

(11) Número de Publicação: **PT 1230261 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 7/06 (2007.10) **A61K 38/08** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2000.11.08	(73) Titular(es): LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH 605 THIRD AVENUE NEW YORK, NEW YORK 10158 US CHANCELLORS, MASTERS & SCHOLARS OF THE UNIVERSITY OF OXFORD GB
(30) Prioridade(s): 1999.11.15 US 440621 2000.02.25 US 514036 2000.09.29 US 676005	
(43) Data de publicação do pedido: 2002.08.14	
(45) Data e BPI da concessão: 2008.06.25 195/2008	(72) Inventor(es): DANILA VALMORI CH JEAN-CHARLES CEROTTINI CH PEDRO ROMERO CH VINCENZO CERUNDOLO GB PETER RODERICK DUNBAR NZ
	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **DERIVADOS NONAPEPTÍDICOS DE NY-ESO-1 E SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

RESUMO

"Derivados nonapeptídicos de NY-ESO-1 e suas utilizações"

O invento refere-se a péptidos variantes que se ligam a moléculas HLA, levando à lise de células através de linhas de células T citolíticas. As variantes baseiam-se em péptidos NY-ESO-1. Os péptidos podem ser incorporados em tetrâmeros imunitários, que são úteis como separadores de células T.

DESCRIÇÃO

"Derivados nonapeptídicos de NY-ESO-1 e suas utilizações"

CAMPO DO INVENTO

O presente invento refere-se a péptidos que se ligam a HLA derivados de um antigénio associado a cancro. Estes péptidos ligam-se a moléculas de classe I e provocam a lise das células às quais se ligam através de linfócitos T citolíticos.

ANTECEDENTES E ARTE PRÉVIA

Encontra-se razoavelmente bem estabelecido que muitas condições patológicas, tais como infecções, cancro, doenças auto-imunes, etc., são caracterizadas pela expressão inadequada de determinadas moléculas. Assim, estas moléculas funcionam como "marcadores" para uma determinada condição patológica ou anómala. Além da sua utilização como "alvos" de diagnóstico, ou seja materiais a serem identificados para diagnosticar estas condições anómalas, as moléculas funcionam como reagentes que podem ser utilizados para gerar agentes de diagnóstico e/ou terapêuticos. Um exemplo não limitativo de tal é a utilização de marcadores de cancro para produzir anticorpos específicos para um determinado marcador. Ainda um outro exemplo não limitativo é a utilização de um péptido que complexa com uma molécula de MHC, para gerar células T citolíticas contra células anómalas.

A preparação de tais materiais pressupõe obviamente uma fonte dos reagentes utilizados para os gerar. A purificação de células é um método laborioso e pouco seguro de o fazer. Outro método preferido é o isolamento de moléculas de ácido nucleico que codificam um determinado marcador, seguido pela utilização da molécula codificante isolada para expressar a molécula pretendida.

Até à data, têm sido utilizadas duas estratégias para a detecção destes antigénios em, por exemplo, tumores humanos. Estes serão referidos como a abordagem genética e a abordagem bioquímica. A abordagem genética é exemplificada, por exemplo por de Plaen et al. Proc. Natl. Sci. USA 85: 2275 (1988).

Nesta abordagem, transfectam-se várias centenas de conjuntos de plasmídeos de uma biblioteca de ADNc, obtida de um tumor, para células receptoras, tais como células COS, ou para variantes negativas relativamente ao antigénio de linhas celulares de tumor que são ensaiadas quanto à expressão do antigénio específico. A abordagem bioquímica, exemplificada, por exemplo, por O. Mandelboim, *et al.*, Nature **369**: 69 (1994), baseia-se na eluição ácida de péptidos que se ligaram a moléculas de MHC de classe I de células de tumor, seguida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase inversa. Os péptidos antigénicos são identificados após se ligarem a moléculas de MHC de classe I vazias de linhas celulares mutantes, deficientes no processamento do antigénio e induzem reacções específicas com linfócitos T citotóxicos. Estas reacções incluem indução de proliferação de CTL, libertação de TNF e lise de células alvo, mensuráveis num ensaio MTT ou num ensaio de libertação de ⁵¹Cr.

Estas duas abordagens à definição molecular de antigénios têm as seguintes desvantagens: em primeiro lugar, são muito incómodas, demoradas e dispendiosas; em segundo lugar, dependem do estabelecimento de linhas de células T citotóxicas (CTL) com especificidade predefinida.

Os problemas inerentes às duas abordagens conhecidas para a identificação e definição molecular de antigénios são bem demonstrados pelo facto de ambos os métodos terem conseguido, até agora, definir apenas muito poucos antigénios novos em tumores humanos. Consultar, por exemplo, van der Bruggen *et al.*, Science **254**: 1643-1647 (1991); Brichard *et al.*, J. Exp. Med. **178**:489-495 (1993); Coulie, *et al.*, J. Exp. Med. **180**: 35-42 (1994); Kawakami, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 3515-3519 (1994).

Além disso, as metodologias descritas baseiam-se na disponibilidade de linhas celulares estabelecidas permanentes do tipo de cancro em consideração. É muito difícil estabelecer linhas celulares de determinados tipos de cancros, tal como se apresenta, por exemplo, em Oettgen, *et al.*, Immunol. Allerg. Clin. North. Am. **10**: 607-637 (1990). Também se sabe que alguns tipos de cancros de células epiteliais são pouco susceptíveis a CTL *in vitro*, excluindo análise de rotina. Estes problemas

têm estimulado a arte para o desenvolvimento de metodologias adicionais para identificar antigénios associados a cancro.

Descreve-se uma metodologia chave em Sahin, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11810-11913 (1995). Consultar também a patente U.S. 5 698 396. Resumidamente, o método envolve a expressão de bibliotecas de ADNc num hospedeiro procariótico. (As bibliotecas são obtidas de uma amostra de tumor.) As bibliotecas expressas são então rastreadas imunologicamente com soros absorvidos e diluídos, de modo a detectar os antigénios que desencadeiam respostas humorais com título elevado. Esta metodologia é conhecida como o método SEREX ("Serological identification of antigens by Recombinant Expression Cloning"). A metodologia tem sido utilizada para confirmar a expressão de antigénios associados a tumores previamente identificados, bem como para detectar outros novos. Consultar os pedidos de patente referidos acima e Sahin, *et al.*, *supra*, bem como Crew, *et al.*, EMBO J 14: 2333-2340 (1995).

A metodologia SEREX tem sido aplicada a amostras de cancro do esófago e foi agora identificado um antigénio e a molécula de ácido nucleico que o codifica foi isolada e clonada. Consultar, por exemplo, patente U.S. 5 804 381 *supracitada*. Verificou-se que o antigénio e formas truncadas são reactivos com anticorpos do soro de doentes de cancro. Também se verificou que os péptidos derivados desta molécula se ligam a moléculas MHC, provocando respostas de células T citolíticas e de células T auxiliadoras. Verificou-se que também se podem utilizar variações destes péptidos.

Uma das dificuldades na área da imunologia do cancro é a falta de protocolos fiáveis que possam ser usados para identificar e quantificar respostas de linfócitos T citolíticos *in vivo*. Consequentemente, é difícil caracterizar a resposta imunitária e monitorizar ensaios de vacinas. Verificou-se que a análise de células T citolíticas é altamente facilitada pela utilização de complexos contendo vários alvos de células T. Mais especificamente, estes complexos baseiam-se na avidéz conhecida dos dois parceiros de ligação, tais como avidina ou estreptavidina e biotina, um pelo outro. É bem sabido que cada molécula de

avidina/estreptavidina se pode ligar a quatro moléculas de biotina. São conhecidas construções em que se utiliza o sistema avidina/estreptavidina-biotina para formar complexos contendo alvos múltiplos para células T citolíticas, ou seja vários complexos imunitários que incluem uma molécula de MHC, tal como uma molécula de HLA, uma microglobulina $\beta 2$ e um péptido que se liga à molécula de HLA. O complexo é marcado e pode ser utilizado para isolar ou para determinar células T citolíticas de interesse numa amostra. Tais complexos foram utilizados no invento seguinte. Jaeger *et al.*, J. Exp. Med., JP, 187(2):265-270 (1998) descreve o péptido SLLMWITQC como um péptido que provoca lise de células T2 tal como avaliado por um ensaio padrão de libertação de ^{51}Cr .

DESCRIÇÃO SUCINTA DAS FIGURAS

A figura 1 apresenta dados relativos à antigenicidade de péptidos e análogos peptídicos relacionados com NY-ESO-1.

As figuras 2A e 2B apresentam, respectivamente, os resultados relativos à imunogenicidade *in vitro* de péptidos e análogos de NY-ESO-1 (2A) e os resultados de ensaios ELISPOT (2B).

