

(11) Número de Publicação: **PT 970206 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/12 (2007.10) **C07K 14/705** (2007.10)

C07K 16/18 (2007.10) **C12Q 1/68** (2007.10)

A61K 38/17 (2007.10) **C12N 15/11** (2007.10)

A61K 48/00 (2007.10)

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

(22) Data de pedido: **1998.01.27**

(30) Prioridade(s): **1997.01.27 US 791495**

(43) Data de publicação do pedido: **2000.01.12**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.07.23**
211/2008

(73) Titular(es):

LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH
605 THIRD AVENUE NEW YORK, NEW YORK
10158 US

(72) Inventor(es):

BERNARD LETHE BE
SOPHIE LUCAS BE
CHARLES DE SMET BE
DANIELE GODELAINE BE
THIERRY BOON-FALLEUR BE

(74) Mandatário:

GONÇALO DA CUNHA FERREIRA
AV. ENG. DUARTE PACHECO, TORRE 1 - 3º 1070-101
LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ÁCIDOS NUCLEICOS LAGE-1 ASSOCIADOS A TUMORES**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

ÁCIDOS NUCLEICOS LAGE-1 ASSOCIADOS A TUMORES

Esta invenção diz respeito a moléculas de ácido nucleico e polipeptídeos codificados que são expressos preferencialmente em tumores. As moléculas de ácido nucleico e os polipeptídeos são úteis, *inter alia*, em contexto de diagnóstico e terapia.

As alterações fenotípicas que distinguem uma célula de tumor do seu equivalente normal são frequentemente resultado de uma ou mais alterações no genoma da célula. Os genes que são expressos em células de tumores mas não nos seus equivalentes normais podem ser denominados genes "associados a tumores". Estes genes associados a tumores são marcadores para o fenótipo tumor. A expressão de genes associados a tumores pode ser um acontecimento essencial no processo de génese do tumor.

Normalmente, o hospedeiro reconhece como estranhos os genes associados a tumores que não são expressos em células não tumorigénicas normais. Assim, a expressão de genes associados a tumores pode provocar uma resposta imune contra as células de tumor pelo hospedeiro. Os genes associados a tumores também podem ser expressos em células normais em certos tecidos sem provocar uma resposta imune. Nesses tecidos, a expressão do gene e/ou a apresentação de um fragmento normal e imunologicamente reconhecível do produto da proteína na superfície celular pode não provocar uma resposta imune porque o sistema imunitário não "vê" as células dentro destes tecidos imunologicamente privilegiados. Exemplos de tecidos imunologicamente privilegiados incluem o cérebro e os testículos.

A descoberta da expressão de um gene associada a um tumor providencia um meio de identificação de uma célula como uma célula de tumor. Os compostos de diagnóstico podem ter como base um gene associado a tumores e usados para determinar a presença e localização das células de tumor. Para além disso, quando o gene associado a tumores é essencial para um aspecto do fenótipo do tumor (por exemplo, crescimento ou metástase não regulada), o gene associado a tumores pode ser usado para providenciar uma terapia como os ácidos nucleicos antisense que podem reduzir ou substancialmente eliminar a expressão desse gene, reduzindo ou substancialmente eliminando o aspecto fenotípico que depende da expressão de um gene associado a tumores em particular.

Tal como já se disse, os produtos polipeptídicos do gene associado a tumores pode ser alvo de vigilância do sistema imunitário do hospedeiro e provocam a selecção e expansão de um ou mais clones de linfócitos T citotóxicos específicos para o produto do gene associado a tumores. Exemplos deste fenómeno incluem proteínas e seus fragmentos codificados pela família de genes MAGE, do gene da tirosinase, do gene Melan-A, do gene BAGE, do gene GAGE, da família de genes RAGE, do gene PRAME e do gene glicogénio fosforilase do cérebro, tal como é detalhado em baixo. Assim, a expressão associada a tumores de genes sugere que esses genes podem codificar proteínas que serão reconhecidas pelo sistema imunitário como estranhas e assim providenciam um alvo para a rejeição do tumor. Estes genes codificam "percursores de antigénios de rejeição de tumores", ou TRAPs, que podem ser usados para dar origem a agentes terapêuticos para potenciar a resposta do sistema imunitário a tumores que expressem estes genes e proteínas.

O processo pelo qual o sistema imunitário dos mamíferos reconhece e reage a materiais estranhos é um processo complexo. Uma faceta importante do sistema é a resposta de células-T. Esta

resposta requer que as células T reconheçam e interajam com complexos de moléculas da superfície celular, referidos como antígenios-leucócitos humanos ("HLA"), ou principais complexos de histocompatibilidade ("MHCs") e peptídeos. Os peptídeos derivam de moléculas maiores que são processadas pelas células que também apresentam a molécula HLA/MHC. Ver, a este respeito, Male et al., Advanced Immunology (J.P. Lipincott Company, 1987)), em especial os capítulos 6-10. A interação das células T com os complexos de HLA/peptídeo é restrita, exigindo uma célula T específica para uma combinação particular de uma molécula HLA e de um peptídeo. Se uma célula T específica não estiver presente, não haverá resposta das células T mesmo se o seu parceiro do complexo estiver presente. De igual modo, não haverá resposta se o complexo específico estiver ausente, mas a célula T estiver presente. O mecanismo está envolvido na resposta do sistema imunitário a materiais estranhos, em patologias autoimunes e na resposta a anormalidades celulares. Tem-se feito muito trabalho focado nos mecanismos pelos quais as proteínas são processadas nos peptídeos de ligação a HLA. Ver, a este respeito, Barinaga, *Science* 257: 880, 1992; Fremont et al., *Science* 257: 919, 1992; Matsumura et al., *Science* 257: 927, 1992; Latron et al., *Science* 257: 964, 1992.

O mecanismo pelo qual as células T reconhecem as anormalidades celulares também tem sido implicado no cancro. Por exemplo, no pedido de patente PCT PCT/US92/04354, de 22 de Maio de 1992, publicado dia 26 de Novembro de 1992, divulga-se uma família de genes, que são processados em peptídeos que, por sua vez, são expressos nas superfícies celulares, que podem levar à lise das células de tumor por CTLs específicas. Os genes codificam "percursores de antígeno de rejeição de tumor" ou moléculas "TRAP" e os peptídeos que deles derivam são referidos como "antígenos de rejeição de tumores" ou "TRAs". Ver Traversari et al., *J. Exp. Med.* 176:1453-1457, 1992; van der Bruggen et al., *Science* 254:

1643,1991; De Plaen et al., *Immunogenetics* 40:360-369, 1994, para mais informações sobre esta família de genes. Ver também o pedido de patente estadunidense com o número de série 807,043 de 12 de Dezembro, 1991, agora Patente estadunidense No. 5,342,774.

No pedido de patente estadunidense com o número de série 938.334, agora Patente estadunidense No 5,405,940, mostram-se que nonapeptídeos que são apresentados pela molécula HLA-A1. A referência diz que dada a especificidade conhecida de peptídeos particulares para moléculas particulares de HLA, devemos esperar que um determinado peptídeo se ligue a uma molécula HLA mas não a outras. Isto é importante, porque diferentes indivíduos têm diferentes fenótipos HLA. Em resultado disto, enquanto que a identificação de um determinado peptídeo como parceiro de uma molécula específica de HLA tem implicações de diagnóstico e de terapia, estas são apenas relevantes para indivíduos comum determinado fenótipo HLA. Há a necessidade de mais trabalhos nesta área porque as anormalidades não estão restritas a um fenótipo particular e a terapia dirigida a um alvo requer algum conhecimento do fenótipo das células anormais em causa.

Na WO 94/16713 divulga-se o facto de que um produto da expressão de MAGE-1 ser processado num segundo TRA. Este segundo TRA é apresentado pelas moléculas HLA-Cw16, também conhecidas como HLA-C*1601. A divulgação mostra que uma determinada TRAP pode originar uma pluralidade de TRAs.

Na Patente Estadunidense No. 5,487,974 descreve-se a tirosinase como precursor de antigénio de rejeição de tumores. Esta referência divulga que uma molécula que é produzida por algumas células normais (por exemplo, melanócitos) é processada em células de tumores para formar um antigénio de rejeição de tumores que é apresentada por moléculas HLA-A2.

Na Patente Estadunidense No. 5,620,886, pensa-se que uma segunda TRA, que não deriva da tirosinase, é apresentada por moléculas HLA-A2. A TRA deriva de uma TRAP, mas é codificada por um gene MAGE conhecido. Esta divulgação mostra que uma determinada molécula HLA pode apresentar TRAs derivadas de diferentes fontes.

Na Patente Estadunidense No. 5,571,711, intitulada "Isolated Nucleic Acid Molecules Coding for BAGE Tumor Rejection Antigen Precursors" e na Patente Estadunidense 5.683,886, intitulada "Isolated Peptides Which form Complexes with MHC Molecule HLA-C-Clone 10 and Uses Thereof", descreve-se um precursor de antigénio de rejeição de tumor não relacionado, o chamado precursor "BAGE". Também se descrevem TRAs derivados da TRAP. Formam complexos com molécula MHC HLA-C·Clone 10.

Na Patente Estadunidense No. 5,610,013, intitulada "Isolated Nucleic Acid Molecules Coding for GAGE Tumor Rejection Antigen Precursors" e na Patente Estadunidense 5,610,013, intitulada "Method for Diagnosing a Disorder by Determining Expression of GAGE Tumor Rejection Antigen Precursors", descreve-se outro precursor de antigénio de rejeição de tumor não relacionado, o chamado precursor "GAGE". O precursor GAGE não está relacionado com o BAGE ou com a família MAGE.

Na Patente Estadunidense No. 5,939,526, intitulada "RAGE Tumor Rejection Antigen Precursors", fala-se de outra TRAP que não é derivada de qualquer um dos genes anteriores. Esta TRAP é referida como RAGE. Na Patente Estadunidense No. 5,514,405, intitulada "Isolated RAGE-1 Derived Peptides Which Complex with HLA-B7 Molecules and Uses Thereof, pensa-se que a TRA derivada de um membro da família de genes RAGE seja apresentada por moléculas HLA-B7. Esta divulgação mostra que TRAPs e TRAs adicionais podem ser derivadas de diferentes fontes.

Na Patente Estadunidense No. 5,589,334, intitulada "Isolated Nucleic Acid Molecule Which Codes for a Tumor Rejection Antigen Precursor Which is Processed to na Antigen Presented by HLA-B44", fala-se de outra TRAP que não é derivada de qualquer um dos genes anteriores. O gene que codifica a TRAP é referido como MUM-1. Na aplicação descreve-se um antigénio de rejeição de tumor, LB-33B.

Na Patente Estadunidense No. 5,997,870, fala-se de outras TRAPs que derivam de LB33 e são apresentadas por HLA-B13, HLA-Cw6, HLA-A28 e HLA-A24.

Na publicação PCT W096/10577, publicada 11 de Abril de 1996, e intitulada "Isolated Nucleic Acid Molecule Coding for a Tumor Rejection Antigen Precursor DAGE and Uses Thereof", fala-se de outra TRAP que não é derivada de qualquer um dos genes anteriores. A TRAP foi referida como DAGE mas é agora referida como PRAME. Na aplicação descreve-se um antigénio de rejeição de tumores que é apresentada por HLA-A24.

Na Patente Estadunidense No. 5,821,122, intitulada "Isolated Nucleic Acid Molecule, Peptides Which Form Complexes with MHC Molecule HLA-A2 and Uses Thereof", fala-se de outra TRAP que não é derivada de qualquer um dos genes anteriores. A TRAP é referida como NAG. Nesta aplicação fala-se de várias TRAs derivadas de NAGE apresentadas por HLA-A2.

Na Patente Estadunidense No.5,587,289, intitulada "Isolated Nucleic Acid Molecules Which Are Members of the MAGE-Xp Family and Uses Thereof", fala-se de três TRAPS que não são derivadas de qualquer um dos genes anteriores. Estas TRAPS são referidas como MAGE-Xp2, MAGE-Xp3 e MAGE-Xp4.

O trabalho que é apresentado por estas divulgações, patentes e pedidos de patente acima descritos lidam, na maioria, com a família de genes MAGE, o gene BAGE, o gene GAGE e a família RAGE de genes. Descobriu-se agora que genes adicionais são similarmente expressos num padrão associado a tumores.

A invenção é elaborada segundo o que se segue na divulgação.

Os genes que se crê que codificam percursores de antigénios de rejeição de tumores foram referidos inicialmente como genes associados a tumores LL-1 (LL-1.1 e LL-1.2). Um dos dois genes, originalmente denominado LL-1.2, é agora conhecido como NY-ESO-1, taal como está descrito na Patente Estadunidense No. 5,804,381. O outro gene LL-1, LL-1.1 é agora conhecido como LAGE-1 e não tem homologia com a família de genes MAGE, com o gene BAGE, com o GAGE, com a família de genes RAGE, com o LB33/MUM-1, o gene PRAME, com o gene NAG ou com a família de genes MAGE-Xp. Assim, a invenção diz respeito ao gene LAGE-1 expresso especificamente em certas células de tumor, a percursores de antigénios de rejeição de tumores codificados pelo gene LAGE-1, bem como a moléculas relacionadas e a aplicações destas várias entidades.

A invenção providencia moléculas de ácido nucleico isolados, fragmentos únicos dessas moléculas, vectores de expressão contendo os anteriores e células hospedeiras transfectadas com estas moléculas. A invenção também providencia polipeptídeos isolados e agentes que se ligam a estes polipeptídeos, incluindo anticorpos. Providenciam-se kits para a detecção da presença de percursores polipeptídicos associados a tumores LAGE-1. Todos estes podem ser usados no diagnóstico ou tratamento de condições caracterizadas pela expressão de um polipeptídeo específico de tumor LAGE-1 ou um seu precursor.

De acordo com um aspecto da invenção, fornece-se uma molécula de ácido nucleico isolado que codifica ou é complementar de uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo associado a tumor LAGE-1 com uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:5 ou na SEQ ID NO:7.

Em formas de realização preferidas, a molécula de ácido nucleico compreende uma molécula seleccionada do grupo que consiste na sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO:4 e na sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO:6. Mais preferivelmente, a molécula de ácido nucleico compreende uma molécula seleccionada do grupo que consiste na região de codificação da sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO:4 e da região de codificação da sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO:6.

De acordo com outro aspecto da invenção, fornece-se uma molécula de ácido nucleico isolado que codifica ou é complementar da de ácido nucleico isolado que codifica um polipeptídeo isolado seleccionado de entre (a) polipeptídeos LAGE-1a com os aminoácidos 89-93, 71-93, 71-98, 89-98, 89-111 ou 71-111 da SEQ ID NO:7 e polipeptídeos LAGE-1b com os aminoácidos 142-148, 187-205, 164-179 ou 134-210 da SEQ ID NO:5.

De acordo com outro aspecto da invenção, a invenção envolve vectores de expressão, e células hospedeiras transformadas ou transfectadas com esses vectores de expressão, contendo as moléculas de ácido nucleico acima descritas. Os vectores de expressão e/ou as células hospedeiras incluem preferencialmente uma molécula de ácido nucleico que codifique uma molécula HLA. Claro que uma molécula de ácido nucleico que codifica uma HLA também pode estar contido num vector de expressão separado.

De acordo com outro aspecto da invenção, um polipeptídeo isolado codificado por uma molécula de ácido nucleico que hibridiza em condições rigorosas com uma molécula seleccionada do grupo que consiste na sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO:4 e a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO:6, moléculas de ácido nucleico que variam das anteriores de acordo com a degeneração do código genético, complementos e variantes alélicas de qualquer uma das moléculas de ácidos nucleicos. Os polipeptídeos preferidos são os que incluem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:7, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:7 com uma substituição de glutamina por arginina no resíduo 6, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:7 com uma substituição de glutamina por ácido glutâmico no resíduo 89, e a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5 com uma substituição de arginina por triptofano 138.

Noutro aspecto da invenção, fornecem-se polipeptídeos LAGE-1 isolados que incluem os aminoácidos 89-93 da SEQ ID NO:5 ou 7. As formas de realização preferidas destes polipeptídeos incluem polipeptídeos LAGE-1 isolados que incluem os aminoácidos 71-93, 71-98, 89-98, 89-111, ou 71-111 da SEQ ID NO:5 ou 7. Também se providenciam os ácidos nucleicos que codificam esses polipeptídeos.

De acordo com outro aspecto da invenção, fornecem-se polipeptídeos LAGE-1 isolados que incluem os aminoácidos 142-148 da SEQ ID NO:5, aminoácidos 187-205 da SEQ ID NO:5, ou aminoácidos 164-179 da SEQ ID NO:5. De preferência, esses polipeptídeos isolados incluem os aminoácidos 134-210 da SEQ ID NO:5. Também se providenciam os ácidos nucleicos isolados que codificam esses polipeptídeos.

A invenção também fornece polipeptídeos isolados que se ligam selectivamente a proteínas LAGE-1 ou a seus fragmentos.

Polipeptídeos isolados que se ligam incluem anticorpos e fragmentos de anticorpos (por exemplo, Fab, F(ab)₂, Fd e fragmentos de anticorpos que incluem a região CDRIII que se ligam selectivamente às proteínas LAGE-1 da invenção). Os polipeptídeos isolados de ligação incluem anticorpos monoclonais.

A invenção noutro aspecto envolve um kit para detectar a presença da expressão de um precursor polipeptídico associado a tumor LAGE-1. Estes kits usam duas ou mais das moléculas isoladas acima descritas em contentores separados e embalados numa embalagem única. Num desses kits, fornece-se um par de moléculas de ácido nucleico isoladas, cada uma do par consiste essencialmente numa molécula seleccionada do grupo que consiste num segmento contíguo com 12-32 nucleótidos da SEQ ID NO:4 e seus complementos e num segmento contíguo com 12-32 nucleótidos da SEQ ID NO:6 e seus complementos, em que os segmentos contíguos não se sobrepõem. De preferência, o par de moléculas de ácido nucleico isoladas é construído e arranjado para amplificar selectivamente uma molécula de ácido nucleico que hibridize em condições rigorosas com uma molécula seleccionada do grupo que consiste na sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO :4; na sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO:6, moléculas de ácido nucleico que diferem das anteriores na sequência de codões de acordo com a degeneração do código genético, complementos e suas variantes alélicas. Em certas formas de realização, o par de moléculas isoladas de ácido nucleico são primers PCR. De preferência um dos primers é um segmento contíguo da SEQ ID NO:4 e outro dos primers é um complemento de outro segmento contíguo da SEQ ID NO:4. Noutra forma de realização preferida, um dos primers é um segmento contíguo da SEQ ID NO:6 e outro dos primers é um complemento de outro segmento contíguo da SEQ ID NO:6.

Ainda de acordo com outro aspecto da invenção, providencia-se um método para diagnosticar cancro, em que o cancro é caracterizado pela expressão de uma molécula de ácido nucleico LAGE-1 ou um produto da sua expressão. O método envolve o contacto de uma amostra biológica isolada de um sujeito com uma molécula de ácido nucleico complementar, uma molécula de ácido nucleico antisense, um anticorpo ou seu fragmento ou um linfócito T citolítico que se liga selectivamente a uma molécula de ácido nucleico LAGE-1 ou um seu produto de expressão. Em certas forma de realização, a molécula de ácido nucleico hibridiza em condições rigorosas com uma molécula seleccionada do grupo que consiste na sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO:4 e na sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO:6, e que codifica um polipeptídeo associado a tumores. O método também envolve a determinação da interacção entre o agente e a molécula de ácido nucleico ou seu produto de expressão como determinação do distúrbio. Em formas de realização preferidas, o agente é uma molécula de ADN que compreende a SEQ ID.NO:4 ou a SEQ ID NO:6, ou um seu fragmento único. Em certas formas realização, a interacção entre o agente e a molécula de ácido nucleico é determinada pela amplificação de pelo menos uma porção da molécula de ácido nucleico.

