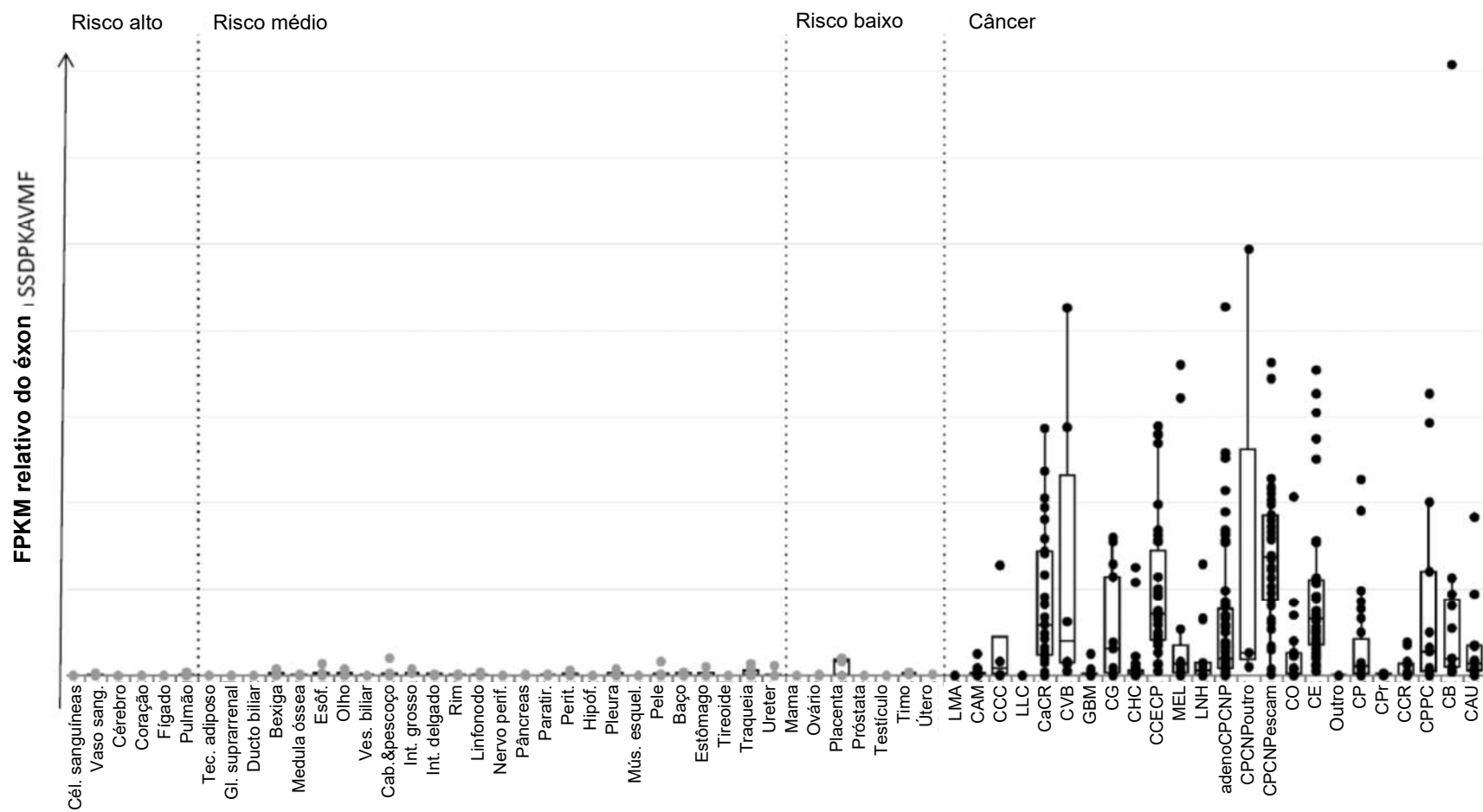


Figura 2l

Gene: **UMODL1**Peptídeo: **ASDDVRIEVGLY**

SEQ ID NO: 7

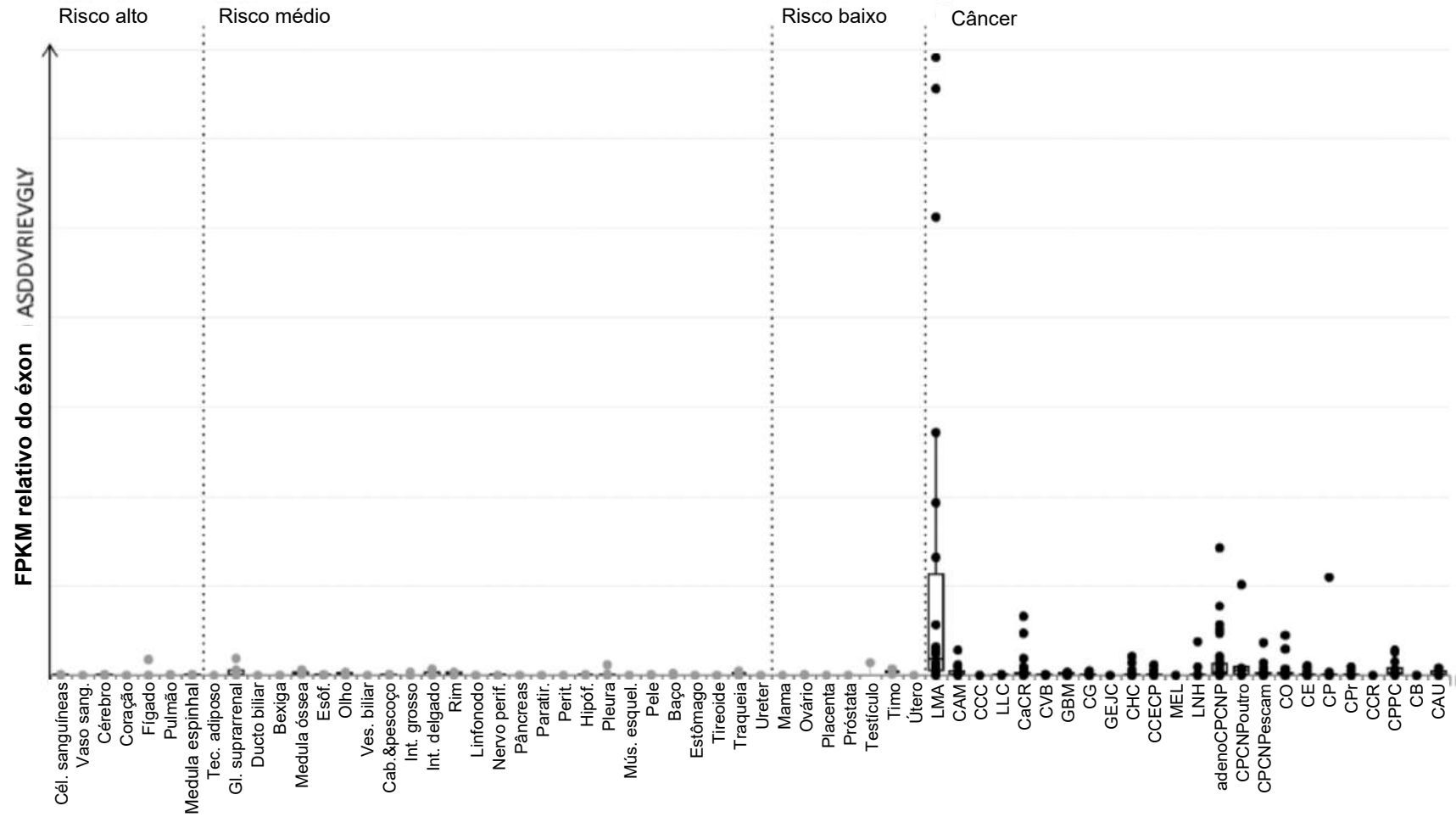


