



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0720794-8 A2



(22) Data de Depósito: 26/12/2007
(43) Data da Publicação: 11/03/2014
(RPI 2253)

(51) Int.Cl.:

C07K 7/06
A61K 39/00
A61K 48/00
A61P 35/00
A61P 37/02
A61P 37/04
C12N 5/00

(54) Título: VACINA DE PEPTIDEO FOXP3

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 03/01/2007 US 60/878,615,
22/03/2007 US 60/896,472

(73) Titular(es): Oncotherapy Science, INC.

(72) Inventor(es): Ryuji Osawa, Takuya Tsunoda

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT JP2007001466 de 26/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/081581 de
10/07/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"VACINA DE PEPTÍDEO FOXP3"**.

Campo Técnico

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

5 O presente pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório US 60/878.615 depositado em 3 de janeiro de 2007, e do Pedido Provisório US 60/896.472 depositado em 22 de março de 2007, cujo teor de cada um deles é aqui incorporado a título de referência, na íntegra.

10 A presente invenção refere-se ao campo da ciência biológica, mais especificamente ao campo de terapia de câncer. Em particular, a presente invenção refere-se a peptídeos Foxp3 que são extremamente eficazes como vacinas contra câncer, e fármacos para tratar e prevenir tumores.

Antecedentes da Invenção

15 Foi demonstrado que linfócitos T citotóxicos CD8+ (CTLs) reconhecem peptídeos de epítipo derivados de antígenos associados a tumor (TAAS) apresentados na molécula MHC da classe I, e então matam as células do tumor. Desde a descoberta da família MAGE como o primeiro exemplo de TAAS, muitos outros TAAS foram descobertos usando-se abordagens imunológicas (Boon T, *Int J Cancer* 54: 177-80, 1993; Boon T *et al.*, *J Exp*
20 *Med* 183: 725-9, 1996; van der Bruggen P *et al.*, *Science* 254: 1643-7, 1991; Brichard V *et al.*, *J Exp Med* 178: 489-95, 1993; Kawakami Y *et al.*, *J Exp Med* 180: 347-52, 1994), e alguns deles estão agora no processo de desenvolvimento químico como alvos de imunoterapia.

25 A identificação de novos TAAs, que induzem imunorrespostas antitumorais potentes e específicas, garantem desenvolvimento adicional de aplicações clínicas de estratégia de vacinação com peptídeos em vários tipos de câncer (Harris CC, *J Natl Cancer Inst* 88: 1442-5, 1996; Butterfield LH *et al.*, *Cancer Res* 59: 3134-42, 1999; Vissers JLM *et al.*, *Cancer Res* 59: 5554-9, 1999; Van der Burg SH *et al.*, *J Immunol* 156: 3308-14, 1996; Tana-
30 ka F *et al.*, *Cancer Res* 57: 4465-8, 1997; Fujie T *et al.*, *Int J Cancer* 80: 169-72, 1999; Kikuchi M *et al.*, *Int J Cancer* 81: 459-66, 1999; Oiso M *et al.*, *Int J Cancer* 81: 387 a 94, 1999).

Vários tipos de imunoterapia específica para antígenos têm sido realizados, contudo, baixa eficácia clínica tem sido obtida até agora em termos de óbvia regressão de tumor (Rosenberg SA *et al.*, Nat Med 10:909-15, 2004). Uma das principais razões é a imunorresposta pobre de linfócitos infiltrados no tumor (TIL) e linfócitos sanguíneos periféricos (PBL) de pacientes com câncer em estágio avançado (Miester S *et al.*, J Immunol 136: 1899-907, 1986). Essa imunossupressão induzida por tumor é a razão para as fracas respostas a antígenos tumorais (Young RC *et al.*, Am J Med 52: 63-8, 1972), pobre proliferação de células T (Alexander JP *et al.*, Cancer Res 53: 1380-7, 1993), perda de produção de citocina (Horiguchi S *et al.*, Cancer Res 59: 2950-6, 1999), e transdução de sinais defeituosos de células T e células assassinas naturais (Kono K *et al.*, Clin Cancer Res 11: 1825-8, 1996, Kiessling R *et al.*, Cancer Immunol Immunother 48: 353-62, 1999).

Para aperfeiçoar a eficácia clínica para imunoterapia, é importante superar o efeito de fatores imunossupressivos induzidos por tumores. Tolerância imunológica e proteção de autoimunidade são conferidas por mecanismos centrais e periféricos incluindo deleção clonal de células T autorreativas no timo e a indução de anergia mediante encontro com autoantígenos na periferia. Recentemente, foi esclarecido que células T reguladoras (Tregs), caracterizadas por coexpressão de marcadores CD4 e CD25, são uma população funcionalmente única de células T e funcionam para manter a homeostasia imune (Sakaguchi S *et al.*, J Immunol. 155: 1151-64, 1995, Dieckmann D *et al.*, J Exp Med 193: 1303-10, 2001). Células T-reg representam um dos maiores realizadores de supressão dos vários tipos de imunorresposta (Miescher S *et al.*, J Immunol 136: 1899-907, 1986; Young RC *et al.*, Am J Med 52: 63-72, 1972; Alexander JP *et al.*, Cancer Res 53: 1380-7, 1997; Horiguchi S *et al.*, Cancer Res 59: 2950-6, 1999; Kono K *et al.*, Clin Cancer Res 11: 1825-8, 1996; Kiessling R *et al.*, Cancer Immunol Immunother 48: 353-62, 1999).

Embora as interações moleculares e vias sinalizadoras que são críticas para a geração e função das Tregs não estejam ainda inteiramente elucidadas, Tregs requerem a escurfina, fator de transcrição "Forkhead"

(Foxp3; SEQ ID NO: 2), codificada pelo gene de Foxp3 (GenBank, Acesso Nº NM_014009; SEQ ID NO: 1), que controla seu desenvolvimento e propriedades reguladoras (Fontenot JD *et al.*, Nat Immunol 4: 330-6, 2003, Hori S *et al.*, Science 299: 1057-61, 2003, Khattri R *et al.*, Nat Immunol 4: 304-6, 2003). Ainda, vacinação de camundongos com células dendríticas transfectadas com mRNA de Foxp3 elicitou uma resposta de CTL específica de Foxp3 (Smita N *et al.*, Cancer Res. Jan 1;67(1):371-80, 2007).

Assim, Foxp3 serve como alvo para imunoterapia de câncer e, além disso, peptídeos parciais da proteína codificada por Foxp3 servem como antígenos reconhecidos por CTL.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Para aperfeiçoar a eficácia clínica para imunoterapia, é importante superar os fatores imunossupressivos induzidos por tumor. Verificou-se que T-reg é um dos maiores realizadores de supressão dos vários tipos de imunorresposta. Portanto, é crucial desenvolver a vacina direcionando Foxp3 que é expresso em T-reg para superar a imunossupressão induzida por T-reg.

A presente invenção é baseada, pelo menos em parte, na identificação de peptídeos de epítipo do produto gênico de Foxp3, que elicitam linfócitos citotóxicos (CTLs) específicos para os peptídeos Foxp3 correspondentes ou epítopos. Células Mononucleares Sanguíneas Periféricas (PBMC) de doador saudável foram estimuladas usando-se peptídeos-candidatos de ligação de HLA-A*24 e HLA-A*02 de Foxp3. Foi demonstrado que esses peptídeos são peptídeos de epítopos restritos a HLA-aA24 ou HLA-A02 que podem induzir imunorrespostas potentes e específicas contra Foxp3 expresso em T-reg.

Por conseguinte, a presente invenção proporciona métodos para regular imunossupressão, cujos métodos compreendem a etapa de administrar polipeptídeos Foxp3 da invenção. Anti-imunossupressão (isto é, reverter ou contrapor-se à imunossupressão), por exemplo, de linfócitos T citotóxicos, é induzida pela administração dos polipeptídeos Foxp3. Assim, a presente invenção proporciona métodos para induzir anti-imunossupressão,

cujos métodos compreendem a etapa de administrar os polipeptídeos Foxp3, bem como agentes farmacêuticos para regular a imunossupressão, compreendendo os polipeptídeos Foxp3.

5 Em um aspecto, a invenção proporciona peptídeos, em que os peptídeos compreendem ou consistem em uma sequência de aminoácidos que consiste em SEQ ID N^{os}: 3 a 5, 7 a 9, 12, 15 a 19, 22, 24, 17-30, 37-67 ou 74.

10 Em um outro aspecto, a invenção proporciona peptídeos tendo indutividade de células T citotóxicas, em que o peptídeo compreende ou consiste na sequência de aminoácidos selecionada do grupo de:

(a) SEQ ID NOs: 3 a 5, 7 a 9, 12, 17, 67 ou 74; e

(b) SEQ ID NOs: 3 a 5, 7 a 9, 12, 17, 67 ou 74, em que 1, 2, ou vários aminoácidos são substituídos ou adicionados.

15 Em um outro aspecto, a invenção proporciona peptídeos tendo indutividade de células T citotóxicas, em que o peptídeo compreende a sequência de aminoácidos selecionada de:

(a) SEQ ID NOs: 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, ou 37, e

(b) SEQ ID NOs: 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, ou 37, em que 1, 2 ou vários aminoácidos são substituídos ou adicionados.

20 Com respeito às modalidades, em algumas modalidades, o segundo aminoácido da terminação N é fenilalanina, tirosina, metionina ou triptofano. Em algumas modalidades, o aminoácido na terminação C é fenilalanina, leucina, isoleucina, triptofano ou metionina. Em algumas modalidades, o segundo aminoácido na terminação N é leucina ou metionina. Em algumas
25 modalidades, o aminoácido na terminação C é valina ou leucina. Por exemplo, o peptídeo substituído compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 95, 97 ou 98.

30 A invenção proporciona ainda composições que compreendem peptídeos Foxp3 da invenção ou polinucleotídeos que codificam os peptídeos Foxp3 da invenção, e um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, as composições são formuladas para serem administradas como uma vacina.

As composições podem compreender um peptídeo ou uma pluralidade de diferentes peptídeos Foxp3 da invenção. As composições são úteis para inibir células T-reg, por exemplo, inibir a proliferação ou suprimir a função de uma célula T-reg.

5 Em algumas modalidades, as composições compreendem um ou mais peptídeos Foxp3 que elicitam uma imunorresposta que inibe as células T-reg em um paciente cujo antígeno HLA é HLA-A24. Em algumas modalidades, as composições compreendem um ou mais peptídeos Fox3p que elicitam uma imunorresposta que inibe as células T-reg em um paciente cujo
10 antígeno HLA é HLA-A02.

Em um outro aspecto, a invenção proporciona composições que compreendem um polinucleotídeo que codifica um peptídeo Foxp3. Em algumas modalidades, as composições compreendem uma pluralidade (isto é, dois ou mais) de polinucleotídeos que codifica uma pluralidade de peptídeos
15 Foxp3 da invenção. Em algumas modalidades, as composições compreendem um polinucleotídeo que codifica uma pluralidade de peptídeos Foxp3 da invenção.

Em algumas modalidades, as composições compreendem um outro peptídeo que tem a capacidade de induzir células T citotóxicas contra
20 células cancerosas ou um outro polinucleotídeo que codifica o outro peptídeo.

Em um outro aspecto, a invenção proporciona um exossoma que apresenta sobre sua superfície um complexo que compreende um antígeno HLA e um peptídeo Foxp3 da invenção. Em algumas modalidades, o antígeno
25 HLA é selecionado do grupo que consiste em HLA-A24, HLA-A2402, HLA-A02 e HLA-A0201.

Em um aspecto relacionado, a invenção proporciona métodos para o tratamento de câncer (por exemplo, reduzir o crescimento de células de tumor, promovendo a morte das células do tumor) por administração a
30 um indivíduo de um peptídeo Foxp3 ou um polinucleotídeo que codifica um peptídeo Fox3peptídeo.

Em um outro aspecto, a invenção proporciona métodos para in-

duzir células que apresentam antígeno tendo alta indutividade de células T citotóxicas por administração de um peptídeo Foxp3 da invenção ou um polinucleotídeo que codifica o peptídeo Foxp3.

5 Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método para induzir células T citotóxicas por administração de um peptídeo Foxp3 da invenção ou um polinucleotídeo que codifica o peptídeo Foxp3.

Em um aspecto relacionado, a invenção proporciona uma célula T citotóxica isolada, que é induzida por um peptídeo Foxp3 da invenção.

10 Em um outro aspecto, a invenção proporciona uma célula apresentadora de antígeno, que compreende um complexo formado entre um antígeno HLA e um peptídeo Foxp3 da invenção. Em algumas modalidades, a célula que apresentadora de antígeno é isolada.

15 Em um outro aspecto, a invenção proporciona métodos para regular células T-reg em um paciente que compreende administrar ao paciente uma vacina que compreende um peptídeo Foxp3 da invenção ou um fragmento imunologicamente ativo do peptídeo, ou um polinucleotídeo que codifica peptídeo.

20 Na prática dos métodos de tratamento, o indivíduo ou paciente pode ser um humano. É para ser entendido que tanto o sumário da invenção acima como a descrição detalhada a seguir são modalidades exemplificadas, e não restritivas da invenção ou outras modalidades alternadas da invenção.

Breve Descrição dos Desenhos

25 [Figura 1] A figura 1 exibe fotografias que mostram os resultados do ensaio IFN-gama ELISPOT em CTLs que foram induzidos com peptídeos derivados de Foxp3. Na figura 1A, os CTLs nos números de poços nº 2 e 7 estimulados com Foxp3-A24-9-363 (SEQ ID NO: 3), nº 1 e nº 6 com Foxp3-A24-9-366 (SEQ ID NO: 7), nº 5 com Foxp3-A24-9-190 (SEQ ID NO: 9), e nº 7 com Foxp3-A24- 10-87 (SEQ ID NO: 67), e com Foxp3-A24- 10-60 (SEQ
30 ID NO: 74) mostraram produção potente de IFN-gama em comparação com o controle. Na figura 1B, os CTLs no número de poço nº 4 estimulados com Foxp3-A24-9-207 (SEQ ID NO: 4), nº 6 com Foxp3-A24-9-332 (SEQ ID NO

5), nº 6 com Foxp3-A24-9-337 (SEQ ID NO: 8), e nº 1 com Foxp3-A24-10-14 (SEQ ID NO: 12) mostraram produção potente de IFN-gama em comparação com o controle.

[Figuras 2A-B] A figura 2 exibe fotografias que mostram os resultados do ensaio IFN-gama ELISPOT em CTLs que foram induzidos com peptídeos derivados de Foxp3. Na figura 1A, os CTLs no número de poço nº 2 estimulados com Foxp3-A2-9-390 (SEQ ID NO 15), nº 2 com Foxp3-A2-9-69 (SEQ ID NO 16), nº 6 com Foxp3-A2-9-252 (SEQ ID NO: 17), nº 4 com Foxp3-A2-10-359 (SEQ ID NO: 22), nº 7 com Foxp3-A2-263 (SEQ ID NO: 24), e nº 2 e nº 5 com Foxp3-A2-10-94 (SEQ ID NO: 27) mostraram produção potente de IFN-gama em comparação com o controle. Na figura 2B, os CTLs em todos os poços estimulados com Foxp3-A2-10-233 (SEQ ID NO: 28), números de poço nº 6 e nº 7 com Foxp3-A2-10-152 (SEQ ID NO: 29), nº 5 com Foxp3-A2-10-77 (SEQ ID NO: 30), e nº 1 com Foxp3-A2-10-246 (SEQ ID NO: 37), e com Foxp3-A2-10-94 (SEQ ID NO 27) mostraram produção potente de IFN-gama em comparação com o controle.

[Figura 2C] Na figura 2C, os CTLs em números de poços nº 1, nº 2, nº 4, nº 5, nº 7, nº 9, nº 11 e nº 12 com Foxp3-A2-9-390 (SEQ ID NO: 15), nº 5 e nº 11 com Foxp3-A2-9-304 (SEQ ID NO: 19), nº 7 com Foxp3-A2-9-68 (SEQ ID NO 7) e nº 12 com Foxp3-A2-9-252 (SEQ ID NO: 17) mostraram produção potente de IFN-gama em comparação com o controle.

[Figura 3A-D] A figura 3 mostra que as células nas células positivas foram expandidas e realizaram o ensaio IFN-gama ELISA. Nas figuras 3A, B e C, as linhas de CTLs estimulados com Foxp3-A02-9-252 (SEQ ID No: 17) (diamante completo) mostraram produção potente de IFN-gama em comparação com o controle (quadrado completo).

[Figura 3E-G] Na figura 3E, as linhas de CTLs estimulados com Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO: 74) (diamante completo) mostraram produção potente de IFN-gama em comparação com o controle (quadrado completo). Na figura 3F, as linhas de CTLs estimulados com Foxp3-A02-10-94 (SEQ ID NO: 270 (diamante completo) mostraram produção potente de IFN-gama em comparação com o controle. Na figura 3F, as linhas de CTLs esti-

mulados com Foxp3-A02-10-94 (SEQ ID NO: 27) (diamante completo) mostraram produção potente de IFN-gama em comparação com o controle (quadrado completo). Na figura 3G, as linhas de CTLs estimulados com Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO: 67) (diamante completo) mostraram produção potente de IFN-gama em comparação com o controle (quadrado completo).

[Figura 4] A figura 4 mostra a atividade específica de CTL contra as células-alvo endogenosamente expressando Foxp3 e HLA-A*02 ou 24. Nas figuras 4A e B, as linhas de CTLs produzidos por Foxp3-A02-9-390 (SEQ ID NO: 15) e Foxp3-A02-9-252 (SEQ ID NO: 17) mostraram alta atividade específica de CTL contra 293T que transfectou tanto Foxp3 como HLA-A02. Por outro lado, não mostrou atividade específica de CTL significativa contra os controles. Na figura 4C, as linhas de CTLs produzidos por Foxp3-A02-9-252 (SEQ ID NO: 17) mostraram atividade específica de CTL contra 293T que transfectou tanto Foxp3 como HLA-A-24. Por outro lado, não mostrou atividade específica significativa de CTL contra os controles.

[Figura 5] A figura 5 mostra análise *in vivo* da imunogenicidade de peptídeo Foxp-252_h e Foxp3-252_m. Peptídeos conjugado com IFA ou IFA sozinho foram injetados s.c. em camundongos BALB/c nos dias 0 e 7. No dia 14, esplenócitos de camundongos vacinados foram coletados e usadas como células respondedoras. 1×10^4 de células RLmale1 pulsadas com peptídeo correspondente (quadrado completo), e sem peptídeo (quadrado aberto) foram usadas como células estimuladoras para o ensaio IFN-gama ELISPOT. Vacinação usando Foxp3-252_h (A) e Foxp3-252_m (B) foi realizada em cinco camundongos (M1-M5) e IFA sem injeção de peptídeo foi realizada em três camundongos (N1-N3) como controle em cada ensaio.

[Figura 6] figura 6 mostra efeitos antitumorais *in vivo* da vacinação usando peptídeo de epítipo Foxp3. 1×10^5 de linhagens de células 4T1 de câncer da mama foram injetadas em camundongos BALB/c no dia 0. IFA-conjugado com Foxp3-252_h (-círculo aberto-), Foxp3-252_m (-quadrado completo-), nenhum peptídeo (-triângulo-) foi injetado nos dias 3 e 10. Como controle do crescimento tumoral, camundongos não-vacinados (-x-) foram também preparados neste ensaio. Foi observada uma diferença significativa

de supressão de crescimento de tumor com a vacinação de peptídeo de epítopo Foxp3. *, $P < 0,01$; **, $P < 0,005$.

[Figura 7A-B] figura 7 mostra ensaio para afinidade de substituições Foxp3-9-252 com a molécula HLA. Na figura 7^a, CTLs induzidos com Foxp3-9-252-WT reconheceram as células apresentando o peptídeo Foxp3-9-252-9V na molécula de HLA-A2. Ensaio de IFN-gama ELISPOT foi realizada usando-se linhagem de CTL induzidas com peptídeo Foxp3-9-252-WT como células respondedoras e células T2 pulsadas com peptídeo Foxp3-9-252-WT ou Foxp3-9-252-9V como células estimuladoras, respectivamente. Células T2 sem pulso de peptídeo foram preparadas como controle. Na figura 7B, Foxp3-9-252-9V e Foxp3-9-252-WT mostraram afinidade similar com a molécula HLA-A2. Ensaio de IFN-gama ELISA foi realizado usando-se a linhagem CTL induzida com a linhagem CTL induzida com peptídeo Foxp3-9-252-WT como células respondedoras (1×10^5 células/poço) e células T2 pulsadas com peptídeo Foxp3-9-252-WT (-círculo completo-), Foxp3-9-252-9V (-círculo aberto-) ou HIV-A02 (-triângulo completo-) como células estimuladores (1×10^4 células/poço). Pulso de peptídeo de células estimuladoras foi conduzido a 37°C, por 2 horas, em cada tipo de peptídeo e concentração de peptídeo.

[Figura 7C-D] Na figura 7C, CTLs poderiam ser induzidos por estímulo com molécula HLA-A2 direcionada com substituições de Foxp3-9-252 para molécula HLA-A2 direcionada. CTLs para todos os peptídeos substituídos para molécula HLA-A2 foram gerados do modo descrito em "Materiais e Métodos". As células nos números de poço 3 e 7 estimuladas com Foxp3-9-252-3M, o número de poço 7 com Foxp3-9-252-3L e o número de poço 8 com Foxp3-9-252-9V mostraram produção de IFN-gama em comparação com o controle. Na figura 7D, CTLs gerados com Foxp3-9-252-9V reconhecem as células estimuladoras revestidas com o peptídeo Foxp3-9-252-WT. A linhagem de CTL induzida com o peptídeo Foxp3-9-252-9V foi usada como células respondedoras. Células T2 incubadas com Foxp3-9-252-9V (-círculo completo-) ou o peptídeo Foxp3-9-252-WT (-círculo aberto-) e sem qualquer peptídeo (-quadrado aberto-) foram usadas como células estimula-

doras neste ensaio.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. Definições

5 As palavras "um", "uma", "o" e "a" conforme usadas aqui significam "pelo menos um", a menos que de outro modo especificamente indicado.

Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados intercambiavelmente aqui com referência a um polímero de resíduos de aminoácidos. Os termos se aplicam aos polímeros de aminoácidos nos quais
10 um ou mais resíduos de aminoácidos são um resíduo modificado, ou um resíduo não-natural, tal como um mimético químico artificial de um aminoácido natural correspondente, bem como polímeros de aminoácidos naturais.

O termo "aminoácido", como usado aqui, refere-se a aminoácidos naturais e sintéticos, bem como análogos de aminoácidos e miméticos de aminoácidos que funcionam de modo similar aos aminoácidos naturais.
15 Aminoácidos naturais são aqueles codificados pelo código genético, bem como aqueles modificados depois da tradução em células (por exemplo, hidroxiprolina, gama-carboxiglutamato, e O-fosfoserina). A expressão "análogo de aminoácido" refere-se a compostos que têm a mesma estrutura química básica (um carbono alfa ligado a um hidrogênio, um grupo carboxi, um
20 grupo amino, e um grupo R) como um aminoácido natural, mas têm um grupo R modificado ou cadeias principais modificadas (por exemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfônio). A expressão "mimético de aminoácido" refere-se a produtos químicos que têm estruturas
25 diferentes, mas funções similares aos aminoácidos gerais.