Ainda de acordo com outro aspecto da invenção, fornece-se a utilização células T citolíticas autólogas, em que as células T citolíticas são específicas para complexos de uma molécula HLA e um antigénio de rejeição de tumor que é seleccionado de entre:

(a) polipeptídeo LAGE-1a que compreende os aminoácidos 89-93, 71-93, 71-98, 89-98, 89-111 ou 71-111 da SEQ ID NO:7; e

(b) polipeptídeo LAGE-1b que compreende os aminoácidos 142-148, 187-205, 164-179 ou 134-210 da SEQ ID NO:5.

Noutro aspecto da invenção, providencia-se a utilização de uma quantidade de polipeptídeo associado a tumor LAGE-1 com a sequência de aminoácidos da SED ID NO:5 ou SEQ ID NO:7 na preparação de um medicamento para tratar cancro num indivíduo.

De acordo com outro aspecto da invenção, métodos para enriquecer selectivamente uma população de células T com células T citolíticas, específicas para um antigénio de rejeição de tumor que é seleccionado de entre:

(a) polipeptídeos LAGE-1a que compreendem os aminoácidos 89-93, 71-93, 71-98, 89-98, 89-111 ou 71-111 da SEQ ID NO:7; e

(b) polipeptídeos LAGE-1b que compreendem os aminoácidos 142-148, 187-205, 164-179 ou 134-210 da SEQ ID NO:5. Os métodos incluem o contacto de uma população isolada de células T com uma célula que apresenta um complexo de um antigénio de rejeição de tumor que é seleccionado de entre:

(a) polipeptídeos LAGE-1a que compreendem os aminoácidos 89-93, 71-93, 71-98, 89-98, 89-111 ou 71-111 da SEQ ID NO:7; e

(b) polipeptídeos LAGE-1b que compreendem os aminoácidos 142-148, 187-205, 164-179 ou 134-210 da SEQ ID NO:5 e uma molécula que apresenta HLA numa quantidade suficiente para enriquecer selectivamente a população isolada de células T com as células t citolíticas.

De acordo com outro aspecto da invenção, fornece-se uma composição de vacina que compreende: um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo associado a tumor LAGE-1 com uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:7; um polipeptídeo LAGE-1

com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:7 ou um polipeptídeo seleccionado de entre:

(a) polipeptídeos LAGE-1a que compreendem os aminoácidos 89-93, 71-93, 71-98, 89-98, 89-111 ou 71-111 da SEQ ID NO:7; e

(b) polipeptídeos LAGE-1b que compreendem os aminoácidos 142-148, 187-205, 164-179 ou 134-210 da SEQ ID NO:5 ou células que expressem um ácido nucleico que codifique um polipeptídeo associado a tumor LAGE-1 com uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:7; ou um polipeptídeo LAGE-1 com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:7 seleccionado de entre:

(a) polipeptídeos LAGE-1a que compreendem os aminoácidos 89-93, 71-93, 71-98, 89-98, 89-111 ou 71-111 da SEQ ID NO:7; e

(b) polipeptídeos LAGE-1b que compreendem os aminoácidos 142-148, 187-205, 164-179 ou 134-210 da SEQ ID NO:5.

Estes e outros objectivos da invenção serão agora descritos com mais detalhe em ligação com a descrição detalhada da invenção.

A fig.1 representa a sequência de nucleótidos dos clones 2, 3 e 4 de LL-1 (agora conhecidos como (LAGE-1 clone 2 [LAGE-1b], NY-ESO-1 e LAGE-1 clone 4 [LAGE-1a], respectivamente).

A SEQ ID NO:1 é a sequência de nucleótidos de LAGE-1 clone 1.

A SEQ ID NO:2 é a sequência de nucleótidos do primer SL25.

A SEQ ID NO:3 é a sequência de nucleótidos do primer BLE56.

A SEQ ID NO:4 é a sequência de nucleótidos de LAGE-1 clone 2 também conhecido como LAGE-1 b.

A SEQ ID NO:5 é a sequência de aminoácidos do produto de tradução de LAGE-1 clone 2.

A SEQ ID NO:6 é a sequência de nucleótidos de LAGE-1 clone 4 também conhecido como LAGE-1 a.

A SEQ ID NO:7 é a sequência de aminoácidos do produto de tradução de LAGE-1 clone 4.

A SEQ ID NO:8 é a sequência de nucleótidos de NY-ESO-1, anteriormente conhecido como LL-1.2 clone.

Os exemplos que se seguem mostram o isolamento de moléculas de ácido nucleico que codificam polipeptídeos e são expressas preferencialmente em amostras de tumores e linhas celulares derivadas de tumores. No entanto, estas moléculas de ácidos nucleicos isoladas não são homólogas de qualquer uma das sequências de codificação anteriormente descritas nas referências supracitadas. Assim, um aspecto da invenção é isolar moléculas de ácidos nucleicos que incluam toda ou uma porção única da sequência de nucleótidos constante da SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO:6. Estas sequências não são sequências MAGE, BAGE, GAGE, RAGE, LB33/MUM-1, PRAME, NAG, MAGE-Xp ou NY-ESO-1, tal como se verá comparando-as com a sequência de qualquer um dos genes descritos nas referências.

A invenção envolve ácidos nucleicos LAGE-1, polipeptídeos codificados por esses ácidos nucleicos, modificações funcionais e variantes deles, fragmentos úteis dos mesmos, bem como as suas utilizações em terapia e diagnóstico.

Também parte da invenção são as sequências de ácido nucleico que também codificam um polipeptídeo associado a tumor LAGE-1 e que hibridizam com uma molécula de ácido nucleico que consiste na sequência de nucleótidos estabelecida na SEQ ID NO:4 (LAGE-1b) ou SEQ ID NO:6 (LAGE-1a), em condições rigorosas, mas que não são moléculas de ácidos nucleicos que consistem na sequência de

nucleótidos estabelecida na SEQ ID NO:8 (NY-ESO-1). Os ácidos nucleicos LAGE-1 são caracterizados por ter pelo menos de 90% de identidade com exon 2 de LAGE-1. De preferência, a identidade de ácidos nucleicos com exon 2 de LAGE-1 é de pelo menos 95% e mais preferivelmente pelo menos 99%. Os seus complementos também estão abarcados pela invenção.

Outros critérios para estabelecer que um ácido nucleico é parte da família LAGE-1 estão representados na Fig.1. Por exemplo, para além da sequência de nucleótidos da região de codificação do gene LAGE-1 e seus produtos de expressão, o comprimento e a composição de intrões presentes no gene LAGE-1 podem ser usados para estabelecer a relação de um ácido nucleico com LAGE-1. As sequências a montante e a jusante da região de codificação também são úteis para distinguir ácidos nucleicos LAGE-1 de ácidos nucleicos não-LAGE-1. O ponto isoeléctrico das proteínas codificadas ou fragmentos das proteínas codificadas também podem servir para distinguir características de ácidos nucleicos relacionados com LAGE-1.

Estes ácidos nucleicos são denominados precursores de polipeptídeos associados a tumores e podem ser ADN, ARN ou compostos por uma mistura deoxiribonucleótidos e ribonucleótidos. Os precursores de polipeptídeos associados a tumores também podem incorporar nucleótidos sintéticos não naturais. Um ácido nucleico ou polipeptídeo associado a tumores é um ácido nucleico ou polipeptídeo expresso preferencialmente em células de tumores. Conhecem-se vários métodos para determinar a expressão de um ácido nucleico e/ou um polipeptídeo em células normais e células de tumores e serão descritos mais em baixo. Tal como é aqui usado, polipeptídeos associados a tumores incluem proteínas, fragmentos de proteínas e peptídeos. Em particular, polipeptídeos associados a tumores incluem TRAPs e TRÁS.

O termo "condições rigorosas" tal como é aqui usado refere-se a parâmetros com os quais os técnicos estão familiarizados. Mais especificamente, condições rigorosas, tal como é aqui usado, referem-se à hibridização a 65°C em tampão de hibridização (3,5 x SSC, 0,02% Ficoll, 0,02% polivinilpirrolidona, 0,02% Albumina de soro bovino, 25mM NaH₂PO₄ (pH 7), 0,5% SDS, 2mM EDTA). SSC é 0,15M cloreto de sódio/0,15 M citrato de sódio, pH 7; SDS é dodecil sulfato de sódio; e EDTA é ácido etilenediaminetetracético. Após hibridização, a membrana em que o ácido nucleico é transferido é lavada a 2 x SSC à temperatura ambiente e depois a 0,1 x SSC/0,1 x SDS a 65°C. SSC é 0,15M cloreto de sódio/0,15 M citrato de sódio, pH 7; SDS é dodecil sulfato de sódio; e EDTA é ácido etilenediaminetetracético.

Há outras condições, reagentes, e assim por diante que podem ser usados, que resultam no mesmo grau de rigor (ver, por exemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, ou *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York). Os técnicos desta área estão familiarizados com essas condições, e assim não serão fornecidas aqui. Deve-se entender, no entanto, que o técnico desta área será capaz de manipular as condições de um modo que permita a identificação clara de homólogos e alelos de moléculas de ácido nucleico de LAGE-1 da invenção. O técnico desta área também está familiarizado com a metodologia para rastrear células, de preferência células cancerosas, e bibliotecas para expressão dessas moléculas que são depois rotineiramente isoladas, seguida do isolamento dos ácidos nucleicos pertinentes e sequenciação.

Os ácidos nucleicos aqui divulgados são úteis para determinar a expressão de LAGE-1, de acordo com procedimentos de hibridização

padronizados. Os ácidos nucleicos podem ser usados para exprimir polipeptídeos LAGE-1 *in vitro* ou *in vivo*. Os ácidos nucleicos podem para preparar fragmentos de polipeptídeos de LAGE-1 úteis, por exemplo, na preparação de anticorpos. Muitas outras utilizações serão evidentes para os técnicos desta área.

Ao rastrear membros da família LAGE-I pode-se fazer um Southern blot usando as anteriores condições, em conjunto com uma sonda radioactiva. De preferência, as hibridizações são feitas usando sondas com LAGE-I exon2 e/ou intrão 2, ou suas porções. Após a lavagem da membrana para a qual o ácido nucleico é finalmente transferido, a membrana pode ser colocada num filme de raios-x para detectar o sinal radioactivo.

A invenção também inclui ácidos nucleicos degenerados que incluem codões alternativos aos presentes nos materiais nativos. Por exemplo, resíduos de serina são codificados pelos codões TCA, AGT, TCC, TCG, TCT e AGC. Cada um dos seis codões é equivalente para o efeito de codificar um resíduo de serina. Assim, será evidente para os técnicos desta área que qualquer um dos conjuntos de três nucleótidos que codificam a serina pode ser usada para direccionar o aparelho de síntese de proteínas *in vitro* ou *in vivo*, de modo a incorporar um resíduo de serina. De igual modo, as sequências de três nucleótidos que codificam outros resíduos de aminoácidos incluem, mas não estão limitados a CCA, CCC, CCG e CCT (codões de prolina); CGA, CGC, CGG, CGT, AGA e AGG (codões de arginina); ACA, ACC, ACG e ACT (codões de treonina); AAC e AAT (codões de asparagina); e ATA, ATC e ATT (codões de isoleucina). Outros resíduos de aminoácidos podem ser codificados de igual modo por múltiplas sequências de nucleótidos. Assim, a invenção abarca os ácidos nucleicos degenerados que diferem dos ácidos nucleicos biologicamente isolados na sequência do codão devido à degeneração do código genético.

A invenção também fornece fragmentos únicos isolados da SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO:6, ou complementos da SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO:6. Um fragmento único é um que é a “assinatura” do ácido nucleico maior. Por exemplo, é suficientemente comprido para assegurar que a sua sequência exacta não é encontrada em moléculas fora da família LAGE-1 tal como definido na reivindicação 1. Em particular, um fragmento único de LAGE-1 é um que não hibridize em condições rigorosas com uma molécula de ácido nucleico com a sequência de nucleótidos da SEQ ID NO:8. Os fragmentos únicos podem ser usados como sondas em ensaios de Southern blot para identificar membros da família ou podem ser usados para ensaios de amplificação como os que usam PCR. Tal como é do conhecimento dos técnicos desta área, sondas grandes como com 200 nucleótidos ou mais (por exemplo, 200, 250, 300, 400, 500 nucleótidos) são preferidas para certas utilizações como Southern blots, enquanto que fragmentos mais pequenos serão preferidos para utilizações como PCR. Os fragmentos únicos também podem ser usados para produzir proteínas de fusão para gerar anticorpos ou para gerar componentes de imunoensaios. Os fragmentos únicos também podem ser usados como moléculas antisense para inibir a expressão das proteínas LAGE-1 da invenção, em particular com fins terapêuticos, tal como descrito com maior detalhe em baixo.

Tal como será reconhecido pelos técnicos desta área, o tamanho do fragmento único dependerá da sua conservação do código genético. Assim, algumas regiões da SEQ ID NO:4 ou da SEQ ID NO:6, e seus complementos, precisarão de segmentos maiores para serem únicos enquanto que outros precisarão de segmentos mais curtos, normalmente entre 12 e 32 nucleótidos (por exemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 e 32 nucleótidos de comprimento). Virtualmente qualquer segmento de da SEQ ID NO:4 ou da SEQ ID NO:6, ou dos seus complementos, ou seja 18 ou mais nucleótidos de comprimento será único. Fragmentos únicos

de LAGE-1, no entanto, excluem fragmentos completamente compostos pela sequência da SEQ ID NO:8 (que codifica o polipeptídeo NY-ESO-) que se sobrepõe à SEQ ID NO:4 ou à SEQ ID NO:6. Um fragmento que é completamente composto pela sequência da SEQ ID NO:8 é um que não inclui qualquer um dos nucleótidos únicos de LAGE-1. Em certas formas de realização, os fragmentos únicos de LAGE-1 incluem pelo menos 5 nucleótidos contíguos que não estão presentes na SEQ ID NO:8 (por exemplo, que estão presentes na SEQ ID NO:4 ou na SEQ ID NO:6); fragmentos únicos preferidos são os que têm 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, ou mais nucleótidos que não estão presentes na SEQ ID NO:8. Assim, uma molécula que consiste num fragmento da SEQ ID NO:8 com 4 nucleótidos da SEQ ID NO:4 ou da SEQ ID NO:6 adicionado na extremidade 5' ou 3' não é um fragmento único. Os técnicos desta área são conhecedores de métodos para seleccionar sequências, normalmente com base na capacidade do fragmento único distinguir selectivamente a sequência de interesse de membros que não são da família. Uma comparação da sequência do fragmento LAGE-1 com a sequência de ácidos nucleicos NY-ESO-1 e com outras sequências depositadas em bases de dados conhecidas é normalmente o suficiente, apesar de se poder fazer a hibridização de confirmação e análise de sequência *in vitro*.

Para qualquer par de primers PCR construídos e arrançados para amplificar selectivamente, por exemplo, um ácido nucleico LAGE-1, pode-se usar um primer específico LAGE-1. Tal primer é uma extensão contígua de LAGE-1 que hibridiza selectivamente com LAGE-1 e não com outros ácidos nucleicos. Tal primer específico irá hibridizar completamente com uma extensão contígua de nucleótidos apenas em LAGE-1, mas hibridiza no máximo apenas em parte com genes que não partilham os nucleótidos com os quais o primer específico LAGE-1 se liga. Para um PCR e identificação LAGE-1 eficiente, o primer específico LAGE-1 deve ser construído e arrançado de modo a não hibridizar eficientemente na terminação 3' com genes que não sejam

LAGE-I. A cinética de hibridização irá então favorecer fortemente a hibridização na terminação 5'. Nesse caso, a extensão PCR iniciada em 3' irá ocorrer apenas quando ambas as terminação 3' e 5' hibridizem com o ácido nucleico. Os primers para a amplificação selectiva do LAGE-1 clone 2 e/ou LAGE-1 clone 4 podem ser seleccionados de porções de LAGE-1 que partilhem menos homologia com NY-ESO-1 (ver Fig.1; comparar SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:8). Nesses casos, os primers específicos LAGE-1 podem ser concebidos para dirigir a síntese de ADN em qualquer das cadeias do gene LAGE-1, aqui descrito como cadeia antisense ou sense. De preferência, a área de não-identidade tem pelo menos um a quatro nucleótidos de comprimento e forma a terminação 3' do primer específico LAGE-1. Tal primer seria completamente complementar e contíguo com o seu complemento em LAGE-1. A terminação 3' do primer iria hibridizar com o seu complemento na cadeia antisense e iniciar a extensão. Em genes que não LAGE-1, a falta de identidade da sequência de nucleótidos irá substancialmente eliminar a hibridização da terminação 3' do primer específico LAGE-1 à cadeia antisense 5' do enxerto. A dissonância gerada na terminação 3' do primer quando hibridizado com genes que não LAGE-1 irá evitar uma amplificação eficiente desses genes. Primers exemplificativos incluem BLE72 (SEQ ID NO: 12) que abarca os nucleótidos 265-283 da SEQ ID NO :6. Os técnicos desta área podem preparar outros primers que contenham sequências de nucleótidos que não se encontrem em NY-ESO-1, por comparação das sequências da SEQ ID NO:4 ou da SEQ ID NO:6 com a SEQ ID NO:8. Porções da SEQ ID NO:6 idênticas à SEQ ID NO:4 servem igualmente bem como primers específicos LAGE-1. Outros exemplos de primers podem diferir dos acima citados pela adição ou deleção de 1, 2, 3, 4, 5, ou mais nucleótidos da terminação 5' do primer.

De igual modo, um técnico desta área pode seleccionar primers da sequência de nucleótidos da SEQ ID NO:8 para amplificação

selectiva de sequências de ARNm NY-ESQ-1. Por exemplo, primers específicos exemplificativos para NY-ESO-1 incluem BLE73 (SEQ ID NO:13), e BLE74 (SEQ ID NO:14) que é um primer sense localizado na SEQ ID NO:8 nos nucleótidos 262-281 (homólogos da posição BLE72 na SEQ ID NO:6, por exemplo, nucleótidos 264-283). Tal como demonstrado nos Exemplos em baixo, os pares primer específicos de LAGE-1 ou NY-ESO-1 podem ser usados para distinguir a expressão dos genes em células e tecidos. Outros primers exemplificativos podem diferir dos acima mencionados pela adição ou deleção de 1, 2, 3, 4, 5, ou mais nucleótidos da extremidade 5' dos primers acima mencionados. Os técnicos desta área podem determinar com apenas experimentação rotineira dos primers preferidos para amplificação selectiva de clones de LAGE-1 particulares.