Figura 2J

Gene: C7orf72

Peptídeo: TSRAANIPGY

SEQ ID NO: 8

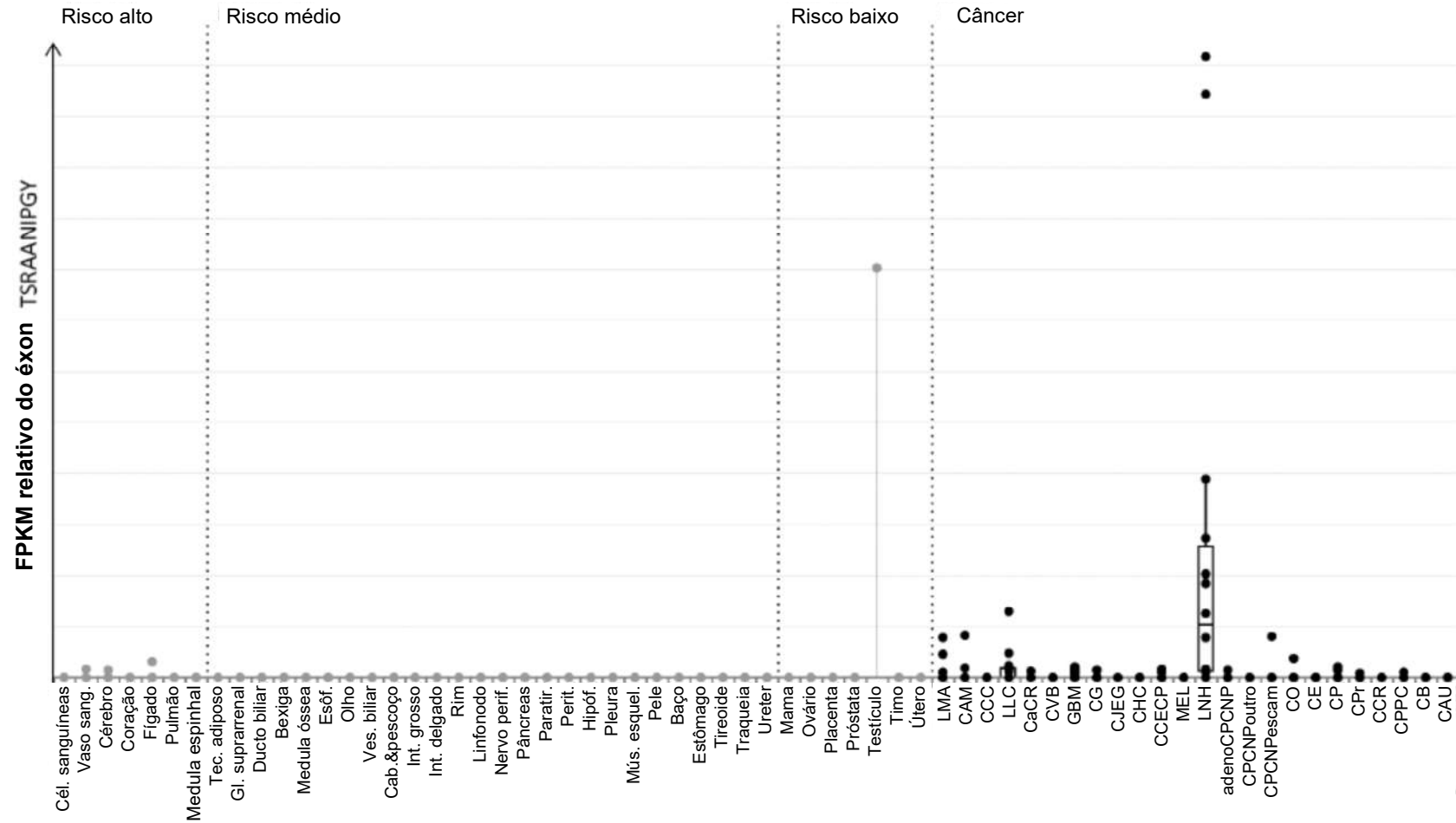


Figura 2K

Gene: CTCFL

Peptídeo: NTHTGTRPY

