

(11) *Número de Publicação:* **PT 810870 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
 C07K007/06 A C12N005/06 B
 A61K038/08 B A61K038/17 B

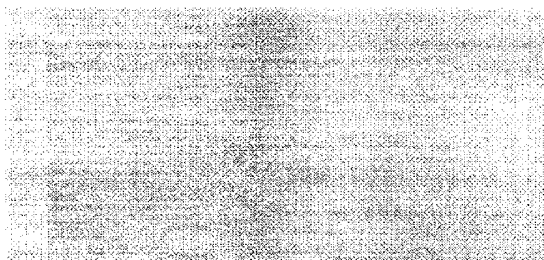
(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) <i>Data de depósito:</i> 1995.03.21	(73) <i>Titular(es):</i> LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH 605 THIRD AVENUE, 33RD FLOOR NEW YORK 10158 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1994.03.24 US 217188	UNIVERSITEIT LEIDEN RAPENBURG 70 NL-2300 RA LEIDEN NL
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1997.12.10	(72) <i>Inventor(es):</i> PIERRE VAN DER BRUGGEN BE THIERRY BOON-FALLEUR BE CORNELIS J.M. MELIEF NL M.W. VISSEREN NL W.M. KAST NL
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.05.16	(74) <i>Mandatário(s):</i> MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO 50, 5º AND. 1269-163 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PÉPTIDOS ISOLADOS DERIVADOS DO MAGE-2 PRECURSOR DE ANTIGÉNIOS DE REJEIÇÃO DE TUMORES E SUAS UTILIZAÇÕES

(57) *Resumo:*

PÉPTIDOS ISOLADOS DERIVADOS DO MAGE-2 PRECURSOR DE ANTIGÉNIOS DE REJEIÇÃO DE TUMORES E SUAS UTILIZAÇÕES



Campo das Cebolas - 1149 - 035 LISBOA
 Telef.: 21 881 81 00
 Linha azul: 808 200 689
 Fax: 21 887 53 08 - 21 886 00 66
 E-mail: inpi @ mail. telepac. pt



INSTITUTO NACIONAL
 DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 MINISTÉRIO DA ECONOMIA

FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. <input checked="" type="checkbox"/>	MOD. UTI. <input type="checkbox"/>	MOD. IND. <input type="checkbox"/>	DES. IND. <input type="checkbox"/>	TOP. SEMIC. <input type="checkbox"/>	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
N.º 810870 (11)		N.º Objectos <input type="checkbox"/> N.º Desenhos <input type="checkbox"/>		DATA DO PEDIDO ___/___/___ (22)	

REQUERENTE (71)
 (NOME E MORADA) LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, americana, industrial e comercial, com sede em 1345 Avenue of the Americas, New York, New York 10105, Estados Unidos da América; UNIVERSITEIT LEIDEN, holandesa, industrial e comercial, com sede em Stationsweg 46, 2312 AV Leiden, Holanda

CÓDIGO POSTAL

INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72)
 CORNELIS J. M. MELIEF, M. W. VISSEREN, W. M. KAST, PIERRE VAN DER BRUGGEN, THIERRY BOON-FALLEUR

REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)

DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO
24-03-94	E.U.A.	217188

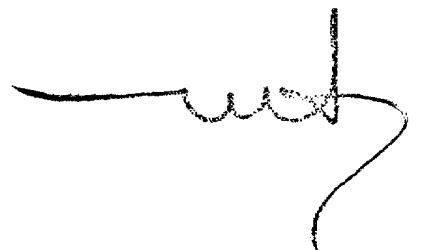
FIGURA (para interpretação do resumo)

EPÍGRAFE (54)
 "PEPTÍDOS ISOLDOS DERIVADOS DO MAGE-2
 PRECURSOR DE ANTIGÉNIOS DE REJEIÇÃO DE
 TUMORES E SUAS UTILIZAÇÕES"

RESUMO (max. 150 palavras) (57)

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBRÉADAS

Descrição



“Péptidos isolados derivados do MAGE-2 precursor de antígenos de rejeição de tumores e suas utilizações”