Aminoácidos são referidos aqui por seus símbolos de três letras comumente conhecidos ou os símbolos de uma letra conforme recomendação da IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

Os termos "gene", "polinucleotídeos", "nucleotídeos" e "ácidos
30 nucleicos" são usados intercambiavelmente aqui a menos que de outro modo especificamente indicado e são, de forma similar aos aminoácidos, referidos aqui por seus códigos de letra única, comumente aceitos.

A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado conforme comumente entendido por aquele versado na técnica à qual essa invenção pertence. No caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo definições, controlará.

II. Peptídeos

Para demonstrar que os peptídeos derivados de Foxp3 funcionam como antígeno reconhecido por células T citotóxicas (CTLs), na presente invenção, peptídeos que são subsequências de Foxp3 foram analisadas quanto a se eles são epítomos de antígeno restritos por HLA-A24 ou HLA-A02, que são alelos HLA comuns no mundo (Date Y *et al.*, Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A *et al.*, J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT *et al.*, J Immunol 152: 3913-24, 1994). Candidatos de peptídeos de ligação de HLA-A24 e HLA-A02 que são subsequências de Foxp3 foram identificados usando-se a informação sobre suas afinidades de ligação com HLA-A24 e HLA-A02. Depois da estimulação *in vitro* das células T por células dendríticas (DCs) carregadas com esses peptídeos, CTLs foram estabelecidos com sucesso usando-se:

Foxp3-A24-9-363 (SEQ ID NO: 3),
 Foxp3-A24-9-366 (SEQ ID NO: 7),
 Foxp3-A24-9-190 (SEQ ID NO: 9),
 Foxp3-A24-9-207 (SEQ ID NO: 4),
 Foxp3-A24-9-332 (SEQ ID NO: 5),
 Foxp3-A24-9-337 (SEQ ID NO: 8),
 Foxp3-A24-10-114 (SEQ ID NO: 12),
 Foxp3-A2-9-390 (SEQ ID NO: 15),
 Foxp3-A2-9-69 (SEQ ID NO: 16),
 Foxp3-A2-9-252 (SEQ ID NO: 17),
 Foxp3-A2-10-359 (SEQ ID NO: 22),
 Foxp3-A2-10-263 (SEQ ID NO: 24),
 Foxp3-A2-10-94 (SEQ ID NO: 27),
 Foxp3-A2-10-233 (SEQ ID NO: 28),

- Foxp3-A2-10-152 (SEQ ID NO: 29),
 Foxp3-A2-10-77 (SEQ ID NO: 30),
 Foxp3-A2-10-246 (SEQ ID NO: 37),
 Foxp3-A2-9-68 (SEQ ID NO: 18),
 5 Foxp3-A2-9-304 (SEQ ID NO: 19), Foxp3-A24- 10-87 (SEQ ID NO: 67) e
 Foxp3-A24- 10-60 (SEQ ID NO: 74).

Esses CTLs estabelecidos mostraram potente atividade específica de CTL contra as células-alvo pulsadas com peptídeo. Esses resultados são consistentes com a conclusão que Foxp3 é um antígeno reconhecido

10 por CTL e que:

- Foxp3-A24-9-363 (SEQ ID NO: 3),
 Foxp3-A24-9-366 (SEQ ID NO: 7),
 Foxp3-A24-9-190 (SEQ ID NO: 9),
 Foxp3-A24-9-207 (SEQ ID NO: 4),
 15 Foxp3-A24-9-332 (SEQ ID NO: 5),
 Foxp3-A24-9-337 (SEQ ID NO: 8),
 Foxp3-A24-10-114 (SEQ ID NO: 12),
 Foxp3-A2-9-390 (SEQ ID NO: 15),
 Foxp3-A2-9-69 (SEQ ID NO: 16),
 20 Foxp3-A2-9-252 (SEQ ID NO: 17),
 Foxp3-A2-10-359 (SEQ ID NO: 22),
 Foxp3-A2-10-263 (SEQ ID NO: 24),
 Foxp3-A2-10-94 (SEQ ID NO: 27),
 Foxp3-A2-10-233 (SEQ ID NO: 28),
 25 Foxp3-A2-10-152 (SEQ ID NO: 29),
 Foxp3-A2-10-77 (SEQ ID NO: 30),
 Foxp3-A2-10-246 (SEQ ID NO: 37),
 Foxp3-A2-9-68 (SEQ ID NO: 18),
 Foxp3-A2-9-304 (SEQ ID NO: 19),
 30 Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO: 67) e
 Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO: 74) são peptídeos de epítipo restritos por HLA-A24 e HLA-A2. Já que Foxp3 é expresso na maioria dos pacientes com

câncer e está associado à imunossupressão induzida por fatores imunossupressivos devido a tumores, Foxp3 é um bom alvo para imunoterapia para promover a eficácia clínica de imunoterapia específica de antígeno contra câncer.

5 Assim, a presente invenção proporciona nonapeptídeos (peptídeos que consistem em nove resíduos de aminoácidos) e decapeptídeos (peptídeos que consistem em dez resíduos de aminoácidos). Os peptídeos Foxp3 da invenção se ligam a uma molécula de HLA e induzem atividade citotóxica em linfócitos T citotóxicos (CTLs). Mais especificamente, a invenção proporciona peptídeos que consistem na sequência de aminoácidos selecionada do grupo de SEQ ID N^{os}; 3 a 5, 7 a 9, 12, 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, 37, 67 ou 74.

Geralmente, programas de software agora disponíveis na Internet, tais como aqueles descritos por Parker KC. Et al, J Immunol. Janeiro de 15 1994 1;152(1):163-175, podem ser usados para calcular as afinidades de ligação entre vários peptídeos e antígenos HLA em silico. Afinidade de ligação com antígenos HLA pode ser avaliada *in vitro* conforme descrita, por exemplo, por Parker KC. et al, J Immunol. 1994 Jan 1;152(1):163-75; Nukaya I. et al, Int J Cancer. 1999 Jan 5;80(1):92-7; Kuzushima K, et al. (2001) Blood;98(6):1872-81; Journal of Immunological Methods, 1995, 185: 181-190; 20 Protein Science, 2000, 9: 1838-1846).

Além disso, os peptídeos Foxp3 da presente invenção podem ser flanqueados com resíduos de aminoácidos adicionais desde que o peptídeo Foxp3 retenha suas indutividade de CTL. Tais peptídeos com indutividade de CTL podem ser menos que cerca de 40 aminoácidos, por exemplo, 25 menos que cerca de 20 aminoácidos, por exemplo, menos que cerca de 15 aminoácidos. A sequência de aminoácidos flanqueando os peptídeos que consiste na sequência de aminoácidos selecionada do grupo de SEQ ID NOs: 3 a 5, 7 a 9, 12, 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, 37, 67 e 74 não é limitada e 30 pode ser composta por qualquer tipo de aminoácidos desde que não iniba a indutividade de CTL do peptídeo. Assim, a presente invenção proporciona também peptídeos tendo indutividade de CTL, que compreende a sequência

de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 3 a 5, 7 a 9, 12, 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, 37, 67 e 74.

5 Geralmente, é sabido que modificações de um ou mais aminoácidos em uma proteína não influenciam a função da proteína, ou, em alguns casos, ainda intensifica, a função desejada da proteína original. De fato, peptídeos modificados (isto é, peptídeos compostos de uma sequência de aminoácidos modificada por substituição ou adição de um, dois ou vários resíduos de aminoácidos para uma sequência de referência original) têm sido conhecidos por reterem a atividade biológica do peptídeo original (Mark *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 81: 5662-6, 1984; Zoller e Smith, Nucleic Acids Res 10: 6487-500, 1982; Dalbadie- McFarland *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 79: 6409-13, 1982). Assim, de acordo com uma modalidade da invenção, o peptídeo tendo indutividade de CTL da presente invenção pode ser composta dos aminoácidos que compreendem a SEQ ID NOs: 3 a 5, 7 a 9, 12, 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, 37, 67 ou 74, em que um ou mais aminoácidos são adicionados e/ou substituídos.

Aquele versado na técnica reconhecerá que adições ou substituições individuais a uma sequência de aminoácidos, que alteram um aminoácido simples ou uma pequena porcentagem de aminoácidos, resultam na conservação das propriedades da cadeia lateral do aminoácido original; ela é assim referida como "substituição conservativa" ou "modificação conservativa", em que a alteração de uma proteína resulta em uma proteína com funções similares. Tabelas de substituições conservativas que proporcionam aminoácidos funcionalmente similares são bem conhecidas da técnica. Exemplos de propriedades de cadeias laterais de aminoácidos são aminoácidos hidrofóbicos (A, I, L, M, F, P, W, Y, V), aminoácidos hidrofílicos (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T), e cadeias laterais tendo os seguintes grupos funcionais ou características em comum: uma cadeia lateral alifática (G, A, V, L, I, P); um grupo hidroxila contendo cadeia lateral (S, T, Y); uma cadeia lateral contendo átomo de enxofre (C, M); um ácido carboxílico e cadeia lateral contendo amida (D, N, E, Q); uma cadeia lateral contendo bases (R, K, H); e uma cadeia lateral contendo aromático (H, F, Y, W). Além disso, os oito gru-

pos seguintes contêm, cada um, aminoácidos que são substituições conservativas um para o outro:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (E);
- 5 3) Aspargina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W);
- 7) Serina (S), Treonina (T); e
- 10 8) Cisteína (C), Metionina (M) (vide, por exemplo, Creighton, Proteins (1984)).

Tais peptídeos conservativamente modificados são também considerados como sendo peptídeos da presente invenção. Contudo, o peptídeo da presente invenção não está restrito a esses e podem incluir modificações não conservativas desde que o peptídeo retenha a indutividade de CTL. Além disso, os peptídeos não-modificados não excluem peptídeos induzíveis por CTL de variantes polimórficas, homólogos de interespecies, e alelos de Foxp3.

Pode-se modificar (adicionar ou substituir) somente uma pequena quantidade (por exemplo, 1, 2 ou vários) ou uma pequena porcentagem de resíduos de aminoácidos enquanto é mantido o requisito de indutividade de CTL (isto é, ativação de CTL). Aqui, o termo "vários" significa 5 ou menos, ou, por exemplo, 3 ou menos. A porcentagem de resíduos de aminoácidos modificados pode ser de 20% ou menos, por exemplo, 15% ou 10% ou menos, por exemplo, 1 a 5% da totalidade da sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 3 a 5, 7 a 9, 12, 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, 37, 67 e 74. Os peptídeos Foxp3 tendo pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidade de sequência de aminoácidos com a totalidade das sequências identificadas são contemplados pela presente invenção. A identidade de sequência pode ser avaliada usando-se qualquer algoritmo conhecido da técnica, por exemplo, BLAST, disponível através do National Center for Biotechnology Information (na rede em ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi).

Análise de homologia (isto é, identidade de sequências) dos presentes peptídeos,

- Foxp3-A24-9-363 (SEQ ID NO: 3),
- Foxp3-A24-9-366 (SEQ ID NO: 7),
- 5 Foxp3-A24-9-190 (SEQ ID NO: 9),
- Foxp3-A24-9-207 (SEQ ID NO: 4),
- Foxp3-A24-9-332 (SEQ ID NO: 5),
- Foxp3-A24-9-337 (SEQ ID NO: 8),
- Foxp3-A24-10-114 (SEQ ID NO: 12),
- 10 Foxp3-A2-9-390 (SEQ ID NO: 15),
- Foxp3-A2-9-69 (SEQ ID NO: 16),
- Foxp3-A2-9-252 (SEQ ID NO: 17),
- Foxp3-A2- 10-359 (SEQ ID NO: 22),
- Foxp3-A2- 10-263 (SEQ ID NO: 24),
- 15 Foxp3-A2- 10-94 (SEQ ID NO: 27),
- Foxp3-A2- 10-233 (SEQ ID NO: 28),
- Foxp3-A2-10-152 (SEQ ID NO: 29),
- Foxp3-A2- 10-77 (SEQ ID NO: 30),
- Foxp3-A2- 10-246 (SEQ ID NO: 37),
- 20 Foxp3-A2-9-68 (SEQ ID NO: 18),
- Foxp3-A2-9-304 (SEQ ID NO: 19),
- Foxp3-A24- 10-87 (SEQ ID NO: 67) e
- Foxp3-A24- 10-60 (SEQ ID NO: 74) mostrou que eles não têm homologia
- significante com peptídeos derivados de quaisquer outros produtos gênicos
- humanos conhecidos. Isso diminui a possibilidade de imunorrespostas des-
- conhecidas ou indesejadas quando do uso para imunoterapia.

Quando usados em imunoterapia, os presentes peptídeos serão apresentados sobre a superfície de uma célula ou exossoma como um complexo com um antígeno HLA. Portanto, os peptídeos são selecionados com

30 alta afinidade de ligação com o antígeno HLA além de sua indutividade de CTL. Além disso, os peptídeos podem ser modificados por substituição, adição e similares dos resíduos de aminoácidos para obter uma alta afinidade

de ligação. Além dos peptídeos que são naturalmente exibidos, já que a regularidade (isto é, consistência) das sequências dos peptídeos exibidos por ligação aos antígenos HLA já é conhecida (J Immunol 152: 3913, 1994; Immunogenetics 41: 178, 1995; J Immunol 155: 4307, 1994), modificações baseadas em tal regularidade podem ser realizadas nos peptídeos imunogênicos da invenção. Por exemplo, os peptídeos que mostram alta afinidade de ligação com HLA-A24 podem ter seu segundo aminoácido da terminação N substituído com fenilalanina, tirosina, metionina, ou triptofano, e peptídeos cujo aminoácido na terminação C é substituído com fenilalanina, leucina, isoleucina, triptofano, ou metionina têm utilidade também. Por outro lado, os peptídeos cujo segundo aminoácido da terminação N é substituído com leucina ou metionina, e no qual o aminoácido na terminação C é substituído com valina ou leucina podem ser usado como peptídeos com alta afinidade de ligação com HLA-A02. A substituição é realizada não somente nos aminoácidos da terminação, mas também na posição de reconhecimento TCR potencial de peptídeos. Zaremba *et al.* demonstraram que as substituições de aminoácidos no peptídeo CPA1 pode ser igual ou melhor que o original (Cancer Res. 57. 4570-4577, 1997). Por exemplo, o peptídeo substituído compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 95, 97 ou 98. Além disso, um ou dois aminoácidos podem ser também adicionados à terminação N e/ou C dos peptídeos. Tais peptídeos modificados com alta afinidade de ligação com HLA são também incluídos na presente invenção.

Contudo, quando a sequência de peptídeos é idêntica a uma porção da sequência de aminoácidos de uma proteína endógena ou exógena tendo uma função diferente, os efeitos colaterais, tais como distúrbios auto-imunes ou sintomas alérgicos contra substâncias específicas, podem ser induzidos. Portanto, buscas por homologia podem ser realizadas usando-se bases de dados disponíveis para evitar, reduzir ou minimizar situações nas quais a sequência do peptídeo emparelha com a sequência de aminoácidos de uma outra proteína. Quando fica claro das buscas por homologia que não existe nenhum outro peptídeo com uma diferença de 1 ou 2 aminoácidos para o peptídeo objetivo, o peptídeo objetivo por ser modificado de

modo a aumentar a afinidade de ligação com antígenos HLA, e/ou aumentar a indutividade de CTL sem qualquer perigo dos efeitos colaterais.

Os peptídeos tendo alta afinidade de ligação para os antígenos HLA conforme descritos acima serão altamente eficazes. Os peptídeos-candidato, que são selecionados de acordo com a presença de alta afinidade de ligação como um indicador, podem ser também examinados quanto à real presença da indutividade de CTL. Aqui, a expressão "indutividade de CTL" indica a capacidade do peptídeo de induzir CTLs quando apresentados nas células apresentadoras de antígenos. Ainda, a "indutividade de CTL" inclui a capacidade do peptídeo de induzir a ativação de CTL, proliferação de CTL, e aumentar a produção de IFN-gama.

A confirmação da indutividade de CTL pode ser obtida por indução de células apresentadoras de antígeno contendo antígenos MHC humanos (por exemplo, linfócitos B, macrófagos, e células dendríticas), ou mais especificamente células dendríticas derivadas de leucócitos mononucleares sanguíneos periféricos, e depois da estimulação com peptídeos, misturar com células positivas para CD8, e então medir o IFN-gama produzido e liberado por CTL contra as células-alvo. Como o sistema de reação, animais transgênicos que foram produzidos para expressar um antígeno HLA humano (por exemplo, aqueles descritos por BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 61(8): 764-79, 2000 Aug, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DRI transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) response) podem ser usados. Por exemplo, as células-alvo podem ser radiomarcadas com ^{51}Cr e similares, e a atividade citotóxica pode ser calculada a partir da radioatividade liberada das células-alvo. Alternativamente, esta pode ser examinada por medição de IFN-gama produzido e liberado por CTL na presença de células apresentadoras de antígeno que abrigam peptídeos imobilizados, e visualizar a zona de inibição no meio usando anticorpos monoclonais anti-IFN-gama.

Como resultado do exame da indutividade de CTL dos peptídeos conforme descrição acima, aqueles tendo alta afinidade de ligação com um

antígeno HLA não tiveram, necessariamente, alta indutividade. Além disso, nonapeptídeos ou decapeptídeos selecionados de peptídeos compreendendo as sequências de aminoácidos indicadas pelas SEQ ID NOs: 3 a 5, 7 a 9, 12, 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, 37, 67 ou 74, mostraram particularmente alta indutividade de CTL bem como alta afinidade de ligação com um antígeno HLA.

Além da modificação mencionada acima dos presentes peptídeos, os peptídeos da presente invenção podem ser ainda ligados a outras substâncias, desde que elas retenham a indutividade de CTL. Substâncias úteis incluem: peptídeos, lipídios, açúcar e cadeias de açúcar, grupos acetila, polímeros naturais e sintéticos, etc. Os peptídeos podem conter modificações tal como glicosilação, oxidação da cadeia lateral, ou fosforilação, desde que as modificações não destruam a atividade biológica dos peptídeos conforme descrição aqui. Esses tipos de modificações podem ser realizados para conferir funções adicionais (por exemplo, função de alveamento, e função de distribuição) ou para estabilizar o polipeptídeo.

Por exemplo, para aumentar a estabilidade *in vivo* de um polipeptídeo, é conhecido da técnica se introduzir particularmente vários D-aminoácidos úteis, miméticos de aminoácidos ou aminoácidos não-naturais; esse conceito pode ser também adotado para os presentes polipeptídeos. A estabilidade de um polipeptídeo pode ser ensaiada a partir de numerosas formas. Por exemplo, peptidases e vários meios biológicos, tais como plasma e soro humanos, têm sido usados para testar a estabilidade (vide, por exemplo, Verhoef *et al.*, Eur J Drug Metab Pharmacokin 11: 291-302, 1986).

25 III. Preparação dos Peptídeos

Os peptídeos da invenção podem ser preparados usando-se técnicas bem conhecidas. Por exemplo, os peptídeos podem ser preparados sinteticamente, por tecnologia de DNA recombinante ou síntese química. Os peptídeos da invenção podem ser sintetizados individualmente ou como peptídeos mais longos compreendendo dois ou mais peptídeos (por exemplo, dois ou mais peptídeos Foxp3 ou um peptídeo Foxp3 e um não-peptídeo Foxp3). Os peptídeos podem ser isolados isto é, purificados para serem

substancialmente isentos de outras proteínas de células hospedeiras naturais e fragmentos destas, por exemplo, pelo menos cerca de 70%, 80% ou 90% purificados.

Um peptídeo da presente invenção pode ser obtido através da síntese química com base na sequência de aminoácidos selecionada. Por exemplo, métodos de síntese de peptídeos convencionais que podem ser adotados para a síntese incluem:

- (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;
- (ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;
- (iii) Peptide Synthesis (em japonês), Maruzen Co., 1975;
- (iv) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (em japonês), Maruzen Co., 1985;
- (v) Development of Pharmaceuticals (segundo volume) (em japonês), Vol. 14 (peptide synthesis), Hirokawa, 1991;
- (vi) WO99/67288; e
- (vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118.

Alternativamente, os presentes peptídeos podem ser obtidos adotando-se quaisquer métodos de engenharia genética para produzir peptídeos (por exemplo, Morrison J. (1977) J. Bacteriology 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss (1983) Methods in Enzymology (eds. Wu *et al.*) 101: 347-62). Por exemplo, primeiramente, um vetor adequado abrigando um polinucleotídeo que codifica o peptídeo objetivo em uma forma expressável (por exemplo, a jusante da sequência reguladora correspondente a uma sequência de promotores) é preparado e transformado em uma célula hospedeira. A célula hospedeira é então cultivada para produzir o peptídeo de interesse. Os peptídeos podem ser também produzidos *in vitro* adotando-se um sistema de tradução *in vitro*.

IV. Polinucleotídeos

A presente invenção proporciona polinucleotídeos que codificam qualquer um dos peptídeos mencionados acima da presente invenção. Esses incluem polinucleotídeos derivados do gene de Foxp3 natural e aqueles

tendo uma sequência de nucleotídeos conservativamente modificada destes. Aqui, a frase "sequência de nucleotídeos conservativamente modificada" refere-se a sequências que codificam sequências de aminoácidos idênticas ou essencialmente idênticas. Devido à degenerescência do código genético, inúmeros ácidos nucleicos funcionalmente idênticos codificam qualquer proteína dada. Por exemplo, os códons GCA, GCC, GCG, e GCU codificam, todos eles, o aminoácido alanina. Assim, em cada posição onde uma alanina é especificada por um códon, o códon pode ser alterado para qualquer um dos códons correspondentes descritos, sem alterar o polipeptídeo codificado. Tais variações de ácidos nucleicos são "variações silenciosas", que são uma espécie de variações modificadas conservativamente. Cada sequência de ácidos nucleicos aqui que codifica um peptídeo descreve também cada variação silenciosa possível do ácido nucleico. Aquele versado na técnica reconhecerá que cada códon em um ácido nucleico (exceto AUG, que ordinariamente o único códon para metionina, e TGG, que é ordinariamente o único códon para triptofano) pode ser modificado para produzir uma molécula funcionalmente idêntica. Por conseguinte, cada variação silenciosa de um ácido nucleico que codifica um peptídeo está implicitamente descrito em cada sequência descrita.

O polinucleotídeo da presente invenção pode ser composto de DNA, RNA e derivados dos mesmos. Um DNA é adequadamente composto de bases, tais como A, T, C, e G. T é substituída por U em um RNA.

Os polinucleotídeos de Foxp3 da presente invenção podem codificar peptídeos Foxp3 múltiplos da presente invenção com ou sem a sequência de aminoácidos de intervenção entre eles. Por exemplo, a sequência de aminoácidos de intervenção pode proporcionar um sítio de clivagem (por exemplo, sequência de reconhecimento de enzima) do polinucleotídeo ou dos peptídeos traduzidos. Além disso, os polinucleotídeos podem incluir quaisquer sequências adicionais à sequência de codificação do peptídeo de presente invenção. Por exemplo, os polinucleotídeos podem ser polinucleotídeos recombinantes que incluem sequências reguladoras requeridas para a expressão do peptídeo. Em geral, tais polinucleotídeos recombinantes po-

dem ser preparados pela manipulação de polinucleotídeos através de técnicas recombinantes convencionais usando, por exemplo, polimerase e endonucleases.