SEQ ID NO: 13

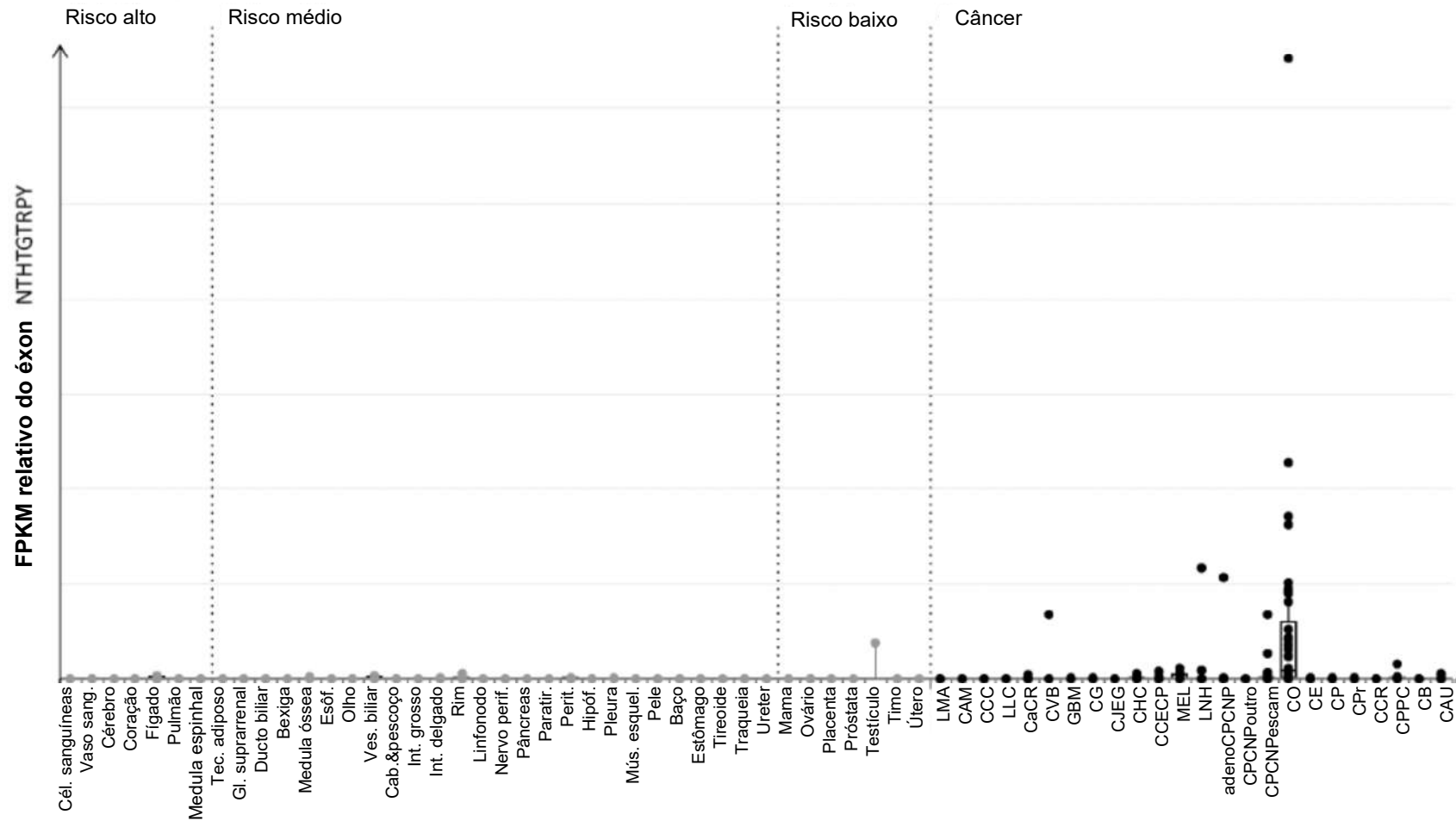


Figura 2L

Gene: SOX14

Peptídeo: DTDPLKAAGL

SEQ ID NO: 23

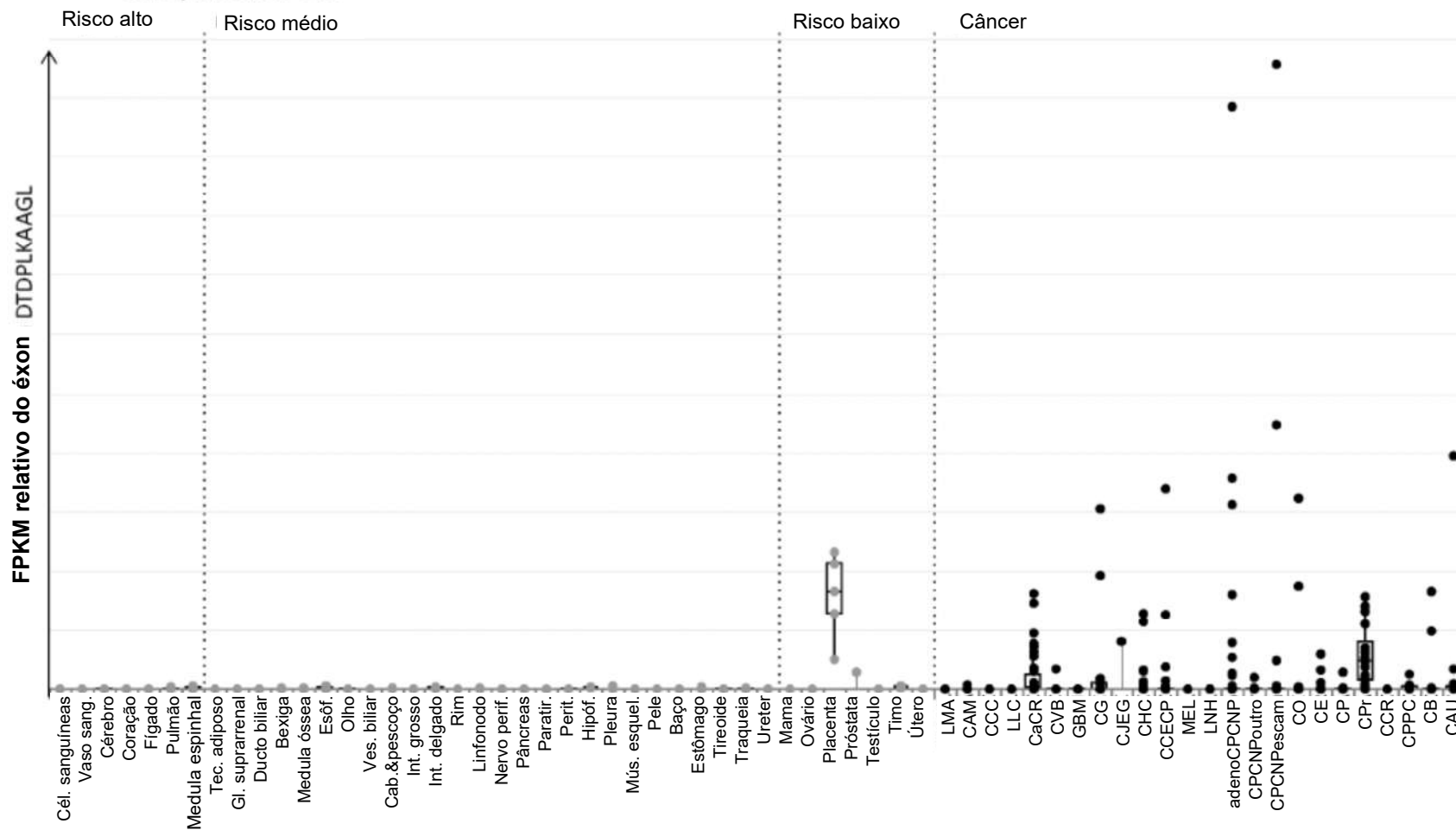