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS

Exemplo 1

A análise de NY-ESO-1, tal como discutida, por exemplo, em patente U.S. 5 804 381, evidenciou que uma molécula apresentadora para este antigénio foi HLA-A2. Assim, efectuou-se um rastreio da sequência de aminoácidos de NY-ESO-1, para identificar todos os péptidos que satisfazem este motivo de ligação HLA-A2 utilizando o modelo apresentado por D'Amaro *et al.*, Human Immunol. 43: 13-18 (1995) e Drijfhout. *et al.*, Human Immunol. 43: 1-12 (1995). Os péptidos correspondentes a todas as sequências de aminoácidos assim deduzidas foram sintetizados, utilizando técnicas padrão, e foram então utilizados em ensaios de citotoxicidade, segundo Knuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3511-3515 (1984). Especificamente, foi utilizada a linha celular CEMX721.174.T2 (doravante "T2"), porque expressa HLA-A2, mas não processa

antigénios para péptidos complexados com MHC, tornando-a assim ideal para experiências do tipo aqui descrito. Marcaram-se amostras de células T2 com 100 μ Ci de Na(^{51}Cr)O₄, utilizando métodos padrão e foram então lavadas três vezes seguido por incubação com péptido a 10 μ g/ml e β 2-microglobulina a 2,5 μ g/ml. A incubação foi durante uma hora, à temperatura ambiente. Seguidamente adicionaram-se células sensíveis (100 μ l de uma suspensão de CTL NW38-IVS-1), a uma razão efector/alvo de 90:1 e incubaram-se durante quatro horas numa atmosfera saturada em água, com CO₂ a 5%, a 37°C. Seguidamente, centrifugaram-se as placas a 200xg durante cinco minutos, removeram-se 100 μ l de sobrenadante e mediu-se a radioactividade. Determinou-se a percentagem de libertação de ^{51}Cr de acordo com estratégias bem conhecidas, verificou-se que os péptidos SLLMWITQCFL (SEQ ID NO:1), SLLMWITQC (SEQ ID NO:2) e QLSELLMWIT (SEQ ID NO:3) foram os três melhores estimulantes de CTL específicos de NY-ESO-1 restringidos por HLA-A2. Obtiveram-se resultados comparáveis quando se utilizaram NW-MEL-38 e linhas celulares SK-MEL-37 e MZ-MEL-19 como alvos.

Exemplo 2

No próximo conjunto de experiências confirmou-se a capacidade das SEQ ID NOS: 1, 2 e 3 se ligarem a moléculas de HLA-A2 e provocarem lise de CTL.

Obtiveram-se amostras de nódulos linfáticos ou lesões de metástases de um doente com melanoma em progressão lenta com metástases recorrentes, todos eles localizados na mesma região paravertebral. A transcrição reversa de ARN obtido de um tumor do indivíduo indicou que este expressava NY-ESO-1. Além disso, o soro do doente indicou títulos elevados de anticorpos anti-NY-ESO-1.

Os nódulos linfáticos ou lesões de metástases removidos cirurgicamente foram finamente divididos em meio RPMI 1640 estéril que tinha sido suplementado com soro de vitelo fetal a 10%. Plaquearam-se suspensões das células em placas de cultura de 24 poços, em 2 ml de meio Iscove da Dulbecco, suplementado com Asn 0,24 mM, Arg 0,55 mM, Gln 1,5 mM, conjunto de soros A+ humanos a 10%, IL-2 a 100 U/ml e IL-7 a 10 ng/ml. As células

foram cultivadas durante 2-3 semanas, antes de serem ensaiadas através de ELISPOT de IFN- γ , de acordo com Czerkinsky. *et al.* J. Immunol. Meth 110:29 (1998). Sucintamente, combinaram-se 2×10^3 células/poço da cultura a curto prazo referida acima com 5×10^4 células T2/poço ou com o mesmo número de células T2, mais 1 μ M de uma das SEQ ID NOS: 1-3. Cada cultura foi efectuada em duplicado.

Contou-se um número médio de 19 manchas nas culturas de controlo, 424 manchas com SEQ ID NO:2, 358 manchas com SEQ ID NO:3 e 396 com SEQ ID NO:1. Estes números elevados correspondem a uma frequência de cerca de 1 célula T específica de NY-ESO-1 por 20 linfócitos infiltrados em tumor. As células T reactivas foram então cultivadas até serem monoclonais de acordo com Valmori, *et al.* J. Immunol 161:6956 (1998). Verificou-se que cinco dos 24 clones derivados de TIL derivados de TIL são reactivos com péptidos derivados de NY-ESO-1, quando estes foram ensaiados através de ensaios CTL tal como descrito acima.

Exemplo 3

Nestas experiências, ensaiou-se CTL ESO5, referido acima, para a sua capacidade de lisar células A2⁻ que expressam ou que não expressam NY-ESO-1. Ensaaiaram-se as linhas celulares NA8-MEL (A2⁻, NY-ESO-1⁻), SK-MEL37 (A2⁻, NY-ESO-1⁻) e Me 275 (A2⁻, NY-ESO-1⁻) em ensaios de libertação de ⁵¹Cr tal como descrito acima.

Os resultados indicaram que NA8-Mel foi lisada quando se adicionou péptido NY-ESO-1 SEQ ID NO:2, mas não na sua ausência. A presença ou ausência de SEQ ID NO:2 foi irrelevante para a lise de SK-MEL 37 e Me 275, tendo sido ambas lisadas em todas as condições. Estes resultados indicam que CTL ESO 5 reconhece SEQ ID NO:2 quando adicionado exogenamente e apresentado endogenamente.

Exemplo 4

Efectuaram-se então experiências para determinar quais das SEQ ID NOS: 1, 2 e 3 constituíam o epítipo óptimo de células T para reconhecimento por CTL. Para determinar tal, ensaiaram-se

péptidos sintéticos correspondentes a SEQ ID NOS: 1, 2 e 3 num ensaio de ligação de competição funcional e seguidamente para reconhecimento por CTL específicos.

O ensaio de ligação de competição funcional utilizado é o ensinado por Valmori, *et al.*, J. Immunol **161**:6956-6962 (1998), mas aqui desenvolvido.

Sabe-se que o péptido YMDGTMSQV (SEQ ID NO:4) se liga a moléculas HLA-A*0201 e provoca lise por um clone de CTL restringido por HLA-A*0201, conhecido como LAU 132/2. Consultar Valmori, *et al.*, Canc. Res. **59**:2167 (1999). Marcaram-se células T2 com ⁵¹Cr, na presença de anticorpo monoclonal anti-classe 1 W6/32. Incubaram-se concentrações variadas de SEQ ID NO:1, 2 ou 3 (50 µl) com 50 µl de amostras das células marcadas (1000 células/poço), durante 15 minutos à temperatura ambiente. Seguidamente, adicionou-se uma dose sub-ótima (1 nM) de SEQ ID NO:4 (50 µl), conjuntamente com 50 µl das células T (5000 células/poço). Mediu-se a libertação de ⁵¹Cr após 4 horas de incubação a 37°C. Determinou-se então a concentração de cada péptido necessária para obter 50% de inibição de lise de célula alvo como [nM] 50%. De modo a facilitar a comparação, calculou-se a actividade competitiva relativa de cada péptido como [nM] 50% do péptido de referência FluMA 58-66 (SEQ ID NO:5 GILGFVFTL), que é um ligando conhecido de elevada afinidade de HLA-A*0201, dividido pelo valor de [nM] 50% determinado para os péptidos de ensaio.

Os resultados indicaram que a SEQ ID NO:3 foi um competidor 100 vezes menos eficaz do que SEQ ID NO:4. Além disso, SEQ ID NO:2 foi 250 vezes menos eficaz. Surpreendentemente, dado os seus comprimentos de péptido respectivos, SEQ ID NO:1 foi 10 vezes mais competitivo do que SEQ ID NO:2.

Estes resultados sugerem que a cisteína, como aminoácido do terminal carboxilo ou SEQ ID NO:2 foi a causa de ligação fraca a moléculas de HLA-A2. Para investigar tal, prepararam-se três derivados de SEQ ID NO:2, substituindo a cisteína do terminal carboxilo por diferentes aminoácidos hidrófobos contendo cadeias laterais não polares, tais como alanina, leucina ou valina (SEQ ID NOS: 6-8, respectivamente).

Efectuou-se o ensaio de competição funcional descrito acima com cada um destes péptidos. Os resultados apresentam-se na tabela 1, que se segue. Todas as substituições aumentaram clara e drasticamente a ligação do péptido, para todos os três péptidos substituídos, indicando que qualquer resíduo hidrófobo naquela posição teria um efeito semelhante.

TABELA 1

Péptido	Sequência	Actividade relativa de competidor
Matriz de influenza A		
58-66	GILGFVFTL	1
NY-ESO-1:		
155-163	QLSLLMWIT	0,01
157-167	SLLMWITQCFL	0,04
157-165	SLLMWITQC	0,004
157-C165A	SLLMWITQA	0,4
157-C165L	SLLMWITQL	0,5
157-C165V	SLLMWITQV	10

Exemplo 5

Tal como indicado, acima, os péptidos aqui descritos foram ensaiados para reconhecimento por CTL específicos. Nestas experiências, marcaram-se células alvo T2 com ^{51}Cr durante 1 hora, a 37°C , e seguidamente foram lavadas duas vezes. Incubou-se então a amostra (1000 células marcadas em 50 μl) com concentrações variadas de péptido, durante 15 minutos. Adicionaram-se então células efectoras (50 μl). Estas células efectoras são CTL específicos de ES01 clone ES05. A razão linfócito:alvo foi de 30:1. Mediu-se a libertação de crómio após 4 horas de incubação a 37°C , por ensaio de amostras de 100 μl de sobrenadante.