- 5 Ambas as técnicas de sínteses químicas e recombinantes podem ser usadas para produzir os polinucleotídeos da presente invenção. Por exemplo, os polinucleotídeos podem ser amplificados usando-se técnicas de PCR ou expressão em hospedeiros adequados (vide, por exemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989). Alternativamente, os polinucleotídeos podem ser
10 sintetizados por técnicas em fase sólida, conforme descritas por Beaucage S. L. & Iyer R.P., Tetrahedron 48: 2223-311, 1992; Matthes *et al.*, EMBO J 3: 801-5, 1984.

V. Agentes Farmacêuticos

- Já que Foxp3 foi identificado como uma molécula de célula reguladora T (T-reg), cujas células funcionam para manter a homeostasia imune,
15 os peptídeos Foxp3 ou polinucleotídeos que codificam os peptídeos Foxp3 desta invenção podem ser usados para regular as células T-reg. Assim, a presente invenção proporciona um agente farmacêutico para regular células T-reg, que compreendem um ou mais peptídeos desta invenção, ou polinucleotídeos que codificam os peptídeos como um ingrediente ativo.
20

- Aqui, "reguladoras" das células T-reg indica modificar o estado das células T-reg *in vivo*, por exemplo, por inibir a proliferação ou supressão da função das células T-reg. Acredita-se que a célula T-reg seja uma das maiores realizadoras da supressão de vários tipos de imunorresposta e "suprimir a função das células T-reg" aqui significa reduzir a capacidade das células T-reg para suprimir a imunorresposta. Especialmente, as células T-reg agem na periferia como o chamado de tolerância periférica (Miescher S
25 *et al.*, J Immunol 136: 1899-907, 1986; Young RC *et al.*, Am J Med 52: 63-72, 1972; Alexander JP *et al.*, Cancer Res 53: 1380-7, 1997; Horiguchi S *et al.*, Cancer Res 59: 2950-6, 1999; Kono K *et al.*, Clin Cancer Res 11: 1825-8, 1996; Kiessling R *et al.*, Cancer Immunol Immunother 48: 353-62, 1999; Fontenot JD *et al.*, Nat Immunol 4: 330-6, 2003, Hori S *et al.*, Science 299: 1057-
30

61, 2003; Khattri R *et al.*, Nat Immunol 4: 304-6, 2003). Células T-reg proporcionam um efeito imunossupressor, por exemplo, em um paciente com câncer. Portanto, os peptídeos Foxp3 da presente invenção, que são super-expressos nas células T-reg, ou polinucleotídeos que codificam os peptídeos Foxp3 podem ser usados como agente farmacêutico (por exemplo, vacina) para tratar câncer.

Na presente invenção, a frase "vacina" (também referida como uma composição imunogênica) refere-se a um substrato que tem a função de induzir imunidade antitumoral ou imunidade para regular T-regs mediante inoculação em animais.

Os agentes farmacêuticos da presente invenção podem ser usados para tratar e/ou prevenir cânceres em pacientes, tal como em humano ou em qualquer outro animal incluindo, mas sem limitação, camundongo, rato, porquinho-da-índia, coelho, gato, cachorro, carneiro, cabra, porco, gado, cavalo, macaco, babuíno, e chimpanzé, particularmente um animal comercialmente importante ou um animal domesticado.

De acordo com a presente invenção, polipeptídeos compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 3 a 5, 7 a 9, 12, 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, 37, 67 ou 74 são peptídeos restritos por HLA-A24 ou HLA-A02 que podem induzir imunorresposta potente e específica contra células T-reg expressando Foxp3. Portanto, os presentes agentes farmacêuticos são destinados à administração a pacientes cujo antígeno HLA é ou HLA-A24 ou HLA-A02.

Cânceres a serem tratados pelos agentes farmacêuticos da presente invenção não são limitados e incluem todos os tipos de cânceres em que Foxp3 é expresso no paciente. Cânceres exemplificados incluem cânceres da mama, AML, câncer da bexiga, cervical, carcinoma colangio-celular, CML, do cólon e do reto, endometriose, esôfago, gástrico, tipo gástrico difuso, fígado, pulmão, linfoma, neuroblastoma, osteossarcoma, ovariano, pancreático, da próstata, carcinoma renal, câncer do pulmão de pequena célula, tumor de tecido macio e tumor testicular.

Se necessário, agentes farmacêuticos da presente invenção,

compostos ou de um peptídeo Foxp3 ou de um polinucleotídeo que codifica um peptídeo Foxp3, podem incluir opcionalmente outras substâncias terapêuticas como um ingrediente ativo, desde que a substância não iniba o efeito regulador das células T-reg do peptídeo de interesse. Por exemplo, a formulação pode incluir agentes anti-inflamatórios, analgésicos, produtos quimioterapêuticos e similares. Além de incluir outras substâncias terapêuticas no próprio medicamento, os medicamentos da presente invenção podem ser também administrados sequencial ou concorrentemente com um ou mais de outros agentes farmacológicos. As quantidades de medicamento e agente farmacológico dependem, por exemplo, do tipo de agente(s) farmacológico(s) que é(são) usado(s), a doença que está sendo tratada, e a programação e vias de administração.

Deve ser entendido que além dos ingredientes particularmente mencionados aqui, os agentes farmacêuticos da invenção podem incluir outros agentes convencionais da técnica com respeito ao tipo de formulação em questão.

Em uma modalidade da presente invenção, os presentes agentes farmacêuticos podem ser incluídos nos artigos de fabricação e kits contendo os materiais úteis para tratar as condições patológicas da doença a ser tratada, por exemplo, câncer. O artigo de fabricação pode incluir um recipiente de qualquer um dos presentes agentes farmacêuticos com um rótulo. Recipientes adequados incluem garrafas, ampolas e tubos de ensaio. Os recipientes podem ser formados de uma variedade de materiais, tal como vidro ou plástico. O rótulo no recipiente deve indicar o agente que é usado para tratar ou prevenir uma ou mais condições da doença. O rótulo pode indicar também instruções para administração e assim por diante.

Além do recipiente descrito acima, um kit incluindo um agente farmacêutico da presente invenção pode ainda incluir opcionalmente um segundo recipiente contendo um diluente farmacêuticamente aceitável. Ele pode incluir ainda outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas, e bulas para embalagem.

As composições farmacêuticas podem, se necessário, ser apresentadas em uma embalagem ou dispositivo dispensador que pode conter uma ou mais formas de dosagem unitária contendo o ingrediente ativo. A embalagem pode incluir, por exemplo, folha de metal ou de plástico, tal como uma embalagem de blister. A embalagem ou dispositivo dispensador podem vir acompanhados da bula para administração.

(1) Agentes Farmacêuticos Contendo os Peptídeos como o Ingrediente Ativo

Os peptídeos desta invenção podem ser administrados diretamente como um agente farmacêutico, se necessário, que foi formulado por métodos de formulação convencionais. Em tais casos, além dos peptídeos, veículos, excipientes, de modo que sejam ordinariamente usados para fármacos, podem ser incluídos como apropriados sem limitações particulares. Exemplos de tais veículos são água esterilizada, soro fisiológico, tampão de fosfato, fluido de cultura e outros. Além disso, os agentes farmacêuticos podem conter, conforme necessário, estabilizadores, suspensões, conservantes, tensoativos e similares. Os agentes farmacêuticos desta invenção podem ser usados para tratar e/ou prevenir câncer, especialmente células T-reg reguladoras.

Os peptídeos desta invenção podem ser preparados em uma combinação, que compreende dois ou mais de peptídeos Foxp3 da invenção, para induzir CTL *in vivo*. Os peptídeos Foxp3 podem estar em um coquetel ou podem ser conjugados uns aos outros usando técnicas padrão. Por exemplo, os peptídeos Foxp3 podem ser expressos como uma sequência de polipeptídeos única. Os peptídeos na combinação podem ser iguais ou diferentes. Por administração dos peptídeos Foxp3 desta invenção, os peptídeos são apresentados em uma densidade alta nos antígenos HLA de células apresentadoras de antígeno, então CTLs que especificamente reagem com o complexo formado entre o peptídeo exibido e o antígeno HLA são induzidos. Alternativamente, as células apresentadoras de antígeno que têm imobilizados os peptídeos Foxp3 desta invenção em sua superfície celular são obtidas por remoção de células dendríticas dos pacientes, que são estimuladas pelos peptídeos desta invenção, CTL é induzido nos pacientes

por re-administração das células carregadas com peptídeo Foxp3 aos pacientes, e como resultado, a agressividade em relação às células-alvo pode ser aumentada.

Os agentes farmacêuticos para regulação das células T-reg, que
5 compreendem um peptídeo Foxp3 desta invenção como o ingrediente ativo, pode compreender opcionalmente um adjuvante de modo que imunidade celular será estabelecida eficazmente, ou eles podem ser administrados com outros ingredientes ativos, e eles podem ser administrados por formulação em grânulos. Um adjuvante se refere a um composto que intensifica a imu-
10 norresposta contra a proteína quando administrado junto (ou sucessivamente) com a proteína tendo atividade imunológica. Um adjuvante que pode ser aplicado inclui aqueles descritos na literatura (Clin Microbiol Ver 7: 277-89, 1994). Adjuvantes típicos incluem fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio, alume, toxina da célula, toxina da salmonela, e outros, mas não são limita-
15 dos a estes.

Além disso, a formulações de lipossomos, formulações granulares nas quais o peptídeo Foxp3 é ligado a contas com diâmetros de poucos mcm, e formulações nas quais um lipídio é ligado ao peptídeo pode ser usado convenientemente.

20 Em algumas modalidades, os agentes farmacêuticos da invenção compreendem um componente que sensibiliza os linfócitos T citotóxicos. Lipídios foram identificados como agentes capazes de sensibilizar CTL *in vivo* contra agentes virais. Por exemplo, resíduos de ácido palmítico podem ser ligados aos grupos epsilon e alfa-amino de um resíduo de lisina e então
25 ligados a um peptídeo da invenção. O peptídeo lipidizado pode ser então administrado ou diretamente em uma micela ou partícula, incorporado em um lipossoma, ou emulsificado em um adjuvante. Como um outro exemplo de lipídio que sensibiliza respostas de CTL, lipoproteínas de *E. coli*, tal como tripalmitoil-S-glicerilcisteinliseric-serina (P3CSS), podem ser usadas para
30 sensibilizar CTL, quando ligadas covalentemente a um peptídeo apropriado (vide, por exemplo, Deres *et al.*, Nature 342: 561, 1989).

O método de administração pode ser oral, intradérmico, subcu-

tâneo, injeção intravenosa, ou similar, e administração sistêmica ou local à vizinhança dos sítios direcionados são úteis. A administração pode ser realizada por administração simples ou reforçada por administrações múltiplas. A dose dos peptídeos desta invenção pode ser ajustada apropriadamente de acordo com a doença a ser tratada, idade do paciente, peso, método de administração, e similar, e é normalmente de 0,001 mg a 1.000 mg, por exemplo, 0,001 mg a 1.000 mg, por exemplo, 0,1 mg a 10 mg, e pode ser administrada uma vez a cada poucos dias a uma vez a cada poucos meses. Aquele versado na técnica pode selecionar apropriadamente a dose adequada.

10 (2) Agentes Farmacêuticos Contendo Polinucleotídeos como o Ingrediente Ativo

Os agentes farmacêuticos da invenção podem compreender também ácidos nucleicos que codificam os peptídeos Foxp3 descritos aqui em uma forma expressável. Aqui, a frase "em uma forma expressável" significa que o polinucleotídeo, quando introduzido em uma célula, é expresso *in vivo* como um polipeptídeo que induz imunidade antitumoral. Em uma modalidade, a sequência de ácidos nucleicos do polinucleotídeo de interesse inclui elementos reguladores necessários para expressão do polinucleotídeo em uma célula-alvo. O(s) polinucleotídeo(s) pode(m) ser equipado(s) para serem inseridos estavelmente no genoma da célula-alvo (vide, por exemplo, Thomas KR & Capecchi MR, Cell 51: 503-12, 1987 para descrição sobre vetores de cassete de recombinação homóloga). Vide, por exemplo, Wolff *et al.*, Science 247: 1465-8, 1990; Patentes US 5.580.859; US 5.589.466; US 5.804.566; US 5.739.118; US 5.736.524; US 5.679.647; e WO 98/04720. Exemplos de tecnologias de distribuição com base em DNA incluem "DNA desprotegido", distribuição facilitada (mediada por bupivacaína, polímeros, peptídeo), complexos lipídicos catiônicos, e distribuição mediada por partícula ("pistola de genes") ou distribuição mediada por pressão (vide, por exemplo, a Patente US 5.922.687).

30 Os peptídeos da invenção podem ser também expressos por vetores virais ou bacterianos. Exemplos de vetores de expressão incluem hospedeiros virais atenuados, tais como vacínia, ou varicela aviária. Essa

abordagem envolve o uso do vírus da vacínia, por exemplo, como um vetor para expressar sequências de nucleotídeos que codificam o peptídeo. Mediante introdução em um hospedeiro, o vírus da vacínia recombinante expressa o peptídeo imunogênico, e daí elicitava uma imunorresposta. Vetores de vacínia e métodos úteis em protocolos de imunização são descritos, por exemplo, na Patente US 4.722.848. Um outro vetor é BCG (Bacille Calmette-Guerin). Vetores de BCG são descritos por Stover *et al.*, *Nature* 351: 456-60, 1991. Uma ampla variedade de outros vetores úteis para administração ou imunização, por exemplo, vetores de adenovírus e de vírus adeno-

5 associados, vetores retrovirais, vetores de *Salmonella typhi*, vetores da toxina de antraz destoxificada, e similares, tornar-se-ão aparentes. Vide, por exemplo, Shata *et al.*, *Mol Med Today* 6: 66-71, 2000; Shedlock *et al.* *J Leukoc Biol* 68: 793-806, 2000; Hipp *et al.*, *In Vivo* 14: 571-85, 2000.

10

A distribuição de um polinucleotídeo em um paciente pode ser ou direta, em cujo caso o paciente é diretamente exposto a um vetor contendo um polinucleotídeo, ou indireta, em cujo caso, as células são primeiramente transformadas com o polinucleotídeo de interesse *in vitro*, então transplantadas no paciente. Essas duas abordagens são conhecidas, respectivamente, como terapia gênica *in vivo* ou *ex vivo*.

15

Para revisões gerais dos métodos da terapia gênica, vide Golds-
 piel *et al.*, *Clinical Pharmacy* 12: 488-505, 1993; Wu and Wu, *Biotherapy* 3:
 87 a 95, 1991; Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 33: 573-96, 1993;
 Mulligan, *Science* 260: 926-32, 1993; Morgan & Anderson, *Ann Rev Biochem*
 62: 191-217, 1993; *Trends in Biotechnology* 11(5): 155-215, 1993). Métodos
 20 comumente conhecidos na técnica de tecnologia de DNA recombinante que
 pode ser usada são descritos por Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1993; e Krieger, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990.

25

O método de administração pode ser oral, intradérmico, subcu-
 30 tâneo, injeção intravenosa, ou similar, e administração sistêmica ou adminis-
 tração local à vizinhança dos sítios direcionados tem utilidade. A administra-
 ção pode ser realizada por administração simples ou reforçada por adminis-

trações múltiplas. A dose do polinucleotídeo no veículo ou células adequadas transformadas com o polinucleotídeo que codifica os peptídeos desta invenção pode ser ajustada apropriadamente de acordo com a doença a ser tratada, idade do paciente, peso, método de administração, e similar, e é
5 comumente de 0,001 mg a 1.000 mg, por exemplo, 0,001 mg a 1.000 mg, por exemplo, 0,1 mg a 10 mg, e pode ser administrada uma vez a cada poucos dias a uma vez a cada poucos meses. Aquele versado na técnica pode selecionar apropriadamente a dose adequada.

(3) Exossomas

10 Alternativamente, a presente invenção proporciona vesículas intracelulares chamadas exossomas, que apresentam complexos formados entre os peptídeos desta invenção e antígenos HLA sobre sua superfície. Exossomas podem ser preparados, por exemplo, pelo uso dos métodos descritos em detalhes na Tradução do Pedido Internacional Japonês Publi-
15 cado N^{os} Hei 11-510507 e 2000-512161, e podem ser preparados usando células apresentadoras de antígeno obtidas de pacientes que são alvos de tratamento e/ou prevenção. Os exossomas desta invenção podem ser inoculados como vacinas, similarmente aos peptídeos desta invenção.

O tipo de antígenos HLA usados deve emparelhar com aquele
20 do paciente que está requerendo tratamento e/ou prevenção. Por exemplo, para japoneses, HLA-A24, particularmente HLA-A2402 é frequentemente apropriado.

Com respeito aos antígenos HLA, o uso do tipo A-24 ou A-02 altamente expresso entre os japoneses e caucasianos é favorável para ob-
25 tenção de resultados eficazes, e o uso de subtipos incluindo A-2402 e A-0201 é útil. Tipicamente, na clínica, o tipo de antígeno HLA do paciente que requer o tratamento é investigado antecipadamente, permitindo a seleção apropriada de peptídeos tendo altos níveis de afinidade de ligação a esse antígeno, ou tendo indutividade de célula T citotóxica (CTL) por apresenta-
30 ção de antígenos. Além disso, de modo a obter peptídeos mostrando a alta afinidade de ligação e indutividade de CTL, substituição ou adição de 1, 2, ou vários aminoácidos podem ser realizados com base na sequência de a-

minoácidos do peptídeo parcial Foxp3.

(4) Células Apresentadoras de Antígenos

A presente invenção proporciona também células apresentadoras de antígeno (APCs) que apresentam complexos formados entre antígenos HLA e os peptídeos desta invenção sobre sua superfície. As APCs que são obtidas por contato com os peptídeos desta invenção, ou com os nucleotídeos que codificam que peptídeos desta invenção podem ser preparadas a partir de pacientes que são alvos de tratamento e/ou de prevenção, e podem ser administradas como vacinas por elas próprias ou em combinação com outros fármacos, inclusive os peptídeos desta invenção, exossomas, ou células T citotóxicas.

As APCs não são limitadas a qualquer tipo de células e incluem células dendríticas (DCs), células Langerhans, macrófagos, células B, e células T ativadas, todas as quais são conhecidas por antígenos protéicos em sua superfície celular de modo a serem reconhecidas por linfócitos. Já DC é uma APC representativa tendo a mais forte ação indutora de CTL entre as APCs, DCs encontram uso particular como as APCs da presente invenção.

Por exemplo, uma APC pode ser obtida por induzir células dendríticas dos monócitos sanguíneos periféricos e então por contatar (estimular) estas com os peptídeos desta *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. Quando os peptídeos desta invenção são administrados aos pacientes, APCs que têm os peptídeos desta invenção imobilizados nelas são induzidas no corpo do paciente. A expressão "induzir APC" inclui contatar (estimular) uma célula com os peptídeos desta invenção, ou nucleotídeos codificam os peptídeos desta invenção para apresentar complexos formados entre antígenos HLA e os peptídeos desta invenção na superfície da célula. Alternativamente, depois de imobilizar os peptídeos desta invenção nas APCs, as APCs podem ser administradas ao paciente como uma vacina. Por exemplo, a administração *ex vivo* pode compreender as etapas de:

- a: coletar APCs do paciente; e
- b: contatar com as APCs da etapa a, com o peptídeo.

As APCs obtidas pela etapa b podem ser administradas ao paci-

ente como uma vacina.

De acordo com um aspecto da presente invenção, as APCs têm um alto nível de indutividade de CTL. Tais APCs tendo um alto nível de indutividade de células T citotóxicas podem ser preparadas por um método que compreende a etapa de transferir os genes compreendendo polinucleotídeos que codificam os peptídeos desta invenção para APCs *in vitro*. Os genes introduzidos podem estar na forma de DNAs ou RNAs. Para o método de introdução, sem limitações particulares, vários métodos convencionalmente realizados neste campo, tais como lipofecção, eletroporação, e método de fosfato de cálcio podem ser usados. Mais especificamente, ele pode ser realizado conforme descrito em Cancer Res 56: 5672-7, 1996; J Immunol 161: 5607-13, 1998; J Exp Med 184: 465-72, 1996; Tradução da Publicação do Pedido Japonês Nº 2000-509281. Por transferência do gene para APCs, o gene sofre transcrição, tradução, e similar na célula, e então a proteína obtida é processada por MHC de Classe I ou de Classe II, e prossegue através de uma via de apresentação para apresentar peptídeos parciais.

(5) Células T Citotóxicas

Supõe-se que uma célula T citotóxica induzida contra qualquer um dos peptídeos Foxp3 da presente invenção reforça o sistema imunológico direcionando as células T-reg *in vivo* e assim pode ser usada como vacinas similares aos peptídeos. Assim, a presente invenção proporciona células T citotóxicas isoladas que são induzidas por quaisquer dos presentes peptídeos.

Tais células T citotóxicas podem ser obtidas por (1) administrar a um paciente ou (2) contatar (estimular) as APCs derivadas do paciente, e células positivas para CD8, ou leucócitos mononucleares sanguíneas periféricas *in vitro* com o peptídeo da presente invenção.

As células T citotóxicas, que foram induzidas por estimulação das APCs que apresentam os peptídeos desta invenção, podem ser derivadas de pacientes que são alvos de tratamento e/ou prevenção, e podem ser administradas por eles mesmos ou em combinação com outros fármacos incluindo os peptídeos desta invenção ou exossomas com a finalidade dos

efeitos reguladores. As células T citotóxicas agem especificamente contra células-alvo que apresentam os peptídeos desta invenção, por exemplo, os mesmos peptídeos usados para indução. As células-alvo podem ser células que expressam Foxp3 endogenosamente, ou células que são transfectadas com genes Foxp3 que apresentam os peptídeos desta invenção na superfície celular devido à estimulação por estes peptídeos podem também tornar alvos de ataque.

(6) TCRs

A presente invenção proporciona também uma composição que compreende ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos que são capazes de formar uma subunidade de um receptor de célula T (TCR), e métodos de usar a mesma. As subunidades de TCR têm a capacidade de formar TCRs que conferem especificidade para células T para células que apresentam o peptídeo desta invenção. Pelo uso do método conhecido na técnica, os ácidos nucleicos de cadeia alfa e beta como as subunidades de TCR de CTL induzido com um ou mais peptídeos desta invenção podem ser identificados (WO2007/032255 e Morgan *et al.*, J Immunol, 171, 3288 (2003)). Os TCRs derivados se ligam preferivelmente a células-alvo exibindo o peptídeo Foxp3 com alta avidéz, e opcionalmente medeiam a morte eficaz das células-alvo apresentando o peptídeo Foxp3 *in vivo* e *in vitro*.

Os ácidos nucleicos que codificam as subunidades de TCR podem ser incorporados em vetores adequados, por exemplo, vetores retrovirais. Esses vetores são bem-conhecidos da técnica. Os ácidos nucleicos ou os vetores compreendendo os mesmos podem ser de modo útil transferidos para uma célula T, cuja célula T é preferivelmente de um paciente. Vantajosamente, a invenção proporciona uma composição desprotegida que permite a modificação rápida de células T do próprio paciente (ou aquelas de um outro mamífero) para produzir de modo rápido e fácil células T modificadas tendo excelentes propriedades de matar células T-reg.