Em certos casos, os primers escolhidos para distinguir clones LAGE-1 providenciam produtos amplificados que são facilmente distinguíveis pelo tamanho molecular. Por exemplo, podem-se escolher primers LAGE-1 que iniciem a extensão em lados opostos do local de junção ('splice site') pela hibridização com sequências que são idênticas ou quase e que hibridizam 5' do lado 5' do local de junção e 3' do lado 3' do local de junção. Como o mRNA LAGE-1 clone 2 contém uma porção do gene que é junto ('spliced') na formação de mRNA LAGE-1 clone 4 (ver Fig. 1; isto é, nucleótidos 469-697 da SEQ ID NO:4), os produtos de amplificação derivados do LAGE-1 clone 2 usando esses primers serão maiores do que os produtos de amplificação derivados do LAGE-1 clone 4 (por cerca de 229 pares de bases). Esta diferença pode ser facilmente distinguível usando métodos padrão na arte incluindo electroforese de gel de agarose e acrilamida.

Métodos adicionais que podem distinguir que podem distinguir sequências de nucleótidos com homologia substancial como a reacção

em cadeia da ligase ("LCR") e outros métodos serão evidentes para os técnicos dessa área.

Tal como é aqui usado em relação aos ácidos nucleicos, o termo "isolado" significa: (i) amplificado *in vitro* por, por exemplo, reacção em cadeia da polimerase (PCR); (ii) recombinante produzido por clonagem; (iii) purificado, por clivagem e separação por gel; ou (iv) sintetizado por, por exemplo, síntese química. Um ácido nucleico isolado é um que é facilmente manipulável por técnicas de ADN bem conhecidas na área. Assim, uma sequência de nucleótidos contida num vector em que os locais de restrição 5' e 3' são bem conhecidos ou para os quais as sequências primer da reacção em cadeia da polimerase (PCR) foram divulgadas é considerada como isolada mas uma sequência de ácidos nucleicos que exista no seu estado nativo não é. Um ácido nucleico isolado pode ser substancialmente purificado, mas não precisa de o ser. Por exemplo, um ácido nucleico dentro de um vector de clonagem ou expressão não é puro pois pode conter apenas uma pequena percentagem do material da célula em que reside. No entanto, tal ácido nucleico é isolado, tal como o termo é aqui usado, porque é facilmente manipulável por técnicas padrão conhecidas pelos técnicos desta área.

A invenção também fornece polipeptídeos isolados que incluem fragmentos únicos da SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:7. Tais polipeptídeos são úteis, por exemplo, sozinhos ou em proteínas de fusão para gerar anticorpos, como componentes de um ensaio imunológico, ou para determinar a especificidade de ligação à proteína LAGE-1 de moléculas HLA e/ou clones CTL. O termo "isolado" tal como é aqui usado em referência a um polipeptídeo, significa um polipeptídeo codificado por uma sequência de ácido nucleico isolado, bem como polipeptídeos sintetizados por, por exemplo, métodos de síntese química e polipeptídeos separados de materiais biológicos, e depois purificados usando procedimentos convencionais de preparação ou de

análise de proteínas. Assim, as proteínas LAGE-1 incluem polipeptídeos com os aminoácidos 89-93 da SEQ ID NO:5 ou 7. As formas de realização preferidas de tais polipeptídeos incluem polipeptídeos LAGE-1 que incluem os aminoácidos 71-93, 71-98, 89-98, 89-111, ou 71-111 da SEQ ID NO:5 ou 7. As sequências de aminoácidos anteriores não se encontram na proteína NY-ESO-1. Os ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos anteriores também estão englobados na invenção. Também são fornecidos os polipeptídeos LAGE-1b que incluem aminoácidos codificados intrão 2 alternativamente junto de LAGE-1. Estes polipeptídeos em certas formas de realização contêm os aminoácidos 142-148 da SEQ ID NO:5, os aminoácidos 187-205 da SEQ ID NO:5, ou os aminoácidos 164-179 da SEQ ID NO:5. De preferência, tais polipeptídeos incluem os aminoácidos 134-210 da SEQ ID NO:5. Estas sequências de aminoácidos não se encontram nas proteínas NY-ESO-1 ou LAGE-1a. Os ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos LAGE-1b também estão englobados na invenção. De preferência, uma proteína LAGE-1 é pelo menos 90%, mais preferivelmente 95%, e mais preferivelmente 99% idêntica à sequência de aminoácidos estabelecida quer SEQ ID NO:5 quer SEQ ID NO:7.

Um fragmento único de uma proteína LAGE-1, em geral, tem as características e funcionalidades de fragmentos únicos como os discutidos em cima em ligação com ácidos nucleicos. Assim, um fragmento de proteína que consista apenas numa porção da SEQ ID NO:9 não é um fragmento único de LAGE-1. Com será reconhecido pelos técnicos desta área, o tamanho do fragmento único irá depender de factores como se o fragmento constitui uma porção de domínio conservado de proteína. Assim, algumas regiões das SEQ ID NO:5 e SEQ ID NO:7, necessitarão de segmentos mais compridos para serem únicos enquanto que outros requerem apenas segmentos curtos, normalmente entre 5 a 12 aminoácidos (por exemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 aminoácidos de comprimento). Virtualmente, qualquer

segmento das SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:7 que exclua a SEQ ID NO:9, que tenha 10 ou mais aminoácidos de comprimento será único. De preferência, os fragmentos únicos de LAGE-1 incluem pelo menos 2, mais preferivelmente 3 e ainda mais preferivelmente 5 aminoácidos contíguos que não estejam presentes na SEQ ID NO:9 (por exemplo, que estejam presentes na SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:7).

Fragmentos únicos de um polipeptídeos são os fragmentos que retenham uma capacidade funcional distinta do polipeptídeo. As capacidades funcionais que podem ser retidas num fragmento único de um polipeptídeo incluem interacção com anticorpos, interacção com outros polipeptídeos ou seus fragmentos, ligação selectiva de ácidos nucleicos e actividade enzimática. Um antígeno de rejeição de tumor é um exemplo de um fragmento único de um polipeptídeo associado a tumores que retém a capacidade funcional de ligação a HLA e interacção com linfócitos T citotóxicos. Os antígenos de rejeição de tumor apresentados pelas moléculas HLA classe I normalmente têm 9 aminoácidos de comprimento apesar dos peptídeos de 8, 9 e 10 e mais aminoácidos também reterem a capacidade de interagir com HLA e linfócitos T citotóxicos de um modo efectivo provocando uma resposta dos linfócitos T citotóxicos (ver, por exemplo, Van den Eynde & Brichard, *Curr. Opin. Immunol.* 7:674-681, 1995; Coulie et al., *Stem Cells* 13:393-403, 1995).

Os técnicos desta área são conhecedores de métodos para seleccionar sequências únicas de aminoácidos, normalmente com base na capacidade do fragmento único de distinguir selectivamente a sequência de interesse dos polipeptídeos que não são da família LAGE-1, em particular NY-ESO-1. Uma comparação da sequência do fragmento com os das bases de dados conhecidas é normalmente suficiente. Certos aspectos funcionais dos fragmentos dos polipeptídeos LAGE-1 podem ser determinados usando algoritmos de computador para comparar fragmentos LAGE-1 com fragmentos de outros

polipeptídeos. Por exemplo, pode-se usar um algoritmo de ligação ao peptídeo HLA (disponível no National Institutes of Health website [<http://bimas.dcrt.nih.gov>]; Parker et al., *J. Immunol.* 152:163,1994) para distinguir as propriedades de ligação a HLA de peptídeos de LAGE-1 das dos peptídeos NY-ESO-1. Por exemplo, prevê-se que a pontuação de ligação de HLA-B7 (meio tempo de dissociação) de um peptídeo LAGE-1 contendo os aminoácidos 114-123 da SEQ ID NO:7 seja 30 vezes maior que a de um peptídeo NY-ESO-1 com os correspondentes aminoácidos (114-123) da SEQ ID NO:9.

Os técnicos desta área também notarão que as substituições de aminoácidos conservativos podem ser feitas em polipeptídeos LAGE-1 para fornecer homólogos funcionalmente activos dos polipeptídeos anteriores, isto é, os homólogos retêm as capacidades funcionais dos polipeptídeos LAGE-1. Tal como é aqui usado, uma "substituição conservativo de aminoácidos" refere-se a uma substituição de aminoácidos que não altera a carga relativa ou as características de tamanho da proteína em que a substituição de aminoácidos é feita. As substituições conservativas de aminoácidos incluem substituições feitas entre aminoácidos dentro dos seguintes grupos (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; e (g) E, D.

As variantes funcionalmente equivalentes de polipeptídeos LAGE-1, isto é, variantes de polipeptídeos de LAGE-1 que retêm a função dos polipeptídeos LAGE-1 naturais, podem ser preparadas de acordo com métodos para alterar sequências de polipeptídeos conhecidos pelos técnicos desta área como os que se encontram nas referências que compilam estes métodos, por exemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, ou *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Exemplos de variantes

funcionalmente equivalentes de polipeptídeos LAGE-1 incluem substituições conservativas de aminoácidos da SEQ ID NO:5 e da SEQ ID NO:7. As substituições conservativas de aminoácidos na sequência de aminoácidos de polipeptídeos LAGE-1 para produzir variantes funcionalmente equivalentes de polipeptídeos LAGE-1 são normalmente feitas pela alteração do ácido nucleico que codifica os polipeptídeos LAGE-1 (SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6). Tais substituições podem ser feitas por uma variedade de métodos conhecidos dos técnicos desta área. Por exemplo substituições de aminoácidos podem ser feitas por mutação dirigida por PCR, mutagénesis direccionada para o local de acordo com o método de Kunkel (Kunkel, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 488-492, 1985), ou por síntese química de um gene que codifica um polipeptídeo LAGE-1. Quando as substituições de aminoácidos são feitas num fragmento único pequeno de um polipeptídeo LAGE-1, como um peptídeo de 9 aminoácidos, as substituições podem ser feitas pela síntese directa do peptídeo. A actividade de fragmentos funcionalmente equivalentes de polipeptídeos LAGE-1 pode ser testada clonando o gene que codifica o polipeptídeo LAGE-1 alterado num vector de expressão bacteriano ou de mamífero, introduzindo o vector numa célula hospedeira apropriada, que expresse o polipeptídeo LAGE-1, e testando a capacidade funcional dos polipeptídeos LAGE-1 aqui divulgados.

Tal como foi mencionado, a invenção abarca oligonucleótidos antisense que se ligam selectivamente a uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína LAGE-1, para diminuir a transcrição e/ou a tradução de genes LAGE-1. Isto é desejável em virtualmente qualquer condição médica em que seja desejável a redução da expressão do produto do gene de LAGE-1, incluindo para reduzir qualquer aspecto dum fenótipo de célula de tumor atribuível à expressão do gene de gene LAGE-1. Deste modo, as moléculas antisense podem ser usadas para diminuir ou parar estes aspectos do fenótipo de células de tumor. Tal como é aqui usado, o termo

“oligonucleótido antisense” ou “antisense” descreve um oligonucleótido que é um oligoribonucleótido, um oligodeoxiribonucleótido, um oligoribonucleótido modificado, ou um oligodeoxiribonucleótido modificado que hibridiza em condições fisiológicas com o ADN que contém um gene particular ou com uma transcrição de ARNm desse gene e, assim, inibe a transcrição desse gene e/ou a tradução desse ARNm. As moléculas antisense são assim designadas por interferirem com a transcrição ou tradução de um gene alvo durante a hibridização com o gene alvo. Os técnicos desta área reconhecerão que o comprimento exacto do oligonucleótido antisense e o seu grau de complementaridade com o seu alvo depende do alvo específico seleccionado, incluindo a sequência do alvo e das bases particulares que constituem essa sequência. É preferível que o oligonucleótido antisense seja construído e arranjado de modo a se ligar selectivamente com o alvo em condições fisiológicas, isto é, hibridizam substancialmente mais com a sequência alvo do que com qualquer outra sequência da célula alvo em condições fisiológicas. Com base na SEQ ID NO:4 e/ou SEQ ID NO:6, ou sequências genómicas alélicas ou homólogas e/ou de ADN, um técnico desta área pode facilmente escolher e sintetizar qualquer uma molécula antisense apropriada para ser usada de acordo com a presente invenção. De modo a ser suficientemente e potente para inibição, estes oligonucleótidos podem conter pelo menos 7 (Wagner et al., *Nature Biotechnology* 14:840-844, 1996) e, mais preferivelmente, pelo menos 15 bases consecutivas que são complementares do alvo. Mais preferivelmente, os oligonucleótidos antisense contêm uma sequência complementar de 20-30 bases. Apesar de se poder escolher os oligonucleótidos que sejam antisense de qualquer região do gene ou da transcrição de ARNm, nas formas de realização preferidas, os oligonucleótidos antisense correspondem a sítios do terminal-N ou a montante de 5' tais como iniciação da tradução, iniciação da transcrição ou sítios promotores. Para além disso, as regiões não traduzidas 3' podem ser marcadas como alvo. A

marcação como alvo de sítios de união de ARNm também tem sido usada mas é menos preferida se ocorrer união alternativa de ARNm. Para além disso, o antisense é marcado como alvo, de preferência, em sítios em que não se espere uma estrutura secundária do ARNm (ver, por exemplo, Sainio et al., *Cell Mol. Neurobiol.* 14(5):439-457,1994) e aos quais não se espera que as proteínas se liguem. Por fim, apesar das SEQ ID NOs:4 e 6 divulgarem sequências de cADN, um técnico desta área pode facilmente derivar o ADN genómico correspondente aos cADNs das SEQ ID NOs:4 e 6. Assim, a presente invenção também providencia oligonucleótidos antisense que são complementares do ADN genómico correspondente às SEQ ID Nos:4 e 6. De igual modo, antisense de ADNs alélicos ou homólogos e ADNs genómicos são permitidos sem sofrer experimentação.

Num conjunto de formas de realização, os oligonucleótidos da invenção podem ser compostos de deoxiribonucleótidos, ribonucleótidos "naturais", ou qualquer combinação deles. Isto é, a terminação 5' do nucleótido nativo e a extremidade 3' de outro nucleótido nativo podem ser ligados covalentemente, tal como nos sistemas naturais, via ligação internucleósido fosfodiéster. Estes oligonucleótidos podem ser preparados por métodos reconhecidos que podem ser levados a cabo manualmente ou por um sintetizador automático. Também podem ser produzidos recombinantemente por vectores.

No entanto, nas formas de realização preferidas, os oligonucleótidos antisense da invenção também podem incluir oligonucleótidos "modificados". Isto é, os oligonucleótidos podem ser modificados de várias maneiras que não evitam que hibridizem com os seus alvos mas que potenciam a sua estabilidade ou a sua ligação ao alvo ou que de outra forma melhorem a sua eficácia terapêutica.

O termo "oligonucleótido modificado", tal como é aqui usado, descreve um oligonucleótido em que (1) pelo menos dois dos seus nucleótidos são covalentemente ligados via ligação internucleosídica sintética are (isto é., uma ligação que não seja uma ligação fosfodiéster entre a terminação 5' de um nucleótido e a terminação 3' de outro nucleótido) e/ou (2) um grupo químico não normalmente associado com ácidos nucleicos foi covalentemente ligado ao oligonucleótido. As ligações internucleosídicas sintéticas preferidas fosforotioatos, alquilfosfonatos, fosforoditioatos, ésteres de fosfato, alquilfosfonotioatos, fosforamidatos, carbamatos, carbonatos, triésteres de fosfato, acetamidatos, peptídeos, e ésteres de carboximetilo.

O termo "oligonucleótido modificado" também engloba oligonucleótidos com uma base e/ou açúcar covalentemente modificada. Por exemplo, oligonucleótidos modificados incluem oligonucleótidos com a estrutura de açúcares que são covalentemente ligados a grupos orgânicos de baixo peso molecular que não sejam um grupo hidroxilo na posição 3' e que não seja um grupo fosfato na posição 5'. Os oligonucleótidos assim modificados podem incluir um grupo ribose 2'-O-alquilado. Para além disso, os oligonucleótidos modificados podem incluir açúcares como a arabinose em vez de ribose. Os oligonucleótidos modificados também podem incluir análogos de bases como bases C-5 propina modificadas (Wagner et al., *Nature Biotechnology* 14:840- 844, 1996). Assim, a presente invenção, contempla preparações farmacêuticas contendo moléculas antisense modificadas que são complementares e hibridizam, em condições fisiológicas, com ácidos nucleicos que codificam proteínas LAGE-1, em conjunto com veículos farmacêuticamente aceitáveis.

Os oligonucleótidos antisense podem ser administrados como parte de uma composição farmacêutica. Tal composição farmacêutica

pode incluir oligonucleótidos antisense em combinação com quaisquer veículos padrão fisiologicamente e/ou farmacologicamente aceitáveis que são conhecidos neste meio. As composições devem ser estéreis e conter uma quantidade terapeuticamente eficaz de oligonucleótidos antisense numa unidade de peso ou volume apropriada à administração a um paciente. O termo "farmacologicamente aceitável" significa um material não-tóxico que não interfira com a eficácia da actividade biológica dos ingredientes activos. O termo "fisiologicamente aceitável" refere-se a um material não-tóxico que seja compatível com um sistema biológico como uma célula, cultura de células, tecido ou organismo. As características do veículo irão depender da via de administração. Os veículos fisiologicamente e farmacologicamente aceitáveis incluem diluentes, agentes de enchimento, sais, tampões, estabilizadores, solubilizantes e outros materiais que são bem conhecidos neste meio.

Também se verá a partir dos exemplos, que a invenção abarca a utilização de sequências de LAGE-1 em vectores de expressão, bem como para transfectar células hospedeiras e linhas celulares, sejam estas procarióticas (por exemplo, *E. coli*), ou eucarióticas (por exemplo, células CHO, células COS, sistemas de expressão de leveduras e expressão de baculovírus recombinante em células de insecto). Especialmente úteis são células de mamíferos como ratos, hamster, porcos, cabras, primatas, etc. Pode haver uma grande variedade de tipos de tecidos, incluindo mastócitos, fibroblastos oócitos e linfócitos e podem células primárias ou linhas celulares. Exemplos específicos incluem células dendríticas, células U293, leucócitos sanguíneos periféricos, células estaminais da medula óssea e células estaminais embrionárias. Os vectores de expressão exigem que a sequência pertinente, isto é, os ácidos nucleicos acima descritas, sejam operativamente ligadas a um promotor. Como se crê que uma molécula HLA classe I humana apresente um antígeno de rejeição de tumor derivado destes genes, o vector de expressão

também pode incluir uma sequência de ácido nucleico que codifique a molécula de HLA que apresente qualquer antígeno de rejeição de tumor derivado destes genes e polipeptídeos. Alternativamente, a sequência de ácido nucleico que codifica essa molécula de HLA pode estar contida num vector de expressão separado. Numa situação em que o vector contém ambas as sequências de codificação, o vector simples pode ser usado para transfectar uma célula que normalmente não expresse nenhuma delas. Quando as sequências de codificação para o precursor do antígeno de rejeição do tumor e da molécula HLA que o apresente estão contidas em vectores de expressão separados, os vectores de expressão podem ser co-transfectados. A sequência de codificação do precursor do antígeno de rejeição do tumor pode ser usada sozinha quando, por exemplo, a célula hospedeira já expresse a molécula HLA que apresente uma LAGE-1 TRA. Claro que não há limitação na célula hospedeira particular que pode ser usada. Tal como os vectores que as duas sequências de codificação podem ser usados em quaisquer células que apresentem o antígeno se se desejar e o gene para o precursor do antígeno de rejeição do tumor pode ser usado em células hospedeiras que não expressem a molécula HLA que apresente um LAGE-1 TRA. Para além disso, sistemas de transcrição livres de células podem ser usadas em vez de células.