A percentagem de lise específica foi calculada como:

$$100 \times \frac{[(\text{libertação experimental} - \text{libertação espontânea})]}{(\text{libertação total} - \text{libertação espontânea})}$$

Os resultados, que se seguem na tabela 2, são apresentados como concentração nanomolar de péptido que dá 50% da actividade máxima. Também se apresenta na tabela 2 o valor de "actividade antigénica relativa", que é calculada como [nM] 50% do péptido SEQ ID NO:2 dividida por [nM] 50% do péptido de ensaio. O reconhecimento dos péptidos análogos por CTL foi comparável ou melhor do que a do péptido parental. Estes resultados demonstram que, entre os péptidos NY-ESO-1 naturais, SEQ ID NO:2 foi o péptido antigénico reconhecido optimamente. Além disso, dos péptidos substituídos, SEQ ID NO:8 foi reconhecido tão eficazmente como SEQ ID NO:2 e os outros foram reconhecidos mais eficazmente. SEQ ID NO:6 foi reconhecido 1000 vezes mais eficazmente do que SEQ ID NO:2.

TABELA 2

Sequência de péptido	Péptido ([nM] 50%)	Actividade antigénica relativa
SLLMWITQC	0,6	1
SLLMWITQA	0,0005	1,200
SLLMWITQL	0,01	60
SLLMWITQV	1	0,6
QLSLLMWIT	50	0,012
SLLMWITQCFL	50	0,012

Exemplo 6

Esta experiência descreve a técnica básica para preparar complexos tetraméricos de antígeno, utilizados nos exemplos que se seguem. De modo a preparar os tetrâmeros pretendidos, foi primeiramente necessário preparar construções que codificariam moléculas HLA-A*0201 modificadas. Para fazer tal, extraiu-se ARN total de células positivas para HLA-A*0201 e clonou-se então HLA-A*0201, utilizando iniciadores específicos para a molécula e seguiu-se a reacção de polimerização em cadeia com transcrição reversa (RT-PCR). Altman *et al.*, Science 274: 94-96 (4 de Outubro de 1996) mas com um novo iniciador a 3', ou seja 5'-GCAGGATCCCGGCTCCCATCCTCAGGGTGAGGGGC-3' (SEQ ID NO:9). Simultaneamente a RT-PCR, alterou-se a sequência de nucleótidos do terminal amino para otimizar a expressão de proteína no vector utilizado. Consultar Garboczi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3429

(1992). Uma vez tal feito, amplificou-se a parte de codificação extracelular da molécula, uma vez mais utilizando iniciadores específicos. A construção resultante foi reclonada num vector que produziria um local de reconhecimento de biotinylation BirA em quadro na extremidade 3' da cadeia pesada de HLA-A*0201. Sobre-expressaram-se a HLA-A*0201 modificada e microglobulina $\beta 2$ em culturas de *E. coli* independentes. Os corpos de inclusão resultantes foram purificados e as proteínas recombinantes HLA e microglobulina $\beta 2$ foram solubilizadas em ureia e seguidamente re-enroladas numa solução de re-enrolamento, a 4°C para formar complexos. (A solução de re-enrolamento continha Tris 100 mM, a pH 8,0, L-arginina 400 mM, EDTA 2 mM, glutathione reduzida 5 mM, glutathione oxidada 0,5 mM, PMSF 0,1 mM, cadeia pesada de HLA e microglobulina $\beta 2$ 1 μ M e o péptido de interesse 10 μ M). A solução de re-enrolamento foi concentrada a 7,5 ml, utilizando técnicas padrão. Seguidamente, trocou-se o tampão de re-enrolamento por tampão de reacção BirA (Tris 100 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, MgCl₂ 5 mM, PMSF 100 μ M, leupeptina 1 μ M e pepstatina 1 μ M), tendo-se adicionado estas três últimas imediatamente antes de utilizar.

Os complexos foram então biotinilados com biotina holoenzima sintase (a enzima BirA) por combinação da mistura de re-enrolamento contendo o complexo HLA-A2 com enzima 50 μ M, biotina 100 mM em Tris 200 mM e adenosina trifosfato 100 mM. A mistura foi incubada durante a noite à temperatura ambiente. Os complexos biotinilados foram então purificados e combinados com estreptavidina marcada com ficoeritrina, para produzir estruturas tetraméricas. Estas foram isoladas e reconstituídas em volumes pequenos, a uma concentração de 1 mg/ml.

Exemplo 7

Estas experiências foram concebidas para avaliar a frequência de células T específicas de NY-ESO-1. Prepararam-se tetrâmeros fluorescentes de biotina, HLA-A2 e péptidos de acordo com Romero, et al. J. Exp. Med. 188:641 (1998) e Altman, et al, Science 274:94 (1996), exemplo 6, acima. Como péptidos antigénicos utilizaram-se o Flu Ma 58-66 (SEQ ID NO:5) e o derivado ESO-1 utilizando alanina como terminal carboxilo (SEQ ID NO:6). Este derivado foi seleccionado devido

à sua elevada afinidade, dado que a ligação com elevada afinidade a HLA-A2 facilita a geração de tetrâmeros estáveis.

Após a montagem de tetrâmeros, combinaram-se clones CTL específicos para os péptidos com os tetrâmeros adequados em 20 µl de PBS com FCS a 2% e incubaram-se à temperatura ambiente durante 1 hora, seguido por adição de 20 µl de anticorpos anti-CD8 marcados com FITC ou uma mistura de anticorpos anti-CD8 marcados com FITC e anticorpos anti-CD45RA marcados com "CYC". Esta mistura foi incubada durante 30 minutos a 4°C, após o que se lavaram as células no mesmo tampão tal como descrito acima e seguidamente analisaram-se por citometria de fluxo.

Os tetrâmeros do derivado NY-ESO-1 (SEQ ID NO:6) coraram especificamente ESO 5, mas não coraram células T específicas para FluMa e vice versa.

Exemplo 8

Estas experiências foram concebidas para validar a utilização de tetrâmeros que contêm péptidos NY-ESO-1 na detecção e isolamento de células T específicas de NY-ESO-1.

Uma amostra enriquecida em células T CD8⁺ que tinha sido estimulada com SEQ ID NO:2 ou com a substituição com alanina terminal (SEQ ID NO:6). (A estimulação foi efectuada por carregamento de antígenos autólogos que apresentam células com o péptido de interesse).

Prepararam-se tetrâmeros, tal como descrito acima, e utilizaram-se para corar as células CD8⁺ catorze dias após a estimulação. As células foram seleccionadas e ensaiadas por ELISPOT de IFN-γ, tal como descrito acima.

Verificou-se que apenas as células de tetrâmero CD8⁺ continham células produtoras de IFN-γ.

Expandiram-se células CD8⁺ tetrâmero e CD8⁺ tetrâmero seleccionadas durante duas semanas através de estimulação com PHA e ambas as populações foram ensaiadas num ensaio de

libertação de ^{51}Cr em células Me 275 e T2, descritas acima, que tinham ou não sido submetidas a impulsos com SEQ ID NO:2.

Somente as células CD8⁺ tetrâmero foram eficazes a matar tanto as células sujeitas a impulsos com SEQ ID NO:2, como células sujeitas a impulsos com o análogo de alanina.

Exemplo 9

Estas experiências foram concebidas para determinar se o antigénio NY-ESO-1 é processado intracelularmente para produzir um péptido que se apresenta por moléculas HLA-A2, que por seu lado estimula lise por CTL.

Prepararam-se tetrâmeros, tal como descrito no exemplo 6, acima, utilizando o péptido de SEQ ID NO:2. Estes tetrâmeros foram então utilizados para corar uma amostra de células obtidas de um doente a quem foi previamente diagnosticado positivamente um melanoma NY-ESO-1. Consultar Dunbar, *et al.*, *J. Immunol* 162(12):6959-62 (1999). Sucintamente, contudo, coraram-se amostras de linfócitos de sangue periférico ("PBL") com tetrâmeros durante 15 minutos a 37°C, seguido por lavagem em PBS/FCS a 1% a 37°C, seguido por incubação com um anticorpo anti-CD8 marcado durante 30 minutos, em gelo. As células foram então lavadas três vezes, em PBS/FCS a 1% gelado e foram então analisadas por citometria de fluxo. Clonaram-se as células positivas, através de impulso das células positivas com o péptido de SEQ ID NO:2 10 µM e cultura em IL-2 (200 u/ml) durante 5 dias.

Expandiram-se quatro destes CTL positivos e ensaiaram-se nas experiências seguintes.

Exemplo 10

Os CTL descritos acima foram então ensaiados para especificidade de morte. Para tal, combinaram-se amostras de uma linha celular previamente tipificada como positiva para NY-ESO-1, uma linha celular previamente tipificada como negativa para NY-ESO-1, amostras de células T2 que tinham sido submetidas a impulsos com o péptido de SEQ ID NO:2 1 µM e amostras de células T2 não submetidas a impulsos com os CTL,

em razões efector/alvo 1:1 e 0,3:1. Determinou-se a morte utilizando o ensaio de libertação de ^{51}Cr descrito acima.

Os resultados indicaram que tanto as células positivas para NY-ESO-1, como as células T2 submetidas a impulsos com SEQ ID NO:2 foram mortas, enquanto as outras não o foram, demonstrando que o processamento intracelular de NY-ESO-1 resulta na geração de um péptido que é reconhecido por CTL específicos de SEQ ID NO:2.