Também, a presente invenção proporciona CTLs que são preparados por transdução com os ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos de subunidades de TCR que se ligam com peptídeo Foxp3 desta in-

venção. Os CTLs traduzidos são capazes de formar para células T-reg *in vivo*, e expandidas por método de cultura *in vitro* conhecido (por exemplo, Kawakami *et al.*, J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)). As células T da invenção podem ser usadas para a formação de uma composição imunogênica útil no tratamento ou na prevenção de câncer em um paciente que necessite de terapia ou proteção (WO2006/031221).

VI. Métodos de Uso dos Peptídeos Foxp3

Os peptídeos Foxp3 da presente invenção e polinucleotídeos que codificam os peptídeos Foxp3 e polinucleotídeos podem ser usados em combinação com quaisquer outros compostos desde que os compostos não inibam sua indutividade de CTL. Assim, quaisquer dos agentes farmacêuticos mencionados acima da presente invenção podem ser usados para os presentes métodos mencionados abaixo.

(1) Métodos para Induzir Células Apresentadoras de Antígeno (APCs)

Assim, a presente invenção proporciona métodos para induzir APCs usando os peptídeos desta invenção ou polinucleotídeos que codificam os peptídeos. A indução de APCs pode ser realizada conforme descrição acima sob o item de "V- (4) Células apresentadoras de antígeno". Essa invenção proporciona também um método para induzir APCs tendo um alto nível de indutividade de células T citotóxicas, cuja indução é discutida sob o item de "V- (4) Células apresentadoras de antígeno", supra. Alternativamente, de acordo com a presente invenção, uso de peptídeos Foxp3 selecionados de peptídeos compreendendo a sequência de aminoácidos das SEQ ID N^{os}: 3 a 5, 7 a 9, 12, 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, 37, 67 ou 64, ou polinucleotídeos que codificam os peptídeos Foxp3 para fabricação de uma composição farmacêutica incluindo células apresentadoras de antígeno. Ainda, a presente invenção proporciona também peptídeos Foxp3 selecionados dos peptídeos compreendendo a sequência de aminoácidos das SEQ ID N^{os}: 3 a 5, 7 a 9, 12, 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, 37, 67 ou 74 ou polinucleotídeos que codificam os peptídeos Foxp3 para induzir as células apresentadoras de antígeno.

(2) Métodos para Induzir Células T Citotóxicas

Além disso, a presente invenção proporciona métodos para pro-

- duzir CTLs usando os peptídeos Foxp3 desta invenção ou polinucleotídeos que codificam os peptídeos Foxp3. Quando os peptídeos Foxp3 desta invenção são administrados a um paciente, CTL é induzido no corpo do paciente, e a resistência do sistema imunológico direcionando as células T-reg é
- 5 aumentada. Alternativamente, elas podem ser usadas em um método terapêutico *ex vivo*, no qual as APCs derivadas do paciente, e células positivas para CD8, ou leucócitos mononucleares sanguíneos periféricos são contatados (estimulados) com os peptídeos desta invenção *in vitro*, e depois de induzir CTL, as células voltam para o paciente. Por exemplo, o método pode
- 10 compreender as etapas de:
- a: coletar APCs do paciente;
 - b: contatar as APCs da etapa a com o peptídeo;
 - c: misturar as APCs da etapa b com células T CD8⁺, e cocultivar para induzir células T citotóxicas; e
- 15 d: coletar CD8⁺ do cocultivo da etapa c.

As células T CD8⁺ tendo atividade citotóxica obtida na etapa d podem ser administradas ao paciente como uma vacina. As APCs a serem misturadas com as células T CD8⁺ na etapa c acima podem ser também preparadas por transferência de genes que codificam os presentes peptí-

20 deos nas APCs conforme mostrado acima sob o item de "V-(4) Células apresentadoras de antígeno"; mas não são limitadas a estas e qualquer APC ou exossoma que apresentem eficazmente os presentes peptídeos para as células T podem ser usados no presente método. Alternativamente, de acordo com a presente invenção, o uso dos peptídeos Foxp3 selecionados de

25 peptídeos compreendendo a sequência de aminoácidos das SEQ ID NOs: 3 a 5, 7 a 9, 12, 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, 37, 67 ou 74, ou polinucleotídeos que codificam os peptídeos Foxp3 para fabricar uma composição farmacêutica inclusive CTL. Ainda, a presente invenção proporciona também os peptídeos Foxp3 selecionados de peptídeos que compreendem a sequência de amino-

30 ácidos das SEQ ID NOs: 3 a 5, 7 a 9, 12, 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, 37, 67 ou 74, ou polinucleotídeos codificam os peptídeos Foxp3 para induzir CTL.

(3) Regulando a Imunossupressão

Como discutido acima, os peptídeos, polinucleotídeos, exossomas, APCs e CTLs da presente invenção podem ser usados como vacinas para regular (isto é suprimir) células T-reg. Já a T-reg é considerada para ser um dos principais realizadores da supressão de vários tipos de imunorrespostas, particularmente atividade citotóxica de CTL, a capacidade dos peptídeos, polinucleotídeos, exossomas, APCs e CTLs da presente invenção indica que eles podem ser usados também para se contraporem à imunossupressão, particularmente à atividade citotóxica de CTL. Por conseguinte, a presente invenção proporciona um método para regular as células T-reg bem como um método para regular (isto é, contraposição) a imunossupressão, os métodos compreendendo as etapas de administrar os peptídeos, polinucleotídeos, exossomas, APCs ou CTLs da presente invenção a um paciente que necessite destes. Além disso, a presente invenção também proporciona o uso de peptídeos Foxp3 selecionados de peptídeos que compreendem a sequência de aminoácidos das SEQ ID NOs: 3 a 5, 7 a 9, 12, 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, 37, 67 ou 74, ou polinucleotídeos que codificam os peptídeos Foxp3 para fabricar uma composição imunogênica para regular imunossupressão. Alternativamente, a presente invenção refere-se também aos peptídeos Foxp3 selecionados de peptídeos que compreendem a sequência de aminoácidos das SEQ ID NOs: 3 a 5, 7 a 9, 12, 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, 37, 67 ou 74 ou polinucleotídeos que codificam os peptídeos de Foxp3 para regular a imunossupressão.

Aqui, regular imunossupressão indica que a administração dos peptídeos, polinucleotídeos, exossomas, APCs ou CTLs da presente invenção causa qualquer tipo de alteração *in vivo*. Em algumas modalidades, a alteração causada pelos presentes peptídeos, polinucleotídeos, exossomas, APCs e CTLs é uma diminuição do nível do estado de imunossupressão (supressão ou contraposição da imunossupressão), a saber, indução de anti-imunossupressão. Portanto, a presente invenção também proporciona um método para induzir a anti-imunossupressão, em que o dito método compreende as etapas de administrar os presentes peptídeos, polinucleotídeos, exossomas, APCs ou CTLs a um paciente que necessite deste.

Em geral, a anti-imunossupressão inclui imunorrespostas tais como a seguir:

- indução de linfócitos citotóxicos contra T-regs expressando Foxp3,
- indução de anticorpos que reconhecem T-regs expressando Foxp3, e
- 5 - indução de produção de citocina anti-Tregs.

Portanto, quando certa proteína induz qualquer uma dessas imunorrespostas mediante inoculação em um animal, decide-se que a proteína tem efeito indutor de auto-imunossupressão. A indução da anti-imunossupressão por uma proteína pode ser detectada por observação da
 10 resposta *in vivo* ou *in vitro* do sistema imunológico hospedeiro *in vivo* ou *in vitro* contra a proteína.

Por exemplo, um método para detectar a indução (isto é, ativação) dos linfócitos T citotóxicos é bem-conhecido. Especificamente, é conhecido que uma substância estranha que entra no corpo vivo é apresentada às células T e células B pela ação das células apresentadoras de antígeno (APCs). Células T que respondem ao antígeno apresentado pela APC no modo específico de antígeno se diferenciam nas células T citotóxicas (ou linfócitos T citotóxicos; CTLs) devido à estimulação pelo antígeno, e então se proliferam (isto é referido como ativação de células T). Portanto, indução de
 15 CTL por certo peptídeo pode ser avaliada apresentando-se o peptídeo a uma célula T por APC, e detectar a indução (isto é, proliferação, produção IFN-gama, e atividade citotóxica) de CTL. Além disso, APCs exercem o efeito de ativar células T CD4+, células CD8+, macrófagos, eosinófilos e células NK. Já que as células T CD4+ são também importantes na imunidade anti-tumoral, em que a imunidade antitumoral que induz a ação do peptídeo pode ser avaliada usando-se o efeito de ativação dessas células como indicadores.
 20
 25

Um método para ativar a ação para induzir CTLs usando células dendríticas (DCs) como APC é bem-conhecido da técnica. De acordo com
 30 esse método, um peptídeo de teste é inicialmente contatado com DC e então esta DC é contatada com as células T. A detecção das células T tendo efeitos citotóxicos contra células que expressam (isto é, que se apresentam em

uma molécula de HLA) o peptídeo de interesse depois do contato com DC mostra que o peptídeo de teste tem uma atividade de induzir as células T citotóxicas. A atividade de CTL contra T-regs pode ser detectada, por exemplo, usando-se a lise das células tumorais marcadas com ^{51}Cr como o indicador. Alternativamente, o método de avaliar o grau dos danos de T-regs usando atividade de captação de ^3H -timidina ou liberação de LDH (lactose desidrogenase) como o indicador é também bem-conhecido e pode ser usado na presente invenção.

Além da DC, células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs) podem ser usadas também como APC. Relata-se que a indução de CTL é intensificada por cultura de PBMC na presença de GM-CSF e IL-4. Similarmente, é também mostrado que CTL é induzida por cultivo de PBMC em presença de hemocianina de lapa de buraco de fechadura (KLH) e IL-7.

Os peptídeos de teste confirmados por possuírem atividade indutora de CTL por esses métodos são peptídeos tendo efeito de ativação de DC e subsequente atividade indutora de CTL. Portanto, os peptídeos Foxp3 que induzem CTL contra células tumorais são úteis como vacinas contra T-regs. Além disso, APC que adquiriu a capacidade de induzir CTL contra T-regs pelo contato com os peptídeos Foxp3 são também úteis como vacinas contra T-regs. Além disso, CTL que adquiriu citotoxicidade devido à apresentação dos peptídeos antígenos por APC podem ser também usados como vacinas contra T-regs. Tais métodos de regulação para T-regs usando imunidade devido à APC e CTL são referidos como imunoterapia celular e são englobados pela presente invenção.

Geralmente, quando se usa um polipeptídeo para imunoterapia celular, sabe-se que a eficácia de indução de CTL é aumentada por combinação de uma pluralidade de peptídeos tendo estruturas diferentes e por contato destes com DC. Portanto, quando se estimula DC com fragmentos de proteína, é vantajoso usar uma mistura de tipos múltiplos de fragmentos.

Alternativamente, a indução de anti-imunossupressão por um peptídeo pode ser confirmada por observação da indução de produção de anticorpos contra T-regs. Por exemplo, quando os anticorpos contra um pep-

tídeo são induzidos em um indivíduo, por exemplo, um paciente, um animal de laboratório, imunizados com o peptídeo, e quando células T-reg são suprimidos por aqueles anticorpos, pode-se determinar o peptídeo como tendo a capacidade de induzir anti-imunossupressão.

5 Anti-imunossupressão é induzida por administração da vacina desta invenção, e a indução permite a dissolução de imunossupressão. Tais efeitos podem ser estatisticamente significantes. Por exemplo, em observação, em um nível de significância de 5% ou menos, em que o efeito regulador de uma vacina contra T-reg é comparado a um controle sem administração de vacina. Por exemplo, o t-teste de Student, U-teste Mann-Whitney
10 ou ANOVA pode ser usado para análises estatísticas.

 Quando se usa APC ou CTL como a vacina desta invenção, T-reg
 regs podem ser reguladas (isto é, suprimidas), por exemplo, pelo método *ex vivo*. Mais especificamente, PBMCs do paciente que está recebendo trata-
15 mento ou prevenção são coletadas, as células são contadas com o polipeptídeo *ex vivo*, e seguinte à indução de APC ou CTL, as células podem ser administradas ao paciente. APC pode ser também induzida por introdução de um vetor que codifica o polipeptídeo em PBMCs *ex vivo*. APC ou CTL induzidos *in vitro* podem ser clonados antes da administração. Por clonagem
20 e crescimento de células tendo alta atividade de danificar células-alvo, imunoterapia celular pode ser realizada mais eficazmente. Além disso, APC e CTL isolados deste modo podem ser usados para imunoterapia celular não somente contra indivíduos dos quais as células são derivadas, mas também contra tipos similares de doenças em outros indivíduos.

25 A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado conforme comumente entendido por aquele com conhecimento ordinário da técnica à qual a invenção pertence. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou em teste da presente inven-
30 ção, métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Todas as publicações, patentes e outras referências mencionadas aqui são incorporadas a título de referência, na íntegra. Em caso de conflito, o presente relatório des-

critivo, inclusive definições, será o controle. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são ilustrativos apenas e não são limitativos.

Os seguintes exemplos são apresentados para ilustrar a presente invenção e para auxiliar aquele com conhecimento do ordinário da técnica na execução e uso da mesma. Os exemplos não têm de modo nenhum o
5 objetivo de limitar o escopo da invenção.

EXEMPLOS

Materiais e Métodos

Linhagens de Células

10 Células A24LCL (HLA-A24/24), células T2 (HLA-A02/02), células linfoblastoides B humanas, 293T e COS7 foram adquiridas da ATCC.

Seleção de Candidatos de Peptídeo Derivado de Foxp3

Peptídeos de 9 mer e de 10 mer derivados de Foxp3 que se ligam à molécula de HLA-A*2402 e HLA*0201 foram prognosticados preditos
15 por software de predição de ligação "BIMAS" (http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform), os algoritmos foram descritos por by Parker KC, *et al.* ((1994) J Immunol.;152(1):163-75) e Kuzushima K, *et al.* (2001) Blood.;98(6):1872-81). Esses peptídeos foram sintetizados por Sigma (Sapporo, Japão) de acordo com o método de síntese de fase sólida-padrão
20 e purificados por HPLC de fase reversa. A pureza (>90%) e a identidade dos peptídeos foram determinadas por HPLC analítica e análise de espectroscopia de massa, respectivamente. Os peptídeos foram dissolvidos em sulfóxido de dimetila (DMSO) em 20 mg/mL e armazenados a -80°C.

Indução de CTL *in vitro*

25 Células dendríticas derivadas de monócitos (DCs) foram usadas como células apresentadoras (APCs) para induzir respostas de CTL contra peptídeos apresentados em HLA. DCs foram geradas *in vitro* conforme descrição em algum lugar (Horiguchi S. *et al.* Cancer Res. 59:2950-6). Especificamente, células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs) isoladas
30 de voluntário normal (HLA-A*2402 e/ou HLA-A*0201) com solução Ficoll-Plaque (Pharmacia) foram separadas por aderência à placa de cultura de tecido de plástico (Becton Dickinson) de modo a enriquecer na presença de

1.000 U/mL de GM-CSF (R&D System) e 1.000 U/mL de IL-4 (R&D System) em meio AIM-V (Invitrogen) contendo soro autólogo inativado com calor a 2% (AS). Depois de 7 dias na cultura, as DCs geradas por citocina foram pulsadas com 20 mcg/mL dos peptídeos sintetizados em presença de 3
 5 mcg/mL de beta2-microglobulina por 4 horas a 20°C em meio AIM-V. Essas DCs pulsadas com peptídeo foram então inativadas com mitocina C (MMC) (30 mcg/mL por 30 minutos) e misturadas em razão de 1:20 com células T CD8⁺, obtidas por seleção positiva com Kit de Isolamento Positivo para CD8 (Dyna). Essas culturas foram colocadas em placas de 48 poços (Corning);
 10 cada poço continha $1,5 \times 10^4$ pulsadas com peptídeo, 3×10^5 células T CD8⁺ e 10 ng/mL de IL-7 (R&D System) em 0,5 mL de AIM-V/2% de AS. Três dias mais tarde, essas culturas foram suplementadas com IL-2 (CHIRON) para uma concentração final de 20 UI/mL. Nos dias 7 e 14, as células T foram ainda reestimuladas com as DCs autólogas pulsadas com peptídeos. As
 15 DCs foram preparadas cada vez através do mesmo procedimento descrito acima. A atividade de CTL foi testada contra células A24LCL pulsadas com peptídeos ou células T2 depois de 3º ciclo de estimulação de peptídeo no dia 21.

Procedimento de Expansão de CTL

20 CTLs foram expandidos em cultura usando-se um método similar conforme reportado por Riddell, *et al.*, (Water *et al.*, N Engl J Med 333(16): 1038-44-, 1995; Riddell *et al.*, Nat Med 2(2): 216-23, fevereiro de 1996). Um total de 5×10^4 CTLs foram re-suspensas em 25 mL de AIM-V/5% de AS com 2 tipos de linhagens de células linfoblastoides B humanas,
 25 inativadas com MMC, em presença de 40 ng/mL de anticorpo monoclonal anti-CD3 (Pharmigen). Um dia depois de iniciar as culturas, 120 UI/mL de IL-2 foram adicionadas às culturas. As culturas foram então alimentadas com AIM-V/5% de AS fresco contendo 30 UI/mL de IL-2 nos dias 5, 8 e 11.

Atividade de CTL Específica

30 Para examinar a atividade de CTL específica, ensaio de IFN-gama ELISPOT e IFN-gama ELISA foram realizados. Em resumo, A24-LCL pulsada com pulsada com peptídeo, célula T2 (1×10^4 /poço) ou as células

que expressam endogenosamente Foxp3 e a molécula HLA foi preparada como células estimuladoras. Linhagens CTL cultivadas em 48 poços foram usadas como células respondedoras. Ensaio IFN-gama ELISPOT e IFN-gama ELISA foram realizados de acordo com o procedimento de fabricação.

5 Imunogenicidade de Peptídeos de Epitopo em Camundongos BALB/c

Para sensibilizar CTLs específicos de peptídeo, foi providenciada imunização usando-se 100 µl de mistura de vacina, que contém 50 µl de peptídeo restrito a HLA-A24 e 50 µl de IFA por camundongo. A vacina foi injetada s.c. no flanco direito dos camundongos para a primeira imunização no dia 0 e no flanco esquerdo para a segunda no dia 7. No dia 14, esplenócitos de camundongos vacinados foram usados como as células respondedoras, e células RLmale1 pulsadas com ou sem peptídeos foram usadas como as células estimuladoras para ensaio IFN-gama ELISPOT.

Efeitos Antitumorais *in vivo*

15 Células 4T1 (1×10^5 por camundongo) foram injetadas s.c. no flanco direito de camundongos BALB/c no dia 0. A vacinação foi efetuada nos dias 3 e 10 usando-se hFoxp3-252 (KLSAMQAHL: SEQ ID NO: 17) ou peptídeos conjugados com mFoxp3-252 (KLGAMQAHL: SEQ ID NO: 88).

20 Ensaio para afinidade de substituições de Foxp3-9-252 para a molécula HLA

Ensaio IFN-gama ELISA foi realizado para examinar a afinidade de peptídeo substituído para a molécula HLA-A2. CTLs induzidos com peptídeo Foxp3-9-252-WT (KLSAMQAHL: SEQ ID NO: 17) foram usados como células respondedoras e células T2 foram preparadas como células estimuladoras por incubação com peptídeo Foxp3-9-252-WT, Foxp3-9-252-9V (KLSAMQAHV: SEQ ID NO: 95) e HIV-A02 (SLYNTYATL) a 37°C por 2 horas. Pulso com peptídeo para células T2 foi realizado com uma grande concentração (10^{-10} mcg/mL) de cada peptídeo.

Resultados

30 Predição de Peptídeos de Ligação de HLA-A24 e HLA-Ae Derivados de Foxp3

As Tabelas 1, 2 e 3 mostram peptídeos de ligação de HLA-

A*2402 ou peptídeos de ligação de HLA-A*0201 da proteína Foxp3 no ordem de classificação de alta afinidade de ligação de predição. No total, 60 peptídeos com atividade potencial de ligação de HLA-A24 e 26 peptídeos com atividade potencial de ligação de HLA-A2 foram selecionados.

Tabela 1

Peptídeos de 9 mer de ligação de HLA-A2402 derivados de Foxp3

	Posição Inicial	Sequência	Pontos	SEQ ID NO
Foxp3-A24-9mer	363	IYHWFTRMF	100	3
	207	VFEEPEDFL	36	4
	332	KFHNMRPPF	20	5
	323	EFLHNMDYF	15	6
	366	WFTRMFAFF	12	7
	337	RPPFTYATL	12	8
	190	SYPLLANGV	10,8	9
	27	RAAPKASDL	9,6	39
	238	MVQSLEQQL	8,64	40
	87	GPLPHLQAL	8,64	41
	252	KLSAMQAHL	8	17
	8	KPSAPSLAL	8	42
	352	EAPEKQRTL	7,2	43
	240	QSLEQQLVL	7,2	44
	245	QLVLEKEKL	6,6	45
	403	GAVWTVDEL	6,6	46
	185	AVPQSSYPL	6	47
	28	AAPKASDLL	6	48
	141	FSLKARPGI	6	49
	383	NAIRHNLSL	6	50
	186	VPQSSYPLL	6	51
	343	ATLIRWAIL	6	52
	200	KWPGCEKVF	6	53
	68	QLQLPTLPL	6	54
	341	TYATLIRWA	6	55
	115	TPVLQVHPL	6	56
	61	LNPMPPSQL	6	57
	159	EWVSREPAL	6	58
	175	SAPRKDSTL	6	59
	234	LQREMVQSL	5,76	60
	304	SLFAVRRHL	5,6	61
	359	TLNEIYHWF	5,04	62

A posição de partida indica o número de aminoácidos da terminação N do Foxp3.

teriais e Métodos.

Tabela 2

Peptídeos de 10 mer de ligação de HLA-A2402 derivados de Foxp3

	Posição Inicial	Sequência	Pontos	SEQ ID NO
Foxp3-A24-10mer	341	TYATLIRWAI	70	10
	140	VFSLKARPGL	20	11
	114	RTPVLQVHPL	12	12
	27	RAAPkASDLL	9,6	63
	206	KVFEcPEDFL	9,6	64
	402	KGAVwTVDEL	8,8	65
	237	EMVQsLEQQL	8,64	66
	87	GPLPhLQALL	8,64	67
	303	DSLfaVRRHL	8,4	68
	358	RTLNeIYHWF	8,4	69
	5	RPGKpSAPSL	8	70
	382	KNAIrHNLSL	8	71
	190	SYPLIANGVC	7,5	72
	86	LGPLpHLQAL	7,2	73
	60	SLNPmPPSQL	7,2	74
	184	SAVPqSSYPL	7,2	75
	62	NPMpPSQLQL	7,2	76
	233	LLQReMVQSL	7,2	77
	244	QQLVIEKEKL	6,6	78
	185	AVPQsSYPLL	6	79
	149	LPPGiNVASL	6	80
	296	SGPReAPDSL	6	81
	77	VMVApSGARL	6	82
	159	EWVStEPALL	6	83
	67	SQLQIPTLPL	6	84
	316	HGNSfPEFL	6	85
	380	TWKNaIRHNL	5,6	86
	363	IYHWfTRMFA	5	87

A posição de partida indica o número de aminoácidos da terminação N do Foxp3.