Figura 2M

Gene: HAS2, HAS3
 Peptídeo: IATVIQLFY
 SEQ ID NO: 66

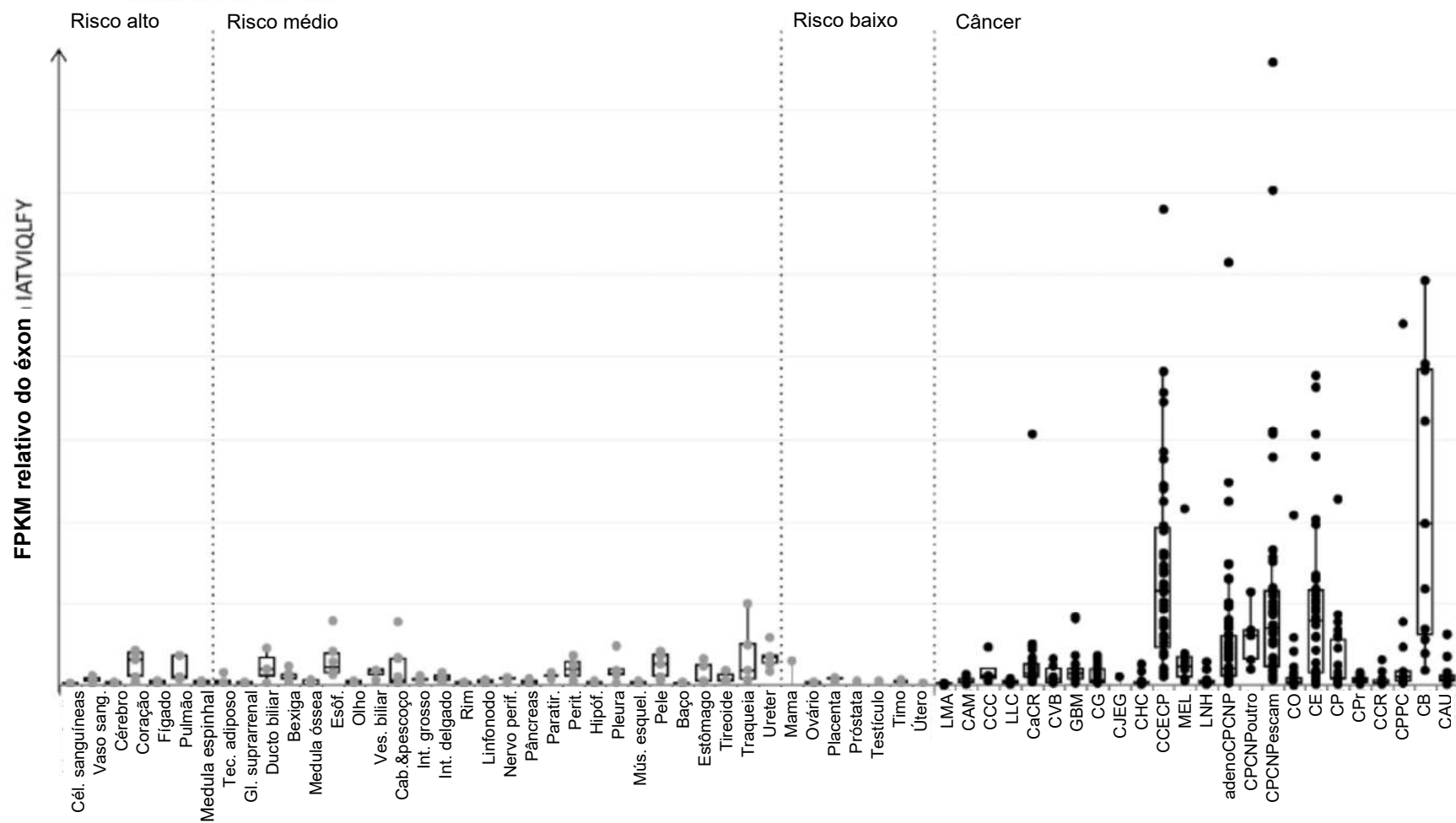


Figura 2N

Gene: SLC6A3

Peptídeo: CLVLVIVLLY