Exemplo 11

As experiências neste exemplo foram concebidas para determinar se uma mistura de CTL diferentes foi responsável pelos resultados positivos obtidos com SEQ ID NOS: 1, 2 e 3, ou se um único clone de CTL reconheceu todos os péptidos. Nestas experiências, sujeitaram-se células T2 a impulsos com um de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:1 ou um péptido que consiste nos aminoácidos 157-166 de NY-ESO-1, ou seja:

SLLMWITQCF

(SEQ ID NO:11). Também se ensaiou SEQ ID NO:3, bem como um péptido que consiste nos primeiros 8 aminoácidos de SEQ ID NO:1. Utilizaram-se várias concentrações de péptido para os impulsos para as células T2. Como um controlo, utilizou-se SEQ ID NO:5. Utilizou-se o mesmo ensaio de libertação de ^{51}Cr descrito acima. Antes de ensaiar os CTL, estes foram ensaiados para determinar de cada um deles expressa um único receptor de célula T.

Os resultados indicaram que todas as células T reconheceram as SEQ ID NOS:2, 3 e 11, mas não reconheceram SEQ ID NO:1 ou o péptido truncado 157-164, ou seja um péptido que consiste nos primeiros 8 aminoácidos de SEQ ID NO:11. Tal indica que todos os três péptidos foram reconhecidos pelos CTL clonais.

Exemplo 12

As experiências descritas neste exemplo foram concebidas para determinar os requisitos de processamento intracelular para gerar o péptido de SEQ ID NO:2.

Cerundolo, et al. Nature 345(6274):449-52 (1990) descreveram células de processamento mutantes que são caracterizadas por terem blocos definidos nas vias de processamento de MHC I. Estas células foram utilizadas nestas experiências. Especificamente, utilizou-se uma linha celular parental, ou seja "linha 45", bem como "linha 174" que foi negativa para TAP, LMP2 e LMP7, um transfectante da linha 174, em que a linha foi transfectada com vectores que codificam TAP1 e TAP2 e um transfectante de linha 174 que tinha sido transfectado com vectores que codificam TAP1, TAP2 e LMP7. (A abreviatura "TAP" refere-se a "transportador associado com processamento de antigénio" e a abreviatura "LMP" refere-se a "glicoproteína de baixa massa molecular").

Além dos transfectantes descritos acima, todas as células foram transfectadas com construções de vírus *vaccinia* que codificam NY-ESO-1, a uma multiplicidade de infecção (M.O.I.) de 5, durante 90 minutos.

Como controlos, suspenderam-se números equivalentes de células (10^6 células) em 50 µl de meio contendo lactacistina 100 µM, durante 1 hora antes da adição de construções de vírus *vaccinia*. Após o período de infecção de 90 minutos, lavaram-se as células e suspenderam-se em 5 ml de meio contendo lactacistina 1 µM e cultivaram-se durante a noite para permitir a expressão do vector de *vaccinia*. LMP2 e LMP7 são subunidades de proteossoma.

As células foram então combinadas com CTL num ensaio de libertação de ^{51}Cr do tipo descrito acima.

Os resultados indicaram que a expressão de *vaccinia* que codifica NY-ESO-1 em células deficientes em TAP não as sensibilizou para lise por CTL. Por outro lado, a presença ou ausência das subunidades de proteossoma LMP2 e LMP7 não impediu a apresentação de um epítipo reconhecido por CTL. Os controlos confirmam isto porque as células 174/TAP não apresentaram o péptido de SEQ ID NO:5 que se sabe ser dependente de LMP7 para apresentação, enquanto que a transfecção com um vector que codifica LMP7 ou a adição de lactacisteína eliminou o bloqueio de apresentação.

Estes resultados sugerem fortemente que está envolvida uma protease não proteossômica na apresentação do epítipo NY-ESO-1.

Exemplo 13

Estas experiências foram concebidas para determinar se os análogos de péptido de SEQ ID NO:2, preparados por modificação do resíduo de cisteína do terminal C, tinham alterado a imunogenicidade. Efectuaram-se ensaios de libertação de ⁵¹Cr do tipo acima, no qual se combinaram o péptido (SEQ ID NO:2) e células alvo com ditiotretal (DTT) ou TCEP (Tris 2-carboximetilfosfina) 200 µM.

Os resultados indicam que, na presença de agente redutor, a antigenicidade de SEQ ID NO:2 aumentou 10 vezes. Efectuaram-se experiências em paralelo com SEQ ID NO:8 e não houve qualquer aumento da antigenicidade.

Exemplo 14

Os resultados verificados no exemplo 13 acima sugeriram o ensaio de péptidos modificados. Além dos péptidos de SEQ ID NOS:7 e 8, sintetizou-se um péptido de fórmula:

SLLMWITQI (SEQ ID NO:12),

bem como os seguintes 10 meros:

SLLMWITQCV (SEQ ID NO:13)

SLLMWITQCF (SEQ ID NO:11, descrita acima)

SLLMWITQCI (SEQ ID NO:14)

SLLMWITQAL (SEQ ID NO:15)

SLLMWITQAI (SEQ ID NO:16)

SLLMWITQAF (SEQ ID NO:17)

Adicionalmente, preparou-se SEQ ID NO:2 em que a cisteína do terminal C foi modificada com uma cadeia lateral -NH₂-CO-CH₂. Todos estes péptidos foram ensaiados em ensaios CTL do tipo descrito acima. Os péptidos de SEQ ID NOS:7, 8 e 12

aumentam todos o reconhecimento por CTL específicos de NY-ESO-1 157-165 cerca de 1000 vezes comparativamente a SEQ ID NO:2. O péptido de SEQ ID NO:14 foi também reconhecido mais eficazmente do que SEQ ID NO:2.

Exemplo 15

Nestas experiências, ensaiou-se a capacidade de diferentes análogos de péptido estimularem proliferação de CTL específicos de NY-ESO-1.

Sucintamente, obtiveram-se PBL de dois doentes de melanoma que apresentavam títulos elevados de anticorpos específicos de NY-ESO-1, utilizando um ensaio padrão. Estes PBL foram então estimulados com SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:8, 100 nM ou 10 nM seguindo protocolos padrão. Ao longo de um período de duas semanas, SEQ ID NO:8 resultou numa expansão 14 vezes maior de CTL específicos de NY-ESO-1. Ao longo de um período de 3 semanas, a expansão foi 54 vezes maior do que a obtida utilizando SEQ ID NO:2. Estes CTL foram corados com tetrâmeros do tipo descrito acima, utilizando SEQ ID NO:2 e a coloração foi positiva, indicando que os CTL reconheceram os epítomos NY-ESO-1 relevantes.

É notável que SEQ ID NO:8 10 nM estimulou os CTL, enquanto de facto foram necessárias quantidades superiores de péptido nativo. Além disso, em experiências de seguimento utilizando metodologias padrão, determinou-se que os CTL expandidos descritos neste exemplo foram capazes de matar células de tumor positivas para NY-ESO-1.

Exemplo 16

Estas experiências foram concebidas de modo a avaliar a reactividade de tetrâmeros com péptidos derivados de NY-ESO-1, tal como descrito acima.

Prepararam-se tetrâmeros tal como descrito nos exemplos 6 e 7, utilizando o péptido de SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:6. Estes foram então ensaiados para a sua capacidade para corar um clone de CTL que se sabe que reage com complexos de HLA-A2 e um péptido derivado de NY-ESO-1. Consultar, por exemplo,

Valmori. *et al.* Canc. Res. (2000). A coloração foi efectuada tal como descrito acima.

Os resultados indicaram que ambos os tetrâmeros coraram clones CTL de uma forma dependente da dose. À dose mais elevada de péptidos ensaiada (100 µg/ml), a intensidade de fluorescência foi 10^3 acima do ruído de fundo. A concentração de tetrâmero necessária para sinalização fluorescente de intensidade intermédia foi de cerca de 12 µg/ml para tetrâmeros utilizando SEQ ID NO:2 e 3 µg/ml de SEQ ID NO:6.

Um estudo adicional examinou a coloração de uma cultura em massa de 14 dias de linfócitos de sangue periférico, seguido de estimulação com SEQ ID NO:2, tal como descrito acima. A intensidade de fluorescência média foi equivalente para os dois tetrâmeros, para várias populações policlonais diferentes. Doravante, quando se referirem tetrâmeros, estes utilizam SEQ ID NO:2.

Exemplo 17

Este exemplo descreve o isolamento de linfócitos T citolíticos adicionais específicos para complexos de molécula de HLA-A2 e SEQ ID NO:2.

Isolaram-se células mononucleares de sangue periférico ("PBMC") de dois doentes de melanoma que eram positivos para HLA-A*0201. Separaram-se as células CD8⁺ através de separação de células magnética, utilizando pérolas magnéticas revestidas com anticorpos específicos para CD8. As células CD8⁺ foram irradiadas (3000 rads) e seguidamente utilizadas como células apresentadoras de antígeno ("APC"). As células CD8⁺ foram estimuladas por combinação de cerca de 1×10^8 células/poço com $2-4 \times 10^6$ APC e o péptido de SEQ ID NO:2 1 µM. As células e péptidos foram cultivados em 2 ml de meio Iscove da Dulbecco, suplementado com Asn 0,24 mM, Arg 0,55 mM, Gln 1,5 mM, conjunto de soro A⁺ humano a 8%, IL-2 humana recombinante (100 U/ml) e IL-7 humana recombinante (10 ng/ml). As células foram estimuladas todas as semanas e após dois ciclos de estimulação semanal, as duas culturas ensaiadas revelaram CD8 9,8% e 2,5%, linfócitos positivos a tetrâmero HLA-A2/NY-ESO-1.