Os técnicos desta área podem determinar que molécula de HLA se ligam a antígenos de rejeição de tumor derivados de precursores de antígenos de rejeição de tumor LAGE-1 clone 2 e/ou LAGE-1 clone 4 por, por exemplo, experiências utilizando anticorpos para bloquear especificamente moléculas individuais de moléculas HLA classe I. Por exemplo, anticorpos que se liguem selectivamente a HLA-A2 evitam a apresentação eficiente de TRAs especificamente apresentadas por HLA-A2. Assim, se as TRAs derivadas de LAGE-1 são apresentadas por are HLA-A2, então a inclusão de anticorpos anti-HLA-A2 num ensaio *in vitro* irá bloquear a apresentação de LAGE-I

TRA. Um ensaio para determinar a natureza da molécula de HLA pode ser encontrado no pedido de patente estadunidense 08/530,569. Resumidamente, na determinação do tipo de molécula HLA, fizeram-se experiências de inibição em que a produção de factor de necrose do tumor (TNF) pelo clone 263/17 de linfócitos T citotóxicos (CTL) foi testada na presença de anticorpos monoclonais dirigidos contra moléculas HLA ou contra moléculas acessórias CD4/CD8. Encontraram-se quatro anticorpos monoclonais que inibem a produção de TNF pelo CTL 263/17: anticorpo monoclonal W6/32, que é dirigido contra todas as moléculas HLA classe I (Parham et al., *J. Immunol.* 123:342, 1979), anticorpo B 1.23.2 que reconhece as moléculas HLA-B e C (Rebai et al., *Tissue Antigens* 22:107, 1983), anticorpo ME-1 que reconhece especificamente HLA-B7 (Ellis et al., *Hum. Immunol.* 5:49, 1982) e o anticorpo B9.4.1 contra CD8. Não se encontrou inibição com anticorpos dirigidos contra moléculas HLA Classe II DR (L243: Lampson et al., *J. Immunol.* 125:293, 1980), contra HLA-A3 (GAPA 3: Berger et al., *Hybridoma* 1 :87, 1982) nem contra CD4 (13B.8.82). A conclusão foi que CTL 263/17 era do tipo CD8, e reconheceu um antigénio apresentado por HLA-B7. Podem-se fazer experiências similares, usando anticorpos anti-HLA largamente disponíveis para determinar a natureza de uma molécula HLA.

Tal como é aqui usado, um "vector" pode ser qualquer um de numerosos ácidos nucleicos em que possa inserir a sequência desejada por restrição e ligação para transporte entre diferentes ambientes genéticos ou para expressão numa célula hospedeira. Os vectores são normalmente compostos por ADN apesar de também estarem disponíveis vectores ARN. Os vectores incluem, mas não estão limitados a, plasmídeos e fagos. Um vector de clonagem é um que seja capaz de se replicar numa célula hospedeira e que também é caracterizado por um ou mais locais de restrição de endonuclease nos quais o vector pode ser cortado de uma determinada maneira e nos quais uma sequência de ADN desejada pode ser ligada de modo que

o novo vector recombinante retenha a sua capacidade de se replicar na célula hospedeira. No caso de plasmídeos, a replicação da sequência desejada pode ocorrer muitas vezes à medida que o plasmídeo aumenta em número de cópias dentro da bactéria hospedeira ou apenas uma vez por hospedeiro antes do hospedeiro se reproduzir por mitose. No caso de fagos, a replicação pode ocorrer activamente durante a fase lítica ou passivamente durante a fase lisogénica. Um vector de expressão é um em que a desejada sequência de ADN pode ser inserida por restrição de ligação de tal modo que é operativamente junta às sequências reguladoras e pode ser expressa como transcrição de ARN. Os vectores também podem uma ou mais sequências marcadoras apropriadas para serem usadas na identificação de células que foram ou não transformadas ou transfectadas com o vector. Os marcadores incluem, por exemplo, genes que codificam proteínas que aumentam ou diminuem quer a resistência quer a sensibilidade a antibióticos ou a outros compostos, genes que codificam enzimas cujas actividades são detectáveis por ensaios padrão conhecidos no meio (por exemplo, B-galactosidase ou fosfatase alcalina), e genes cuja visibilidade afecte o fenótipo de células, hospedeiros, colónias ou placas transformadas ou transfectadas. Os vectores preferidos são os que são capazes de replicação autónoma e expressão de produtos de genes estruturais presentes nos segmentos de ADN aos quais foram operativamente ligados.

Tal como é aqui usado, diz-se que uma sequência de codificação e sequências reguladoras estão “operativamente” ligadas quando estão covalentemente ligadas de modo a colocar a expressão ou transcrição da sequência de codificação sob a influência ou controlo das sequências reguladoras. Se se desejar que as sequências de codificação sejam traduzidas uma proteína funcional, duas sequências de ADN são operativamente juntas se a indução de um promotor nas sequências reguladoras 5' resulte na transcrição da

sequência de codificação e se a natureza da ligação entre as duas sequências de ADN não (1) resulte na introdução de uma mutação de mudança de estrutura, (2) interfira com a capacidade da região promotora dirigir a transcrição das sequências de codificação, ou (3) interfira com a capacidade da correspondente transcrição de ARN ser traduzida numa proteína. Assim, a região promotora seria operativamente ligada a uma sequência de codificação se a região promotora fosse capaz de efectuar a transcrição da sequência de ADN de modo que a transcrição resultante pudesse ser traduzida na proteína ou polipeptídeo desejado.

A exacta natureza das sequências reguladoras necessárias para a expressão do gene pode variar entre espécies ou tipos de células, mas deverá incluir, à medida do necessário, sequências 5' não-transcricoras e 5' non-tradutoras envolvidas com a iniciação da transcrição e tradução, respectivamente, como uma caixa TATA, uma sequência 'capping', sequência CAAT, e outras que tais. Em especial, estas sequências reguladoras 5' não-transcricoras incluem uma região promotora que inclui uma sequência promotora para o controlo transcripcional do gene operativamente junto. As sequências reguladoras também podem incluir sequências potenciadoras ou sequências activadoras a montante, como se desejar. Os vectores da invenção podem opcionalmente incluir sequências líder 5' ou sinal, 5' ou 3'. A escolha e concepção de um vector apropriado estão dentro das capacidades e discernimento de um técnico desta área.

Os vectores de expressão contendo todos os elementos necessários para a expressão estão comercialmente disponíveis e são conhecidos pelos técnicos desta área. Ver *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al, eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. As células são geneticamente modificadas pela introdução nas

células de ADN heterólogo (ARN) que codifica o polipeptídeo ou fragmento ou variante associado a tumor LAGE-1. Esse ADN heterólogo (ARN) é colocado sob controlo operativo de elementos de transcrição para permitir a expressão do ADN heterólogo na célula hospedeira.

Os sistemas preferidos para a expressão de ARNm em células de mamíferos são os que são como pRc/CMV (disponível na Invitrogen, San Diego, CA) que contém um marcador seleccionável como um gene que confere resistência a G418 (que facilita a selecção de linhas celulares estavelmente transfectadas) e as sequências potenciadoras- promotoras do citomegalovírus humano (CMV). Para além disso, apropriado para expressão em linhas celulares de primatas ou caninas é o vector pCEP4 (Invitrogen), que contém uma origem de replicação do vírus Epstein Barr (EBV), o que facilita a manutenção do plasmídeo como elemento extracromossómico multicópia. Outro vector de expressão é o plasmídeo pEF-BOS contendo o promotor do polipeptídeo Elongation Factor 1 α , que estimula eficientemente a transcrição *in vitro*. O plasmídeo está descrito por Mishizuma e Nagata (*Nuc. Acids Res.* 30 18:5322, 1990), e a sua utilização para experiências de transfecção está descrita por, por exemplo, Demoulin (*Mol. Cell. Biol.* 16:4710-4716, 1996). Ainda outro vector de expressão preferido é um adenovírus, descrito por Stratford-Perricaudet, que é defeituoso (insuficiente) para as proteínas E1 e E3 (*J. Clin. Invest.* 90:626-630, 1992). A utilização do adenovirus como um recombinante Adeno.PIA foi divulgada por Warnier et al., na injeção intradérmica em ratos para imunização contra PIA (*Int. J. Cancer*, 67:303-310, 1996).

A invenção também abarca os chamados kits de expressão, que permitem que o técnico prepare o vector ou vectores de expressão desejados. Tais kits de expressão incluem pelo menos porções separadas de cada uma das sequências de codificação previamente discutidas. Podem-se adicionar outros componentes, se se desejar,

desde que as sequências anteriormente mencionadas, que são necessárias, estejam incluídas. A invenção também envolve agentes que se ligam aos polipeptídeos LAGE-1 e em certas formas de realização, de preferência, a fragmentos únicos de polipeptídeos LAGE-1. Estes parceiros de ligação podem ser usados em testes de detecção para detectar a presença ou a ausência de polipeptídeos LAGE-1 e em protocolos de purificação para isolar polipeptídeos LAGE-1. de igual modo, estes parceiros de ligação podem ser usados para ter como alvo selectivo drogas, toxinas ou outras moléculas em células de tumor que apresentem polipeptídeos associados a tumor LAGE-1. Deste modo, as células de tumor que expressem polipeptídeos LAGE-1 podem ser tratadas com compostos citotóxicos.

A invenção, para esse fim, envolve anticorpos ou fragmentos de anticorpos com a capacidade de se ligar selectivamente a polipeptídeos LAGE-1, e de preferência a fragmentos únicos deles. Os anticorpos incluem anticorpos monoclonais e policlonais, preparados de acordo com a metodologia convencional.

De modo significativo, tal como é sabido, apenas uma pequena porção de uma molécula de anticorpo, o parátipo, está envolvido na ligação do anticorpo ao seu epítipo (ver, na generalidade, Clark, W.R. (1986) The Experimental Foundations of Modern Immunology Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 7th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford). As regiões pFc' e Fc, por exemplo, são efectoras da cascata complemento mas não estão envolvidas na ligação ao antigénio. Um anticorpo em que a região pFc' tenha sido enzimaticamente clivada, ou que tenha sido produzido sem a região pFc', designou um fragmento F(ab')₂, e retém ambos os locais de igual modo, um anticorpo em que a região Fc foi enzimaticamente clivada, ou que tenha sido produzido sem a Fc, designou um fragmento Fab, retém um dos locais de ligação ao antigénio de uma molécula de anticorpo intacta. Avançando, os

fragmentos Fab consistem numa cadeia leve de anticorpo ligada com uma ligação covalente e uma porção de uma cadeia pesada de anticorpo denominada Fd. Os fragmentos Fd são os maiores determinantes da especificidade do anticorpo (um único fragmento pode estar associado até dez diferentes cadeias leves sem alterar a especificidade do anticorpo) e os fragmentos Fd retêm a capacidade de ligação ao epítipo em isolamento.

Dentro da porção de ligação ao antigénio de um anticorpo, tal como é sabido, há regiões que determinam a complementaridade (CORs), que interagem directamente com o epítipo do antigénio e das regiões estruturais (FRs), que mantêm a estrutura terciária do parátipo (ver, na generalidade, Clark, 1986; Roitt, 1991). Em ambos os fragmentos de cadeias pesadas e na cadeia leve das imunoglobulinas IgG, há quatro regiões estruturais (FR1 a FR4) separadas respectivamente por três regiões determinantes da complementaridade (CDR1 a CDR3). As CDRs, e em particular as regiões CDR3, e mais particularmente a cadeia pesada CDR3, são grandemente responsáveis pela especificidade do anticorpo.

É do conhecimento geral que as regiões não-CDR de um anticorpo de mamífero pode ser substituído por regiões similares de anticorpos conspecíficos ou heterospecífico mantendo a especificidade epitópica do anticorpo original. Isto é mais claramente manifestado no desenvolvimento e utilização de anticorpos "humanizados" em que CDRs não-humanos são covalentemente ligados a regiões FR e/ou Fc/pFc' humanas para produzir um anticorpo funcional. Assim, por exemplo, a Publicação Internacional PCT Numero WO 92/04381 divulga que a produção e utilização de anticorpos de murídeo RSV humanizados em que pelo menos uma porção das regiões FR de murídeo foram substituídas por regiões FR de origem humana. Tais anticorpos, incluindo fragmentos de anticorpos

intactos com capacidade de ligação a antígenos, são frequentemente referidos como anticorpos "quiméricos".

Assim, como será evidente para os técnicos desta área, a presente invenção também providencia fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv e Fd; anticorpos quiméricos em que as regiões Fc e/ou FR e/ou CDR1 e/ou CDR2 e/ou cadeia leve de CDR3 foram substituídas por sequências homólogas humanas ou não-humanas; anticorpos de fragmentos F(ab')₂ quiméricos em que as regiões FR e/ou CDR1 e/ou CDR2 e/ou cadeia leve de CDR3 foram substituídas por sequências homólogas humanas ou não-humanas; anticorpos de fragmentos Fab quiméricos em que as regiões FR e/ou CDR1 e/ou CDR2 e/ou cadeia leve de CDR3 foram substituídas por sequências homólogas humanas ou não-humanas; e anticorpos de fragmentos Fd quiméricos em que as regiões FR e/ou CDR1 e/ou CDR2 foram substituídas por sequências homólogas humanas ou não-humanas. A presente invenção também inclui os chamados anticorpos de cadeia simples. Assim, a invenção envolve polipeptídeos de vários tamanhos e tipos que se ligam especificamente a polipeptídeos LAGE-1. Estes polipeptídeos também podem ser derivados de fontes que não de tecnologia de anticorpos. Por exemplo, esses agentes de ligação aos polipeptídeos podem ser fornecidos por bibliotecas de peptídeos que são facilmente preparados em solução, em formas imobilizadas ou na forma de bibliotecas de fagos. Bibliotecas combinatórias também podem ser sintetizadas por peptídeos contendo um ou mais aminoácidos. As bibliotecas também podem ser sintetizadas por partes de peptídeos e não-peptídeos sintéticos.

Os fagos podem ser particularmente eficazes na identificação de peptídeos de ligação úteis de acordo com a invenção. Resumidamente, prepara-se uma biblioteca de fagos (usando, por exemplo, fagos m13, fd, ou lambda), tendo enxertos de 4 a cerca de 80 resíduos de aminoácidos usando procedimentos convencionais. Os enxertos podem

representar uma selecção completamente degenerada ou tendenciosa. Pode-se seleccionar fagos com enxertos que se ligam a polipeptídeos LAGE-1. Este processo pode ser repetido em vários ciclos de re-selecção de fagos que se ligam a polipeptídeos LAGE-1. polypeptide. Séries repetidas levam ao enriquecimento de fagos com sequências particulares. A análise de sequência de ADN pode ser feita de modo a identificar as sequências dos polipeptídeos expressos. Pode-se determinar a porção linear mínima da sequência que se liga ao polipeptídeo LAGE-1. Pode-se repetir o procedimento usando uma biblioteca 'biased' contendo enxertos contendo partes ou toda a porção linear mínima mais um ou dois resíduos degenerados adicionais a montante ou a jusante. Assim, os polipeptídeos LAGE-1 da invenção podem ser usados para testar bibliotecas de peptídeos, incluindo bibliotecas de fagos, para identificar e seleccionar parceiros de ligação ao peptídeo dos polipeptídeos LAGE-1 da invenção. Tais moléculas podem ser usadas, tal como descrito, para ensaios de triagem, para ensaios de diagnóstico, para protocolos de purificação ou para marcar drogas, toxinas e/ou agentes de marcação (por exemplo, radioisótopos, moléculas fluorescentes, etc.) em células que apresentem polipeptídeos LAGE-1 na superfície celular. Tais moléculas de agentes de ligação podem ser preparados para se ligarem a complexos de um polipeptídeo LAGE-1 com uma molécula HLA seleccionando o agente de ligação usando esses complexos. As moléculas de drogas que desactivam ou destroem as células de tumor que expressam esses complexos ou polipeptídeos LAGE-1 são conhecidos dos técnicos desta área e estão comercialmente disponíveis. Por exemplo, a área das imunotoxinas fornece exemplos de toxinas que são eficazes quando entregues a uma célula por um anticorpo ou seu fragmento. Exemplos de toxinas incluem toxinas que danificam os ribossomas derivadas de plantas ou bactérias como a ricina, abrina, saporina, endotoxina de *Pseudomonas*, toxina da difteria, toxinas de cadeia A, ricina bloqueada, etc.

A invenção, tal como aqui descrita tem várias utilizações, algumas das quais estão aqui descritos. Em primeiro lugar, a invenção permite ao técnico diagnosticar um distúrbio caracterizado pela expressão de TRAP. Estes métodos envolvem a determinação da expressão do gene TRAP, e/ou TRAs dele derivados. Na situação anterior, tais determinações podem ser feitas por qualquer teste padrão de determinação de ácidos nucleicos, incluindo a reacção em cadeia da polimerase (PCR) tal como exemplificado nos exemplos em baixo, ou testando com sondas de hibridização marcadas.

O isolamento do gene TRAP também torna possível o isolamento da própria molécula TRAP, em especial moléculas TRAP que contêm as sequências de aminoácidos codificadas pelas SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO:6. Pode-se usar uma variedade de metodologias bem conhecidas pelos técnicos desta área para obter moléculas TRAP isoladas. A proteína pode ser purificada de células que produzem naturalmente a proteína. Em alternativa, pode-se introduzir um vector de expressão em células para provocar a produção. Noutro método, podem-se microinjectar transcrições de ARNm ou introduzi-las de outra forma em células para provocar a produção da proteína codificada. A tradução de ARNm em extractos livres de células como o sistema de lisado reticulócito também pode ser usada para produzir a proteína. Os técnicos desta área podem facilmente seguir métodos conhecidos para isolar proteínas de modo a obter TRAPs isoladas. Estes métodos incluem, mas não estão limitados a, imunocromatografia, HPLC, cromatografia de exclusão por tamanho, cromatografia de troca iónica e cromatografia de imuno-afinidade.

Estas moléculas isoladas, quando processadas e apresentadas como TRA, ou como complexos de TRA e HLA, como HLA-AI, HLA-A2, ou HLA-B7, podem ser combinadas com materiais como adjuvantes para produzir vacinas úteis no tratamento de distúrbios caracterizados pela expressão da molécula TRAP. Para além dos peptídeos LAGE-1,

podem-se usar ácidos nucleicos que codificam os epítomos de peptídeos LAGE para preparar vacinas. A preparação de ácidos nucleicos e/ou peptídeos para utilização em vacinas é bem conhecida no meio. Quando se utiliza “distúrbio”, referimo-nos a qualquer condição patológica em que é expresso o precursor do antigénio de rejeição do tumor. Um exemplo de tal distúrbio é o cancro, em particular melanoma.