SEQ ID NO: 91

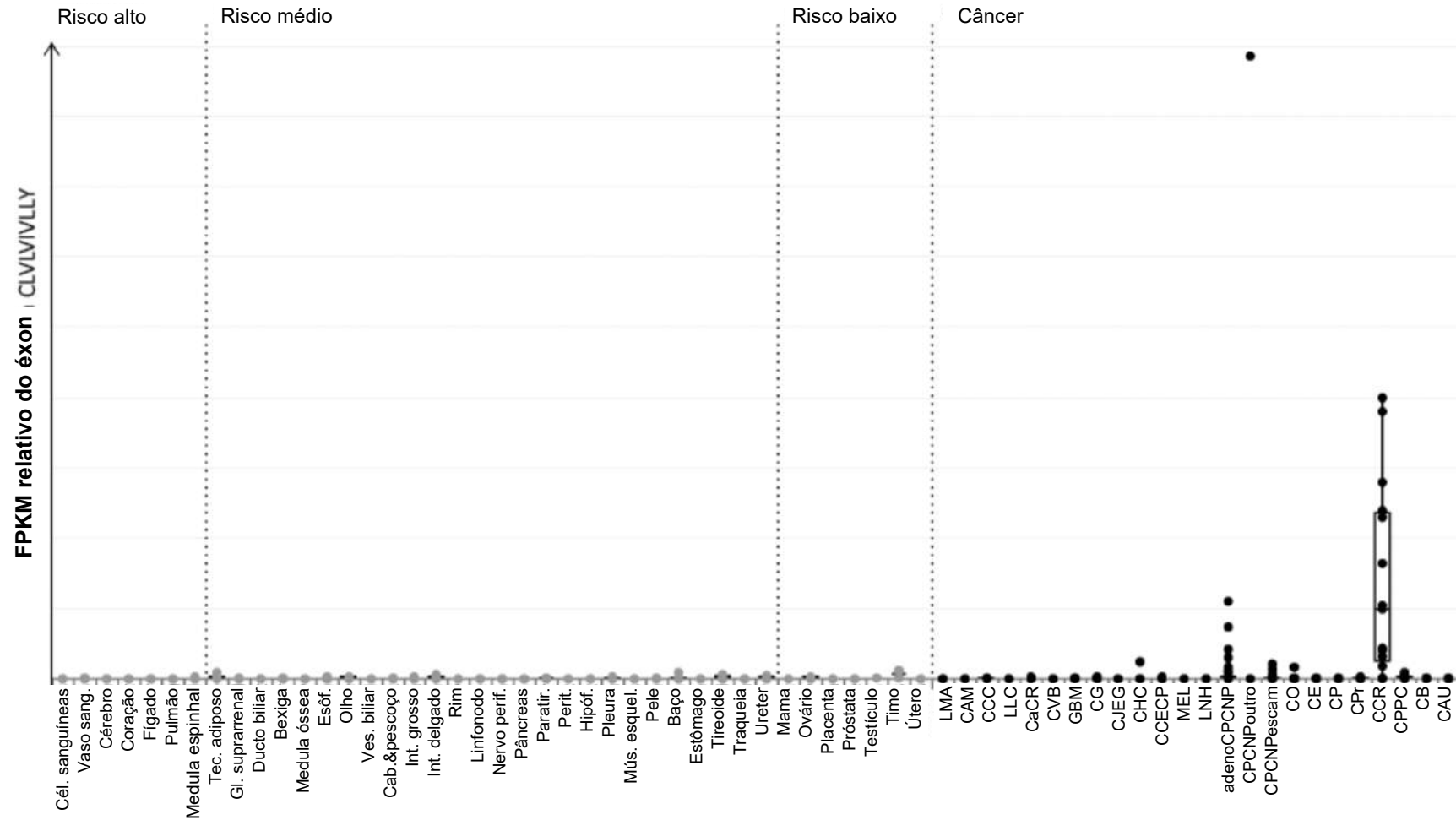


Figura 20

Gene: UMODL1

Peptídeo: TATLLIVRY

SEQ ID NO: 96

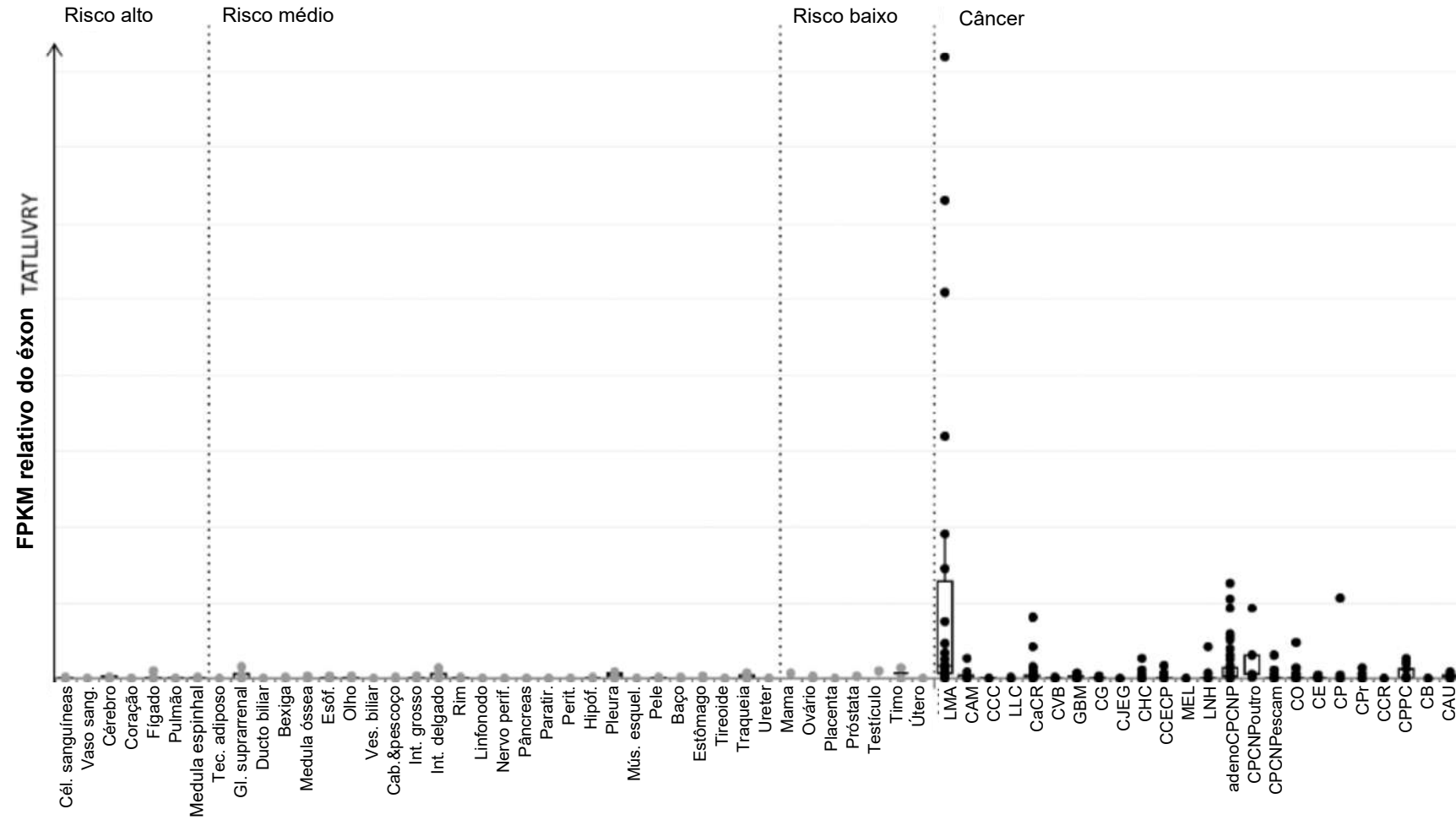