Classificação de ligação é derivada de "BIMAS" descrito em Materiais e Métodos.

Tabela 3

Peptídeos de ligação de HLA-A0201 derivados de Foxp3

	Posição Inicial	Sequência	Pontos	SEQ ID NO
Foxp3-A2-9mer	388	NLSLHKCFV	382,536	13
	95	LLQDRPHFM	190,448	14
	390	SLHKCFVRV	132,149	15
	69	LQLPTLPLV	102,018	16
	252	KLSAMQAHV	74,768	17
	68	QLQLPTLPL	21,362	18
	304	SLFAVRRHL	15,808	19
	239	VQSLEQQLV	11,988	20
	245	QLVLEKEKL	10,468	21
Foxp3-A2-10mer	359	TLNEIYHWFT	1260,32	22
	206	KVFEEPEDFL	267,467	23
	263	KMALTKASSV	175,812	24
	70	QLPTLPLVMV	159,97	25
	68	QLQLPTLPLV	159,97	26
	94	ALLQDRPHFM	101,099	27
	233	LLQREMVQSL	83,527	28
	152	GINVASLEWV	59,279	29
	77	VMVAPSGARL	26,228	30
	60	SLNPMPPSQL	21,362	31
	299	REAPDSLFAV	18,041	32
	252	KLSAMQAHVLA	17,388	33
	102	FMHQLSTVDA	16,505	34
	223	LLDEKGRAQC	13,851	35
	344	TLIRWAILEA	11,426	36
	246	LVLEKEKLSA	11,21	37
	238	MVQSLEQQLV	10,346	38

A posição de partida indica o número de aminoácidos da terminação N do Foxp3.

5

Classificação de ligação é derivada de "BIMAS" descrito na seção "Materiais e Métodos".

Estimulação da Células T Usando Peptídeos Preditos Restritos com HLA-

A2402

CTLs para os peptídeos derivados da proteína Foxp3 foram gerados de acordo com o método descrito na seção "Materiais e Métodos", acima. CTLs resultantes mostrando

- 5 atividade de CTL específica detectável por ensaio IFN-gama ELISPOT são mostrados na figura 1A e figura 1B. Na figura 1A, as células nos números de poço nº 2 e 7 estimuladas com Foxp3-A24-9-363, nº 1 e nº 6 com Foxp3-A24-9-366, nº 5 com Foxp3-A24-9-190, nº 7 com Foxp3-A24-10-87, e com Foxp3-A24-10-60 mostram produção potente de IFN-gama em comparação com o controle. Na figura 1B, as células no número de poço nº 4 estimuladas com Foxp3-A24-9-207, nº 6 com Foxp3-A24-9-332, nº 6 com Foxp3-A24-337, e nº 1 com Foxp3-A24-10-114 mostraram potente produção de IFN-gama em comparação com o controle.

Estimulação da Células T Usando Peptídeos Preditos Restritos com HLA-15 A2401

- CTLs resultantes mostrando atividade de CTL específica detectável foram mostrados na figura 2A, figura 2B e figura 2C quando da realização com ensaio IFN-gama ELISPOT. Na figura 2A, as células no número de poço nº 2 estimuladas com Foxp3-A2-9-390, nº 2 com Foxp3-A2-9-69, nº 6 com Foxp3-A2-9-252, nº 4 com Foxp3-A2-10-359, nº 7 com Foxp3-A2-263, e nº 2 e nº 5 com Foxp3-A2-10-94 mostraram uma potente produção de IFN-gama em comparação com o controle. Na figura 2B, as células em todos os poços estimuladas com Foxp3-A2-10-233, os números de poço nº 6 e nº 7 com Foxp3-A2-10-152, nº 5 com Foxp3-A2-10-77, nº 1 com Foxp3-A2-10-246 e com Foxp3-A2-10-94 mostraram uma potente produção de IFN-gama em comparação com o controle. Na figura 2C, as células nos números de poço nº 1, 2, 4, 5, 7, 9, 11 e 12 estimuladas com Foxp3-A2-9-320, os números de poço nº 5 e nº 11 com Foxp3-A2-9-304, os número de poço nº 7 com Foxp3-A2-9-68 e o número de poço nº 12 com Foxp3-A2-9-252 mostraram produção potente de IFN-gama em comparação com o controle.

Estabelecimento para Linhagens de CTL de Peptídeos Específicos Foxp3

Essas células nos poços positivos foram expandidas e o ensaio

de IFN-gama ELISA foi realizado. Nas figuras 3A, B, C, as linhagens de CTL estimuladas com Fosp3-A02-9-320 (SEQ ID NO: 15) mostraram produção potente de IFN-gama em comparação com o controle. Na figura 3D, as linhagens de CTL estimuladas com Fosp3-A02-9-252 (SEQ ID NO: 17) mostraram produção potente de IFN gama em comparação com o controle. Na figura 3E, as linhagens de CTL estimuladas com Fosp3-A24-10-60 (DEQ ID NO: 75) mostraram produção potente de IFN-gama em comparação com o controle. Na figura 3F, as linhagens de CTL estimuladas com Fosp3-A02-10-94 (SEQ ID NO:27) mostraram produção potente de IFN-gama em comparação com o controle. Na figura 3G, as linhagens de CTL estimuladas com Fosp3-A24-10-87 (SEQ ID NO: 68) mostraram produção potente de IFN gama em comparação com o controle.

Atividade de CTL Específica Contra as Células-alvo que Expressam Endogenosamente Fosp3 e HLA-A*2402 ou HLA-A*0201

O clone de CTL estabelecido produzido contra esses peptídeos foi examinado quando à sua capacidade de reconhecer as células-alvo que expressam endogenosamente Fosp3 e HLA-A*24 ou 02. Atividade de CTL específica contra 293T transfectado com ambos o comprimento normal do gene Fosp3 e a molécula HLA-A*24 OU 02, que é um modelo específico para as células-alvo que expressam endogenosamente FOXP3 e HLA-A*24 ou 02, foi testada usando-se as linhas de CTL produzidas por Fosp3-A02-9-390 (SEQ ID NO: 15) e Fosp3-A02-9-252 (SEQ ID NO: 17) como células efectoras. Na figura 4A e na figura 4B, as linhagens de CTL produzidas por Fosp3-A02-9-390 (SEQ ID NO; 15) e Fosp3-A02-9-252 (SEQ ID NO: 17) mostraram alta atividade de CTL específica contra 293T que transfectou ambos Fosp3 e HLA-A02. Na figura 4C, as linhagens de CTL produzidas por Fosp3-A02-9-252 (SEQ ID NO: 17) mostraram alta atividade de CTL específica contra 293T que transfectou ambos Fosp3 e HLA-A-A24. Por outro lado, não mostrou atividade de CTL específica significativa contra os controles. Foi claramente demonstrado que Fosp3-A02-390 e Fosp3-A02-9-252 foram naturalmente expressos para a superfície de célula-alvo com molécula de HLA-A02 e/ou 24 e reconheceram CTL. Além disso, esses peptídeos de epítipo, que

podem utilizar vacina que direciona Foxp3, expressaram T-regs.

Imunogenicidade de Peptídeo Foxp3-A24-9-252 em camundongos BALB/c

Para avaliar a imunogenicidade do peptídeo Foxp3-9-252 para camundongos MALB/c, foi realizada imunização com peptídeo Foxp3-9-252 humano (Foxp3-252_h; KLSAMQAHL) e com peptídeo Foxp3-9-252 (Foxp3-252_m; KLGANQAHL) (SEQ ID NO: 89), respectivamente. Depois da segunda injeção de peptídeo, foi determinada a atividade de CTL específica por ensaio IFN-gama ELISPOT (figura 5).

Dos esplenócitos colhidos de camundongos vacinados com peptídeo, foi detectada produção potente de IFN-gama no poço que foi cocultivado com células estimuladoras pulsadas com peptídeo correspondentes sem mostrar produção de IFN-gama nos poços de controle. Na figura 5A, resposta de CTL específica para peptídeo Foxp3-252_h foi detectada de três dos cinco camundongos (M3, M4 e M5), mas não nos camundongos de controle (N1~N3), que foram vacinados somente IFA. Na figura 5B, a resposta de CTL específica para peptídeo Foxp3-252_m foi detectada em um dos cinco camundongos (M1), mas não nos camundongos de controle (N1-N3), que vacinados somente IFA. Esses dados indicaram que a vacinação com peptídeo de cada peptídeo Foxp3-252_h ou Foxp3-252_m pode induzir CTLs contra células-alvo pulsadas com peptídeo, *in vivo*.

Efeitos antitumorais da vacinação com peptídeo de epítipo Foxp3

Para examinar os efeitos antitumorais com Foxp3 direcionado com vacinação com peptídeo, ajuste terapêutico *in vivo* foi tentado pelo uso de células tumorais 4T1 e camundongos BALB/c. Células de câncer de mama 4T1 foram injetadas s.c. em camundongos BALB/c no dia 0, e então foi efetuada a vacinação nesses camundongos e 10 dias depois do desafio com tumor. Como resultado, o crescimento do tumor reduziu aparentemente em camundongos MALB/c vacinados com peptídeo Foxp3-252_h ou Foxp3-252 em comparação com esta em camundongos como controle (figura 6). Considerando a análise estatística, foi verificada uma diferença significativa de supressão do crescimento do tumor nos camundongos vacinados com peptídeos de epítipo Foxp3.

Substituição dos Aminoácidos do Peptídeo de Epítipo Foxp3

Nos resultados mencionados cima, o peptídeo Foxp3-9-252 (SEQ ID NO: 17) é identificado como peptídeo de epítipo restrito com ambos HLA-A*2402 e HLA-A*0201. Para intensificar a imunogenicidade do peptídeo Foxp3-9-252, uma substituição simples ou poucas substituições de aminoácidos foram selecionadas para obter uma afinidade mais de ligação maior para a molécula HLA-A*2402 ou HLA-A*0201 que o peptídeo natural Foxp-3-9-252; Foxp3-9-252-WT (KLSAMQAHL) (SEQ IN NO: 17). A classificação de ligação da substituição de aminoácidos no Foxp3-9-252 (SEQ ID NO: 17) é derivada do software BIMAS. A Tabela 4 mostra sequências de aminoácidos e classificação de ligação para moléculas HLA-A*2402 e 0201 de peptídeo substituído de Foxp3-9-252. A classificação de ligação de peptídeos é derivada do software BIMAS. Foram sintetizados seis ou nove tipos de substituições, um total de quinze peptídeos, que prediziam ter afinidade de ligação maior para moléculas HLA-A24 ou HLA-A2 que o tipo selvagem (Tabela 4).

Tabela 4

Classificação de ligação de substituição de aminoácidos em Foxp3-9-252 (SEQ ID NO: 17) para a molécula HLA-A*2402 ou 0201

	Nome Peptídeo	Sequência	Pontos Obrigatórios	SEQ ID NO
A2402	Foxp3-9-252	KLSAMQAHL	8,0	17
	2Y	KYSAMQAHL	400,00	89
	2F	KFSAMQAHL	40,00	90
	2Y9I	KYSAMQAHI	100,00	91
	2Y9F	KYSAMQAHF	200,0	92
	2F9I	KFSAMQAHI	10,0	93
	2F9F	KFSAMQAHF	20,0	94
A0201	WT	KLSAMQAHL	74,8	17
	9V	KLSAMQAHV	243,4	95
	3Y	KLYAMQAHL	239,3	96
	3M	KLMAMQAHL	276,6	97
	3L	KLLAMQAHL	276,6	98
	3F	KLFAMQAHL	276,6	99
	3Y9V	KLYAMQAHV	779,0	100
	3M9V	KLMAMQAHV	900,7	101
	3L9V	KLLAMQAHV	900,7	102
	3F9V	KLFAMQAHV	900,7	103

E então os presentes inventores examinaram para verificar se as

5 células estimuladoras pulsadas com peptídeo usando essas substituições eram reconhecidas por CTLs gerados com o peptídeo Foxp3-9-252-WT. Consequentemente, CTLs induzidos pelo peptídeo Foxp3-9-252-WT produzi-

ram IFN-gama contra células T2 pulsadas com Foxp3-9-25-9V (KLSAM-

QAHV) (SEQ ID NO: 95), da mesma maneira que as células T2 pulsadas

10 com peptídeo Foxp3-9-252-WT (figura 7A). Já que não foi detectada nenhuma produção de IFN-gama a partir de CTLs contra células estimuladoras sem qualquer pulso de peptídeo, foi indicado que CTLs gerados com o pep-

tídeo Foxp3-9-252-WT podem reconhecer a apresentação do peptídeo

Foxp3-9-252-9V na molécula de HLA-A2 bem como Foxp3-9-252-WT.

Além disso, para avaliar se o peptídeo Foxp3-9-252-9V tinha afinidade maior para a molécula HLA-A2 que o peptídeo Foxp3-9-252-WT, atividade de CTL foi determinada usando-se as células estimuladoras pulsa-
 5 das com esses peptídeos em uma faixa ampla de concentração (10^{-10} mcg/mL). Como resultado, IFN-gama similar foi produzido de CTLs cocultivadas com células estimuladoras que foram pulsadas com peptídeo Foxp3-9-252-WT ou Foxp3-9-252-9V, respectivamente (figura 7B). A partir desses dados, foi mostrado que a apresentação do peptídeo Foxp3-9-252-9V na
 10 molécula HLA-A*0201 poderia ser reconhecida por CTLs estabelecidos com o peptídeo Foxp3-9-252-WT.

Por outro lado, os presentes inventores tentaram a indução de CTLs usando todas as substituições restritas à HLA-A*201 incluindo o peptídeo Foxp3-9-252-9V. Como resultado, CTLs foram induzidos por estimula-
 15 ção com o peptídeo Foxp3-9-252-3M (KLAMAMQAH L) (SEQ ID NO: 97), Foxp3-9-252-3L (KLLAMQAH L) (SEQ ID NO: 98) ou Foxp3-9-252-9V (figura 7C). As células nos números de poço 3 e 7 estimuladas com Foxp3-A02-9-252-3M, número de poço 7 com Foxp3-A02-9-252-3L, e número de poço 8 com Foxp3-A02-9V mostraram produção de IFN-gama dependente de peptí-
 20 deo em comparação com o controle. Depois que a linhagem de CTL induzida por estimulação com Foxp3-9-252 foi estabelecida por expansão *in vitro*, a atividade de CTL foi determinada usando-se células estimuladoras pulsa-
 25 das com o peptídeo Foxp3-9-252-WT ou Foxp3-9-252-9V. Consequentemente, CTLs induzidos por estimulação com Foxp3-9-252-9V reconheceram células estimuladoras pulsadas com o peptídeo Foxp3-9-252-WT como iguais àsquelas pulsadas com o peptídeo Foxp3-9-252-9V (figura 7D). Esses resultados exibiram claramente que o peptídeo Foxp3-9-252-9V poderiam induzir CTLs específicos de Foxp3, bem como o peptídeo Foxp3-9-WT.

Análise de Homologia dos Peptídeos Antígenos

30 Os CTLs estimulados com:
 FOXp3-A24-9-363 (SEQ ID NO: 3),
 FOXp3-A24-9-366 (SEQ ID NO: 7),

FOXp3-A24-9-207 (SEQ ID NO: 4),
 FOXp3-A24-9-332 (SEQ ID NO: 5),
 FOXp3-A24-9-337 (SEQ ID NO: 8),
 FOXp3-A24-10-114 (SEQ ID NO: 12),
 5 FOXp3-A2-9-390 (SEQ ID NO: 15),
 FOXp3-A2-9-69 (SEQ ID NO: 16),
 FOXp3-A2-9-252 (SEQ ID NO: 17),
 FOXp3-A2-10-359 (SEQ ID NO: 22),
 FOXp3-A2-10-263 (SEQ ID NO: 24),
 10 FOXp3-A2-10-94 (SEQ ID NO: 27),
 FOXp3-A2-10-233 (SEQ ID NO: 28),
 FOXp3-A2-10-152 (SEQ ID NO: 29),
 FOXp3-A2-10-77 (SEQ ID NO: 30),
 FOXp3-A2-10-246 (SEQ ID NO: 37),
 15 FOXp3-A2-9-68 (SEQ ID NO: 18),
 FOXp3-A2-9-304 (SEQ ID NO: 19),
 FOXp3-A24-10-87 (SEQ ID NO: 67) e
 FOXp3-A24-10-60 (SEQ ID NO: 74) mostraram atividade signifi-
 cante e específica de CTL.

20 Isso pode significar que a sequência de
 FOXp3-A24-9-363 (SEQ ID NO: 3),
 FOXp3-A24-9-366 (SEQ ID NO: 7),
 FOXp3-A24-9-190 (SEQ ID NO: 9),
 FOXp3-A24-9-207 (SEQ ID NO: 4),
 25 FOXp3-A24-9-332 (SEQ ID NO: 5),
 FOXp3-A24-9-337 (SEQ ID NO: 8),
 FOXp3-A24-10-114 (SEQ ID NO: 12),
 FOXp3-A2-9-390 (SEQ ID NO: 15),
 FOXp3-A2-9-69 (SEQ ID NO: 16),
 30 FOXp3-A2-9-252 (SEQ ID NO: 17),
 FOXp3-A2-10-359 (SEQ ID NO: 22),
 FOXp3-A2-10-263 (SEQ ID NO: 24),

FOXp3-A2-10-94 (SEQ ID NO: 27),
 FOXp3-A2-10-233 (SEQ ID NO: 28),
 FOXp3-A2-10-152 (SEQ ID NO: 29),
 FOXp3-A2-10-77 (SEQ ID NO: 30),
 5 FOXp3-A2-10-246 (SEQ ID NO: 37),
 FOXp3-A2-9-68 (SEQ ID NO: 18),
 FOXp3-A2-9-304 (SEQ ID NO: 19)
 Foxp3-A24-10-87 (SEQ ID NO: 67) e
 Foxp3-A24-10-60 (SEQ ID NO: 74) é homóloga aos peptídeos
 10 derivados de outras moléculas, que são conhecidas por sintetizarem o sis-
 tema imunológico humano. Para excluir esta possibilidade, a análise de ho-
 mologia foi realizada com as sequências de peptídeo como questionários
 usando o algoritmo BLAST
 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) e
 15 não revelou nenhuma sequência com homologia significativa.
 Esses resultados indicam que a sequência de
 FOXp3-A24-9-363 (SEQ ID NO: 3),
 FOXp3-A24-9-366 (SEQ ID NO: 7),
 FOXp3-A24-9-190 (SEQ ID NO: 9),
 20 FOXp3-A24-9-207 (SEQ ID NO: 4),
 FOXp3-A24-9-332 (SEQ ID NO: 5),
 FOXp3-A24-9-337 (SEQ ID NO: 8),
 FOXp3-A24-10-114 (SEQ ID NO: 12),
 FOXp3-A2-9-390 (SEQ ID NO: 15),
 25 FOXp3-A2-9-69 (SEQ ID NO: 16),
 FOXp3-A2-9-252 (SEQ ID NO: 17).
 FOXp3-A2-10-359 (SEQ ID NO: 22),
 FOXp3-A2-10-263 (SEQ ID NO: 24),
 FOXp3-A2-10-94 (SEQ ID NO: 27),
 30 FOXp3-A2-10-233 (SEQ ID NO: 28),
 FOXp3-A2-10-152 (SEQ ID NO: 29),
 FOXp3-A2-10-77 (SEQ ID NO: 30),

FOXP3-A2- 10-246 (SEQ ID NO: 37),

FOXP3-A2-9-68 (SEQ ID NO: 18),

FOXP3-A2-9-304 (SEQ ID NO: 19)

Foxp3-A24- 10-87 (SEQ ID NO: 67) e

- 5 Foxp3-A24- 10-60 (SEQ ID NO: 74) é única e existe pouca possibilidade, até o melhor de nosso conhecimento, de produzir resposta imunológica não pretendida a qualquer molécula não-relacionada.

Conclusão, Foxp3 é um antígeno útil para direcionar células T-reg, e vacinas usando esses peptídeos de epítipo pode ser úteis na imunoterapia.

10 Discussão

- Dos dados da figura 6, a vacinação de cada peptídeo hFOXP3-252 e mFoxp3-252 poderia induzir CTLs específicos de epítipo *in vivo*. Isso indicou que ambos os peptídeos de epítipo Foxp3 poderia induzir CTLs contra Foxp3 expressos nas células-alvo e a molécula complexa de histocompatibilidade principal correspondente. Em outras palavras, é sugerido que esses CTLs podem reconhecer linfócitos T reguladores (T-regs). Para avaliar essa hipótese, efeitos antitumorais *in vivo* da vacinação com esses peptídeos de epítipo Foxp3 foram examinados usando-se camundongos BALB/c.
- 15 Isso mostrou, obviamente, efeitos antitumorais nos camundongos vacinados com peptídeo hFocp3-352 e mFoxp3-252, respectivamente. Esses resultados mostraram uma forte indicação de que o crescimento do tumor poderia ser inibido por supressão de T-regs no microambiente local do tumor, mesmo sem vacinação usando quaisquer peptídeos de epítipo TAA. Os presentes inventores consideram que CTLs contra células tumorais são induzidas quando o tumor existe dentro do corpo, contudo, T-regs são também induzidas por alguns fatores imunossupressores e inibem a função das células efectoras antitumorais. Já que a vacinação usando peptídeo de epítipo Foxp3 poderia cancelar a situação imunossupressora sem vacinação de
- 20 peptídeo de epítipo TAA ou estimulação de todo o sistema imunológico usando-se adjuvante forte.

Portanto, a vacinação de peptídeo hFoxp3-252 (KLSAMQAHL)

(SEQ ID NO: 17) poderia induzir CTLs e efeitos antitumorais superiores ao peptídeo mFoxp3-252 (KLGAMQAH L) (SEQ ID NO: 88) na figura 5 e na figura 6. A partir desses resultados, foi considerado que a vacinação do peptídeo hFoxp3-252 pode evitar tolerância imunológica eficazmente em comparação com vacinação de peptídeo mFoxp3-252 na posição 3, o peptídeo hFoxp3-252 é considerado "não-auto-antígeno" *in vivo* e poderia induzir CTLs contra T-regs, eficazmente.