As culturas positivas foram então ensaiadas para encontrar CTL positivos para complexos tetraméricos contendo SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:6. Os que foram positivos para ambos foram seleccionados e clonados através de diluição limitante. Seleccionaram-se dois clones como representativos da população completa. Estes serão referidos doravante como LAU 155/18 e LAU 50/13. Estes, conjuntamente com a linha celular LAU 156/5, descrita por Valmori, *et al. supra*, foram utilizados nas experiências seguintes.

Exemplo 18

Os três clones de CTL específicos de HLA-A2/NY-ESO-1 descritos no exemplo anterior foram ensaiados para a sua capacidade de lisar células alvo, utilizando o ensaio de libertação de ⁵¹Cr descrito nos exemplos 1 e 3 acima. Todas as três linhas foram capazes de lisar as células T2 deficientes em TAP descritas acima eficazmente após terem sido sujeitas a impulsos com concentrações de saturação de SEQ ID NO:2. Verificou-se lise a metade do máximo a uma razão de 3:1 de linfócitos/células alvo.

Os três clones foram também capazes de lisar a linha celular de melanoma Me 275 eficazmente. Esta linha celular foi derivada de uma metástase de nódulo linfático obtida do mesmo doente de onde foi derivada uma das três linhas de CTL, ou seja, é autóloga a uma destas. Esta linha celular de melanoma expressa bons níveis de proteína NY-ESO-1, ARNm e também expressa o gene homólogo LAGE-1, revelado por Lethe, *et al*, patente U.S. 5 811 519.

Nenhum destes CTL reconheceu a linha celular alogénica Me 242, também descrita acima. Esta linha também expressa NY-ESO-1 e LAGE, mas é negativa para HLA-A2.

Conjuntamente, estes dados indicam que os três clones CTL são específicos de NY-ESO-1/HLA-A2 e reagem com tumor.

Exemplo 19

Estas experiências descrevem um ensaio de competição funcional utilizado para avaliar a ligação de péptido a moléculas de HLA-A2. O ensaio encontra-se descrito em Valmori.

et al. J. Immunol 160:1750-1758 (1988). O ensaio baseia-se na inibição de reconhecimento de SEQ ID NO:4, tal como descrito no exemplo 4, acima. Ensaaiaram-se os seguintes péptidos e os resultados do ensaio de competição apresentam-se:

SEQ ID NO:	Sequência de aminoácidos	Actividade de competidor [mM] 50%	Actividade de competidor relativamente a SEQ ID NO:2
2	SLLMWITQC	0,27	1
3	QLSLLMWIT	0,03	9
1	SLLMWITQCFL	0,02	13
6	SLLMWITQA	0,0003	900
7	SLLMWITQL	0,002	130
19	SLLMWITQS	0,02	13
8	SLLMWTTQV	0,00006	4500
20	ALLMWITQA	0,0013	208
21	SALMWITQA	0,01	27
22	SLAMWITQA	0,001	270
23	SLLAWITQA	<0,0001	>2700
24	SLLMAITQA	0,004	68
25	SLLMWATQA	0,01	27
26	SLLMWIAQA	0,0002	1350
27	SLLMWITAA	0,00018	1500

Estes resultados demonstram que, enquanto foi necessário cerca de 0,3 μ M de SEQ ID NO:2 para actividade de competição de 50%, foram necessárias quantidades 9 e 13 vezes menores com SEQ ID NOS: 3 e 1, respectivamente. Verificar-se-á que os péptidos de SEQ ID NOS: 6 e 7 resultaram num aumento significativo da ligação de péptido, bem como SEQ ID NOS: 8 e 19.

Sintetizaram-se os péptidos substituídos com uma única Ala de SEQ ID NOS: 20-27 como uma primeira etapa para determinar o papel de um único aminoácido na ligação a moléculas de MHC e interacção com receptores de células T. Demonstrou-se acima que a cisteína do terminal C foi nociva para a ligação, de modo que se utilizou como péptido base a muteína substituída

com Ala, SEQ ID NO:6. Os resultados apresentam-se acima. A substituição na posição 2, tal como esperado, levou a uma redução de 100 vezes da ligação de péptido. As substituições nas posições 5 e 6 também resultaram numa diminuição significativa da ligação. Surpreendentemente, o péptido de SEQ ID NO:23 apresenta uma capacidade de ligação muito maior.

Exemplo 20

Estas experiências foram concebidas para avaliar a eficácia de reconhecimento de antígeno por CTL específicos de NY-ESO-1. Para tal efectuaram-se titulações de péptido utilizando um ensaio de libertação de ^{51}Cr de 4 horas do tipo descrito acima, utilizando a linha celular T2, também descrita acima. A medição padrão foi 50% da lise máxima conseguida com SEQ ID NO:2. A quantidade de SEQ ID NO:2 necessária para 50% de lise variou para os três clones de CTL ensaiados, ou seja os clones LAU 50/13, LAU 155/18 e 156/5, descritos acima (7 nM, 12 nM e 3 nM). Os resultados apresentam-se na figura 1, que mostra que SEQ ID NOS: 1 e 3 foram menos eficazes como antígenos para todos os três clones. Um dos clones (LAU 156/5) nem sequer detectou SEQ ID NO:3.

Em geral, os análogos que utilizam variantes no terminal C foram antígenos melhores do que SEQ ID NO:2. SEQ ID NO:6 pareceu ser o péptido antigénico mais eficaz. As concentrações necessárias para obter 50% da lise máxima foram 3-4 ordens de grandeza inferiores à de SEQ ID NO:2, para todos os três clones. SEQ ID NOS: 7 e 19 foram também reconhecidos mais eficazmente, com aumentos variáveis. Num caso, SEQ ID NO:7 apresentou um aumento de 10^5 de actividade antigénica relativa, mas apresentou um efeito mínimo num segundo CTL.

SEQ ID NO:8 foi reconhecido mais eficazmente por dois dos três clones.

Relativamente às substituições únicas por alanina de SEQ ID NOS:20-27, cada clone apresentou especificidade de reconhecimento fina. SEQ ID NO:27 apresentou tal de forma mais distinta. Dois dos clones reconheceram-no tão bem ou melhor do que reconheceram SEQ ID NO:2 e um não o reconheceu. Dois dos clones apresentaram padrões de reconhecimento semelhantes.

Todos os péptidos nas posições 3 a 7 parecem ser críticos para reconhecimento de todos os clones de CTL.

Exemplo 21

Estas experiências foram efectuadas para avaliar a capacidade de vários péptidos desencadear respostas específicas. Células CD8⁺ altamente enriquecidas obtidas de PBMC de doentes de melanoma foram estimuladas, *in vitro*, com uma das SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 6, 7, 8 ou 19, tal como descrito nos exemplos anteriores. Uma semana após estimulação, coraram-se com tetrâmeros contendo SEQ ID NO:2 e anticorpos anti-CD8, tal como descrito acima.

Após uma semana, cerca de 0,1 a 0,2% dos linfócitos CD8⁺ na cultura foram positivos para tetrâmero. SEQ ID NO:3 foi um estimulador fraco, enquanto que SEQ ID NO:1 e todos os derivados substituídos no carboxilo levaram a expansão das populações, comparativamente a SEQ ID NO:2. Estes resultados apresentam-se na figura 2A.

Numa experiência de seguimento, ensaiaram-se as culturas num ensaio ELISPOT de IFN- γ , utilizando as instruções do fabricante. Sucintamente, revestiram-se placas durante a noite com anticorpos específicos de IFN- γ e lavaram-se seis vezes. Adicionaram-se células T2 (5×10^4 células/poço) conjuntamente com células T sensíveis (2×10^4 poço) e péptido 1 μ M. Prepararam-se culturas em duplicado e incubaram-se durante 20 horas a 37°C. Removeram-se então as células e revelaram-se as placas com um segundo anticorpo IFN- γ biotinilado e complexos estreptavidina-fosfatase alcalina. Contaram-se as manchas utilizando um estereomicroscópio. O ensaio foi efectuado porque o ensaio de análogos de péptido na indução de expansão de células T com tetrâmeros pode não detectar células T específicas que não sofrem reacção cruzada com a sequência parental.

A figura 2B apresenta estes resultados. Obtiveram-se números comparáveis de células específicas, quer se tenha utilizado SEQ ID NO:2, quer um análogo de péptido. Os resultados confirmam que SEQ ID NO:3 tem baixa imunogenicidade e que a maioria das células T específicas induzidas pelos

péptidos substituídos no carboxilo não reagem cruzadamente de forma completa com SEQ ID NO:2.

O invento, tal como será aparente da revelação anterior, refere-se a péptidos de sequência:

SLLMWITQX (SEQ ID NO:10)

em que X é diferente de cisteína e é serina ou é um aminoácido com uma cadeia lateral não polar, tal como Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met, Trp ou Gly e é com a maior preferência Ala, Ile, Val, Leu ou Ser. Estes péptidos podem ser utilizados terapeuticamente, através de administração a uma doente positivo para HLA-A2 e expressa NY-ESO-1 em relação com uma patologia, bem como para diagnóstico, ou seja para determinar a presença de células positivas a HLA-A2 ou se estão presentes CTL relevantes, etc.

Também se descrevem aqui péptidos de SEQ ID NO:10 em que X são dois aminoácidos, o primeiro dos quais é cisteína ou alanina e o segundo dos quais é qualquer aminoácido. De preferência, o segundo aminoácido é Phe, Ile, Val ou Leu. Com a maior preferência, o primeiro aminoácido é cisteína e o segundo aminoácido é Phe ou Ile, tal como em SEQ ID NO:11 ou 14.