Para além disso, as vacinas podem ser preparadas a partir de células que apresentem os complexos TRA/HLA na sua superfície, como as células de cancro não proliferativo, etc. Em todos os casos em que se usam células como uma vacina, estas podem ser células transfectadas com sequências de codificação para um ou ambos os componentes necessários para provocar uma resposta CTL, ou serem células que já expressem ambas as moléculas sem a necessidade de transfecção. As abordagens terapêuticas com base nesta divulgação têm como premissa a resposta pelo sistema imunitário do sujeito, conduzindo à lise das células que apresentem TRA, como as células HLA-B7. Uma dessas abordagens é a administração de CTLs autólogos específicos para o complexo ao sujeito com células anormais do fenótipo em causa. Está dentro das competências dos técnicos desenvolver esses CTLs *in vitro*. Em geral, retira-se uma amostra de células de um sujeito, como células sanguíneas, são postas em contacto com uma célula que apresente o complexo e capaz de provocar a proliferação de CTLs. A célula alvo pode ser uma transfectante, como uma célula COS do tipo acima descrito. Estes transfectantes apresentam o complexo desejado na sua superfície e, quando combinados com um CTL de interesse, estimula a sua proliferação. As células COS, como as aqui usadas, estão largamente disponíveis, tal como outras células hospedeiras. A produção específica de CTL é bem conhecida dos técnicos desta área. As CTLs autólogas clonalmente expandidas são depois administradas ao

sujeito. Outras CTLs específicas de LAGE-1 clone 2 e/ou LAGE-1 clone 4 podem ser isoladas e administradas por métodos similares.

Para detalhar uma metodologia terapêutica, referida como transferência adoptiva (Greenberg, *J. Immunol.* 136(5): 1917, 1986; Riddel et al., *Science* 257,: 238,1992; Lynch et al, *Eur. J. Immunol.* 21: 1403-1410, 1991; Kast et al., *Cell* 59: 603-614, 1989), as células que apresentam o complexo desejado são combinadas com CTLs conduzindo à proliferação de CTLs específicas. As CTLs proliferadas são depois administradas a um sujeito com uma anormalidade celular que é caracterizada por determinadas células anormais apresentarem o complexo particular. Então as CTLs lisam as células anormais, conseguindo assim o objective terapêutico desejado.

A terapia anterior assume que pelo menos algumas das células anormais do sujeito apresentam o complexo HLA/TRA relevante. Isto pode ser facilmente determinado, pois os técnicos estão muito familiarizados com métodos para identificar células que apresentem uma molécula particular HLA, bem como para identificar células que expressem o ADN das sequências pertinentes, neste caso, uma sequência LAGE-1. Assim que se identifiquem células que apresentam o complexo relevante pelos métodos de rastreio anteriores, elas podem ser combinadas com uma amostra do paciente, em que a amostra contém CTLs. Se as células que apresentam o complexo são lisadas pela amostra mista de CTL, então pode-se assumir que se apresenta uma TRA derivada de LAGE-1, e o sujeito é um candidato apropriado para as abordagens terapêuticas supracitadas.

A transferência adoptiva não é a única forma de terapia disponível.

As CTLs também podem ser provocadas *in vivo*, usando várias abordagens. Uma abordagem é a utilização de células não-

proliferativas que expressem o complexo. As células usadas nesta abordagem podem ser as que normalmente expressam o complexo, como as células de tumor irradiadas ou células transfectadas com um ou ambos os genes necessários para a apresentação do complexo. Chen et al., *Proc. Natl, Acad Sci, USA* 88: 110-114 (1991) exemplifica esta abordagem, mostrando a utilização de células transfectadas que expressam peptídeos HPV E7 num regime terapêutico. Podem-se usar vários tipos de células. De igual modo, podem-se usar vectores com um ou ambos os genes de interesse. Preferem-se especialmente os vectores virais ou bacterianos. Por exemplo, ácidos nucleicos que codificam um TRA de LAGE-I podem estar operativamente ligados a sequências promotoras e potenciadoras que dirigem a expressão da TRA de LAGE-1 em certos tecidos ou tipos de células. O ácido nucleico pode ser incorporado num vector de expressão. Os vectores de expressão ácidos nucleicos extracromossómicos, plasmídeos ou genomas virais não modificados construídos ou modificados para permitir a inserção de ácidos nucleicos exógenos, como os que codificam TRAs LAGE-1. Os ácidos nucleicos que codificam a TRA LAGE-1 também podem ser inseridos num genoma retroviral, facilitando assim a integração do ácido nucleico no genoma do tecido ou tipo de célula alvo. Nestes sistemas, o gene de interesse é carregado por um microrganismo, por exemplo, um vírus Vaccinia, retrovírus ou a bactéria BCG, e os materiais de células hospedeiras *de facto* "infectados". As células resultantes apresentam o complexo de interesse, e são reconhecidas por CTLs autólogos, que depois proliferam.

Pode-se conseguir um efeito similar combinando uma TRAP ou um seu fragmento estimulador com um adjuvante para facilitar a incorporação em células que apresentem HLA *in vivo*. A TRAP é processada de modo a produzir o peptídeo parceiro da molécula HLA enquanto que a TRA é apresentada sem a necessidade de mais processamento. Em geral, os sujeitos podem receber uma injeção

intradérmica de uma quantidade eficaz de TRAP LAGE-1, e/ou TRAs seus derivados. As doses iniciais podem ser seguidas por doses reforçadas, seguindo protocolos de imunização padrão desta área.

Ainda outra abordagem que pode ser usada para provocar uma resposta imune é fornecer TRAs LAGE-1 na forma de ácido nucleico que codifica uma série de epítomos, conhecidos como "polítomos". Os epítomos podem ser arrançados de um modo sequencial ou sobrepostos (ver, por exemplo, Thomson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:5845-5849, 1995; Gilbert et al., *Nature Biotechnol.* 15:1280-1284, 1997), com ou sem as sequências naturais de flanqueamento, e podem ser separados por sequências de ligação não relacionadas, se se desejar. O polítopo é processado de modo a gerar epítomos individuais que são reconhecidos pelo sistema imunitário para gerar as respostas imunes.

Como parte dos protocolos de imunização, as substâncias que potenciam a resposta imune podem ser administradas com componentes de ácidos nucleicos ou peptídeos de uma vacina para o cancro. Tais compostos que potenciam a resposta imune podem ser classificados como adjuvantes ou citocinas. Os adjuvantes podem potenciar a resposta imunológica fornecendo um reservatório de antígenos (extracelularmente ou dentro de macrófagos), activando macrófagos e estimulando conjuntos específicos de linfócitos. Neste meio são conhecidos adjuvantes de muitos tipos; exemplos específicos incluem MPL (SmithKline Beecham), um congénere obtido após purificação e hidrólise ácida do lipopolissacarídeo Re 595 de *Salmonella minnesota*, QS21 (SmithKline Beecham), uma saponina QA-21 pura purificada a partir de extracto de *Quillja saponaria*, e várias emulsões de água-em-óleo preparadas a partir de óleos biodegradáveis como o esqualeno e/ou tocoferol. As citocinas também são usadas em protocolos de vacinação devido às propriedades estimuladoras dos linfócitos. Muitas citocinas úteis para esses

fins serão conhecidas dos técnicos desta área, incluindo a interleuquin-12 (IL-12) que se verificou potenciar os efeitos protectores das vacinas (*Science* 268: 1432-1434, 1995).

Quando administradas, as composições terapêuticas da presente invenção são administradas em preparações farmacêuticamente aceitáveis. Tais preparações podem, de forma rotineira, conter concentrações farmacêuticamente aceitáveis de sal, agentes tampão, conservantes, veículos compatíveis, agentes de potenciação imune suplementares como adjuvantes e citocinas e opcionalmente outros agentes terapêuticos.

As composições da invenção podem ser administradas por qualquer via convencional, incluindo injeção ou por infusão gradual ao longo do tempo. A administração pode, por exemplo, ser oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavidade, subcutânea, ou transdérmica. Quando os anticorpos são usados terapeuticamente, uma via de administração preferida é por aerosol pulmonar. As técnicas para preparar sistemas de entrega de aerossóis contendo anticorpos são bem conhecidas dos técnicos. Em geral, tais sistemas devem utilizar componentes que não prejudiquem significativamente as propriedades biológicas dos anticorpos, como a capacidade de ligação ao parátipo (ver, por exemplo, Sciarra and Cutie, "Aerosols," in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, 1990, pp 1694-1712). Os técnicos desta área podem facilmente determinar os vários parâmetros e condições para a produção de aerossóis sem recurso a experimentação desmedida. Quando se usam as preparações antisense da invenção, prefere-se a administração intravenosa lenta.

As preparações para administração parenteral incluem soluções, suspensões e emulsões aquosas ou não-aquosas estéreis. Exemplos de solventes não-aquosos são o propilenoglicol, polietilenoglicol,

óleos vegetais como o azeite e ésteres orgânicos injectáveis como o etiloleate. Veículos aquosos incluem água, soluções alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões, incluindo meios tamponados e salinos. Veículos parenterais incluem solução de cloreto sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, Ringer lactato ou óleos fixados. Os veículos intravenosos incluem recarregadores ('replenisher') fluidos e de nutrientes, recarregadores de electrólitos (como os que têm como base a dextrose de Ringer's), e outros que tais. Os conservantes e outros aditivos também podem estar presentes como, por exemplo, agentes antimicrobianos, anti-oxidantes, agentes quelantes, e gases inertes gases e outros como estes.

A também contempla terapia genética. O procedimento para fazer terapia genética *ex vivo* está delineada na Patente Estadunidense 5,399,346 e em exposições submetidas na história desta patente, havendo de todas elas documentos publicamente disponíveis. Em geral, envolve a introdução *in vitro* de uma cópia funcional do gene numa(s) célula(s) de um sujeito que contém uma cópia defeituosa do gene, e devolvendo a célula ou células geneticamente modificadas ao sujeito. A cópia funcional do gene está sob o controlo de elementos reguladores que permitem a expressão do gene nas células geneticamente modificadas. Numerosas técnicas de transfecção e transdução bem como vectores de expressão apropriados são bem conhecidos dos técnicos desta área, alguns dos quais estão descritos no requerimento PCT W095/00654. A terapia genética *in vivo* usando vectores como adenovírus também está contemplada de acordo com a invenção.

As preparações da invenção são administradas em quantidades eficazes. Uma quantidade eficaz é a quantidade de uma preparação farmacêutica que sozinha ou em conjunto com outras doses estimula a resposta desejada. No caso do tratamento do cancro, a resposta

desejada é a inibição da progressão do cancro. Isto pode envolver apenas o retardamento da progressão da doença temporariamente, apesar de mais preferivelmente, envolva a paragem da progressão da doença permanentemente. Isto pode ser monitorizado por métodos rotineiros ou pode ser monitorizado de acordo com métodos de diagnóstico da invenção aqui discutidos.

Quando se deseja estimular uma resposta imune usando uma composição terapêutica da invenção, isto pode envolver a estimulação de uma resposta de anticorpos humorais que resultam num aumento do título de anticorpos no soro, uma expansão clonal de linfócitos citotóxicos ou outras respostas imunológicas desejáveis. Crê-se que as doses de imunogénios de um nanograma/quilograma a 100 miligrama/quilograma, dependendo do modo de administração, seriam eficazes. O intervalo preferido crê-se que seja entre 500 nanograma e 500 micrograma por quilograma. A quantidade absoluta irá depender de uma variedade de factores, incluindo o material seleccionado para administração, se a administração é numa dose única ou em várias doses, e parâmetros individuais do paciente incluindo idade, condição física, tamanho, peso e o estágio da doença. Estes factores são bem conhecidos dos técnicos desta área e podem ser determinados sem mais do que experimentação de rotina.

Exemplo 1: Isolamento de uma sequência especificamente expressa pela linha celular de melanoma LB373-MEL

Enriqueceram-se fragmentos de cADN específicos da linha celular de melanoma subtraindo fragmentos de cADN encontrados em células normais da pele LB243, de acordo com o método de análise de diferença representacional (RDA) descrito para ADN por Hubank and Schatz (*Nucl. Acids Res.* 22: 5640-5648, 1994).

Resumidamente, os cADN celulares obtidos por transcrição reversa de ARN poli-A de ambas as células LB373--MEL4.0 e células

da pele normais LB373 com primer oligo-dT foram digeridos com a enzima de restrição DpnII. Os fragmentos de cADNs de cada origem (LB373-MEL ou células normais da pele LB243) foram ligados com o mesmo conjunto de adaptadores, divididos em vários grupos e amplificados em separado por PCR. Os produtos PCR originários da mesma amostra foram reunidos e digeridos com DpnII. Os fragmentos DpnII da linha celular LB373-MEL (o cADN "teste") foram ligados a um novo conjunto adaptador e hibridizados com um excesso de fragmentos de ADN DpnII derivados da pele normal (o cADN "condutor"). A mistura de hibridização foi depois submetida a amplificação por PCR usando o novo conjunto adaptador. Espera-se que apenas os fragmentos de DpnII do ADN teste mas não presentes no ADN condutor sejam amplificados exponencialmente porque contêm sequências complementares do primer em ambas as extremidades. Estes produtos de amplificação específicos para o teste foram depois clonados.

Trinta clones de cADN específicos de células de melanoma obtidos por este procedimento de enriquecimento foram depois sequenciados e comparados com sequências compiladas em bases de dados. Alguns dos clones de cADN corresponderam a genes conhecidos com expressão ubíqua, alguns dos clones de cADN corresponderam a genes associados a tumores (MAGE-3, MAGE-10, PRAME - anteriormente conhecido como DAGE) e alguns dos clones de cADN eram desconhecidos. Entre os seis clones desconhecidos, um cADN específico do melanoma, LAGE-1 clone 1 (SEQ ID NO: I) que foi inicialmente denominado LL-1 clone 1, pareceu ter uma expressão associada a tumor tal como determinado por RT-PCR. O LAGE-1 clone 1 foi sequenciado e determinou-se ter 217 pares de bases de comprimento.

Para determinar o padrão de expressão de LAGE-1, fez-se a RT-PCR de amostras de vários tecidos de tumor e vários tecidos

normais. O ARN total de amostras de tecidos normais e de tumores dói convertido em cADN. Uma quantidade de ADN correspondente a 50 ng de ARN total foi depois amplificado por trinta e dois ciclos (desnaturado a 94°C durante 60 segundos, temperado a 58°C durante 60 segundos e a extensão foi a 72°C durante 90 segundos) seguido de um passo de extensão final de 10 minutos a 73°C usando os primers SL25 (SEQ ID NO:2) e BLE56 (SEQ ID NO:3), com 0,5U DYNAZYME™ num tampão, fornecido pelo fornecedor (Finnzyme, Finlândia), contendo 10mM TRIS (pH8.8), 50mM KCl e 1,5mM MgCl₂. O volume total da mistura de reacção dou de 25µl. Separaram-se dez microlitros por electroforese em géis de agarose. Um fragmento do tamanho esperado foi gerado pelo cADN da linha celular parental LB373-MEL e testículos. Não se obteve produto PCR a partir dos materiais iniciais de cADN da pele normal, nem a partir de um painel de cADN de oito outros tecidos normais. Observou-se um sinal fraco numa amostra de útero normal.

Exemplo 2: Isolamento dos clones de cADN LAGE-1 completos da linha celular de melanoma LB373-MEL

Preparou-se uma biblioteca de cADN LB373-MEL por transcrição reversa de poli-ARN como um primer oligo-dT/NotI usando o kit Superscript II do BRL (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Ligaram-se adaptadores *Bst*XI às extremidades do cADN, a as cadeias duplas de cADN foram digeridas com *Not*I. Estes fragmentos foram depois clonadas em plasmídeos pCADN II Amp digeridos com *Bst*XI e *Not*I.

Para identificar clones de cADN LAGE-I com o comprimento total, usámos o produto PCR de 137 pb amplificado com os primers SL25 (SEQ ID NO:2) e BLE56 (SEQ ID NO:3), como sonda para rastrear 75 000 clones de uma biblioteca de cADN de células LB373-MEL. A biblioteca de cADN foi hibridizada com a sonda marcada radioactivamente e

lavada de acordo com os protocolos padrão usando 0.4X SSC a 63°C. As condições de lavagem de rigor ('stringency') reduzido foram seleccionadas de modo a maximizar a detecção de clones de cADN relacionados. O ADN de 25 colónias hibridizou com a sonda LAGE-1 (0.03% do número total de colónias), sendo que alguns dessas ADNs foram isolados e sequenciados.

Dois clones tinham identidade de sequência com o clone cADN originalmente isolado de células LB373-MEL (ver Exemplo 1, "clone 1" na Fig. 1). Um dos clones continha a sequência que era idêntica aos 217 pares de bases do LAGE-1 clone 1. Determinou-se que este cADN, referido como LAGE-1 clone 2 (SEQ ID NO:4, Fig. 1) tinha cerca de 993 nucleótidos de comprimento excluindo a cauda poli A. Outro clone que hibridizou continha a sequência que era idêntica aos últimos 82 pares de bases do LAGE-1 clone 1. Determinou-se que este segundo cADN, referido como clone 3 (SEQ 10 NO:8, Fig. 1), tinha cerca de 744 nucleótidos de comprimento excluindo a cauda poli A. O clone 3 é agora conhecido como NY -ESO-I (ver Chen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94(5): 1914-1918, 1997). As sequências do clone 2 e do clone 3 foram 94% idênticas. Muitas das diferenças na sequência de nucleótidos entre os dois clones localizaram-se na região central dos cADNs. Determinou-se que um terceiro clone que hibridizou clone 4 (SEQ ID NO:6, Fig. 1), tinha cerca de 746 nucleótidos de comprimento excluindo a cauda poli A. A análise do fragmento genómico correspondente a LAGE-1 indicou que a região que engloba os nucleótidos 469-697 do clone 2 na Fig. 1 é um intrão que não foi retirado (spliced out) durante a formação do mARN de LAGE-1 clone 2.

Em todos os clones, crê-se que a moldura aberta de leitura (ORF) mais comprida comece no mesmo primeiro ATG num bom contexto de iniciação de transcrição (gccATGc) de acordo com Kozak (*J. Biol. Chem.* 266: 19867-19870, 1991). Crê-se que o tamanho do produto de

tradução das sequências completamente separadas (spliced) do clone 4 (SEQ ID NO:6) e clone 3 (SEQ ID NO:8) derivadas dos genes LAGE-1 e NYESO-1, respectivamente, esteja de bom acordo com a ORF correspondente (cerca de 19-20 kD para 180 aminoácidos). A sequência da proteína putativa codificada por NY-ESO-1 é referida SEQ ID NO:9. O produto de tradução do ARNs mensageiro parcialmente separado (spliced) (clone 2) de LAGE-1 tem uma massa de cerca de 25kDa tal como determinado por análise de SDS-PAGE da proteína preparada por tradução *in vitro*.

Exemplo 3: Expressão de genes LAGE-1 em amostras de tecidos normais e de tumor

Para determinar a especificidade de tecido da expressão de ambos os clones LAGE-1 e NY-ESO-1 por PCR, usámos dois primers que correspondem a sequências em que LAGE-1 e NY-ESO-1 são idênticos. Os primers BLE70 (SEQ ID NO: 10) e BLE71 (SEQ ID NO: 11), que englobam a ORF principal, deram repetidamente dois sinais de cerca de 600 pares de bases e 850 pares de base que correspondem a tamanhos de fragmentos de 614 e 842 pares de bases esperados para os cADN separados e não separados de LAGE-1 e NY-ESO-1.