Figura 2P

Gene: CDK6

Peptídeo: LTSVVVTLW

SEQ ID NO: 374

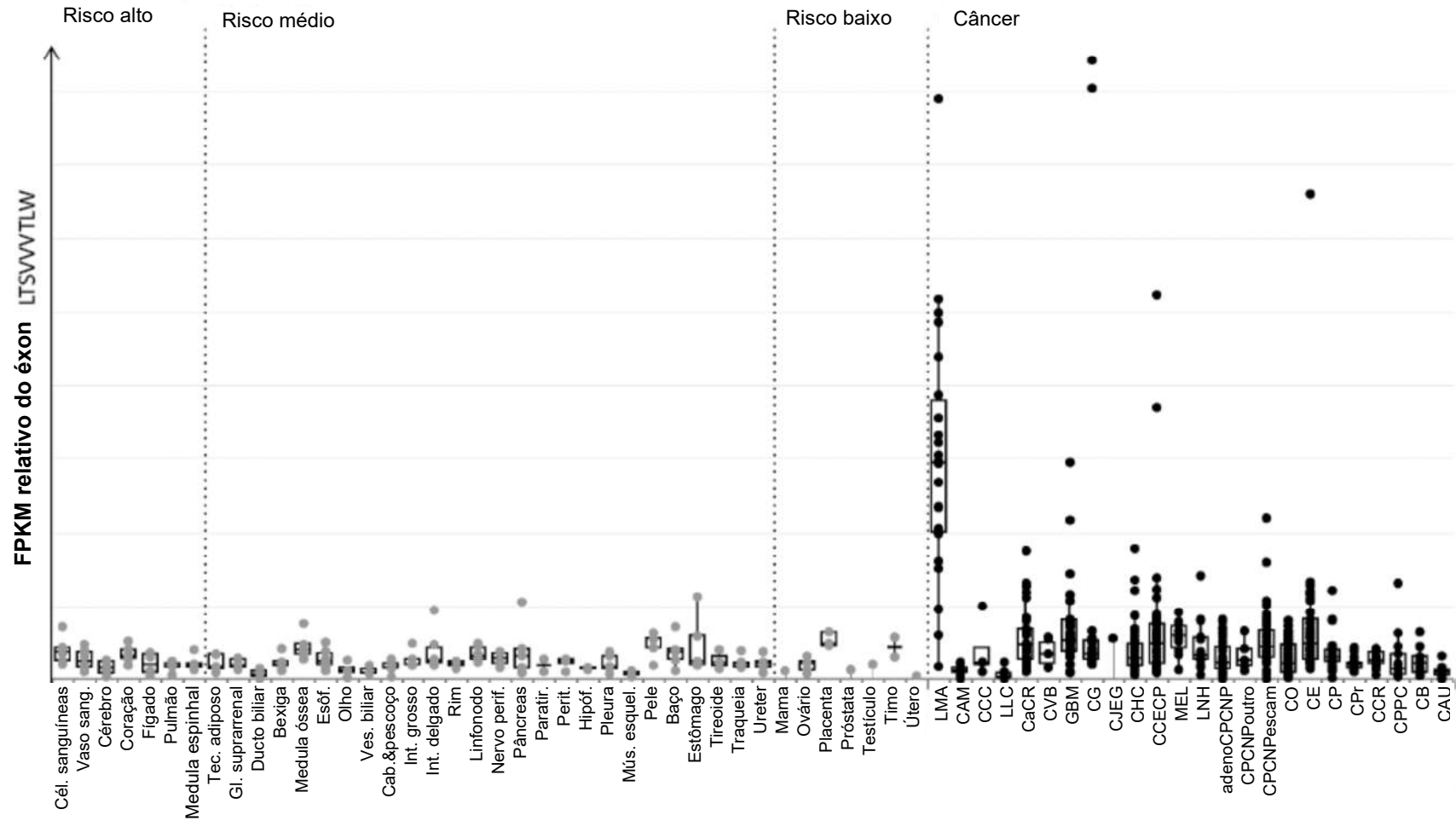
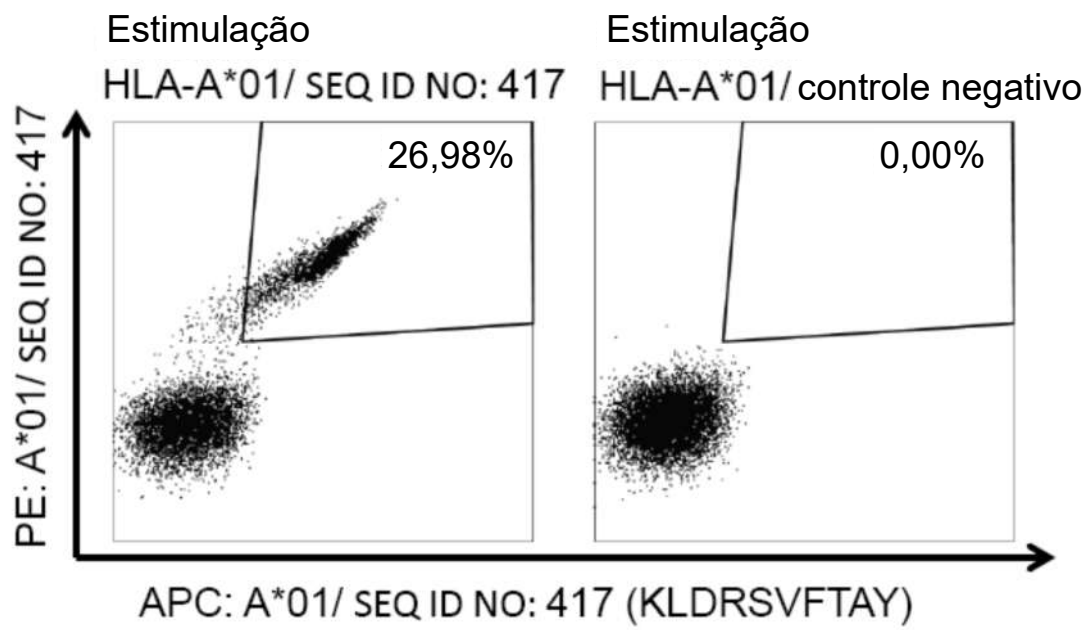