Ainda outra concretização do invento são análogos do péptido apresentado em SEQ ID NO:6, ou seja péptidos em que pelo menos um dos aminoácidos em SEQ ID NO:6, excepto o aminoácido do terminal C, foi substituído por alanina. SEQ ID NO:27 é especialmente preferida, mas os outros péptidos apresentados em SEQ ID NOS: 20-26 são também uma parte do invento.

A molécula de HLA-A2 é uma molécula de MHC de classe I e as células T sensíveis a complexos de péptidos e moléculas de classe I são em geral células CD8⁺.

O péptido definido por SEQ ID NO:6 é um exemplo dos péptidos definidos pela sequência nuclear de SEQ ID NO:10. Este péptido, tal como indicado, liga-se a moléculas de HLA-A2. Assim é um "marcador" para HLA-A2, bem como um

componente de complexos péptido/MHC que estimulam a proliferação de CTL, tal como descrito acima. De igual modo, podem ser utilizados péptidos em que o terminal carboxilo é Ile, Leu ou Val na estrutura de SEQ ID NO:10.

Os péptidos podem ser combinados com adjuvantes para formar composições terapêuticas. São também uma parte do invento moléculas de ácido nucleico que consistem em sequências de nucleótidos (denominados "minigenes") que codificam os péptidos do invento. Estes minigenes podem ser incorporados em vectores de expressão, em ligação operacional com um promotor. São parte do invento construções adicionais que codificam mais do que um péptido do invento, incluindo cópias múltiplas de um ou mais péptidos. Estas construções podem estar, por exemplo, sob a forma de vectores recombinantes ou o denominado "ADN nu" ou seja pequenas moléculas de ácido nucleico que codificam o péptido ou péptidos pretendidos. De igual modo, são parte do invento células recombinantes que incluem o ADN ou os vectores, tais como células eucarióticas ou procarióticas.

A capacidade destes péptidos se ligarem a moléculas de HLA torna-os úteis como agentes para determinar a presença de células positivas a HLA-A2, tais como células positivas a HLA-A*0201, determinando se os péptidos se ligam ou não a células numa amostra. Este tipo de reacção "ligando/receptor" é bem conhecido na arte e encontram-se disponíveis várias metodologias para a sua determinação.

Um aspecto adicional do invento são os denominados "minigenes" que transportam informação necessária para dirigir a síntese de péptidos através de células nas quais os minigenes são transfectados. Podem conceber-se minigenes que codificam um ou mais péptidos antigénicos e são então transferidos para genomas de célula hospedeiras através de transfecção com plasmídeos ou através de clonagem para vírus *vaccinia* ou adenovírus. Consultar, por exemplo, Zajac. *et al.*, Int. J. Cancer 71: 496 (1997). Estes vectores recombinantes, tais como vectores recombinantes de vírus *vaccinia*, podem ser construídos de modo a produzirem proteínas de fusão. Por exemplo, tal como se apresentou acima, podem construir-se proteínas de fusão em que uma parte da proteína de fusão é o

precursor de antígeno de rejeição de tumor ou o antígeno de rejeição de tumor pretendido e podem ser incluídos segmentos de proteína ou péptido adicionais. São exemplos não limitativos de tipos de segmento de proteína ou péptido adicionais que podem ser adicionados às proteínas de fusão, proteínas ou péptidos repórter, ou seja proteínas ou péptidos que dão um sinal observável para indicar que ocorreu expressão, tal como a proteína fluorescente verde. São, entre outras, proteínas repórter adicionais tais como β -galactosidase, luciferase, dhfr e "eGFP" ou proteína fluorescente verde melhorada, tal como descrita por Cheng, *et al.*, Nature Biotechnology **14**:606 (1996), etc. As várias proteínas repórter disponíveis para o perito na arte podem ser e são utilizadas de diferentes modos. Por exemplo, "GFP" e "eGFP" podem ser utilizadas para visualizar células infectadas, facilitando assim a sua detecção quando se utiliza citometria de fluxo e o isolamento das células assim infectadas. Outras proteínas repórter são úteis quando se utilizam métodos tais como hibridação de Western, imunoprecipitação, etc. Estas técnicas são padrão na arte e não é necessário serem aqui repetidas. Podem também ser incluídos segmentos de proteína ou péptido que facilitam a clivagem do precursor de antígeno de rejeição de tumor ou antígeno de rejeição de tumor do péptido de fusão. A proteína de fusão pode incluir mais do que um antígeno de rejeição de tumor, tal como descrito acima, e pode também incluir proteínas ou péptidos que facilitam a entrega de antígeno ou antígenos de rejeição de tumor a uma molécula de MHC relevante. Tais proteínas e péptidos são bem conhecidos na arte e não é necessário serem aqui descritos adicionalmente.

São também uma parte do invento células recombinantes que foram transfectadas com os vectores repórter recombinantes aqui descritos. Tais células podem ser, por exemplo, qualquer tipo de células eucarióticas, sendo especialmente preferidas as células humanas. Tais células podem então ser utilizadas, por exemplo, para produzir precursores de antígeno de rejeição de tumor ou antígenos de rejeição de tumor. Também podem ser utilizadas, num contexto *ex vivo*, para gerar células T citolíticas específicas para determinados complexos de moléculas de MHC e antígenos de rejeição de tumor. Tal pode ser efectuado simplesmente pondo em contacto as células

transfectadas com uma fonte de células T, tal como uma amostra de sangue, de modo a provocar a proliferação de quaisquer células na amostra específicas para os complexos de moléculas MHC e TRA (ou seja antigénios de rejeição de tumor) produzidos após expressão da proteína de fusão e processamento de TRA. Tais células, quando se tornam não proliferativas, podem também ser utilizadas como materiais de vacina, dado que apresentarão os complexos relevantes na sua superfície e provocam o mesmo tipo de resposta de células T *in vivo*, tal como aqui apresentado. De igual modo, os vectores podem ser utilizados como materiais de vacina por si só e podem ser administrados a um doente com necessidade de uma resposta de células T contra complexos de moléculas de MHC e péptido em superfícies celulares. Obviamente, as células T geradas *ex vivo* podem também ser utilizadas para tratamento de doentes.

Os péptidos podem ser combinados com péptidos de outros antigénios de rejeição de tumor para formarem "polítomos". Exemplos de péptidos incluem os apresentados em patente U.S. 5 932 684, patente U.S. 5 821 122, 5 939 526 e 6 025 470.

São péptidos adicionais que podem ser utilizados os descritos nas seguintes referências, patentes U.S. 5 405 940; 5 487 974; 5 519 117; 5 530 096; 5 554 506; 5 554 724; 5 558 995; 5 585 461; 5 589 334; 5 648 216; e 5 683 886; publicações internacionais PCT 92/20356; 94/14459; 96/10577; 96/21673; 97/10837; 97/26535; e 97/31017 bem como patente U.S. 6 265 215.

Os polítomos são grupos de dois ou mais péptidos potencialmente imunogénicos ou estimulantes imunitários, que se podem juntar de várias formas, para determinar se este tipo de molécula estimula e/ou provoca uma resposta imunitária.

Estes péptidos podem ser ligados entre si directamente ou através de utilização de sequências flanqueadoras. Consultar Thompson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(13): 5845-5849 (1995), que revela a ligação directa de sequências epitópicas relevantes. É bem conhecida a utilização de polítomos como vacinas. Consultar, por exemplo, Gilbert *et al.*, Nat. Biotechnol. 15(12): 1280-1284 (1997); Thomson *et al.*, *supra*; Thomson *et al.*, J. Immunol. 157(2): 822-826 (1996); Tam *et al.*, J. Exp. Med. 171(1): 299-306 (1990). A referência Tam, em

particular, mostra que os polítopos, quando utilizados num modelo de ratinho, são úteis para gerar tanto anticorpo, como imunidade protectora. Além disso, a referência mostra que os polítopos, quando digeridos, produzem péptidos que podem ser e são apresentados por MHC. Tam demonstra tal, demonstrando reconhecimento de epítomos individuais processados das "cadeias" de polítopo através de CTL. Esta abordagem pode ser utilizada, por exemplo, na determinação de quantos epítomos podem ser ligados conjuntamente num polítopo e ainda provocarem reconhecimento e também para determinar a eficácia de diferentes combinações de epítomos. As diferentes combinações podem ser feitas "à medida" para os doentes que expressam subconjuntos específicos de antigénios de rejeição de tumor. Estes polítopos podem ser introduzidos como estruturas de polipéptido ou através da utilização de sistemas de entrega de ácido nucleico. Para desenvolver, a arte tem muitas formas diferentes disponíveis de introduzir ADN que codifica um epítopo individual ou um polítopo, tal como é discutido acima. Consultar, por exemplo, Allsopp *et al.*, Eur. J. Immunol. 26(8): 1951-1959 (1996). Podem ser utilizados adenovírus, poxvírus, partículas do tipo vírus Ty, plasmídeos, bactérias, etc. Podem ensaiar-se estes sistemas em modelos de ratinho para determinar qual o sistema que parece ser mais adequado para uma determinada situação paralela em humanos. Também podem ser ensaiados em ensaios clínicos humanos.