A. Tecidos Normais

Fez-se RT-PCR com os primers BLE70 e BLE71 tal como descrito no Exemplo 1, excepto que se fizeram 20 ciclos (desnaturado a 95°C durante 30 segundos, temperado a 60°C durante 1 minuto e a extensão foi a 70°C durante 3 minutos) seguido de 10 ciclos com um tempo de extensão de 10 minutos a 70°C e de 15 minutos a 72°C para a extensão final. Para além disso, o tampão usado foi 50mM Tris-HCl, pH9.2 (25°C), 16mM (NH₄)₂SO₄, 2,25mM MgCl₂, 2% (v/v) DMSO e 0,1 % (v/v) TWEEN™ 20 (tampão 3 de Expand Long template de Boehringer). A análise de produtos de amplificação foi feita por electroforese de

gel de agarose de 10 µl de um total de 25 µl de volume total. As amostras de tecidos de várias origens foram testadas contra primers BLE71 e quer BLE72 (SEQ ID NO:12, específica para LAGE-1) ou BLE73 (SEQ ID NO: 13, específica para NY-ESO-1), durante 30 ciclos com um passo de tempero a 62°C durante 1 minuto e um passo de extensão a 72°C durante 2 minutos usando 0,5U Dynazyme de acordo com as instrução do fabricante. Os produtos LAGE-1 PCR tiveram 399 e 628 pb, e o produto NY-ESO-1 teve 274 pb. Como o produto de 628 pb aparecia sistematicamente num produto PCR mais curto (separado), apenas o último aparece registado na Tabela 1. Os resultados estão indicados na Tabela 1, com maior quantidade de sinais mais indicando níveis mais elevados de expressão de ARN num determinado tecido. As amostras que não originaram produtos de amplificação PCR foram novamente testados usando os 15 µl residuais de reacções PCR negativas numa reacção de re-amplificação de 5 ou 6 ciclos. Os resultados de quaisquer reacções de re-amplificação estão registadas na Tabela 1 como - ou (+).

Não se observou sinal na amplificação do ADN genómico usando condições PCR padrão com primers BLE70 e BLE71 após 30 e 33 ciclos com um passo de temperamento de 60°C. Dos tecidos normais analisados, apenas os testículos, mama, placenta de termo e um ou duas amostras de útero foram positivas (Tabela I). Investigando a expressão dos genes LAGE-1 e NY-ESO-1, observou-se que uma das amostras de útero expressou um baixo nível de mARN de LAGE-1, mas manteve-se claramente negativa para mARN de NY-ESO-1. Além disso, as sete amostras de ARN de endométrio duas de miométrio mantiveram-se negativas para ambos os genes. Por outro lado, ambas as amostras de testículos mostraram expressão de LAGE-1 e NY-ESO-1 a um nível similar ao da expressão em células LB373- MEL4.0. As amplificações controlo foram feitas usando primers específicos. Todas estas amostras de cADN expressaram fortemente β-actina, como avaliado pelo sinal obtido após a amplificação PCR durante 21 ciclos. A

partir de um painel de 6 outras amostras de tecidos normais já marcadas como negativas com os primers SL25 e BLE56, todas foram negativas usando os primers específicos de LAGE-1 BLE72-BLE71. No entanto, quatro destas amostras foram positivas para a expressão de NY-ESO-1, mas abaixo do limiar de 1 % da expressão encontrada em células LB373-MEL4.0. Essas amostras normais que apresentavam um baixo nível de expressão de NY-ESO-1 são a pele, os pulmões, supra-renais e mama (Tabela I).

Tabela I. Expressão dos genes LAGE-1 & NY-ESO-1 em tecidos normais (RT-PCR)

Amostra de tecido	código	LAGE-1 ou NY-ESO-1	LAGE-1	NY-ESO-1
Cérebro	JNO10	–	–	–
Retina	SH8-5	–	–	–
PBL	LB33, LB569, LB678	–	–	–
Pele	LB243	–	–	(±)
Mama	LB520, LB673	±	–	±
Coração	LB1266	–	–	–
Músculo	CL084033	–	–	–
Pulmões	LB175, LB264	–	–	±
Medula óssea	LB214, LB1765	–	–	–
Fígado	LB898	–	–	–
Rim	BA4, BA25	–	–	–
Glândulas supra-renais	LB535, LB538	–	–	±
Testículos	HM31, LB882	++/+++	++/+++	++/+++
Prostata	HM88, CLO64038	–	–	–
Ovário	LB1266, CLO84036	–	–	–
Placenta de termo	LB692, LB695	±	±	±
Útero	LB1022	±	±	–
Útero	CLO64029	–	–	–
Endométrio d.2, 13	LB1872, LB1874	–	–	–
Endométrio d.19-32	5 amostras	–	–	–
Miométrio	LB1031, LB1032	–	–	–

CL064029: conjunto de 10 úteros de mulheres (idade 15-74) falecidas por trauma, comprados à Clontech.

B. Amostras de Tumor

O ARN total de amostras de tumor das origens indicadas na Tabela II foi usado em reacções RT-PCR com primers específicos LAGE-1 e NY-ESO-1 (BLE70 e BLE71) tal como descrito para os tecidos normais. As amostras positivas foram novamente testadas por amplificação usando os primers BLE71 e BLE72 (específico para transcrição LAGE-I) ou BLE73 (específico para transcrição NY-ESO-1) durante 30 ciclos tal como descrito em cima com um passo de tempero ('annealing') a 62°C durante um minuto e um passo de extensão a 72°C durante 2 minutos usando 0,5U DYNAZYME™ de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade de ARN e a eficiência de síntese se cADN foram controladas por reacções PCR paralelas com um conjunto de primers específicos de β -actina

Como duas amostras de útero normais apresentaram uma expressão basal do gene LAGE-1, estudaram-se amostras de tumor derivadas deste órgão. Surpreendentemente, entre os 8 tumores testados (4 tumores do cervix e 4 tumores do miométrio), nenhum pareceu ser positivo para LAGE-1 ou NY-ESO-1 com os primers BLE70-BLE71 após 30 e 33 ciclos, apesar de uma confirmada boa expressão de β -actina (Tabela II). A expressão de LAGE-1 no útero foi depois verificada usando uma amostra comercial de ARN, derivada tecidos uterinos de 10 mulheres normais falecida por trauma, que deu negativa para ambos os genes apesar da boa expressão de actina.

Tal como indicado na Tabela II, não se detectou a expressão de genes LAGE-1 nem NY-ESO-1 em cancros do cólon, rim, tiróide e cérebro, nem em leucemias, tal como atestado por genes RT-PCR com primers BLE70-BLE71. A expressão de genes LAGE-1 ou NY-ESO-1 no cancro da mama não é rara, mas é fraca. A expressão em melanomas, SCLC, sarcomas, tumores da cabeça e do pescoço, próstata e bexiga foi mais forte, relativamente mais frequente e correlacionada com a expressão de outros genes que se sabe codificarem peptídeos

antigénicos tal como se vê na Tabela III. As mesmas amostras de de cADN foram testadas quanto à expressão de um painel de TRAPs incluindo MAGE-1, -2, -3, -4, -6 e -12, BAGE, PRAME, GAGE-1&2, -3, -4, -5 e -6, e RAGE. Na Tabela III dá-se a correlação entre a expressão de LAGE-1 ou NYESO-1 com a activação de MAGE-1 ou outras TRAPs. Metade das amostras que foram positivas para LAGE-1 também o foram para MAGE-A enquanto que apenas doze por cento das amostras negativas expressaram MAGE-A1. Uma correlação de expressão similar foi encontrada entre LAGE-1 e MAGE-A3.

Como a expressão de LAGE-1 estava claramente correlacionada com a de genes MAGE, que são activados em tumores com a desmetilação da região promotora, fizeram-se estudos para determinar se a desmetilação poderia induzir a expressão de LAGE-1. Células linfoblastóides ou células de tumor estimuladas por fitohemaglutininas que foram negativas para LAGE-1 e NY-ESO-1 afinal expressam estes genes após tratamento com deoxi-azacitidina, indicando que a metilação está envolvida no controlo de ambos os genes. Na confirmação, observou-se que os sítios *HpaII* localizados no exão 1 e no promotor de LAGE-1 foram metilados em células sanguíneas mononucleadas e em linhas celulares de tumores que não expressam LAGE-1, enquanto que os sítios *HpaII* foram desmetilados em linhas celulares que expressaram LAGE-1.

Cada um de LAGE-1 e NY-ESO-1 teve 75% de amostras de tumores positivos. Assim, tal como demonstrada na Tabela II ambas as famílias de genes LAGE-1 e NY-ESO-1 foram expressas independentemente um do outro. Os sarcomas de vários tipos histológicos expressaram preferencialmente elevados níveis de ARN NY-ESO-1, independentemente da expressão dos genes conhecidos que codificam antigénios associados a tumores.

Usando os cADNs de oito amostras que expressam genes LAGE-1 e NY-ESO-1 simultaneamente ou NY-ESO-1 sozinho como padrão para as reacções RT-PCR, a sequência NY-ESO-1 foi amplificada com primers BLE73 e BLE71 para ser usado como matéria-prima nas reacções de sequenciação. O primer BLE56 (SEQ ID NO:3) foi usado para começar as reacções de sequenciação. Observou-se uma sequência única que era idêntica à região correspondente do clone 3 derivado de células LB373-MEL4.0, demonstrando quer a especificidade das reacções PCR quer a ausência de polimorfismo nesta região do gene NY-ESO-1 (ver Fig. 1).

Tabela II. Expressão dos genes LAGE-1 & NY-ESO-1 em tumores (RT-PCR)

Amostra	Número	LAGE-1 & NY-ESO-1 Positivos BLE70-BLE71 (%)	LAGE-1 BLE72-BLE71	NY-ESO-1 BLE73-BLE71
CÓLON	9	0	ND	ND
LEUCEMIA	17	0 0%	ND	ND
B-LINFOMA	6	1	1	1
MELANOMA	21	7 33%	6	5
CABEÇA & PESCOÇO	15	4 27%	4	3
PULMÕES	15	5 33%	5	3
RIM	10	0	ND	ND
SARCOMA	19	9 47%	4/8	6
MAMA	12	4	2	3
ÚTERO cérvix Corpo	8	0 0/4 0/4	0	0
BEXIGA	15	5 33%	4	5
CÉREBRO	4	0	ND	ND
TIRÓIDE	3	0	ND	ND
PRÓSTATA	12	4	3	3
TOTAL Positivas	166	39	29/38	29/39
Positivas (%)		23%	76%	74%

Tabela III. Expressão dos genes LAGE-1 & NY-ESQ-1 por RT-PCR usando BLE70-BLE71 (30 ciclos)

Amostra	Número Positivo (%)			Entre amostras de tumores		
				MAGE-1 pos.	≥ 1 outro TRAP pos (MAGE-1 neg.)	TRAPs neg
CÓLONS	9	0		–	0/5	0/4
LEUCEMIAS	17	0	0%	0/1	0/9	0/7
B- LINFOMAS	6	1		–	1/3	0/3
MELANOMAS	21	7	33%	3/5	4/9	0/7
CABEÇA& PESCOÇO	15	4	27%	3/4	1/6	0/5
PULMÕES	15	5	33%	3/5	2/5	0/5
nsc lc		3/8		2/4	1/2	0/2
(AC)		1/6		–	1/3	0/3
nsc lc		1/1		1/1	–	–
(epid.)						
outro						
RIM	10	0		0/2	0/2	0/6
SARCOMAS	19	9	47%	2/2	4/8	3/9
MAMA	12	4	33%	2±/5	2±/3	0/4
ÚTERO	8	0		–	0/3	0/5
cérvix		0/4		–	0/2	0/2
corpo		0/4		–	0/1	0/3
(benigno)						
BEXIGA	15	5	33%	3/4	1/5	1/6
CÉREBRO	4	0		–	0/2	0/2
TIRÓIDE	3	0		–	0/2	0/1
PROSTATA	12	4	33%	1/3	1/1	2/8

TOTAL	166	31	63	72
% de		19%	38%	43%
todas as	39	17	16	6
amostras	23%	53%	23%	11%
Positivas				
Positivas				
(%)				

Exemplo 4: Northern Blot em ARN total

Testaram-se várias linhas celulares de tumor e amostras positivas para LAGE-1 e/ou NY-ESQ-1 por RT-PCR com os primers BLE70-BLE71 por Northern blot de modo a determinar o comprimento do ARN mensageiro. Usou-se uma amostra normal de pulmão como controlo negativo.

Separou-se o ARN total (10 µg) de testículos normais, pulmão normal e com tumor do mesmo paciente (LB264), de duas linhas celulares de melanoma (LB373 e LB24) e uma linha celular de sarcoma (LB188) por electroforese em 1,3% gel de agarose desnaturante, fez-se o Northern blot durante a noite contra filtros Hybond C (Amersham), usando o sistema de turbo-blotting da Schleicher & Schuell (Keene, NH). O ARN foi fixado no filtro por autocruzamento ('autocrosslinking') UV a 254 nm (Stratalinker, Stratagene, La Jolla, CA), e hibridizou-se com 5×10^6 CPM de uma sonda PCR de 842 pares de bases numa solução 5 ml sulfato de Dextrano/SDS/NaCl. A sonda foi obtida por amplificação do LAGE-1 clone 2 com os primers BLE70 e BLE71 na presença de dCTP marcado. Determinou-se a actividade específica da sonda após purificação por Chromaspin X (Clontech, Palo Alto, CA). Após a hibridização durante a noite a 60°C, o filtro foi lavado em banhos sucessivos de 2X SSC com

temperaturas crescentes até 60°C. O filtro lavado foi exposto a raios-X para visualizar o sinal de hibridização como autodiagrama.

Observaram-se dois sinais claros de aproximadamente 750 e 1000 nucleótidos de comprimento no autodiagrama. Estes tamanhos estão de acordo com o comprimento dos clones 2, 3 e 4 do cADN que têm cerca de 993, 744, e 746 nucleótidos respectivamente, sem a cauda poli-A. Assim sendo, crê-se que os cADNs de LAGE-1b (clone 2), NY-ESQ-1 clone 3, e LAGE-1a (clone 4) estejam praticamente completo. O facto de os cADNs estarem completos foi depois avaliado pelos resultados de RTP-CR obtidos com vários primers sense a montante e primer antisense localizado no exão 1 (ver Exemplo 5). Estes sinais foram pouco visíveis na amostra de testículos e ausentes na amostra de pulmão normal T. A coloração com brometo de etídio não revelou diferenças quantitativas significativas entre as seis amostras e o rARN 28S estava não degradado em todas as amostras.

Exemplo 5: Estrutura do gene e mapa do cromossoma

A estrutura genómica com três exões tinha já sido sugerida para LAGE-1 e NY-ESO-1 pelos produtos de PCR de sequenciação que foram obtidos a partir de ADN genómico de linfócitos normais alogéneos por amplificação com par primer BLE70-BLE71. No entanto não se obteve informação fora destes primers. Em particular, a região promotora permaneceu por definir com esta análise preliminar.

Usou-se uma construção de biblioteca com o ADN genómico da linha celular de melanoma LB33-MELA, dividida em grupos de 3×10^4 a 9×10^4 cosmídeos para isolar o gene LAGE-1 inteiro. Submeteram-se bactérias de 12 grupos a amplificação com o par de primers BLE72-BLE71 que é específico para LAGE-1. Escolheu-se um grupo positivo pela sua baixa diversidade (3×10^4 clones independentes). As bactérias ($1,6 \times 10^5$) deste grupo foram espalhadas em 4 filtros. Os

filtros foram rastreados com um produto PCR marcado obtido a partir de ADN genómico com os primers BLE70-BLE71. O tampão de hibridização (10 ml) continha 3,5xSSC, 1x Denhardt, 0,5% SDS, EDTA (2 mM), Na₂PO₄ (25 mM) e ADN de esperma de salmão (100 µg/ml). Os filtros foram hibridizados durante a noite a 65°C em cilindros rotativos. Foram lavados duas vezes em 500 ml de 2xSSC, 0,5% SDS, a 60°C durante 15 min. E duas vezes em 500 ml de 0,2xSSC, 0,1% SDS a 65°C durante 10 min. Isolou-se um cosmídeo. Uma digestão do cosmídeo com várias enzimas de restrição foi fraccionada por electroforese, foi feito o Northern blot e hibridizou-se com a mesma sonda de PCR. Os fragmentos de hibridização foram comparados com os dados obtidos por Southern blot do ADN genómico previamente sondado com um produto PCR derivado do cADN clone 2 e amplificado com os primers BLE70-BLE71. Uma comparação dos fragmentos de restrição e das bandas de hibridização indicaram que o cosmídeo continha o gene LAGE-1. Obtiveram-se sinais relevantes com *EcoRI* (4,5 kb), *BamHI* (4,8 kb, 1 kb, e 0,2 kb) e *PstI* (0,8 kb, 0,7 kb e 0,5 kb). As sequências foram determinadas por sequenciação directa do cosmídeo com os primers específicos e pela sequenciação de vários sub-clones. As sequências dos ácidos nucleicos LAGE-1 foram depositadas na base de dados EMBL com os números de acesso AJ223093 (gene LAGE-1), AJ223040 (cADN LAGE-1b [clone 2]), AJ223041 (cADN LAGE-1a [clone 4]) e AJ003149 (NY-ESO-1 [clone 3]).

Tal como indicado pelos tamanhos das bandas observadas nos Northern blots, o início de transcrição parece estar localizado perto das extremidades 5' dos cADN dos clones representados na Fig. 1. Para além disso, as experiências RT-PCR com um primer antisense específico localizado no exão 1 e vários primers sense localizados a montante da extremidade 5' de LAGE-1 clone 2 indicaram que cerca de 90% das transcrições começam entre as posições -25 e + 1, enquanto que as outras transcrições começam entre as posições -100 e -25. A sequência promotora de LAGE-1 aparentemente não contém uma

caixa TATA mas contém dois locais Sp 1 nas posições -24 e -145 e um sítio centro de consenso (aggat) na posição -51. Uma ilha CpG localiza-se entre as posições -400 e +333. Apresenta 73% de G + C, com uma frequência do dinucleótido CpG correspondente a 0,6 do esperado numa base aleatória (Gardiner-Garden and Frommer, *J.Mol. Biol.* 96:261-282, 1987).

Na linha celular LB373-MEL, o intrão 2 é separado ('spliced out') em apenas metade das transcrições. Também se observa uma elevada frequência de mRNA de LAGE-1 parcialmente separado em linhas celulares de tumores e em amostras cirúrgicas de tumores tal como verifica por análise de Northern blot. A presença de duas formas de mRNA LAGE-1 foi confirmada por experiências de RT-PCR. O mRNA de LAGE-1 parcialmente separado contém uma moldura de leitura que engloba o intrão 2 quase completo e codifica uma proteína de 210 aminoácidos, em que o mRNA completamente separado codifica um polipeptídeo de 180 aminoácidos. A proteína codificada pelo mRNA parcialmente separado pode ter uma função diferente da proteína codificada pelo mRNA completamente separado.

As sequências de cADN e dos cosmídeos de diferentes pacientes possibilitaram a detecção de polimorfismos (não exaustivos) no gene LAGE-1. Observaram-se duas substituições de bases nas sequências codificadoras do exão 1 que resultaram em duas alterações de aminoácidos (Gln para Arg no resíduo 6 e Gln para Glu no resíduo 89). Observou-se uma terceira substituição no exão 2 que é silenciosa (Pro no resíduo 115). Observou-se um quarto polimorfismo oito aminoácidos a jusante do sítio de separação 5' do intrão 2 modificando o resíduo 138 de Arg para Trp no polipeptídeo de LAGE-1 parcialmente separado.