Figura 3

A



B

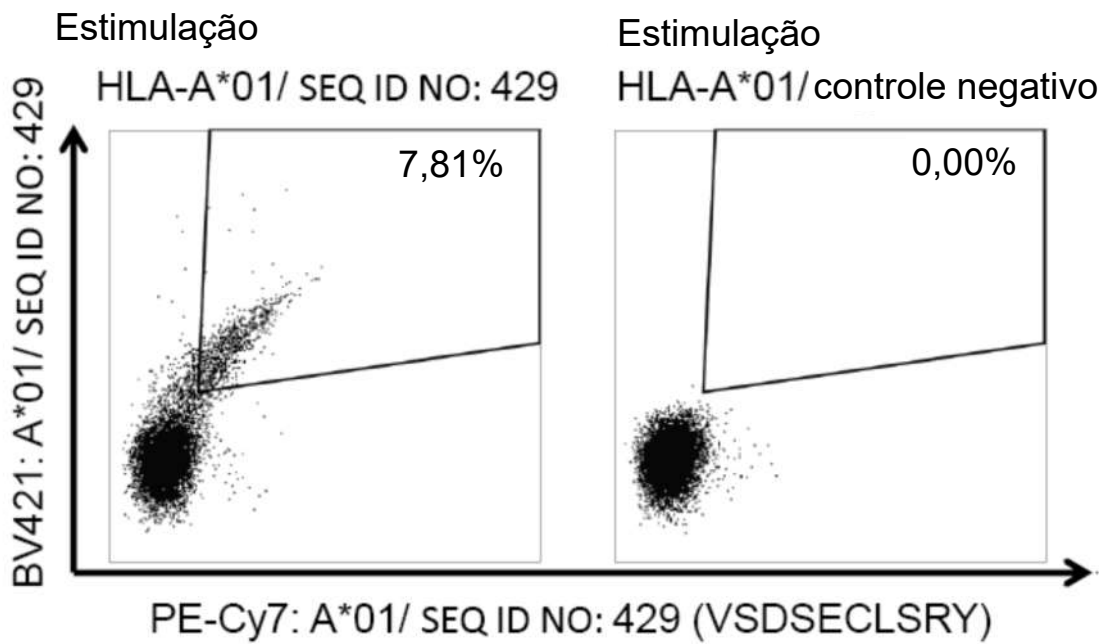


Figura 3 (continuação)

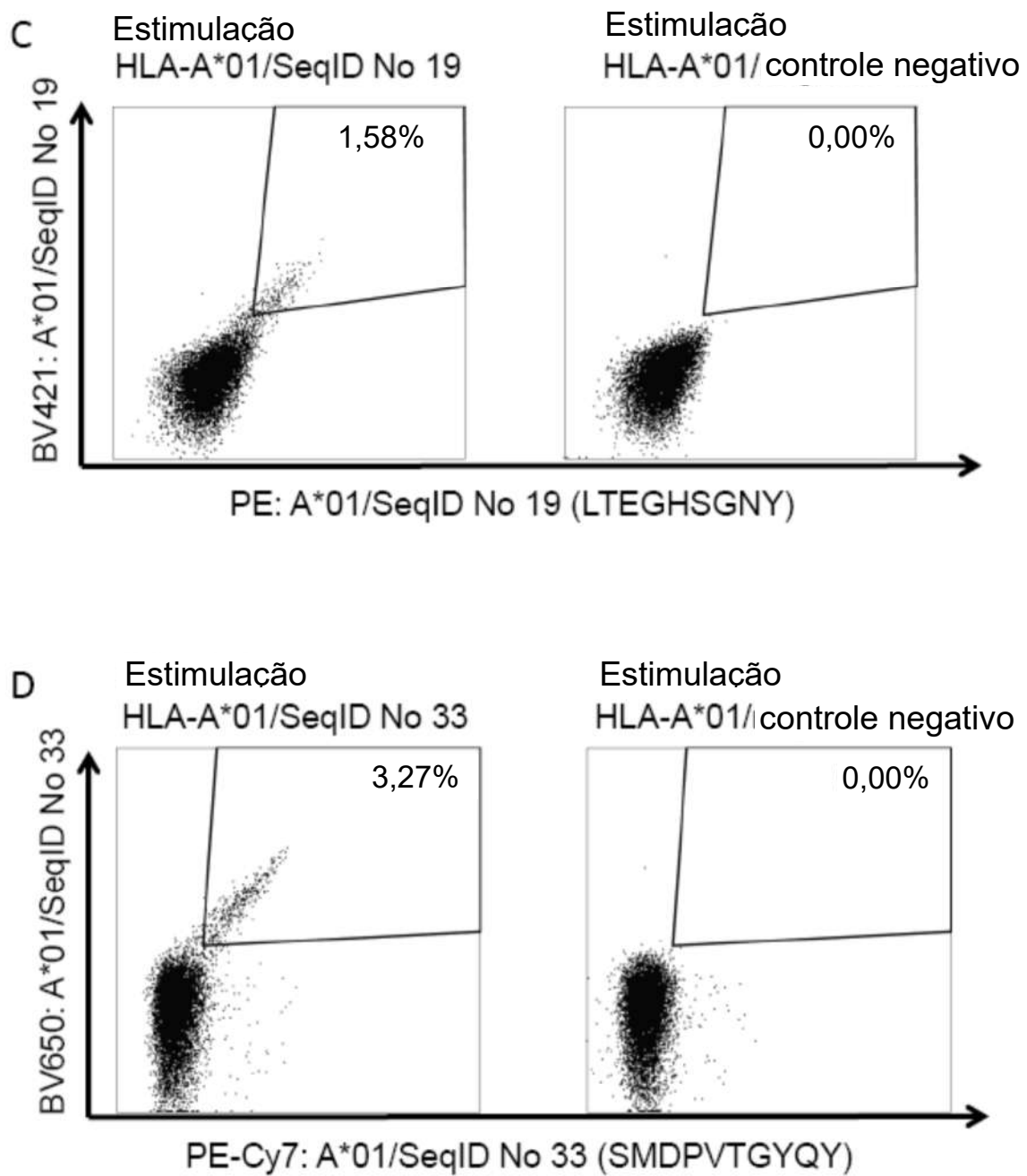


Figura 3 (continuação)