Igualmente, uma característica do invento é a utilização destes péptidos para determinar a presença de células T citolíticas numa amostra. Demonstrou-se acima que CTL numa amostra reagirão com complexos péptido/MHC. Assim, caso se saiba que se encontram CTL numa amostra, as células positivas a HLA-A2 podem ser "lisadas" por adição dos péptidos do invento a células positivas a HLA-A2, tais como células positivas a HLA-A*0201 e determinando então, por exemplo, a libertação de crómio radioactivo, produção de TNF, etc., ou quaisquer outros métodos pelos quais se determine a actividade de células T. De igual modo, pode determinar-se se estão ou não presentes numa amostra linfócitos de infiltração no tumor ("TIL") específicos, por adição de um dos péptidos reivindicados com células positivas a HLA-A2 a uma amostra e determinando a lise de células positivas a HLA-A2 através, por exemplo, de libertação de ⁵¹Cr, presença de TNF, etc. Além

disso, podem detectar-se CTL por análise ELISPOT. Consultar por exemplo Schmittel *et al.*, (1997). J. Immunol. Methods **210**: 167-174 e Lalvani *et al.*, (1997). J. Exp. Med. **126**: 859 ou por análise FACS de complexos de tetrâmero fluorogénico de MHC de classe I/péptido (Dunbar *et al.*, (1998). Current Biology **8**: 413-416, Romero. *et al.*, J. Exp. Med. **188**: 1641-1650 (1998). Desenvolvendo, os complexos incluem um primeiro parceiro de ligação e um segundo parceiro de ligação, em que o primeiro e o segundo parceiros de ligação são específicos um para o outro. Estes podem ser, por exemplo, avidina ou estreptavidina e biotina, um anticorpo ou uma parte de ligação de um anticorpo específico para biotina, etc. A característica chave é que o segundo parceiro de ligação deve ligar-se a vários complexos de uma molécula de MHC, uma molécula de $\beta 2$ -microglobulina e um péptido que liga especificamente à referida molécula de MHC e o complexo multicomponentes deve estar marcado. As moléculas de MHC são de preferência moléculas de HLA-A2; contudo, será óbvio para o perito na arte que pode ser utilizada qualquer molécula de HLA.

De preferência, o segundo parceiro de ligação é biotina, mas também pode ser, por exemplo, um anticorpo que é específico para um componente do complexo HLA/ $\beta 2$ -microglobulina/péptido, tal como um anticorpo específico para HLA ou um anticorpo específico para $\beta 2$ -microglobulina. De igual modo, o primeiro parceiro de ligação pode ser, por exemplo, proteína L recombinante ou de ocorrência natural ou proteína A recombinante ou de ocorrência natural ou mesmo um anticorpo secundário. O complexo pode estar numa forma solúvel ou ligado, por exemplo, a uma fase sólida removível, tal como uma pérola magnética.

O número de complexos HLA/ $\beta 2$ -microglobulina/péptido na molécula grande do invento pode variar. Inclui pelo menos dois complexos e, de preferência, pelo menos quatro, mas pode também estar presente um número maior.

O complexo de parceiros de ligação e HLA/ $\beta 2$ -microglobulina/péptido pode ser marcado, utilizando qualquer dos marcadores conhecidos na arte. São apresentados acima exemplos de marcadores fluorescentes. Podem também ser utilizados marcadores enzimáticos, tais como fosfatase

alcalina, partículas metálicas, plásticos coloridos feitos de materiais sintéticos, marcadores radioactivos, etc.

Pode também ser utilizado um terceiro parceiro de ligação, que se liga especificamente ao primeiro parceiro de ligação. Por exemplo, se o primeiro parceiro de ligação for estreptavidina e o segundo parceiro de ligação for biotina, então o terceiro parceiro de ligação pode ser um anticorpo específico para estreptavidina. Quando se utilizam três ou mais parceiros de ligação, o marcador *supracitado* pode estar ligado a qualquer dos parceiros de ligação desde que não prejudique a ligação com os complexos HLA/ β 2-microglobulina/péptido.

Os complexos podem ser utilizados, por exemplo, para identificar ou para isolar células T citolíticas presentes numa amostra, em que estas células são específicas para o complexo HLA/ β 2-microglobulina/péptido. Tais células T citolíticas ligam-se aos imunocomplexos do invento. Numa concretização preferida, a amostra a ser ensaiada é tratada com um reagente que se liga especificamente a uma célula T citolítica, em que o referido marcador proporciona um sinal detectável. A amostra, incluindo CTL marcados, é então posta em contacto com o complexo, onde se liga e pode ser separado por qualquer das abordagens padrão bem conhecidas de separação de células. De preferência, utiliza-se FACS, mas são também bem conhecidas do perito na arte outras metodologias de separação. O péptido utilizado é deixado ao critério e necessidades do perito na arte e dependerá, por exemplo, da natureza do sistema de MHC específico em consideração.

Adicionalmente, o método pode ser utilizado para monitorizar o estado de tumores, após administração de um determinado agente terapêutico, tal como uma vacina. Adicionalmente, dado que a metodologia pode ser utilizada para identificar precursores de células T citolíticas, tal como demonstrado acima, podem identificar-se candidatos para terapias potenciais determinando se possuem os precursores de células T relevantes.

Obviamente, os péptidos podem ser também utilizados para provocar produção de CTL. Tal como se demonstra acima, os

precursores de CTL evoluem para CTL quando confrontados com complexos adequados. Causando tal "confronto" podem gerar-se CTL. Tal é útil num contexto *in vivo*, bem como *ex vivo*, para gerar tais CTL.

São também parte do invento os denominados "cocktails" incluindo vários péptidos diferentes, em que pelo menos um deles é um péptido do invento, bem como moléculas de "polítopo" e moléculas de ácido nucleico que as codificam. "Polítopo", tal como aqui utilizado, refere-se a uma molécula recombinante concebida para conter várias sequências de péptido que são apresentadas por moléculas de MHC, após processamento intracelular. Tais polítopos podem consistir de epítopo repetido, um número de epítopos diferentes, etc.

Outras características e aplicações do invento serão óbvias para o perito na arte e não é necessário apresentá-las aqui.

Os termos e expressões que foram utilizadas são utilizados como termos de descrição e não são limitativos e não há qualquer intenção na utilização de tais termos e expressões de excluir quaisquer equivalentes de características apresentadas e descritas ou suas partes, sendo reconhecido que são possíveis várias modificações no âmbito do invento.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110>Valmori, Danila
Cerotini, Jean, Charels
Romero, Pedro

<120> Derivados de Péptidos NY-ESO-1 e Suas Utilizações

<130> LUD 5629.2

<140>

<141>

<150> US09/514,036

<151> 2000-02-05

<150> US09/440,621

<151> 1999-11-15

<150> US 09/165,546

<151> 1998-10-02

<150> US 09/062,422

<151> 1998-04-17

<150> US 08/725,162

<151> 1996-10-03

<160> 27

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<400>1

Ser	Leu	Leu	Met	Trp	Ile	Thr	Gln	Cys	Phe	Leu
1				5					10	

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<400>2

Ser	Leu	Leu	Met	Trp	Ile	Thr	Gln	Cys
1				5				

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<400>3

Gln	Leu	Ser	Leu	Leu	Met	Trp	Ile	Thr
1				5				

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<400> 4

Tyr	Met	Asp	Gly	Thr	Met	Ser	Gln	Val
1				5				

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> *H. influenzae*

<220>

<400> 5

Gly	Ile	Leu	Gly	Phe	Val	Phe	Thr	Leu
1				5				

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<221> Mutagénio
<222> 9

<400> 6
Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Ala
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<221> Mutagénio
<222> 9

<400> 7
Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Leu
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<221> Mutagénio
<222> 9

<400>8
Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Val
1 5

<210> 9
<211> 34
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>

<400>
gcaggatccc ggctcccatc ctcagggtga gggc 34

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> Mutagénio
<222> 9

<223> Xaa é qualquer aminoácido, preferivelmente um com uma cadeia lateral não polar, tal como Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met, Trp, ou Gly

<400>10

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Xaa
1 5

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<400> 11

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe
1 5 10

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Mutagénio

<222>9

<400>12

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Ile
1 5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Mutagénio

<222> 10

<400>13

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Val
1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Mutagénio

<222> 10

<400> 14

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Ile
1 5 10

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<221> Mutagénio
<222> 9..10

<400> 15
Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Ala Leu
1 5 10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<221> Mutagénio
<222> 9..10

<400> 16
Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Ala Ile
1 5 10

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<221> Mutagénio
<222> 9..10

<400>17
Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Ala Phe
1 5 10

<210>18
<211>10
<212>PRT
<213>Sequência artificial

<220>
<221> Mutagénio
<222> 9..10
<223> O primeiro Xaa é Cys ou Ala. O segundo Xaa é qualquer aminoácido, e é preferivelmente Val, Phe, Ile ou Leu

<400>18
Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Xaa Xaa
1 5 10

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>

<221> Mutagénio

<222> 9

<400> 19

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Ser
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Mutagénio

<222> 1, 9

<400> 20

Ala Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Ala
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Mutagénio

<222> 2, 9

<400> 21

Ser Ala Leu Met Trp Ile Thr Gln Ala
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Mutagénio

<222> 3, 9

<400> 22

Ser Leu Ala Met Trp Ile Thr Gln Ala
1 5

<210> 23

<212> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<221> Mutagénio

<222> 4, 9

<400> 23

Ser Leu Leu Ala Trp Ile Thr Gln Ala
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<221> Mutagénio
<222> 5,9

<400> 24
Ser Leu Leu Met Ala Ile Thr Gln Ala
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<221> Mutagénio
<222> 6,9

<400> 25
Ser Leu Leu Met Trp Ala Thr Gln Ala
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<221> Mutagénio
<222> 7,9

<400> 26
Ser Leu Leu Met Trp Ile Ala Gln Ala
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<221> Mutagénio
<222> 8,9

<400> 27
Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Ala Ala
1 5

Lisboa, 2008-09-24

REIVINDICAÇÕES

1. Péptido isolado de sequência:

SLLMWITQX;

em que X é diferente de cisteína e é serina ou é um aminoácido com uma cadeia lateral não polar;

péptido este que se liga a uma molécula de HLA-A2 e provoca a lise por células T citolíticas.