Concluindo, é indicado que Foxp3 poderia servir como alvos novos para a imunoterapia de câncer. Além disso, esses resultados suportam fortemente que a vacinação usando peptídeo de epítipo Foxp3 poderia suprimir a função de T-regs, e poderia ser disponível para imunoterapia de câncer para muitos tipos de células cancerosas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

15 <120> FOXP3 PEPTIDE VACCINE

<130> ONC-A0620P

<150> US 60/878,615

<151> 2007-01-03

<150> US 60/896,472

20 <151> 2007-03-22

<160> 103

<170> Patentin versão 3.4

<210> 1

<211> 1869

25 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (189)..(1484)

30 <400> 1

gcacacactc atcgaaaaaa atttg gatta ttagaagaga gaggtctgcg gcttcacac 60

cgtacagcgt gggttttctt ctcggtataa aagcaaagtt gtttttgata cgtgacagtt 120

tcccacaagc caggctgac cttttctgtc agtcacattc accaagcctg cccttgga 180
 aggacccg atg ccc aac ccc agg cct ggc aag ccc tcg gcc cct tcc ttg 230
 Met Pro Asn Pro Arg Pro Gly Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu
 1 5 10
 5 gcc ctt ggc cca tcc cca gga gcc tcg ccc agc tgg agg gct gca ccc 278
 Ala Leu Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser Pro Ser Trp Arg Ala Ala Pro
 15 20 25 30
 aaa gcc tca gac ctg ctg ggg gcc cgg ggc cca ggg gga acc ttc cag 326
 Lys Ala Ser Asp Leu Leu Gly Ala Arg Gly Pro Gly Gly Thr Phe Gln
 10 35 40 45
 ggc cga gat ctt cga ggc ggg gcc cat gcc tcc tct tct tcc ttg aac 374
 Gly Arg Asp Leu Arg Gly Gly Ala His Ala Ser Ser Ser Ser Leu Asn
 50 55 60
 ccc atg cca cca tcg cag ctg cag ctg ccc aca ctg ccc cta gtc atg 422
 15 Pro Met Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met
 65 70 75
 gtg gca ccc tcc ggg gca cgg ctg ggc ccc ttg ccc cac tta cag gca 470
 Val Ala Pro Ser Gly Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala
 80 85 90
 20 ctc ctc cag gac agg cca cat ttc atg cac cag ctc tca acg gtg gat 518
 Leu Leu Gln Asp Arg Pro His Phe Met His Gln Leu Ser Thr Val Asp
 95 100 105 110
 gcc cac gcc cgg acc cct gtg ctg cag gtg cac ccc ctg gag agc cca 566
 Ala His Ala Arg Thr Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu Glu Ser Pro
 25 115 120 125
 gcc atg atc agc ctc aca cca ccc acc acc gcc act ggg gtc ttc tcc 614
 Ala Met Ile Ser Leu Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Gly Val Phe Ser
 130 135 140
 ctc aag gcc cgg cct ggc ctc cca cct ggg atc aac gtg gcc agc ctg 662
 30 Leu Lys Ala Arg Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu
 145 150 155
 gaa tgg gtg tcc agg gag ccg gca ctg ctc tgc acc ttc cca aat ccc 710

	Glu Trp Val Ser Arg Glu Pro Ala Leu Leu Cys Thr Phe Pro Asn Pro	
	160	165 170
	agt gca ccc agg aag gac agc acc ctt tgc gct gtg ccc cag agc tcc	758
	Ser Ala Pro Arg Lys Asp Ser Thr Leu Ser Ala Val Pro Gln Ser Ser	
5	175	180 185 190
	tac cca ctg ctg gca aat ggt gtc tgc aag tgg ccc gga tgt gag aag	806
	Tyr Pro Leu Leu Ala Asn Gly Val Cys Lys Trp Pro Gly Cys Glu Lys	
	195	200 205
	gtc ttc gaa gag cca gag gac ttc ctc aag cac tgc cag gcg gac cat	854
10	Val Phe Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu Lys His Cys Gln Ala Asp His	
	210	215 220
	ctt ctg gat gag aag ggc agg gca caa tgt ctc ctc cag aga gag atg	902
	Leu Leu Asp Glu Lys Gly Arg Ala Gln Cys Leu Leu Gln Arg Glu Met	
	225	230 235
15	gta cag tct ctg gag cag cag ctg gtg ctg gag aag gag aag ctg agt	950
	Val Gln Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu Ser	
	240	245 250
	gcc atg cag gcc cac ctg gct ggg aaa atg gca ctg acc aag gct tca	998
	Ala Met Gln Ala His Leu Ala Gly Lys Met Ala Leu Thr Lys Ala Ser	
20	255	260 265 270
	tct gtg gca tca tcc gac aag ggc tcc tgc tgc atc gta gct gct ggc	1046
	Ser Val Ala Ser Ser Asp Lys Gly Ser Cys Cys Ile Val Ala Ala Gly	
	275	280 285
	agc caa ggc cct gtc gtc cca gcc tgg tct ggc ccc cgg gag gcc cct	1094
25	Ser Gln Gly Pro Val Val Pro Ala Trp Ser Gly Pro Arg Glu Ala Pro	
	290	295 300
	gac agc ctg ttt gct gtc cgg agg cac ctg tgg ggt agc cat gga aac	1142
	Asp Ser Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu Trp Gly Ser His Gly Asn	
	305	310 315
30	agc aca ttc cca gag ttc ctc cac aac atg gac tac ttc aag ttc cac	1190
	Ser Thr Phe Pro Glu Phe Leu His Asn Met Asp Tyr Phe Lys Phe His	
	320	325 330

aac atg cga ccc cct ttc acc tac gcc acg ctc atc cgc tgg gcc atc 1238
 Asn Met Arg Pro Pro Phe Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile
 335 340 345 350
 ctg gag gct cca gag aag cag cgg aca ctc aat gag atc tac cac tgg 1286
 5 Leu Glu Ala Pro Glu Lys Gln Arg Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp
 355 360 365
 ttc aca cgc atg ttt gcc ttc ttc aga aac cat cct gcc acc tgg aag 1334
 Phe Thr Arg Met Phe Ala Phe Phe Arg Asn His Pro Ala Thr Trp Lys
 370 375 380
 10 aac gcc atc cgc cac aac ctg agt ctg cac aag tgc ttt gtg cgg gtg 1382
 Asn Ala Ile Arg His Asn Leu Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val
 385 390 395
 gag agc gag aag ggg gct gtg tgg acc gtg gat gag ctg gag ttc cgc 1430
 Glu Ser Glu Lys Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu Glu Phe Arg
 15 400 405 410
 aag aaa cgg agc cag agg ccc agc agg tgt tcc aac cct aca cct ggc 1478
 Lys Lys Arg Ser Gln Arg Pro Ser Arg Cys Ser Asn Pro Thr Pro Gly
 415 420 425 430
 ccc tga cctcaagatc aaggaaagga ggatggacga acagggggcca aactggtggg 1534
 20 Pro
 aggcagaggt ggtgggggca gggatgatag gccctggatg tgcccacagg gaccaagaag 1594
 tgaggtttcc actgtcttgc ctgccagggc ccctgttccc ccgctggcag ccacccccctc 1654
 ccccatcata tcctttgccc caaggctgct cagagggggcc ccggtcctgg cccagcccc 1714
 25 cacctccgcc ccagacacac cccccagtcg agccctgcag ccaaacagag ccttcacaac 1774
 cagccacaca gagcctgcct cagctgctcg cacagattac ttcagggtcg gaaaagtcac 1834
 acagacacac aaaatgtcac aatcctgtcc ctcac 1869
 <210> 2
 <211> 431
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Met Pro Asn Pro Arg Pro Gly Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser Pro Ser Trp Arg Ala Ala Pro Lys Ala
 20 25 30
 5 Ser Asp Leu Leu Gly Ala Arg Gly Pro Gly Gly Thr Phe Gln Gly Arg
 35 40 45
 Asp Leu Arg Gly Gly Ala His Ala Ser Ser Ser Ser Leu Asn Pro Met
 50 55 60
 Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met Val Ala
 10 65 70 75 80
 Pro Ser Gly Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu Leu
 85 90 95
 Gln Asp Arg Pro His Phe Met His Gln Leu Ser Thr Val Asp Ala His
 100 105 110
 15 Ala Arg Thr Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu Glu Ser Pro Ala Met
 115 120 125
 Ile Ser Leu Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Gly Val Phe Ser Leu Lys
 130 135 140
 Ala Arg Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu Glu Trp
 20 145 150 155 160
 Val Ser Arg Glu Pro Ala Leu Leu Cys Thr Phe Pro Asn Pro Ser Ala
 165 170 175
 Pro Arg Lys Asp Ser Thr Leu Ser Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro
 180 185 190
 25 Leu Leu Ala Asn Gly Val Cys Lys Trp Pro Gly Cys Glu Lys Val Phe
 195 200 205
 Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu Lys His Cys Gln Ala Asp His Leu Leu
 210 215 220
 Asp Glu Lys Gly Arg Ala Gln Cys Leu Leu Gln Arg Glu Met Val Gln
 30 225 230 235 240
 Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu Ser Ala Met
 245 250 255

Gln Ala His Leu Ala Gly Lys Met Ala Leu Thr Lys Ala Ser Ser Val
 260 265 270
 Ala Ser Ser Asp Lys Gly Ser Cys Cys Ile Val Ala Ala Gly Ser Gln
 275 280 285
 5 Gly Pro Val Val Pro Ala Trp Ser Gly Pro Arg Glu Ala Pro Asp Ser
 290 295 300
 Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu Trp Gly Ser His Gly Asn Ser Thr
 305 310 315 320
 Phe Pro Glu Phe Leu His Asn Met Asp Tyr Phe Lys Phe His Asn Met
 10 325 330 335
 Arg Pro Pro Phe Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu Glu
 340 345 350
 Ala Pro Glu Lys Gln Arg Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe Thr
 355 360 365
 15 Arg Met Phe Ala Phe Phe Arg Asn His Pro Ala Thr Trp Lys Asn Ala
 370 375 380
 Ile Arg His Asn Leu Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val Glu Ser
 385 390 395 400
 Glu Lys Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu Glu Phe Arg Lys Lys
 20 405 410 415
 Arg Ser Gln Arg Pro Ser Arg Cys Ser Asn Pro Thr Pro Gly Pro
 420 425 430
 <210> 3
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptídeo
 <400> 3
 30 Ile Tyr His Trp Phe Thr Arg Met Phe
 1 5
 <210> 4

- <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
5 <223> vacina de peptideo
 <400> 4
 Val Phe Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu
 1 5
 <210> 5
10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptideo
15 <400> 5
 Lys Phe His Asn Met Arg Pro Pro Phe
 1 5
 <210> 6
 <211> 9
20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptideo
 <400> 6
25 Glu Phe Leu His Asn Met Asp Tyr Phe
 1 5
 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
30 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptideo

<400> 7
 Trp Phe Thr Arg Met Phe Ala Phe Phe
 1 5
 <210> 8
 5 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptídeo
 10 <400> 8
 Arg Pro Pro Phe Thr Tyr Ala Thr Leu
 1 5
 <210> 9
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptídeo
 <400> 9
 20 Ser Tyr Pro Leu Leu Ala Asn Gly Val
 1 5
 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptídeo
 <400> 10
 Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile
 30 1 5 10
 <210> 11
 <211> 10

- <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptideo
 5 <400> 11
 Val Phe Ser Leu Lys Ala Arg Pro Gly Leu
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptideo
 <400> 12
 15 Arg Thr Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptideo
 <400> 13
 Asn Leu Ser Leu His Lys Cys Phe Val
 25 1 5
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> vacina de peptideo
 <400> 14

Leu Leu Gln Asp Arg Pro His Phe Met

1 5

<210> 15

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> vacina de peptídeo

<400> 15

10 Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> vacina de peptídeo

<400> 16

Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val

20 1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> vacina de peptídeo

<400> 17

Lys Leu Ser Ala Met Gln Ala His Leu

1 5

30 <210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> vacina de peptideo

<400> 18

5 Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> vacina de peptideo

<400> 19

Ser Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu

15 1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> vacina de peptideo

<400> 20

Val Gln Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val

1 5

25 <210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> vacina de peptideo

<400> 21

Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu

	1	5	
	<210> 22		
	<211> 10		
	<212> PRT		
5	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> vacina de peptídeo		
	<400> 22		
	Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe Thr		
10	1	5	10
	<210> 23		
	<211> 10		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> vacina de peptídeo		
	<400> 23		
	Lys Val Phe Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu		
	1	5	10
20	<210> 24		
	<211> 10		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
25	<223> vacina de peptídeo		
	<400> 24		
	Lys Met Ala Leu Thr Lys Ala Ser Ser Val		
	1	5	10
	<210> 25		
30	<211> 10		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		

<220>

<223> vacina de peptideo

<400> 25

Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met Val

5 1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> vacina de peptideo

<400> 26

Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val

1 5 10

15 <210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> vacina de peptideo

<400> 27

Ala Leu Leu Gln Asp Arg Pro His Phe Met

1 5 10

<210> 28

25 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> vacina de peptideo

30 <400> 28

Leu Leu Gln Arg Glu Met Val Gln Ser Leu

1 5 10

<210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> vacina de peptideo
 <400> 29
 Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu Glu Trp Val
 1 5 10
 10 <210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> vacina de peptideo
 <400> 30
 Val Met Val Ala Pro Ser Gly Ala Arg Leu
 1 5 10
 <210> 31
 20 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptideo
 25 <400> 31
 Ser Leu Asn Pro Met Pro Pro Ser Gln Leu
 1 5 10
 <210> 32
 <211> 10
 30 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

- <223> vacina de peptídeo
 <400> 32
 Arg Glu Ala Pro Asp Ser Leu Phe Ala Val
 1 5 10
- 5 <210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
- 10 <223> vacina de peptídeo
 <400> 33
 Lys Leu Ser Ala Met Gln Ala His Leu Ala
 1 5 10
 <210> 34
- 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
- 20 <223> vacina de peptídeo
 <400> 34
 Phe Met His Gln Leu Ser Thr Val Asp Ala
 1 5 10
 <210> 35
- 25 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
- 30 <223> vacina de peptídeo
 <400> 35
 Leu Leu Asp Glu Lys Gly Arg Ala Gln Cys
 1 5 10
 <210> 36

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> vacina de peptideo
 <400> 36
 Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu Glu Ala
 1 5 10
 <210> 37
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptideo
 15 <400> 37
 Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu Ser Ala
 1 5 10
 <210> 38
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptideo
 <400> 38
 25 Met Val Gln Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val
 1 5 10
 <210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> peptide

<400> 39
 Arg Ala Ala Pro Lys Ala Ser Asp Leu
 1 5
 <210> 40
 5 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptídeo
 10 <400> 40
 Met Val Gln Ser Leu Glu Gln Gln Leu
 1 5
 <210> 41
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptídeo
 <400> 41
 20 Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu
 1 5
 <210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptídeo
 <400> 42
 Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu Ala Leu
 30 1 5
 <210> 43
 <211> 9

- <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptídeo
 5 <400> 43
 Glu Ala Pro Glu Lys Gln Arg Thr Leu
 1 5
 <210> 44
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptídeo
 <400> 44
 15 Gln Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val Leu
 1 5
 <210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptídeo
 <400> 45
 Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu
 25 1 5
 <210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> vacina de peptídeo
 <400> 46

Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu

1 5

<210> 47

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> vacina de peptídeo

<400> 47

10 Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro Leu

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> vacina de peptídeo

<400> 48

Ala Ala Pro Lys Ala Ser Asp Leu Leu

20 1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> vacina de peptídeo

<400> 49

Phe Ser Leu Lys Ala Arg Pro Gly Leu

1 5

30 <210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> vacina de peptídeo

<400> 50

5 Asn Ala Ile Arg His Asn Leu Ser Leu

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> vacina de peptídeo

<400> 51

Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro Leu Leu

15 1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> vacina de peptídeo

<400> 52

Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu

1 5

25 <210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> vacina de peptídeo

<400> 53

Lys Trp Pro Gly Cys Glu Lys Val Phe

1 5
 <210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptídeo
 <400> 54
 Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu
 10 1 5
 <210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> vacina de peptídeo
 <400> 55
 Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala
 1 5
 20 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> vacina de peptídeo
 <400> 56
 Thr Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu
 1 5
 <210> 57
 30 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> vacina de peptideo

<400> 57

Leu Asn Pro Met Pro Pro Ser Gln Leu

5

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> vacina de peptideo

<400> 58

Glu Trp Val Ser Arg Glu Pro Ala Leu

1 5

15

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20

<223> vacina de peptideo

<400> 59

Ser Ala Pro Arg Lys Asp Ser Thr Leu

1 5

<210> 60

25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> vacina de peptideo

30

<400> 60

Leu Gln Arg Glu Met Val Gln Ser Leu

1 5

<210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> vacina de peptideo
 <400> 61
 Ser Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu
 1 5
 10 <210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> vacina de peptideo
 <400> 62
 Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe
 1 5
 <210> 63
 20 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptideo
 25 <400> 63
 Arg Ala Ala Pro Lys Ala Ser Asp Leu Leu
 1 5 10
 <210> 64
 <211> 10
 30 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

- <223> vacina de peptideo
 <400> 64
 Lys Val Phe Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu
 1 5 10
- 5 <210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
- 10 <223> vacina de peptideo
 <400> 65
 Lys Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu
 1 5 10
 <210> 66
- 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
- 20 <223> vacina de peptideo
 <400> 66
 Glu Met Val Gln Ser Leu Glu Gln Gln Leu
 1 5 10
 <210> 67
- 25 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
- 30 <223> vacina de peptideo
 <400> 67
 Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu Leu
 1 5 10
 <210> 68

- <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
- 5 <223> vacina de peptídeo
 <400> 68
 Asp Ser Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu
 1 5 10
 <210> 69
- 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
- <223> vacina de peptídeo
 15 <400> 69
 Arg Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe
 1 5 10
 <210> 70
 <211> 10
- 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
- <223> vacina de peptídeo
 <400> 70
- 25 Arg Pro Gly Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu
 1 5 10
 <210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
- 30 <213> Artificial
 <220>
- <223> vacina de peptídeo

<400> 71

Lys Asn Ala Ile Arg His Asn Leu Ser Leu

1 5 10

<210> 72

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> vacina de peptideo

10 <400> 72

Ser Tyr Pro Leu Leu Ala Asn Gly Val Cys

1 5 10

<210> 73

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> vacina de peptideo

<400> 73

20 Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu

1 5 10

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> vacina de peptideo

<400> 74

Ser Leu Asn Pro Met Pro Pro Ser Gln Leu

30 1 5 10

<210> 75

<211> 10

- <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacuna de peptideo
 5 <400> 75
 Ser Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro Leu
 1 5 10
 <210> 76
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacuna de peptideo
 <400> 76
 15 Asn Pro Met Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu
 1 5 10
 <210> 77
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacuna de peptideo
 <400> 77
 Leu Leu Gln Arg Glu Met Val Gln Ser Leu
 25 1 5 10
 <210> 78
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> vacuna de peptideo
 <400> 78

Gln Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu

1 5 10

<210> 79

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> vacuna de peptideo

<400> 79

10 Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro Leu Leu

1 5 10

<210> 80

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> vacuna de peptideo

<400> 80

Leu Pro Pro Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu

20 1 5 10

<210> 81

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> vacuna de peptideo

<400> 81

Ser Gly Pro Arg Glu Ala Pro Asp Ser Leu

1 5 10

30 <210> 82

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptideo
 <400> 82
5 Val Met Val Ala Pro Ser Gly Ala Arg Leu
 1 5 10
 <210> 83
 <211> 10
 <212> PRT
10 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptideo
 <400> 83
 Glu Trp Val Ser Arg Glu Pro Ala Leu Leu
15 1 5 10
 <210> 84
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
20 <220>
 <223> vacina de peptideo
 <400> 84
 Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu
 1 5 10
25 <210> 85
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
30 <223> vacina de peptideo
 <400> 85
 His Gly Asn Ser Thr Phe Pro Glu Phe Leu

	1	5	10
	<210> 86		
	<211> 10		
	<212> PRT		
5	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> vacina de peptideo		
	<400> 86		
	Thr Trp Lys Asn Ala Ile Arg His Asn Leu		
10	1	5	10
	<210> 87		
	<211> 10		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> vacina de peptideo		
	<400> 87		
	Ile Tyr His Trp Phe Thr Arg Met Phe Ala		
	1	5	10
20	<210> 88		
	<211> 9		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
25	<223> vacina de peptideo		
	<400> 88		
	Lys Leu Gly Ala Met Gln Ala His Leu		
	1	5	
	<210> 89		
30	<211> 9		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		

<220>

<223> vacina de peptídeo

<400> 89

Lys Tyr Ser Ala Met Gln Ala His Leu

5

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> vacina de peptídeo

<400> 90

Lys Phe Ser Ala Met Gln Ala His Leu

1 5

15

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20

<223> vacina de peptídeo

<400> 91

Lys Tyr Ser Ala Met Gln Ala His Ile

1 5

<210> 92

25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> vacina de peptídeo

30

<400> 92

Lys Tyr Ser Ala Met Gln Ala His Phe

1 5

<210> 93
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> vacuna de peptideo
 <400> 93
 Lys Phe Ser Ala Met Gln Ala His Ile
 1 5
 10 <210> 94
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> vacuna de peptideo
 <400> 94
 Lys Phe Ser Ala Met Gln Ala His Phe
 1 5
 <210> 95
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacuna de peptideo
 25 <400> 95
 Lys Leu Ser Ala Met Gln Ala His Val
 1 5
 <210> 96
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

<223> vacina de peptideo

<400> 96

Lys Leu Tyr Ala Met Gln Ala His Leu

1 5

5 <210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> vacina de peptideo

<400> 97

Lys Leu Met Ala Met Gln Ala His Leu

1 5

<210> 98

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> vacina de peptideo

20 <400> 98

Lys Leu Leu Ala Met Gln Ala His Leu

1 5

<210> 99

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> vacina de peptideo

<400> 99

30 Lys Leu Phe Ala Met Gln Ala His Leu

1 5

<210> 100

- <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> vacina de peptídeo
 <400> 100
 Lys Leu Tyr Ala Met Gln Ala His Val
 1 5
 <210> 101
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptídeo
 15 <400> 101
 Lys Leu Met Ala Met Gln Ala His Val
 1 5
 <210> 102
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptídeo
 <400> 102
 25 Lys Leu Leu Ala Met Gln Ala His Val
 1 5
 <210> 103
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> vacina de peptídeo