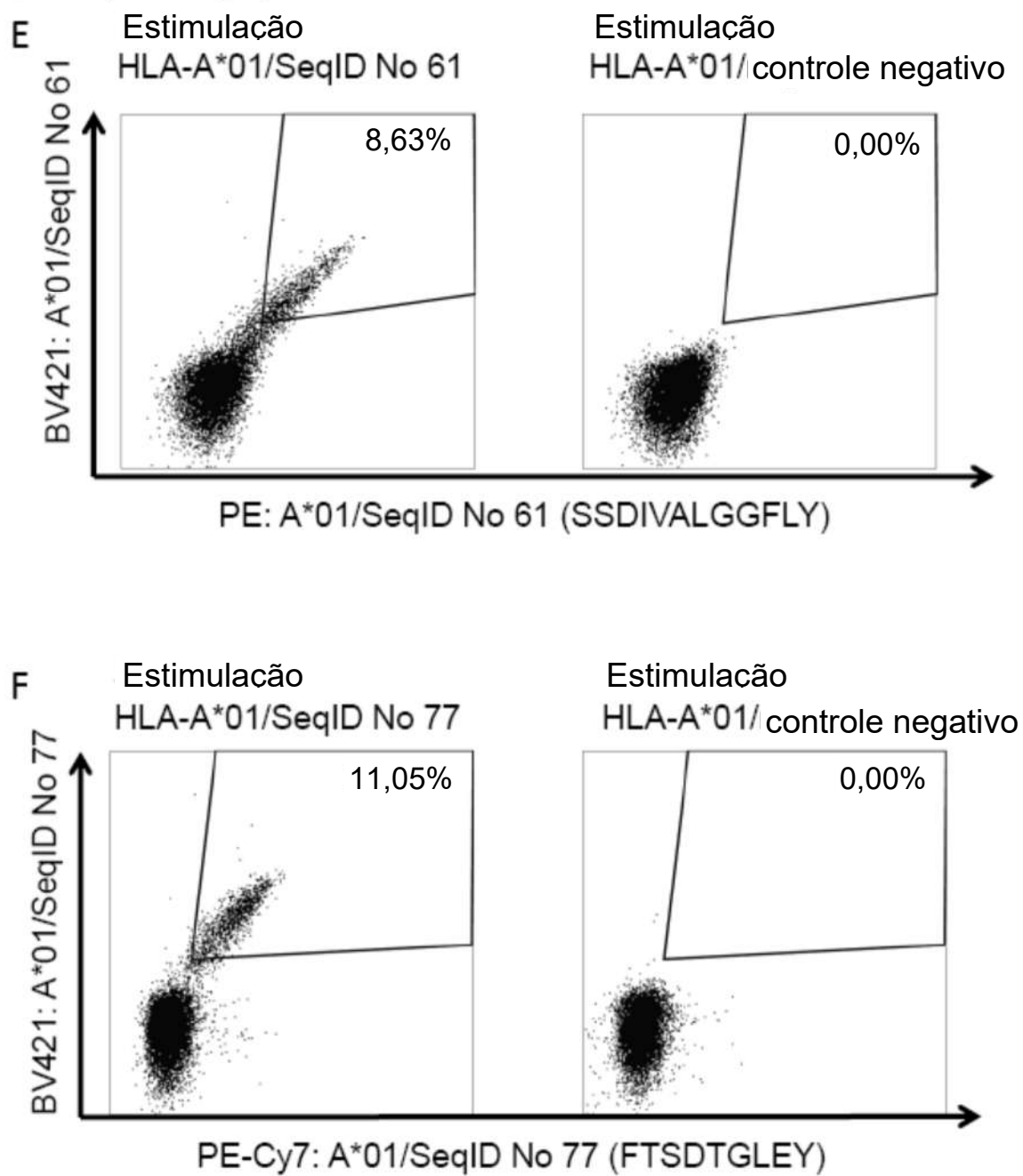
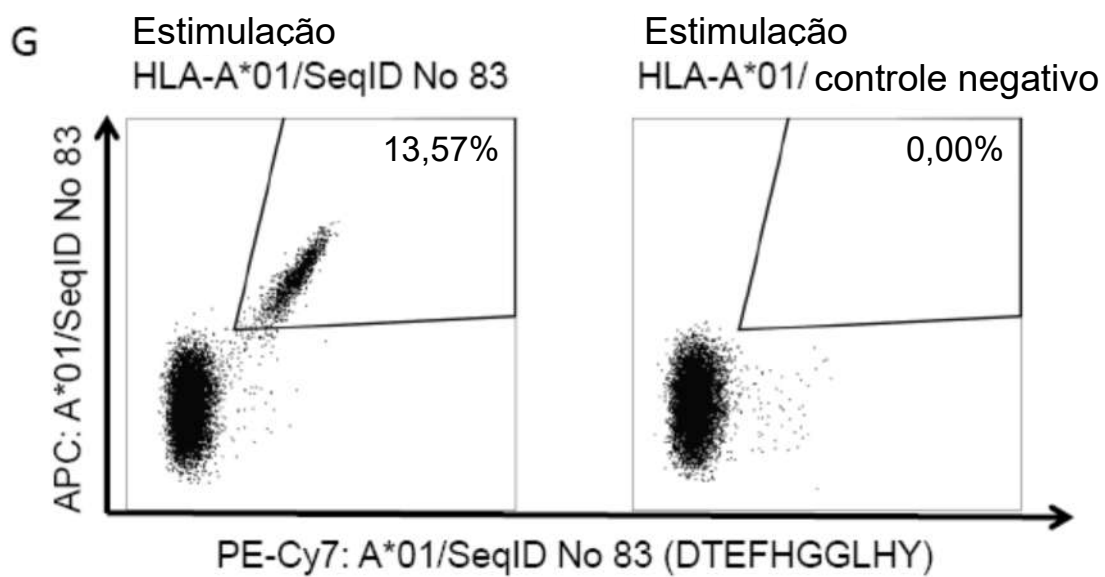


Figura 3 (continuação)



Resumo

“PEPTÍDEO, ANTICORPO, RECEPTOR DE CÉLULA T, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO IN VITRO DE PRODUÇÃO DE LINFÓCITOS, LINFÓCITO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE UM PEPTÍDEO E KIT”

A presente invenção refere-se a peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos e células para utilização em métodos de imunoterapia. Mais especificamente, a presente invenção refere-se à imunoterapia do câncer. A presente invenção refere-se também a epítopos de peptídeos obtidos de células T associadas a tumores, isoladamente ou combinados com outros peptídeos associados a tumores, que podem, por exemplo, atuar como ingredientes farmacêuticos ativos de composições vacinais que estimulam respostas imunes antitumorais ou que estimulam células T *ex vivo*, que são depois transferidas a pacientes. Peptídeos, quer ligados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), quer peptídeos como tal, também podem ser alvos de anticorpos, de receptores de células T solúveis e de outras moléculas ligantes.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 3421-0007_Filing_Listagem de Sequências_ESY.TXT
- Data de Geração do Código: 24/02/2021
- Hora de Geração do Código: 17:10:04
- Código de Controle:
 - Campo 1: 98C64C73BCDFA16A
 - Campo 2: 76061FBD9D79CEB4