2. Péptido isolado da reivindicação 1 em que X é Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met, Trp ou Gly.

3. Péptido isolado da reivindicação 1 que consiste na sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO:6, 7, 8, 12 ou 19.

4. Péptido isolado, que é um análogo de SEQ ID NO:6 e em que o referido péptido é SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 ou 27.

5. Molécula de ácido nucleico isolada que consiste numa sequência de ácido nucleico que codifica o péptido de qualquer das reivindicações 1 a 4.

6. Vector de expressão incluindo várias sequências de nucleótidos que codificam péptidos que se ligam a moléculas de MHC, em que pelo menos um dos referidos péptidos é o péptido de qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

7. Célula recombinante transformada ou transfectada com a molécula de ácido nucleico isolada da reivindicação 5 ou o vector de expressão da reivindicação 6.

8. Método para determinar se uma célula apresenta uma molécula de HLA-A2 na sua superfície incluindo pôr em contacto uma amostra contendo a referida célula com o péptido de qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e determinar a ligação entre eles, sendo a referida ligação indicativa de HLA-A2 na superfície da referida célula.

9. Composição útil para provocar uma resposta de células T citolíticas incluindo o péptido isolado de qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e um adjuvante e, opcionalmente, um péptido adicional.

10. Molécula de polítopo isolada, em que pelo menos uma sua parte inclui a sequência de aminoácidos de qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

11. Método para determinar se uma célula T citolítica específica para complexos de uma molécula de HLA-A2 e um péptido está presente numa amostra, incluindo misturar a referida amostra com uma molécula de HLA-A2 e o péptido de qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e determinar a interacção entre a referida célula T citolítica e complexos da referida molécula de HLA-A2 e o referido péptido para determinar especificidade da referida célula T citolítica.

12. Complexo isolado útil para isolar uma célula T citolítica, incluindo um primeiro e um segundo parceiros de ligação que são específicos um para o outro, em que o referido segundo parceiro de ligação está ligado a uma pluralidade de complexos incluindo uma molécula de HLA-A2, uma molécula de β -microglobulina e o péptido de qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

13. Complexo da reivindicação 12 em que o referido primeiro parceiro de ligação é avidina e o referido segundo parceiro de ligação é biotina.

14. Método para monitorizar o estado de um tumor incluindo pôr em contacto uma amostra obtida de um doente com um tumor com o complexo isolado da reivindicação 12 ou 13 para determinar células T citolíticas na referida amostra, e comparar um valor obtido com um valor determinado previamente para determinar o estado do referido tumor.

15. Método para identificar ou isolar células T citolíticas numa amostra, incluindo misturar a referida amostra com o complexo das reivindicações 12 ou 13 e identificar ou isolar células T citolíticas que se ligam a ele.

16. Utilização de um péptido tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, um ácido nucleico tal como definido na reivindicação 5, um vector de expressão tal como definido na reivindicação 6, uma célula tal como definida na reivindicação 7, uma composição tal como definida na reivindicação 9 ou um complexo tal como definido nas reivindicações 12 ou 13, na monitorização do estado de um tumor ou na identificação ou isolamento de células T citolíticas.

Lisboa, 2008-09-24

Figura 1

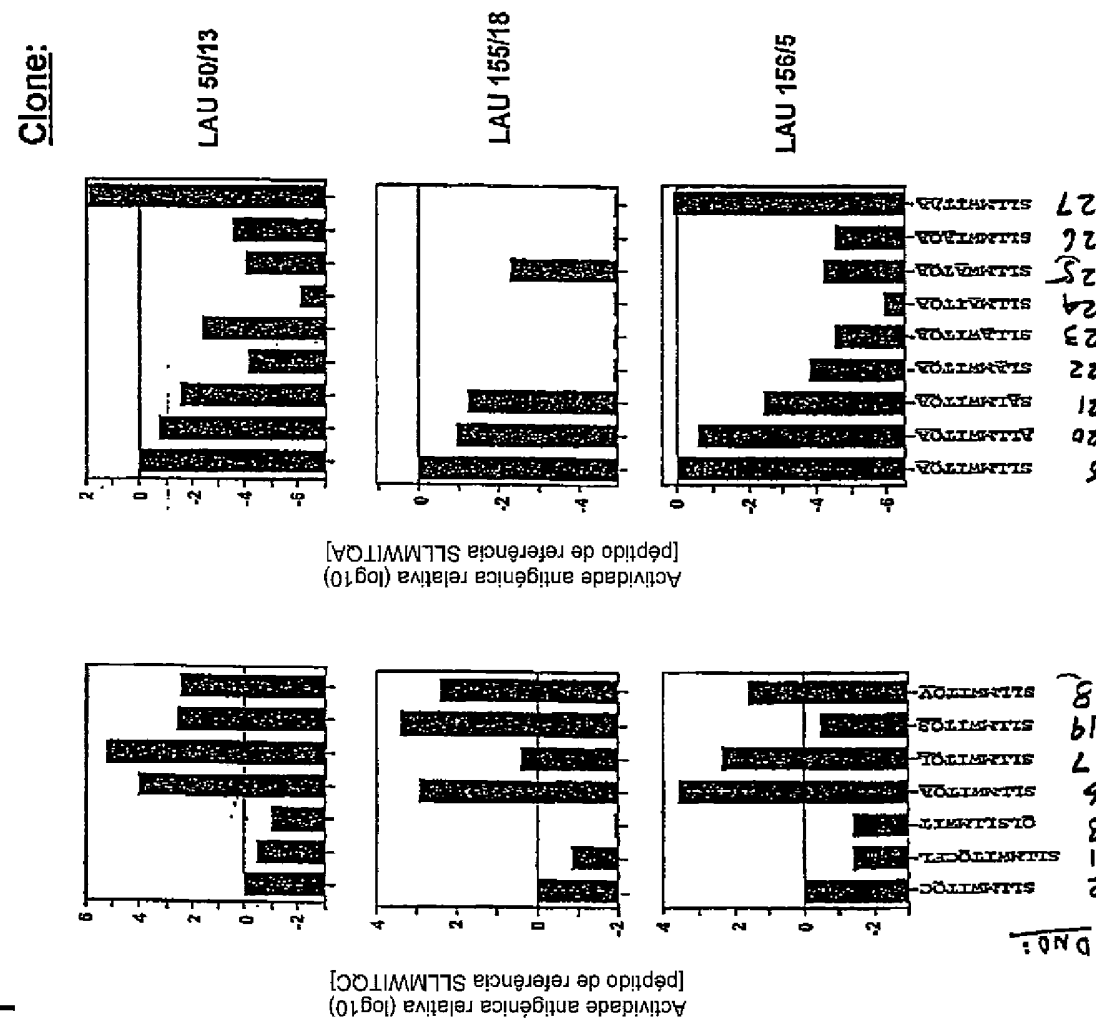
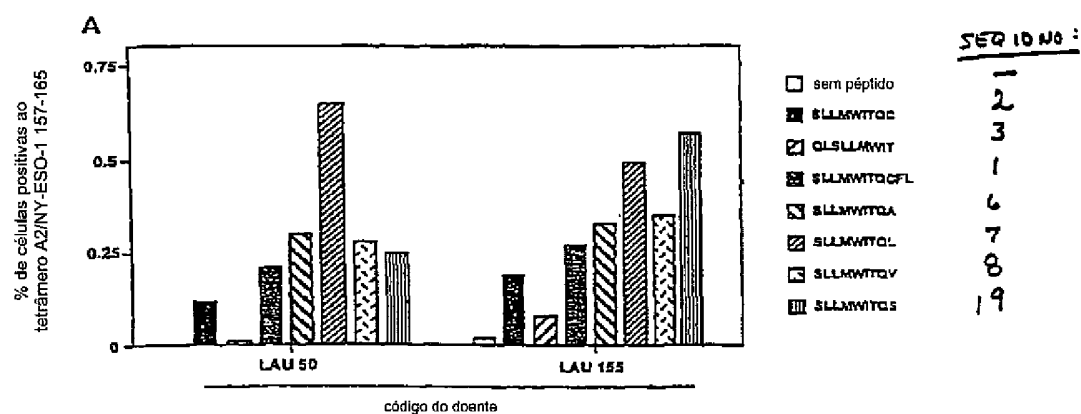


Figura 2



B

Número de células produtoras de IFN- γ em 20 000 células cultivadas na presença de:

SEQ ID NO :

péptido de estimulação:

	sem péptido	SLLMWITQC	péptido de estimulação
SLLMWITQC	17	75	n.s.
QLSLLMWIT	40	38	29
SLLMWITQCFL	11	74	66
SLLMWITQA	19	> 100	> 100
SLLMWITQL	14	72	77
SLLMWITQS	10	> 100	> 100
SLLMWITQV	9	66	65