<400> 103

Lys Leu Phe Ala Met Gln Ala His Val

1

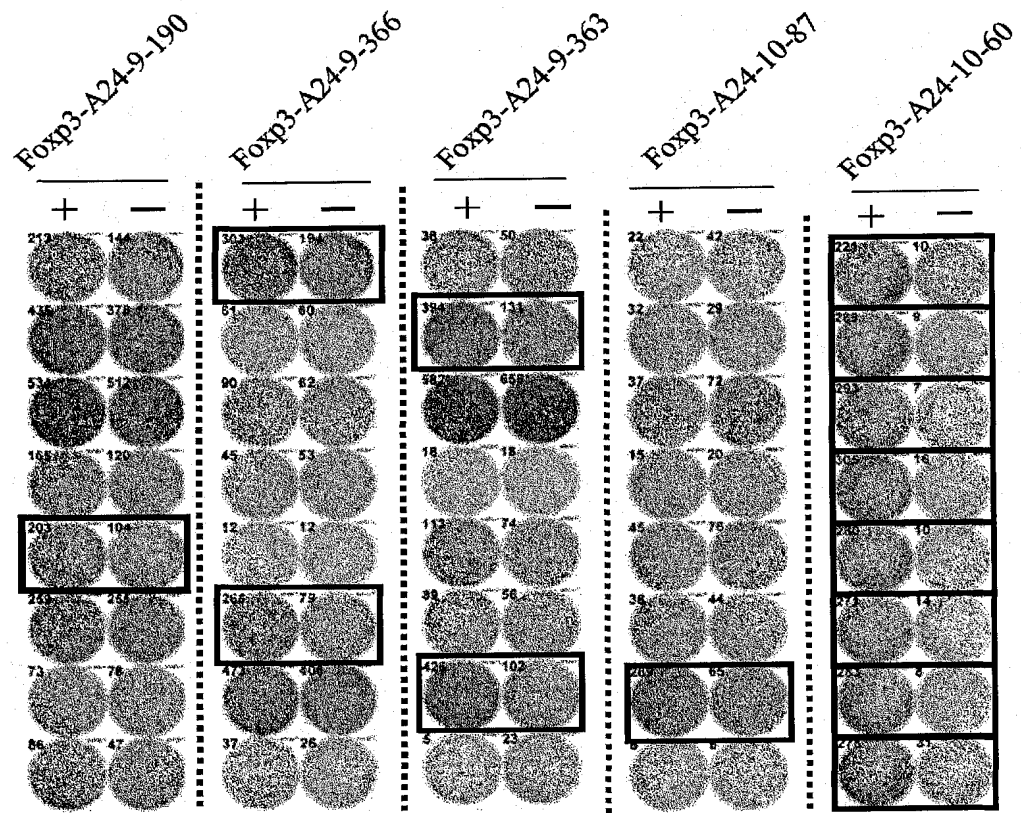
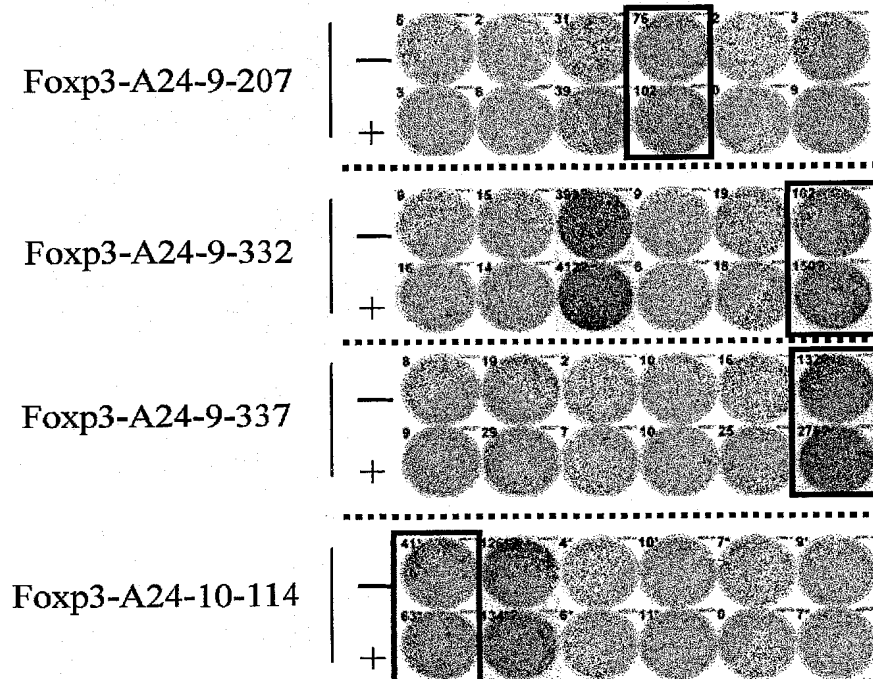
5

RESUMO

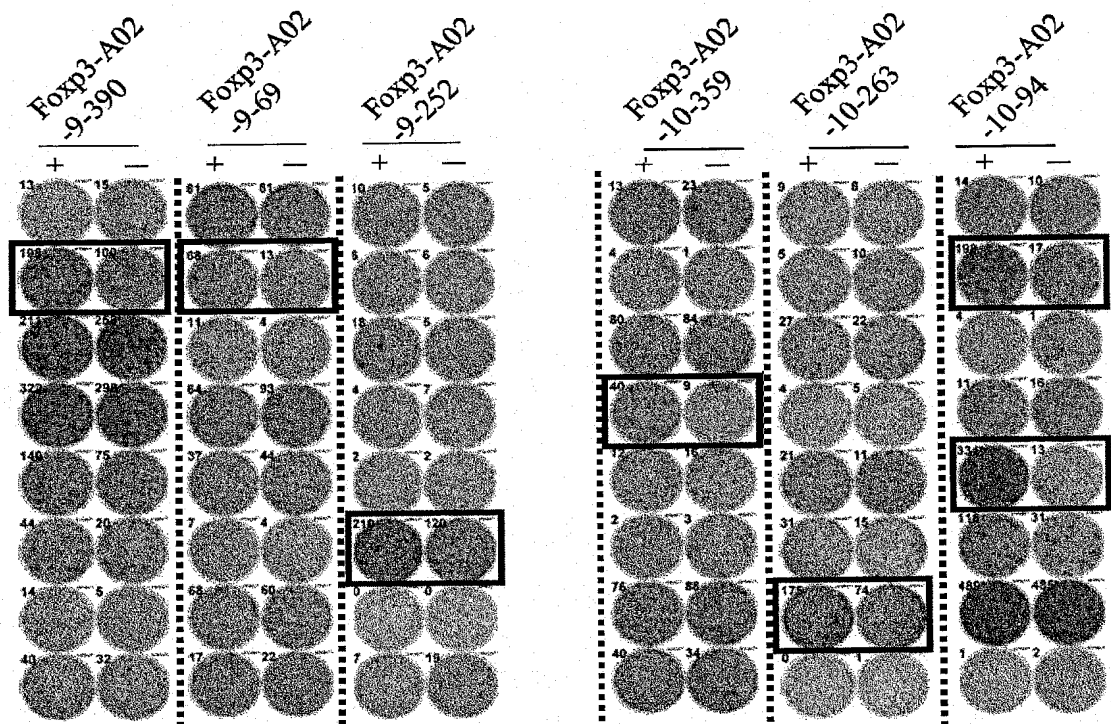
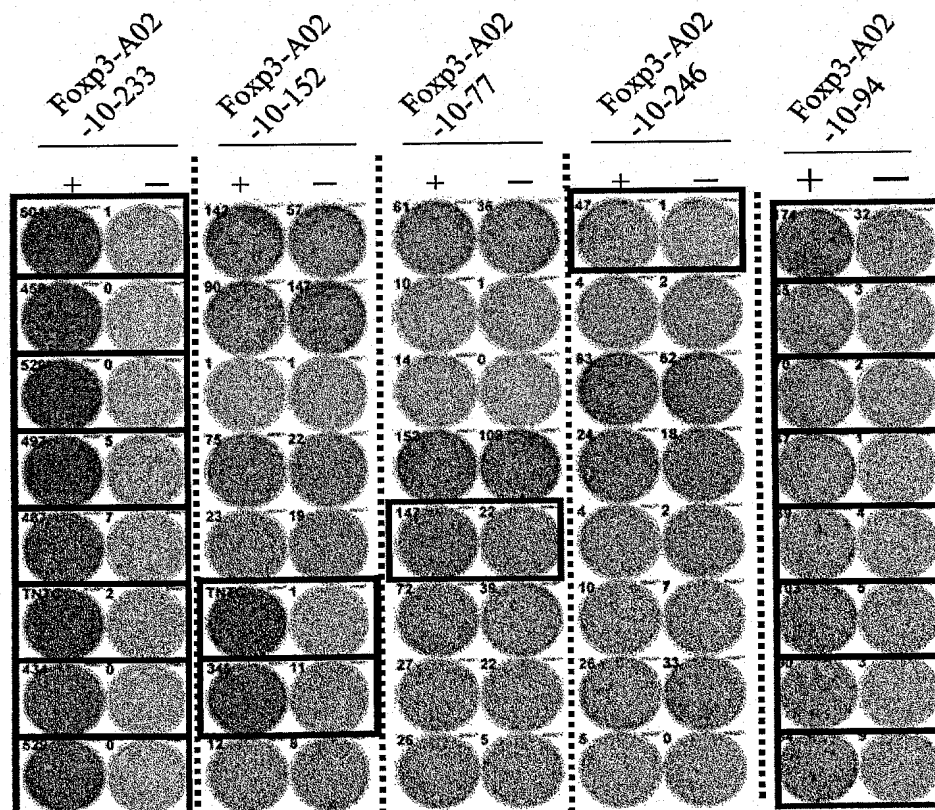
Patente de Invenção: **"VACINA DE PEPTÍDEO FOXP3"**.

5 A presente invenção refere-se peptídeos Foxp3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N^{os}: 3 a 5, 7 a 9, 12, 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, 67 ou 74, e peptídeos Foxp3 compreendendo as sequências mencionadas acima nas quais 1, 2 ou vários aminoácidos são substituídos ou adicionados, e tendo indutividade de células T citotóxicas, e também proporciona fármacos para regular células T reguladoras que compreendem peptídeos Foxp3. Os peptídeos Foxp3 desta invenção são úteis como vacinas.

[Fig. 1]

A**B**

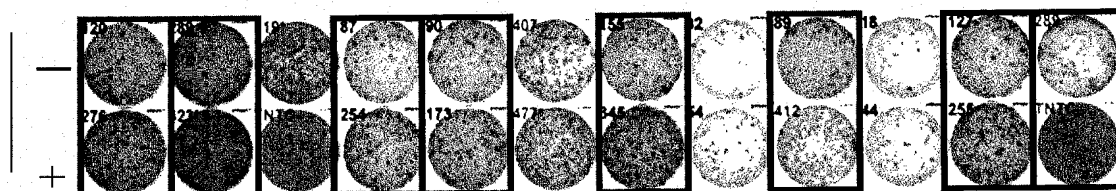
[Fig. 2A-B]

A**B**

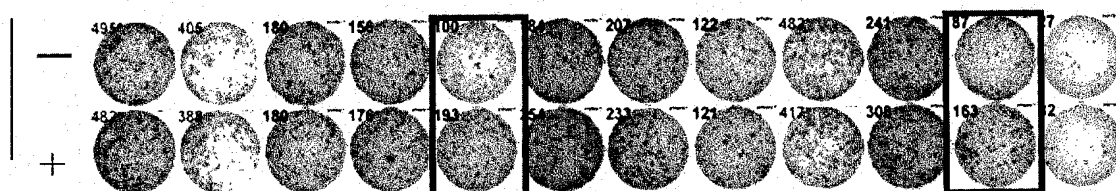
[Fig. 2C]

C

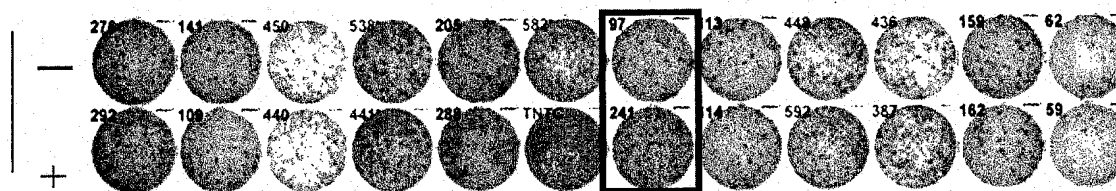
Foxp3-A2-9-390



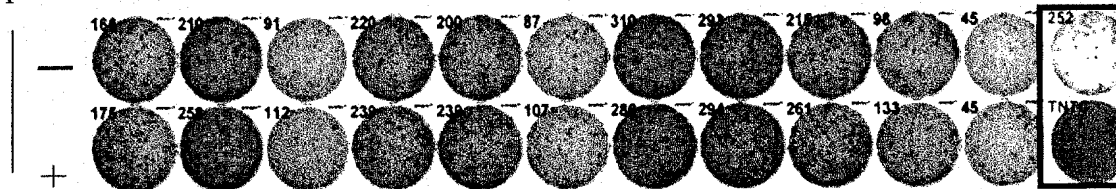
Foxp3-A2-9-304



Foxp3-A2-9-68

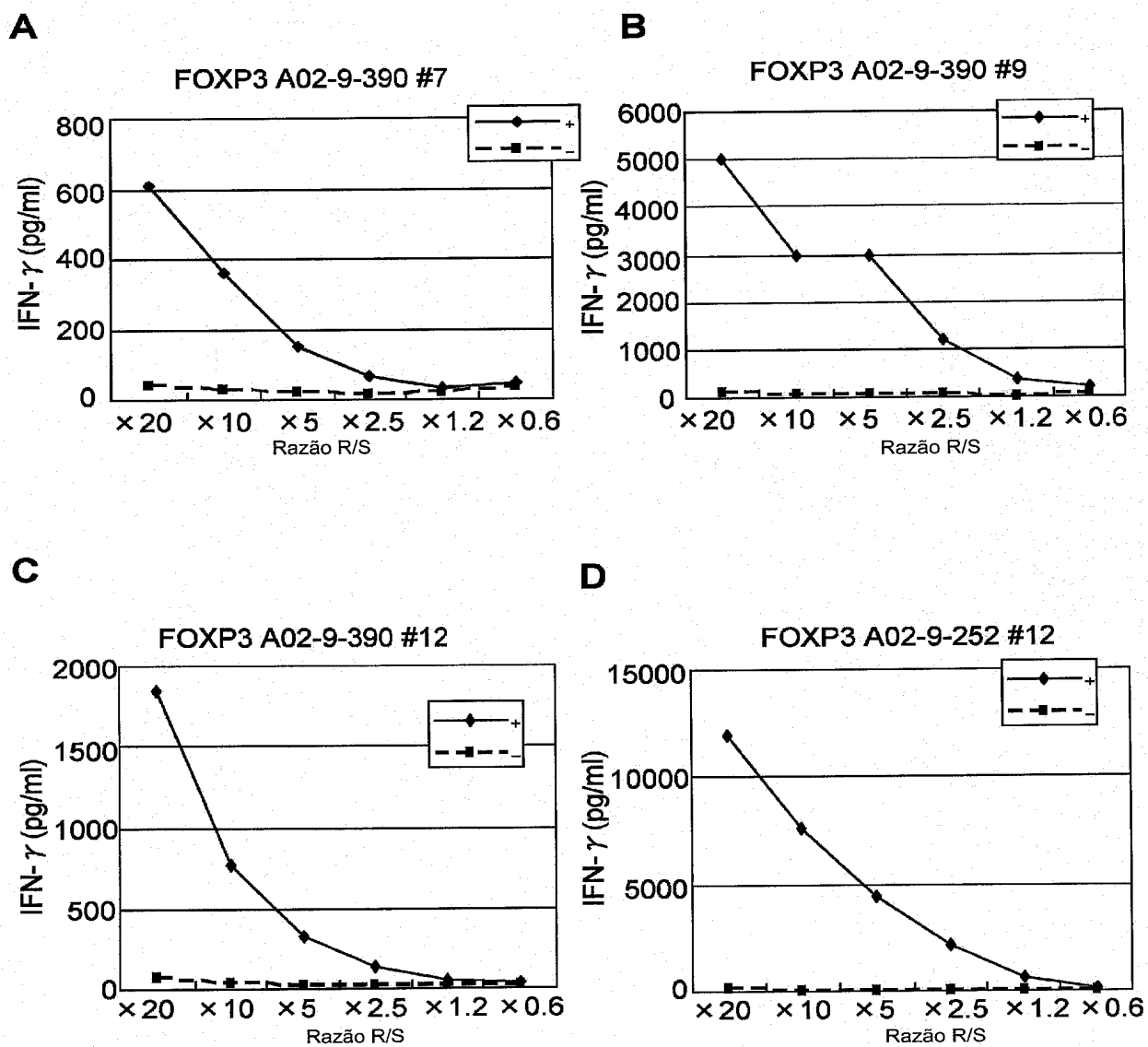


Foxp3-A2-9-252

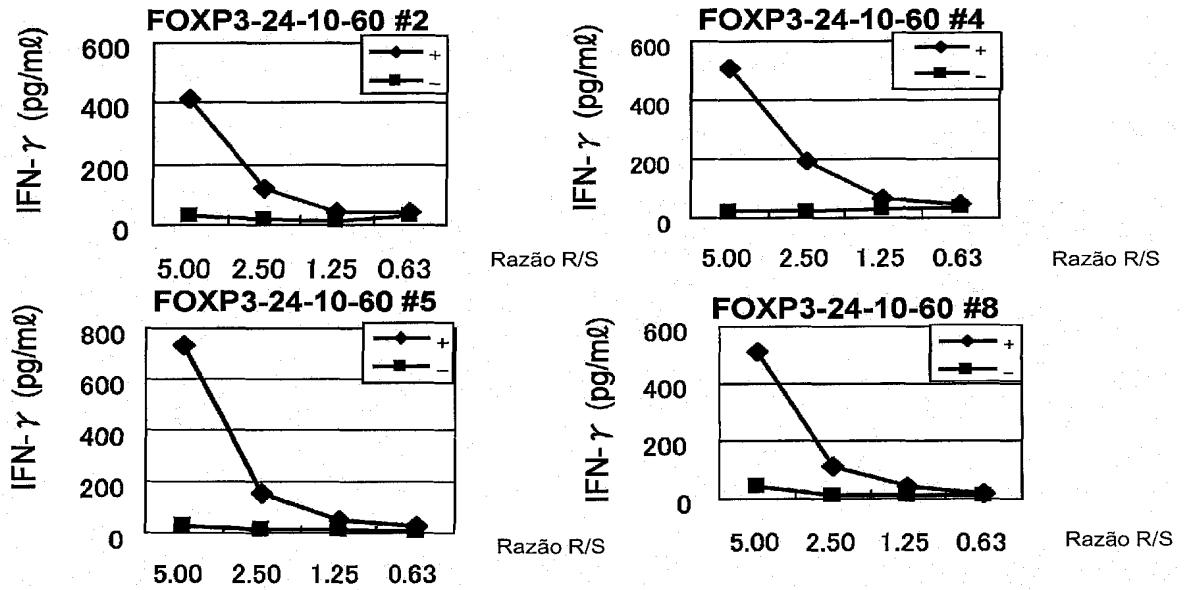
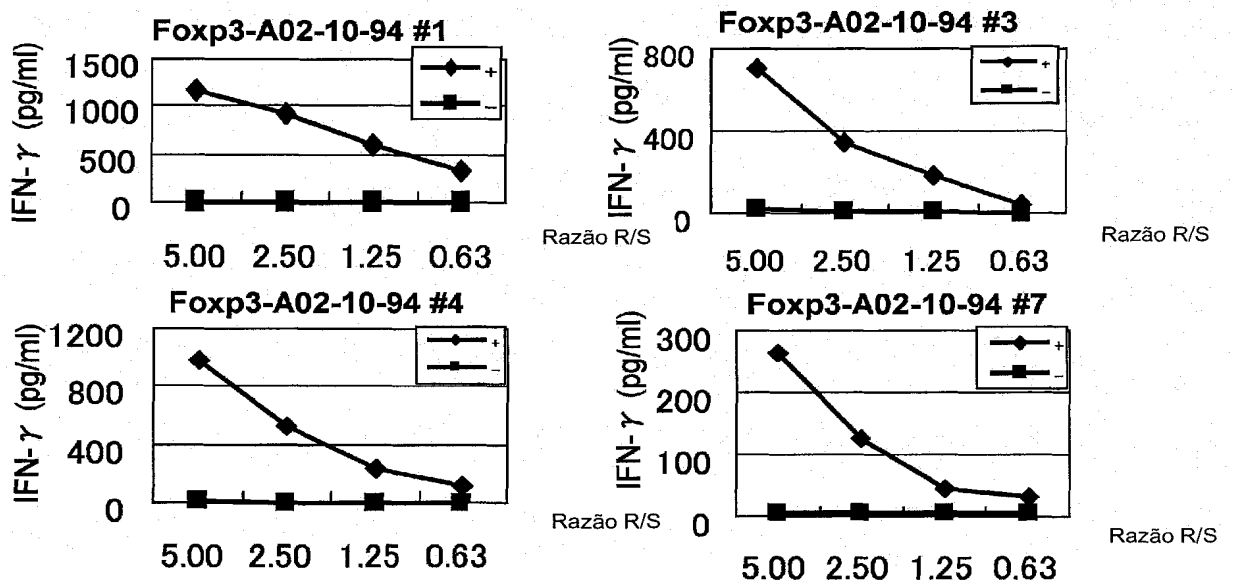
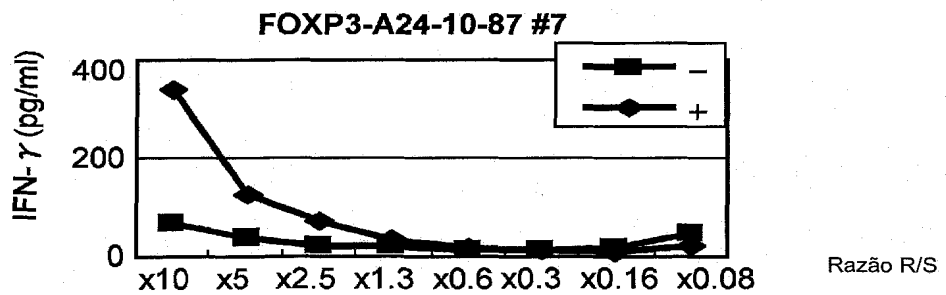


[Fig. 3A-D]

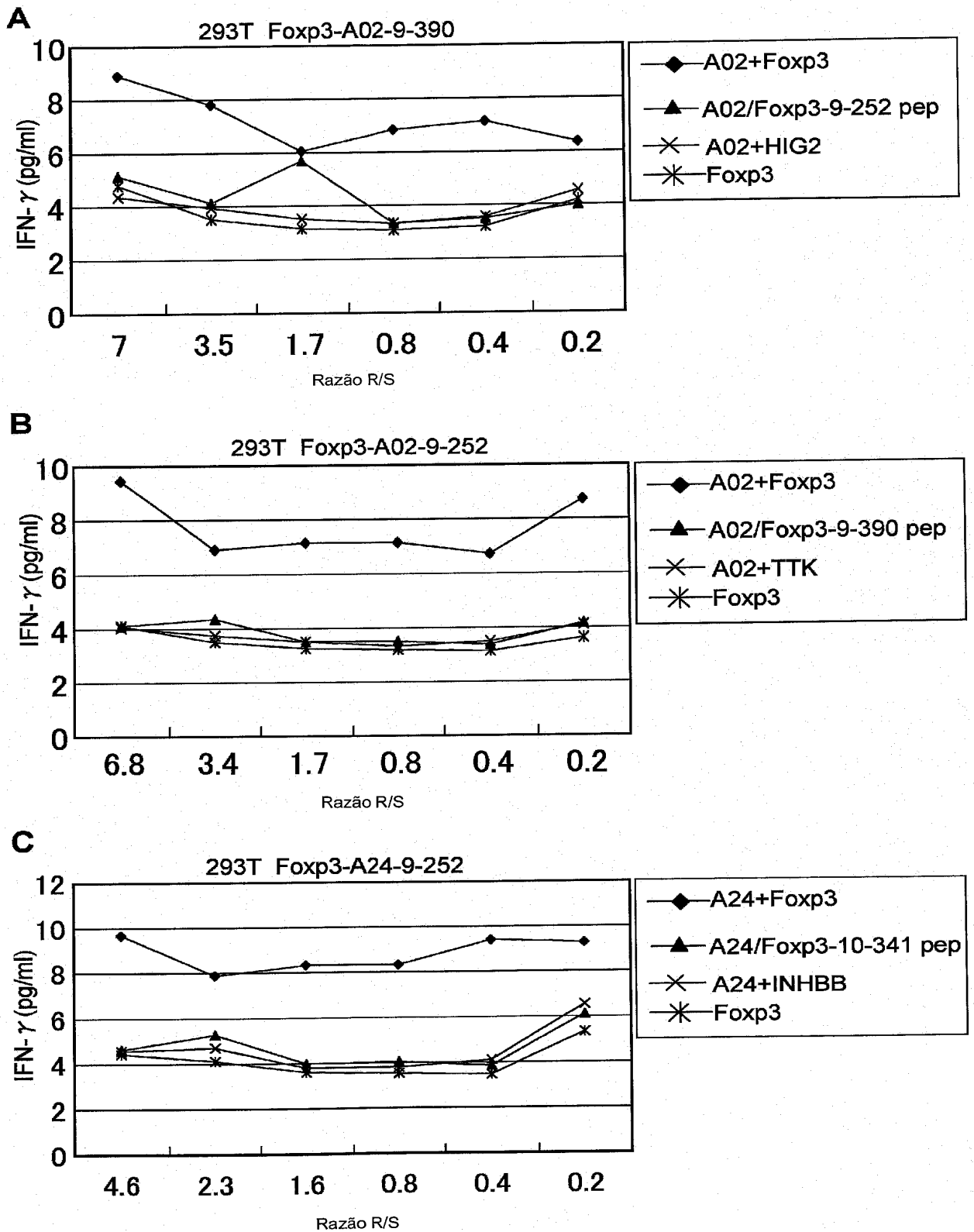
Estabelecimento para linhagens de CTL estimuladas com Foxp3-A02-9-390 ou Foxp3-A02-9-252