Verificou-se que o cosmídeo respeitava a estrutura do gene. De modo a verificar as sequências do promotor encontradas no cosmídeo,

conceberam-se primers para amplificar a sequência flanco do gene usando ADN genómico como modelo (template). Vários pares de primers produziram sinais de tamanho idêntico no cosmídeo e no ADN genómico. O produto PCR maior foi testado por hibridização com um oligonucleótido interno (BLE70) obtendo-se uma banda única de tamanho idêntico no cosmídeo e no ADN genómico.

O mapeamento cromossómico do gene LAGE- 1 foi feito em dois passos. Em primeiro lugar, os híbridos somáticos monocromossómicos fornecidos pelo centro de recursos UK HGMP (lote 96/01) contendo células híbridas humano-rato e humano-hamster permitiram a localização dos genes LAGE-1 (LL-1.1) e NY-ESO-1 (LL-1.2) numa região distal do cromossoma Xq. Fez-se a amplificação por PCR usando o par de primers específicos para o gene BLE72-BLE71 e BLE73-BLE71 (para LAGE-1 e NY-ESO-1, respectivamente). Observara-se sinais específicos de LAGE-1 e NY-ESO-1 com híbridos contendo todo o cromossoma X humano ou um fragmento distal Xq. Em segundo lugar, o mapeamento cromossómico de LAGE-1 foi depois refinado por experiências de hibridização fluorescente in situ (FISH) realizadas na metáfase de linfócitos normais (PBL) estimulados com fitohemaglutinina (PHA) para Xq28. Como se descreveu uma região telomérica pseudoautossómica de 320 kb (Kvaloy et al., *Hum. Mol. Genet.* 3:771-778, 1994), a experiência foi repetida usando PBL estimulados com PHA de um dador macho: o cromossoma Y permaneceu negativo.

Os cromossomas foram identificados por análise de bandas G simultânea usando um contador de coloração DAPI. O cromossoma X foi identificado por co-hibridização com pBAM X.5, uma sonda plasmídeo gentilmente cedida pelo Dr. Hans Dauwerse (Leiden, Holanda) que reconhece DXZ1, o satélite alfa específico para o centrómero do cromossoma X. Viram-se diapositivos com um microscópio de fluorescência Leitz DMRB (E. Leitz Inc., Wetzlar, Alemanha)

equipado com uma câmara CCD arrefecida (Photometrics, Tuscoll, AZ) usando o programa Vysis (Vysis, Sluttgart, Alemanha). Avaliaram-se pelo menos dez metafases em cada experiência.

Como os genes MAGE-A também se mapeiam com Xq28, o LAGE-1 foi mapeado em relação aos genes MAGE-A. Usou-se um cosmídeo com os genes MAGE-A6 e MAGE-A2 (Rogner et al., *Genomics* 29: 725-731, 1995) como sonda de co-hibridização. O sinal LAGE-1 sobrepôs-se ao sinal MAGE sugerindo que ambos os genes ficam dentro de 2 Mb na banda Xq28.

Exemplo 6: Características da proteína LAGE-1

As proteínas de 180 aminoácidos codificadas pelo cADN de LAGE-1a (clone 4) e do cADN de NY-ESO-1 apresentam 84% de identidade e, tendo em conta as alterações conservativas 89% de homologia. As proteínas LAGE-1 e NY-ESO-1 têm pontos isoeléctricos de 10,9 e 8,5, respectivamente. Podem-se distinguir quatro regiões de 45 aminoácidos no polipeptídeo LAGE-1. As primeiras duas regiões são codificadas pelo exão 1 e são muito ricas em resíduos de glicina (42% e 22%), que frequentemente aparecem como duplas. A primeira região é acídica enquanto que a segunda é altamente básica. A terceira região codificada pelo exão 2 representa a maior diferença entre os dois genes sendo básica em LAGE-1 (ponto isoeléctrico de 10,0) e acídica no NY-ESO-1 (ponto isoeléctrico de 4,6). A quarta região codificada pelo exão 3, é básica e contém uma extensão hidrofóbica perto do terminal-C. O polipeptídeo LAGE-1b de 210 aminoácidos (clone 2) não tem essa extensão hidrofóbica. Os três polipeptídeos apresentam vários sítios de fosforilação putativos para a caseína quinase II, que se sabe que fosforila muitos substratos envolvidos no controlo da divisão celular (Allende and Allende, *FASEB J* 9: 313-323, 1995).

Exemplo 7: Identificação da porção de LAGE-1 que codifica um antígeno de rejeição de tumor

Com base nas descobertas feitas com os genes MAGE (e outros genes) em que se formam peptídeos antigénicos a partir dos produtos de proteína do gene, crê-se que células de tumor que expressem LAGE-1 carregam pelo menos um antígeno que pode ser reconhecido pelos linfócitos T citolíticos autólogos (CTL) na forma de peptídeos antigénicos codificados por LAGE-1 apresentados por várias moléculas HLA. Uma análise da expressão de LAGE-1 indicou que o número de moléculas LAGE-1 presentes em células LB373-MEL é similar ao de mARNs de MAGE-A1 na linha celular de melanoma MZ2-MEL. Verificou-se que as linhas celulares que expressam níveis de mARN MAGE-A1 acima de 10% dos encontrados nas células MZ2-MEL são reconhecidas pelos CTL anti-MAGE (Lethé et al., *Melanoma Research* 7:S83-S88, 1997). Com base nisto crê-se que metade dos tumores positivos para LAGE-1 expressam antígeno suficiente para serem marcados para imunoterapia.

Podem-se fazer pelo menos duas abordagens experimentais para identificar antígenos codificados por LAGE-1. Num primeiro método, produzem-se clones CTL estimulando os linfócitos sanguíneos periféricos (PBLs) de um paciente com células autólogas normais transfectadas com clones de ADN que codificam os polipeptídeos LAGE-1a ou LAGE-1b (por exemplo, SEQ ID NOs: 6 e 4) ou com PBLs irradiados carregados com peptídeos sintéticos correspondentes às proteínas putativas e coincidentes com o consenso para a molécula de HLA classe I apropriada para localizar peptídeos antigénicos entre os polipeptídeos LAGE-1 (ver, por exemplo, van der Bruggen et al., *Eur. J Immunol.* 24:3038-3043, 1994; MAGE3 peptides presented by HLA.A2; Herman et al., *Immunogenetics* 43:377-383, 1996). A localização de um ou mais peptídeos antigénicos numa sequência proteica pode ser facilitada pelas previsões de ligação de

peptídeos HLA feitas de acordo com o estabelecido para potenciais ligações (por exemplo, Parker et al., *J Immunol.* 152:163, 1994; Rammensee et al., *Immunogenetics* 41:178-228, 1995). As previsões de ligação de HLA podem ser, convenientemente, feitas usando um algoritmo disponível via Internet no sítio dos National Institutes of Health World Wide Web na URL <http://bimas.dort.nih.gov>.

Em alternativa, os clones CTL obtidos pela estimulação de linfócitos com células de tumor autólogas que expressam um ou ambos os clones LAGE-1 são rastreadas para especificidade contra células COS transfectadas com cADNs de LAGE-1 e alelos HLA autólogos tal como descrito por Brichard et al. (*Eur. J. Immunol.* 26:224-230, 1996).

O reconhecimento das CTL de LAGE-1 é determinado pela mediação da libertação de TNF dos linfócitos T citolíticos ou pelo ensaio de libertação de ^{51}Cr (Herin et al., *Int. J Cancer* 39:390-396, 1987). Se um clone CTL reconhece especificamente uma célula COS transfectada, testam-se fragmentos mais curtos das sequências de codificação para identificar a região do gene que codifica o peptídeo. Os fragmentos de LAGE-1 são preparados por digestão com exonuclease III ou por outros métodos de biologia molecular padrão. Preparam-se peptídeos sintéticos para confirmar a sequência exacta do antigénio.

Opcionalmente, produzem-se fragmentos mais curtos de cADNs de LAGE-1 por PCR. Usam-se fragmentos mais curtos para provocar a libertação de TNF ou de ^{51}Cr , tal como em cima.

Preparam-se os peptídeos sintéticos correspondentes aos fragmentos mais curtos do clone LAGE-1 que provoquem a libertação de TNF. Progressivamente são sintetizados peptídeos mais curtos

para determinar os peptídeos antigénio de rejeição de tumores LAGE-1 óptimos para uma dada molécula de HLA.

A seguir apresenta-se uma listagem de sequências seguida pelo que é reivindicado.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(I) REQUERENTE:

- (A) NOME: LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH
- (B) RUA: 1345 AVENUE OF THE AMERICAS
- (C) CIDADE: NOVA IORQUE
- (D) ESTADO: NOVA IORQUE
- (E) PAÍS: ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA
- (F) CÓDIGO POSTAL: 10105

(I) REQUERENTE/INVENTOR:

- (A) NOME: LETHÉ, BERNARD
- (B) RUA: AVENUE HIPPOCRATE 74, UCL 7459
- (C) CIDADE: BRUXELAS
- (E) COUNTRY: BÉLGICA
- (F) CÓDIGO POSTAL: 1200

(i) REQUERENTE/INVENTOR:

- (A) NOME: LUCAS, SOPHIE
- (B) RUA: AVENUE HIPPOCRATE 74, UCL 7459
- (C) CIDADE: BRUXELAS
- (E) PAÍS: BÉLGICA
- (F) CÓDIGO POSTAL: 1200

(i) REQUERENTE/INVENTOR:

- (A) NOME: DE SMET, CHARLES
- (B) RUA: AVENUE HIPPOCRATE 74, UCL 7459
- (C) CIDADE: BRUXELAS
- (E) PAÍS: BÉLGICA
- (F) CÓDIGO POSTAL: 1200

(i) REQUERENTE/INVENTOR:

- (A) NOME: GODELAINE, DANIELE
- (B) RUA: AVENUE HIPPOCRATE 74, UCL 7459
- (C) CIDADE: BRUXELAS
- (E) PAÍS: BÉLGICA
- (F) CÓDIGO POSTAL: 1200

(i) REQUERENTE/INVENTOR:

- (A) NOME: BOON-FALLEUR, THIERRY
- (B) RUA: AVENUE HIPPOCRATE 74, UCL 7459
- (C) CIDADE: BRUXELAS
- (E) PAÍS: BÉLGICA
- (F) CÓDIGO POSTAL: 1200

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: ÁCIDOS NUCLEICOS ASSOCIADOS A TUMORES
LAGE-1

(iii) NUMERO DE SEQUÊNCIAS: 14

(iv) MORADA DE CORRESPONDÊNCIA:

- (A) DESTINATÁRIO: WOLF, GREENFIELD & SACKS, P.C.
- (B) RUA: 600 ATLANTIC AVENUE
- (C) CIDADE: BOSTON
- (D) STATE: MASSACHUSETTS
- (E) PAÍS: UNITED STATES OF AMERICA
- (F) CÓDIGO POSTAL: 02110

(v) FORMA DE LEITURA EM COMPUTADOR:

- (A) TIPO DE MEIO: DISQUETE
- (B) COMPUTADOR: PC COMPATÍVEL COM IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) PROGRAMA: Patent In Release #1.0, Version #1.25

(vi) DADOS DO PEDIDO ACTUAL:

- (A) NÚMERO DE PEDIDO:
- (B) DATA DE PREENCHIMENTO:
- (C) CLASSIFICAÇÃO:

(vii) DADOS DE PEDIDOS ANTERIORES:

- (A) NÚMERO DE PEDIDO: 08/791,495
- (B) DATA DE PREENCHIMENTO: 27-JAN-1997

(viii) INFORMAÇÃO ADVOGADO/AGENTE:

- (A) NOME: Van Amsterdam, John Ro
- (B) NÚMERO DE REGISTO: 40,212
- (C) NÚMERO DE REFERÊNCIA: L0461/7005WO

(ix) INFORMAÇÃO DE TELECOMUNICAÇÃO:

(A) TELEFONE: 617-720-3500

(B) TELEFAX: 617-720-2441

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 217 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIA: dupla

(D) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENSE: NÃO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FONTE DE ORIGEM:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 1:

GATCTCAGAA	CACCCAAACA	CAAGGTCTCA	GAACAGAGAC	CTGGTACACC	
AGGCCCGCCG					60
CCACCCGAGG	GAGCCCAGGG	AGATGGGTGC	AGAGGTGTCG	CCTTTAATGT	
GATGTTCTCT					120
GCCCTCACA	TTTAGCCGAC	TGACTGCTGC	CAGACCACCGC	CAACTGCAGC	TCTCCATCAG
					180
CTCCTGTCTC	CAGCAGCTTT	CCCTGTTGAT	GTGGATC		217

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 2 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 18 nucleótidos

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIA: simples

(O) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENSE: NÃO

(vi) FONTE DE ORIGEM:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 2:

AGATGGGTGC AGAGGTGT

18

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 19 nucleótidos

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIA: simples

(D) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENSE: SIM

(vi) FONTE DE ORIGEM:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 3:

GATCCACATC AACAGGAA

19

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 1002 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIA: dupla

(D) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENSE: NÃO

(vi) FONTE DE ORIGEM:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) LOCALIZAÇÃO: 65 . . 697

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:4:

```
TCTGCCTCCG CATCCTCGTG GGCCCTGACC TTCTCTCTGA GAGCCGGGCA GAGGCTCCGG 60

AGCC ATG CAG GCC CAA GGC CAG GGG ACA GGG GGT TCG ACG GGC GAT GCT 109
Met Gln Ala Glu Gli Gln Gli Tre Gli Gli Ser Tre Gli Asp Ala
1 5 10 15

GAT GGC CCA GGA GGC CCT GGC ATT CCT GAT GGC CCA GGG GGC AAT GCT 157
Asp Gli Pro Gli Gli Pro Gli Ile Pro Asp Gli Pro Gli Gli Asn Ala
20 25 30

GGC GGC CCA GGA GAG GCG GGT GCC ACG GGC GGC AGA GGT CCC CGG GGC 205
Gli Gli Pro Gli Glu Ala Gli Ala Tre Gli Gli Arg Gli Pro Arg Gli
35 40 45

GCA GGG GCA GCA AGG GCC TCG GGG CCG AGA GGA GGC GCC CCG CGG GGT 253
Ala Gli Ala Ala Arg Ala Ser Gli Pro Arg Gli Gli Ala Pro Arg Gli
50 55 60

CCG CAT GGC GGT GCC GCT TCT GCG CAG GAT GGA AGG TGC CCC TGC GGG 301
Pro His Gli Gli Ala Ala Ser Ala Gln Asp Gli Arg Cys Pro Cys Gli
65 70 75

GCC AGG AGG CCG GAC AGC CGC CTG CTT CAG TTG CAC ATC ACG ATG CCT 349
Ala Arg Arg Pro Asp Ser Arg Leu Leu Gln Leu His Ile Tre Met Pro
80 85 90 95

TTC TCG TCG CCC ATG GAA GCG GAG CTG GTC CGC AGG ATC CTG TCC CGG 397
Fen Ser Ser Pro Met Glu Ala Glu Leu Val Arg Arg Ile Leu Ser Arg
100 105 110

GAT GCC OCA CCT CTC CCC CGA CCA GGG GCG GTT CTG AAG GAC TTC ACC 445
Asp Ala Ala Pro Leu Pro Arg Pro Gli Ala Val Leu Lis Asp Fen Tre
115 120 125

GTG TCC GGC AAC CTA CTG TTT ATG TCA GTT CGG GAC CAG GAC AGG GAA 493
Val Ser Gli Asn Leu Leu Fen Met Ser Val Arg Asp Gln Asp Arg Glu
130 135 140

GGC GCT GGG CGG ATG AGG GTG GTG GGT TGG GGG CTG GGA TCC GCC TCC 541
Gli Ala Gli Arg Met Arg Val Val Gli Trp Gli Leu Gli Ser Ala Ser
145 150 155
```

CCG GAG GGG CAG AAA GCT AGA GAT CTC AGA ACA CCC AAA CAC AAG GTC 589
 Pro GIu Gli Gln Lis Ala Arg Asp Leu Arg Tre Pro Lis His Lis Val
 160 165 170 175

 TCA GAA CAG AGA CCT GGT ACA CCA GGC CCG CCG CCA CCC GAG GGA GCC 637
 Ser GIu Gln Arg Pro Gli Tre Pro Gli Pro Pro Pro Pro GIu Gli Ala
 180 185 190

 CAG GGA GAT GGG TGC AGA GGT GTC GCC TTT AAT GTG ATG TTC TCT GCC 685
 Gln Gli Asp Gli Cis Arg Gli Val Ala Fen Asn Val Met Fen Ser Ala
 195 200 205

 CCT CAC ATT TAGCCGACTG ACTGCTGCAG ACCACCGCCA ACTGCAGCTC 734
 Pro His Ile
 210

 TCCATCAGCT CCTGTCTCCA GCAGCITI'CC CTGTTGATGT GGATCACGCA GTGCITTCTG
 794

 CCCGTGTTTT TGGCTCAGGC TCCCTCAGGG CAGAGGCGCT AAGCCCAGCC TGGCGCCCCT
 854

 TCCTAGGTCA TGCCTCCTCC CCTAGGGAAT GGTCCCAGCA CGAGTGGCCA GTTCATTGTG
 914

 GGGGCCTGAT TGTTTGTCGC TGGAGGAGGA CGGCTTACAT GTTTGTTTCT GTAGAAAATA
 974

 AAGCTGAGCT ACGATTCCGA AAAAAAAAAA 1002

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 210 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:

Met Gln Ala GIu Gli Gln Gli Tre Gli Gli Ser Tre Gli Asp Ala Asp
 1 5 10 15

 Gli Pro Gli Gli Pro Gli Ile Pro Asp Gli Pro Gli Gli Asn Ala Gli
 20 25 30

Gli Pro Gli Glu Ala Gli Ala Tre Gli Gli Arg Gli Pro Arg Gli Ala
 35 40 45
 Gli Ala Ala Arg Ala Ser Gli Pro Arg Gli Gli Ala Pro Arg Gli Pro
 50 55 60
 His Gli Gli Ala Ala Ser Ala Gln Asp Gli Arg Cis Pro Cis Gli Ala
 65 70 75 80
 Arg Arg Pro Asp Ser Arg Leu Leu Gln Leu His Ile Tre Met Pro Fen
 85 90 95
 Ser Ser Pro Met Glu Ala Glu Leu Val Arg Arg Ile Leu Ser Arg Asp
 100 105 110
 Ala Ala Pro Leu Pro Arg Pro Gli Ala Val Leu Lis Asp Fen Tre Val
 115 120 125
 Ser Gli Asn Leu Leu Fen Met Ser Val Arg Asp Gln Asp Arg Glu Gli
 130 135 140
 Ala Gli Arg Met Arg Val Val Gli Trp Gli Leu Gli Ser Ala Ser Pro
 145 150 155 160
 Glu Gli Gln Lis Ala Arg Asp Leu Arg Tre Pro Lis His Lis Val Ser
 165 170 175
 Glu Gln Arg Pro Gli Tre Pro Gli Pro Pro Pro Pro Glu Gli Ala Gln
 180 185 190
 Gli Asp Gli Cis Arg Gli Val Ala Fen Asn Val Met Fen Ser Ala Pro
 195 200 205
 His Ile
 210

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 755 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: dupla
- (D) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENSE: NÃO

(vi) FONTE DE ORIGEM:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) LOCALIZAÇÃO: 53 .. 595