[Fig. 3E-G]

E**F****G**

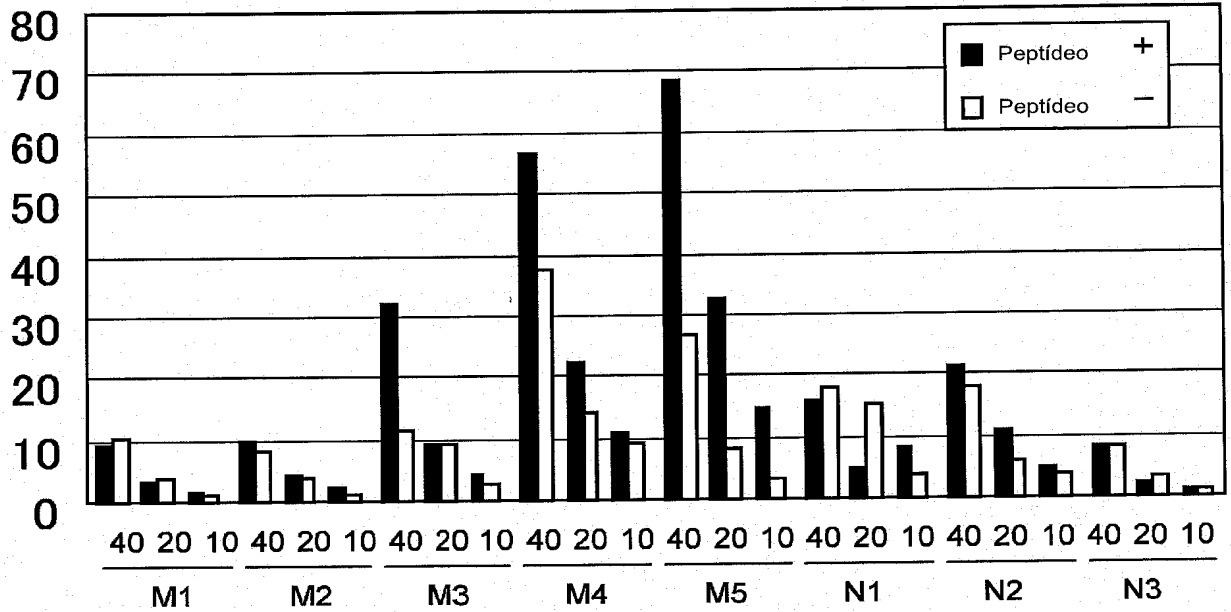
[Fig. 4]



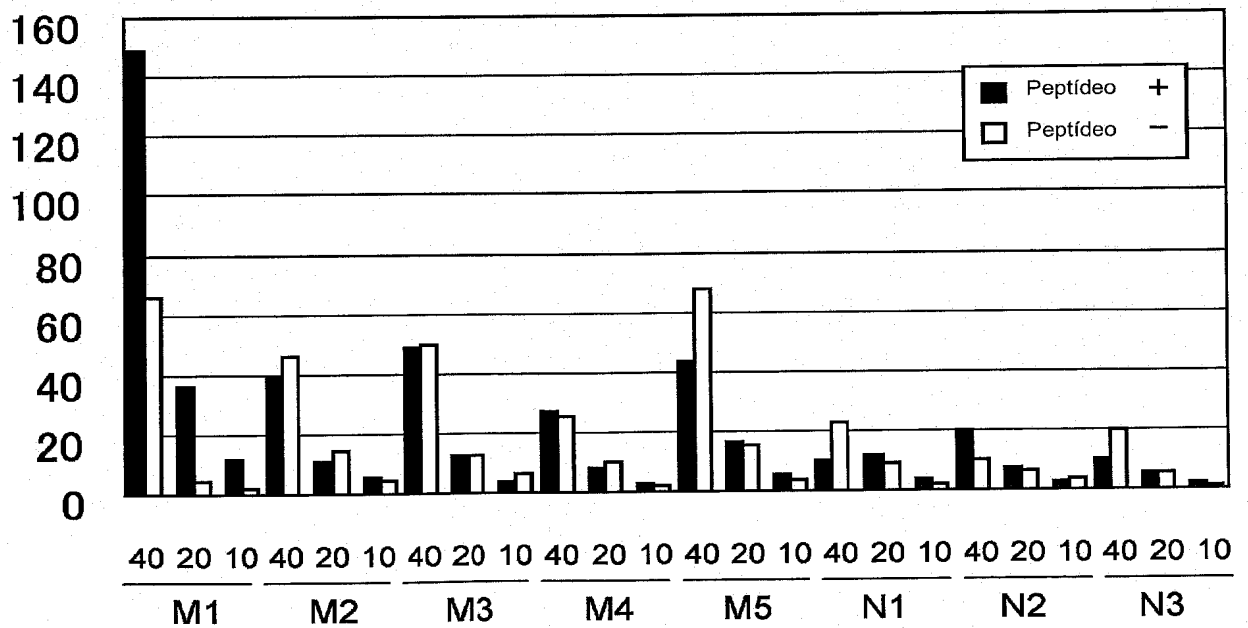
[Fig. 5]

A**Foxp3-9-252_h**

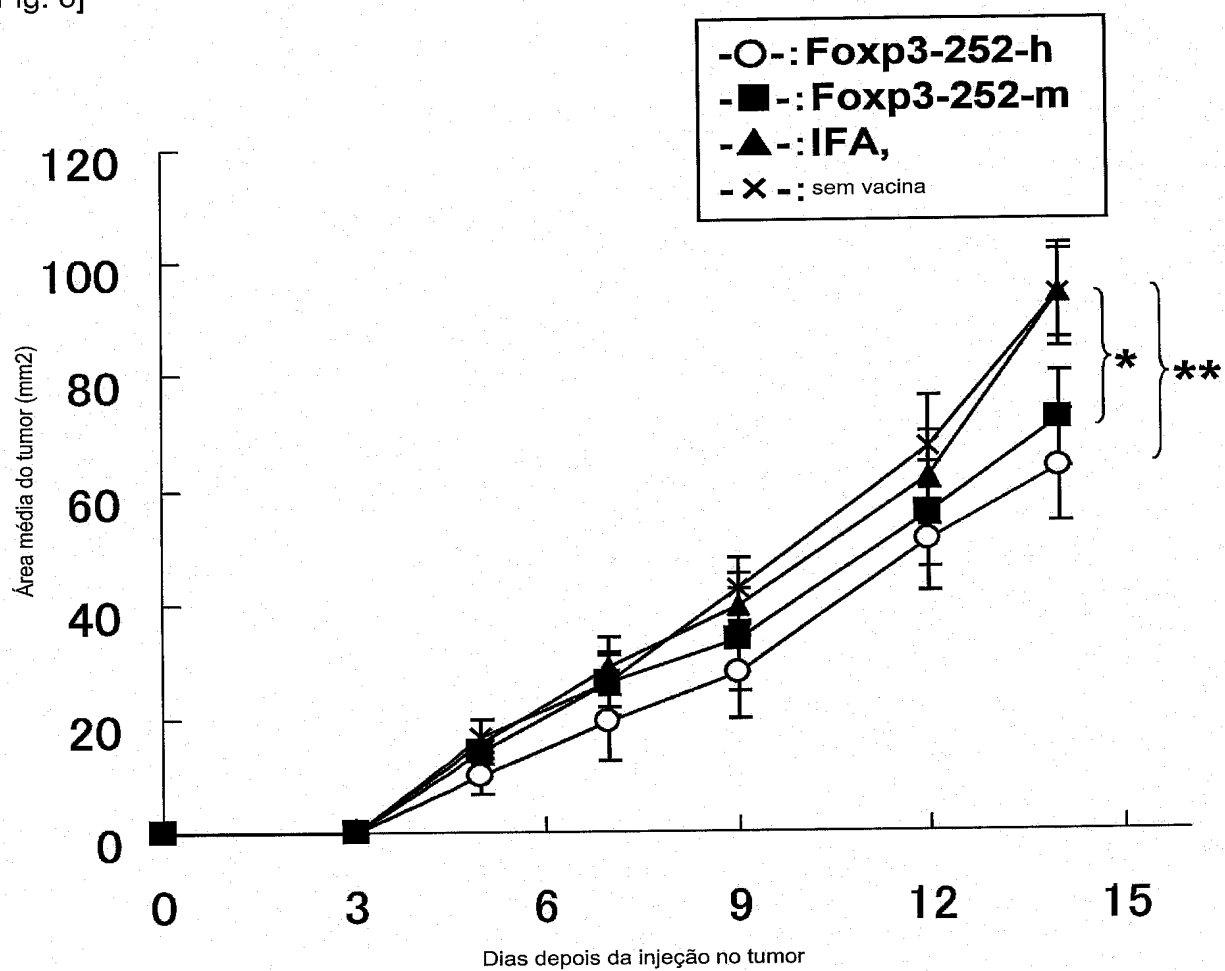
Células formadoras de manchas

**B****Foxp3-9-252_m**

Células formadoras de manchas



[Fig. 6]

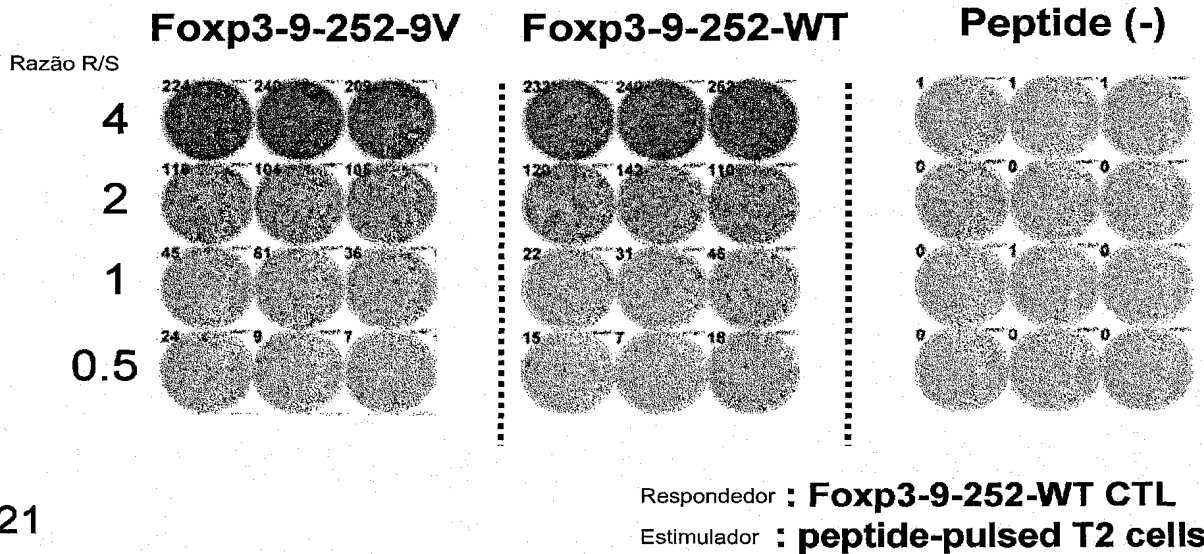


*, $P < 0.01$; **, $P < 0.005$

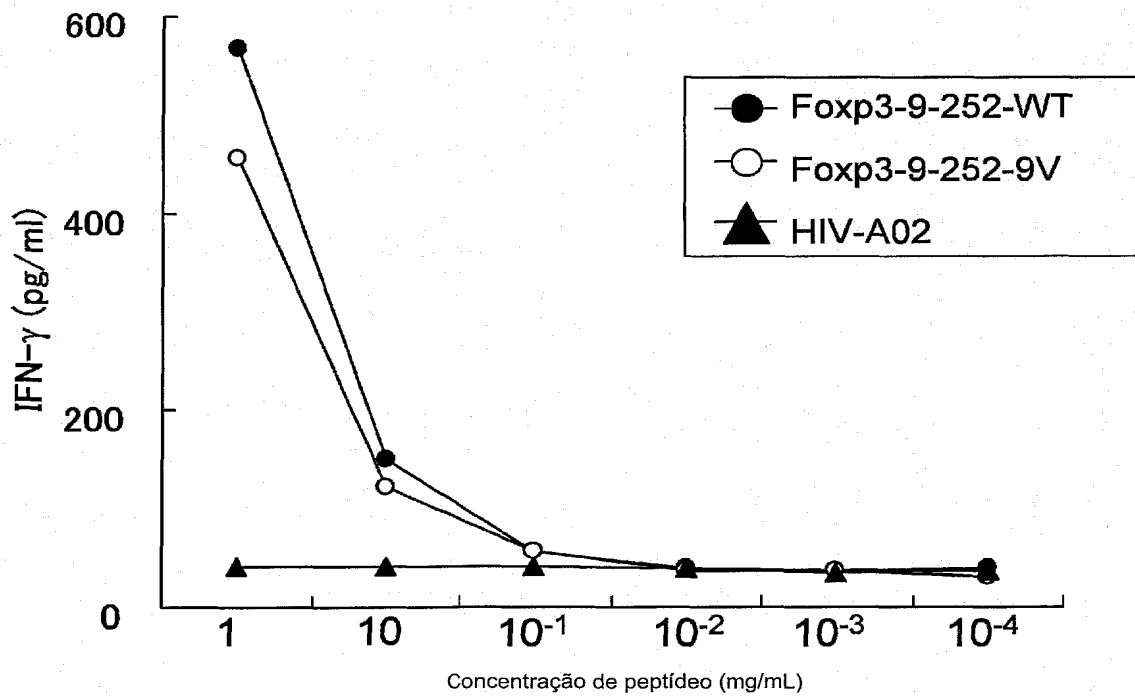
[Fig. 7A-B]

A

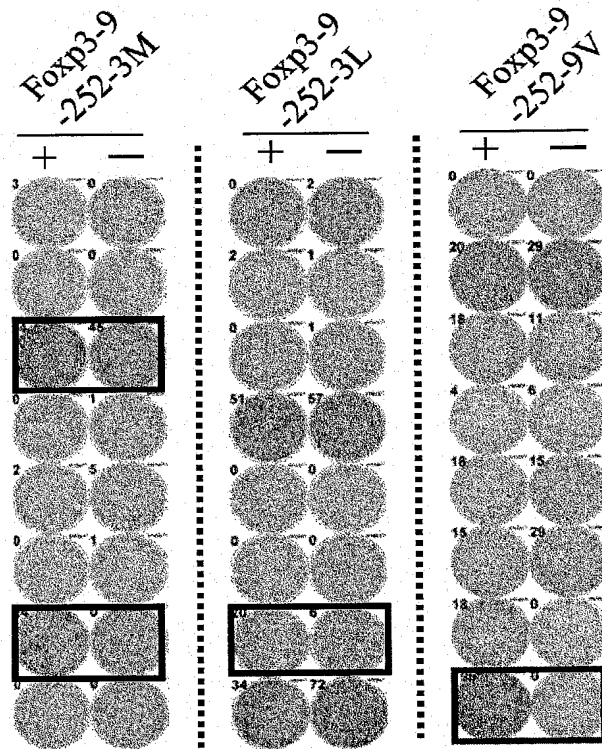
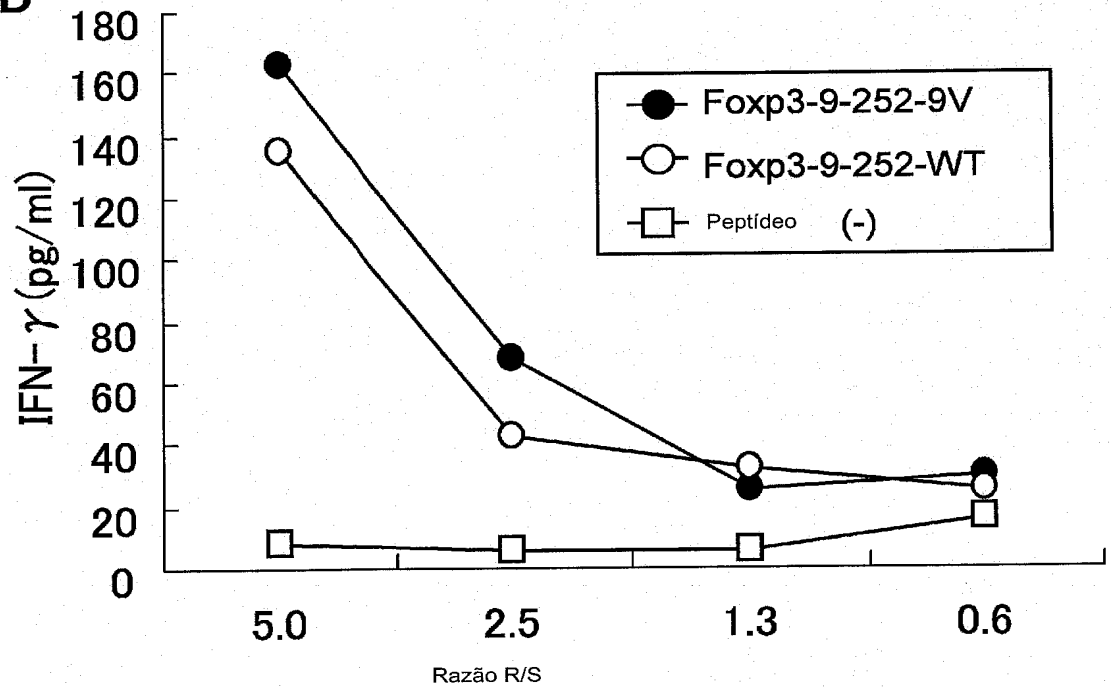
20



21

B

[Fig. 7C-D]

22 **C**23 **D**

Respondedor; : Foxp3-9-252-9V CTL
 Estimulador: células T2 pulsadas com peptídeo

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo que consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 3 a 5, 7 a 9, 12, 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, 37, 67 ou 74.
2. Peptídeo tendo indutividade de célula T citotóxica, em que o
5 peptídeo compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo de:
 - (a) SEQ ID NOs: 3 a 5, 7-19, 12, 17, 67 ou 74, e
 - (b) SEQ ID NOs: 3 a 5, 7 a 9, 12, 17, 67 ou 74, em que 1, 2, ou vários aminoácidos são substituídos ou adicionados.
3. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 2, em que o segundo
10 aminoácido da terminação N é fenilalanina, tirosina, metionina, ou triptofano.
4. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, em que o aminoácido na terminação C é fenilalanina, leucina, isoleucina, triptofano, ou metionina.
5. Peptídeo tendo indutividade de célula T citotóxica, em que o
15 peptídeo compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo de:
 - (a) SQ ID NOs: 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, ou 37, e
 - (b) SEQ ID NOs: 15 a 19, 22, 24, 27 a 30, ou 37, em que 1, 2, ou vários aminoácidos são substituídos ou adicionados.
6. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 5, em que o segundo
20 aminoácido na terminação N é leucina ou metionina.
7. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, em que o aminoácido na terminação C é valina ou leucina.
8. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 2 ou 5, em que o peptídeo substituído compreende a sequência de aminoácidos das SEQ ID
25 NOs: 95, 97 ou 98.
9. Agente farmacêutico para regular células T-reg, que contém 1 ou mais tipos de peptídeos como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, ou um polinucleotídeo que codifica o peptídeo.
10. Agente farmacêutico, de acordo com a reivindicação 9, que é
30 destinado a inibir a proliferação de células T-reg.
11. Agente farmacêutico, de acordo com a reivindicação 9, que é destinado à administração a um paciente cujo antígeno HLA é HLA-A24.

12. Agente farmacêutico, de acordo com a reivindicação 9, que é destinado à administração a um paciente cujo antígeno HLA é HLA-A02.

13. Agente farmacêutico, de acordo com a reivindicação 9, que é destinado a suprimir a função da célula T-reg.

5 14. Agente farmacêutico, de acordo com a reivindicação 9, que é destinado ao tratamento de câncer.

15. Agente farmacêutico, de acordo com a reivindicação 14, que é uma vacina.

10 16. Agente farmacêutico, de acordo com a reivindicação 15, que contém, além do peptídeo como definido nas reivindicações 2, 5 ou um polinucleotídeo que codifica o peptídeo, um outro peptídeo que tem a capacidade de induzir células AT citotóxicas contra células cancerosas ou um outro nucleotídeo que codifica o outro peptídeo.

15 17. Exossoma que apresenta em sua superfície um complexo que compreende um antígeno HLA e o peptídeo como definido na reivindicação 2 ou 5.

18. Exossoma, de acordo com a reivindicação 17, em que o antígeno é HLA-A24.

20 19. Exossoma, de acordo com a reivindicação 17, em que o antígeno HLA é HLA-A2402.

20 20. Exossoma, de acordo com a reivindicação 17, em que o antígeno HLA é HLA-A02.

21. Exossoma, de acordo com a reivindicação 17, em que o antígeno HLA é HLA-A0201.

25 22. Método para induzir células apresentadoras de antígeno tendo alta indutividade de célula T citotóxica ou administração do peptídeo como definido na reivindicação 2, 5 ou um polinucleotídeo que codifica o peptídeo.

30 23. Método para induzir células T citotóxicas por administração do peptídeo como definido na reivindicação 2, 5 ou um polinucleotídeo que codifica o peptídeo.

24. Método para induzir células apresentadoras de antígeno ten-

do alta indutividade de célula T citotóxica como definida na reivindicação 22, em que o método compreende transferir um gene que compreende um polinucleotídeo que codifica o peptídeo como definido na reivindicação 2 ou 5 para as células apresentadoras de antígeno.

5 25. Célula T citotóxica isolada, que é induzida pelo peptídeo como definido na reivindicação 2.

26. Célula apresentadora de antígeno, que compreende um complexo formado entre um antígeno HLA e o peptídeo como definido na reivindicação 2 ou 5.

10 27. Célula apresentadora de antígeno, de acordo com a reivindicação 26, que é induzida pelo método como definido na reivindicação 24.

28. Método para regular células T-reg em um paciente, que compreende administrar ao dito paciente uma vacina que compreende um peptídeo como definido na reivindicação 2, ou um fragmento imunologicamente ativo do dito peptídeo, ou um polinucleotídeo que codifica o peptídeo.

15