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:

```
TCCTCGTGGG CCCTGACCTT CTCTCTGAGA GCCGGGCAGA GGCTCCGGAG CC ATG      55
                                     Met
                                     1

CAG GCC GAA GGC CAG GGC ACA GGG GGT TCG ACG GGC GAT GCT GAT GGC 103
Gln Ala Glu Gli Gln Gli Tre Gli Gli Ser Tre Gli Asp Ala Asp Gli
      5                      10                      15

CCA GGA GGC CCT GGC ATT CCT GAT GGC CCA GGG GGC AAT GCT GGC GGC 151
Pro Gli Gli Pro Gli Ile Pro Asp Gli Pro Gli Gli Asn Ala Gli Gli
      20                      25                      30

CCA GGA GAG GCG GGT GCC ACG GGC GGC AGA GGT CCC CGG GGC GCA GGC 199
Pro Gli Glu Ala Gli Ala Tre Gli Gli Arg Gli Pro Arg Gli Ala Gli
      35                      40                      45

GCA GCA AGG GCC TGG GGG CCG AGA GGA GGC GCC CCG CGG GGT CCG CAT 247
Ala Ala Arg Ala Ser Gli Pro Arg Gli Gli Ala Pro Arg Gli Pro His
      50                      55                      60                      65

GGC GGT GCC GCT TCT GCG CAG GAT GGA AGG TGC CCC TGC GGG GCC AGG 295
Gli Gli Ala Ala Ser Ala Gln Asp Gli Arg Cis Pro Cis Gli Ala Arg
      70                      75                      80

AGG CCG GAC AGC CGC CTG CTT CAG TTG CAC ATC AGG ATG CCT TTC TCG 343
Arg Pro Asp Ser Arg Leu Leu Gln Leu His Ile Tre Met Pro Fen Ser
      85                      90                      95

TCG CCC ATG GAA GCG GAG CTG GTC CGC AGG ATC CTG TCC CGG GAT GCC 391
Ser Pro Met Glu Ala Glu Leu Val Arg Arg Ile Leu Ser Arg Asp Ala
      100                      105                      110

GCA CCT CTC CCC CGA CCA GGG GCG GIT CTG AAG GAC TTC ACC GTG TCC 439
Ala Pro Leu Pro Arg Pro Gli Ala Val Leu Lis Asp Fen Tre Val Ser
      115                      120                      125
```

GGC AAC CTA CTG TTT ATC CGA CTG ACT GCT GCA GAC CAC CGC CAA CTG 487
Gli Asn Leu Leu Fen Ile Arg Leu Tre Ala Ala Asp His Arg Gln Leu
130 135 140 145

CAG CTC TCC ATC AGC TCC TGT CTC CAG CAG CTT TCC CTG TTG ATG TGG 535
Gln Leu Ser Ile Ser Ser Cis Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp
150 155 160

ATC AGG CAG TGC TTT CTG CCC GTG TTT TTG GCT CAG GCT CCC TCA GGG 583
Ile Tre Gln Cis Fen Leu Pro Val Fen Leu Ala Gln Ala Pro Ser Gli
165 170 175

CAG AGG CGC TAAGCCCAGC CTGGCGCCCC TTCCTAGGTC ATGCCTCCTC 632
Gln Arg Arg
180

CCCTAGGGAA TGGTCCCAGC ACGAGTGGCC AGTTCATTGT GGGGGCCTGA TTGTTTGTCTG 692

CTGGAGGAGG ACGGCTTACA TGTTTGTTC TGTAGAAAAT AAAGCTGAGC ACGAAAAA752

AAA 755

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ 10 NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 180 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TIPOLOGIA: linear

(ii) MOLÉCULA TIPO: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:7:

Met Gln Ala Glu Gli Gln Gli Tre Gli Gli Ser Tre Gli Asp Ala Asp
1 5 10 15

Gli Pro Gli Gli Pro Gli Ile Pro Asp Gli Pro Gli Gli Asn Ala Gli
20 25 30

Gli Pro Gli Glu Ala Gli Ala Tre Gli Gli Arg Gli Pro Arg Gli Ala
35 40 45

Gli Ala Ala Arg Ala Ser Gli Pro Arg Gli Gli Ala Pro Arg Gli Pro
50 55 60

His	Gli	Gli	Ala	Ala	Ser	Ala	Gln	Asp	Gli	Arg	Cis	Pro	Cis	Gli	Ala
65					70				75						80
Arg	Arg	Pro	Asp	Ser	Arg	Leu	Leu	Gln	Leu	His	Ile	Tre	Met	Pro	Fen
				85					90					95	
Ser	Ser	Pro	Met	Glu	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Arg	Ile	Leu	Ser	Arg	Asp
			100					105					110		
Ala	Ala	Pro	Leu	Pro	Arg	Pro	Gli	Ala	Val	Leu	Lis	Asp	Fen	Tre	Val
		115					120					125			
Ser	Gli	Asn	Leu	Leu	Fen	Ile	Arg	Leu	Tre	Ala	Ala	Asp	Ris	Arg	Gln
	130					135					140				
Leu	Gln	Leu	Ser	Ile	Ser	Ser	Cis	Leu	Gln	Gln	Leu	Ser	Leu	Leu	Met
145					150					155					160
Trp	Ile	Tre	Gln	Cis	Fen	Leu	Pro	Val	Fen	Leu	Ala	Gln	Ala	Pro	Ser
				165					170					175	
Gli	Gln	Arg	Arg												
			180												

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 8 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 755 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: dupla
- (D) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENSE: NÃO

(vi) FONTE DE ORIGEM:

- (A) ORGANISMO: Homo sapiens

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOME/CHAVE: CDS
- (B) LOCALIZAÇÃO: 51. .593

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:8:

Ser	Gli	Asn	Ile	Leu	Tre	Ile	Arg	Leu	Tre	Ala	Ala	Asp	His	Arg	Gln
130						135					140				
Leu	Gln	Leu	Ser	Ile	Ser	Ser	Cis	Leu	Gln	Gln	Leu	Ser	Leu	Leu	Met
145					150					155					160
Trp	Ile	Tre	Gln	Cis	Fen	Leu	Pro	Val	Fen	Leu	Ala	Gln	Pro	Pro	Ser
				165					170					175	
Gli	Gln	Arg	Arg												
			180												

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 18 nucleótidos
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENSE: NÃO

(vi) FONTE DE ORIGEM:

- (A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:10

GCCATGCAGG CCGAAGGC

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:11.:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 19 nucleótidos
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENSE: SIM

(vi) FONTE DE ORIGEM:

- (A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:11:

CTGGCCACTC GTGCTGGGA

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 12 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 18 nucleótidos

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIA: simples

(D) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENSE: NÃO

(vi) FONTE DE ORIGEM:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 12 :

GCAGGATGGA AGGTGCCC

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 13 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 17 nucleótidos

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIA: simples

(D) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENSE: NÃO

(vi) FONTE DE ORIGEM:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:13:

CCCCACCGCT TCCCGTG

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 14 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 (A) COMPRIMENTO: 20 nucleótidos
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADEIA: simples
 (D) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENSE: NÃO

(v) FONTE DE ORIGEM:
 (A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 14 :

GGCTGAATGG ATGCTGCAGA

Lisboa, 16 de Outubro de 2008.

REIVINDICAÇÕES

1. Uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica ou é complementar de uma molécula de ácido nucleico que codifica, um polipeptídeo associado a tumor LAGE-1 com uma sequência de aminoácidos **caracterizada por** ser pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:5 ou na SEQ ID NO:7.

2. A molécula de ácido nucleico isolada da reivindicação 1, **caracterizada por** a molécula de ácido nucleico compreender:

(a) a sequência de nucleótidos da SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO:6;

ou

(b) a região de codificação da sequência de nucleótidos da SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO:6.

3. A molécula de ácido nucleico isolada da reivindicação 1 ou 2, **caracterizada por** compreender uma variante alélica da molécula de ácido nucleico LAGE-1.

4. Uma molécula de ácido nucleico isolada **caracterizada por** codificar ou ser complementar de uma molécula de ácido nucleico que codifica, um polipeptídeo isolado selecionado de entre:

(a) polipeptídeos LAGE-1a com os aminoácidos 89-93, 71-93, 71-98, 89-98, 89-111 ou 71-111 da SEQ ID NO:7; e

(b) polipeptídeos LAGE-1b com os aminoácidos 142-148, 187-205, 164-179 ou 134-210 da SEQ ID NO:5.

5. A molécula de ácido nucleico isolada da reivindicação 4, **caracterizada por** a molécula de ácido nucleico compreender pelo menos 5 nucleótidos contíguos, sendo que a sua sequência não está presente na SEQ ID NO:8.

6. Um vector de expressão **caracterizado por** conter a molécula de ácido nucleico isolada de qualquer uma das reivindicações 1-5 operativamente ligado a um promotor.

7. Uma célula hospedeira transformada ou transfectada com o vector de expressão da reivindicação 6, **caracterizada por** a referida célula hospedeira, de preferência, também expressar uma molécula HLA.

8. Um polipeptídeo LAGE-1 **caracterizado por** ser codificado pela molécula de ácido nucleico isolada de qualquer uma das reivindicações 1-3.

9. O polipeptídeo da reivindicação 8, **caracterizado por** o polipeptídeo ser uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo que consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5, da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:7, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:7 com uma substituição de glutamina por arginina no resíduo 6, da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:7 com uma substituição de glutamina por ácido glutâmico no resíduo 89, e da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5 com uma substituição de arginina por triptofano 138.

10. Um polipeptídeo isolado **caracterizado por** ser seleccionado de:
(a) (a) polipeptídeos LAGE-1a com os aminoácidos 89-93, 71-93, 71-98, 89-98, 89-111 ou 71-111 da SEQ ID NO:7; e
(b) polipeptídeos LAGE-1b com os aminoácidos 142-148, 187-205, 164-179 ou 134-210 da SEQ ID NO:5.

11. Um polipeptídeo isolado, tal como reivindicado na reivindicação 10, **caracterizado por** o referido polipeptídeo se ligar a um agente de ligação a polipeptídeos.

12. Um polipeptídeo isolado, tal como reivindicado na reivindicação 11, **caracterizado por** o agente de ligação a polipeptídeos ser um anticorpo ou um linfócito T citotóxico.

13. Um anticorpo ou seu fragmento, ou um linfócito T citotóxico, **caracterizado por** se ligar selectivamente a uma proteína LAGE-1 codificada pela molécula de ácido nucleico isolada de qualquer uma das reivindicações 1-3 ou um peptídeo isolado tal como reivindicado nas reivindicações 10 a 12.

14. Um anticorpo ou seu fragmento tal como reivindicado na reivindicação 13, **caracterizado por** ser um fragmento Fab, F(ab')₂, Fv ou Fd de um anticorpo, um fragmento de um anticorpo que inclui a região selectiva CDR3 para a proteína LAGE-1, ou um anticorpo monoclonal.

15. Uma molécula de ácido nucleico isolada **caracterizada por** codificar o anticorpo ou fragmento de anticorpo da reivindicação 13 ou 14.

16. Um kit para detecção da presença da expressão de um precursor de polipeptídeo associado a tumores **caracterizado por** compreender um par de moléculas de ácido nucleico isoladas, cada uma do par consiste essencialmente numa molécula seleccionada do grupo que consiste (a) num segmento contíguo com 12-32 nucleótidos dos nucleótidos 1-993 da SEQ ID NO:4; (b) num segmento contíguo com 12-32 nucleótidos dos nucleótidos 1-746 da SEQ ID NO:6; (c) complementos de "(a)" e "(b)", em que os segmentos contíguos não se sobrepõem.

17. O kit da reivindicação 16 **caracterizado por** o par de moléculas de ácido nucleico isoladas ser construído e arranjado para amplificar selectivamente a molécula de ácido nucleico isolada da reivindicação 1, ou uma porção de ambas as SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO:6.

18. O kit da reivindicação 16 **caracterizado por** o par de moléculas de ácido nucleico isoladas serem primers PCR em que um dos primers é um segmento contíguo da SEQ ID NO:4 e outro dos primers é o complemento de um segmento contíguo da SEQ ID NO:4 ou um dos primers é um segmento contíguo da SEQ ID NO:6 e outro dos primers é o complemento de um segmento contíguo da SEQ ID NO:6.

19. Um método para diagnosticar cancro, em que o cancro é caracterizado pela expressão de uma molécula de ácido nucleico LAGE-1, tal como reivindicado na reivindicação 1, ou um produto da sua expressão **caracterizado por** compreender:

fazer contactar uma amostra biológica isolada de um sujeito com uma molécula de ácido nucleico complementar, uma molécula de ácido nucleico antisense, um anticorpo ou seu fragmento ou um linfócito T citolítico que se liga selectivamente a à molécula de ácido nucleico LAGE-1 da reivindicação 1, ou um seu produto de expressão, e

determinar a interacção entre a molécula de ácido nucleico complementar, a molécula de ácido nucleico antisense, o anticorpo ou seu fragmento ou o linfócito T citolítico e a molécula de ácido nucleico ou seu produto de expressão como determinação do distúrbio.

20. O método da reivindicação 19, **caracterizado por** o cancro ser melanoma.

21. O método da reivindicação 19, **caracterizado por** a molécula de ácido nucleico LAGE-1 compreender a SEQ ID.NO:4 ou a SEQ ID NO:6.

22. O método da reivindicação 19, **caracterizado por** a interacção ser determinada pela amplificação de pelo menos uma porção da molécula de ácido nucleico.

23. Uma composição **caracterizada por** conter um polipeptídeo LAGE-1 tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 8 a 12 que retém a capacidade funcional de ligação a HLA e/ou de interacção com linfócitos T citolíticos, com um anticorpo ou seu fragmento tal como reivindicado nas reivindicações 13 ou 14, ou uma molécula de ácido nucleico isolado tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 15, para ser usada como medicamento.

24. Utilização de um polipeptídeo isolado, tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 8 a 12, **caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar cancro num sujeito.

25. Utilização de células T citolíticas autólogas específicas para complexos de uma molécula HLA e um antígeno de rejeição de tumor **caracterizado por** ser seleccionado de entre:

(a) polipeptídeos LAGE-1a que compreendem os aminoácidos 89-93, 71-93, 71-98, 89-98, 89-111 ou 71-111 da SEQ ID NO:7; e

(b) polipeptídeos LAGE-1b que compreendem os aminoácidos 142-148, 187-205, 164-179 ou 134-210 da SEQ ID NO:5, na preparação de um medicamento para tratar cancro num sujeito.

26. Utilização de um polipeptídeo associado a tumor LAGE-1 com a sequência de aminoácidos da SED ID NO:5 ou SEQ ID NO:7 **caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar cancro num sujeito.

27. A utilização das reivindicações 24, 25 ou 26 **caracterizada por** ser na preparação de um medicamento para tratar cancro num sujeito.

28. Um método para enriquecer selectivamente uma população de células T com células T citolíticas, específicas para um antígeno de rejeição de tumor **caracterizado por** ser seleccionado de entre:

(a) polipeptídeos LAGE-1a que compreendem os aminoácidos 89-93, 71-93, 71-98, 89-98, 89-111 ou 71-111 da SEQ ID NO:7; e

(b) polipeptídeos LAGE-1b que compreendem os aminoácidos 142-148, 187-205, 164-179 ou 134-210 da SEQ ID NO:5 incluindo:

o contacto de uma população isolada de células T com uma célula que apresenta um complexo de um antígeno de rejeição de tumor que é seleccionado de entre:

(a) polipeptídeos LAGE-1a que compreendem os aminoácidos 89-93, 71-93, 71-98, 89-98, 89-111 ou 71-111 da SEQ ID NO:7; e

(b) polipeptídeos LAGE-1b que compreendem os aminoácidos 142-148, 187-205, 164-179 ou 134-210 da SEQ ID NO:5 e uma molécula que apresenta HLA numa quantidade suficiente para enriquecer selectivamente a população isolada de células T com as células T citolíticas.

29. Um método tal como reivindicado na reivindicação 28, **caracterizado por** o polipeptídeo associado a tumor LAGE-1 ser o polipeptídeo isolado tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 8 a 12.

30. Uma composição de vacina **caracterizada por** compreender: um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo associado a tumor LAGE-1 com uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:5 ou na SEQ ID NO:7; um polipeptídeo LAGE-1 com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:7 ou um polipeptídeo seleccionado de entre:

(a) polipeptídeos LAGE-la que compreendem os aminoácidos 89-93, 71-93, 71-98, 89-98, 89-111 ou 71-111 da SEQ ID NO:7; e

(b) polipeptídeos LAGE-lb que compreendem os aminoácidos 142-148, 187-205, 164-179 ou 134-210 da SEQ ID NO:5 ou células que expressem um ácido nucleico que codifique um polipeptídeo associado a tumor LAGE-1 com uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:5 ou na SEQ ID NO:7; ou um polipeptídeo LAGE-1 com a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:5 ou na SEQ ID NO:7 seleccionado de entre:

(a) polipeptídeos LAGE-la que compreendem os aminoácidos 89-93, 71-93, 71-98, 89-98, 89-111 ou 71-111 da SEQ ID NO:7; e

(b) polipeptídeos LAGE-lb que compreendem os aminoácidos 142-148, 187-205, 164-179 ou 134-210 da SEQ ID NO:5.

31. Uma vacina, tal como reivindicado na reivindicação 30, **caracterizado por** a referida vacina conter um ou mais adjuvantes e/ou citocinas.

Lisboa, 16 de Outubro de 2008.

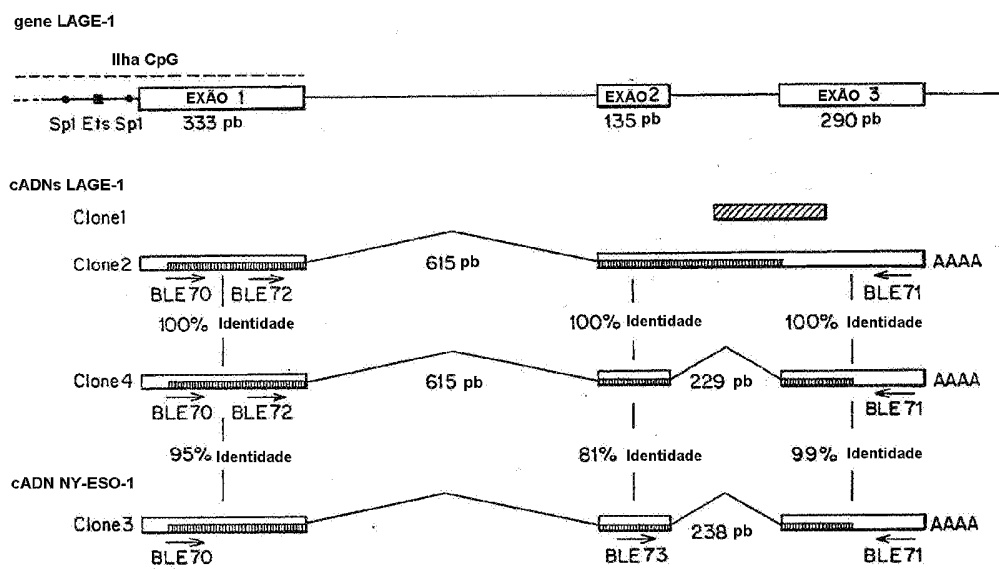


FIG. 1