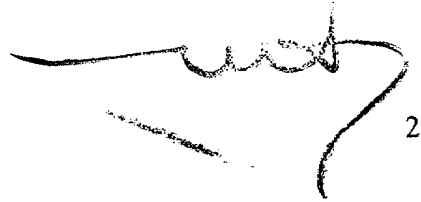
CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção insere-se no domínio da imunogenética e da química peptídica. Mais particularmente, a invenção diz respeito a nonapeptidos úteis de diversas maneiras, quer como imunogénios quer como ligandos para a molécula ALH-A2 (em inglês HLA-A2). Mais particularmente, a invenção diz respeito ao chamado “antígeno de rejeição de tumores” obtido a partir do precursor do antígeno de rejeição de tumores codificado pelo gene MAGE-2 e que é apresentado pela molécula ALH-A2 de classe I do CPH (em inglês MHC).

ANTECEDENTES E TÉCNICA ANTERIOR

O estudo do reconhecimento ou da falta de reconhecimento de células cancerosas por um organismo hospedeiro tem avançado em muitas direcções diferentes. A compreensão do fenómeno presume um certo conhecimento da imunologia e da oncologia básicas.

Pesquisas já efectuadas em tumores de murganhos revelaram que estes apresentavam moléculas que conduziam à rejeição das células tumorais quando transplantadas para animais singeneicos. Estas moléculas são “reconhecidas” pelas células T no animal que as recebe e provocam uma resposta citotóxica das células T com lise das células transplantadas. Chegou-se a esta conclusão pela primeira vez com tumores induzidos *in vitro* por agentes químicos carcinogénicos, tais como o metil-colantreno. Concluiu-se que os antígenos



expressos pelos tumores e que suscitam a resposta das células T eram diferentes de um tumor para o outro. Para saber os preceitos gerais sobre a indução de tumores com agentes químicos carcinogénicos e as diferenças dos antígenos da superfície das células veja-se Prehn *et al.*, J. Natl. Canc. Inst. 18: 769-778 (1957); Klein *et al.*, Cancer Res. 20: 1561-1572 (1960); Gross, Cancer. Res. 3: 326-333 (1943) e Basombrio, Cancer Res. 30: 2458-2462 (1970). Esta classe de antígenos passou a ser conhecida pela designação de “antígenos de transplantação específicos dos tumores” ou “ATET, em inglês TSTA”. A seguir à observação da apresentação de tais antígenos, quando induzidos por agentes químicos carcinogénicos, foram obtidos resultados semelhantes quando os tumores foram induzidos *in vitro* por meio de radiação ultravioleta. Ver Kripke, J. Natl. Canc. Inst. 53: 333-1336 (1974).

Embora as respostas imunitárias mediadas pelas células T tenham sido observadas nos tipos de tumores descritos *supra*, presume-se que os tumores espontâneos sejam genericamente não imunogénicos. Acreditou-se por isso que não apresentassem antígenos que provocassem uma resposta ao tumor no paciente portador do tumor. Ver Hewitt *et al.*, Brit. J. Cancer 33: 241-259 (1976).

A família das linhagens celulares que apresentam antígenos tum⁻ são variantes imunogénicas obtidas por mutagénese de células ou de linhagens celulares de tumores de murganho, conforme descrito por Boon *et al.*, J. Exp. Med. 152: 1184-1193 (1980). Pormenorizando, obtém-se os antígenos tum⁻ mutacionando células tumorais que não gerem uma resposta imunitária em murganhos singeneicos e que venham a formar tumores (isto é, células “tum⁺”). Quando estas células tum⁺ são mutagenizadas, são rejeitadas pelo murganho singeneico e não conseguem formar tumores (daí designadas por “tum⁻”). Ver Boon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 272 (1977). Comprovou-se já que há muitos

tipos de tumores que manifestam este fenómeno. Ver, v.g., Frost *et al.*, Cancer Res. 43: 125 (1983).

Presume-se que as variantes tum̄ não sejam capazes de formar tumores progressivos uma vez que iniciam um processo de rejeição imunitária. Os argumentos a favor desta hipótese compreendem a capacidade de as variantes de tumores “tum̄”, isto é, as que normalmente não formam tumores, passarem a formá-los em murganhos com sistemas imunitários suprimidos por irradiação subletal, Van Pel *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5282-5285 (1979); e também a observação de que as células tum̄ do mastocitoma P815, injectadas intraperitonealmente, se multiplicam de forma exponencial durante 12 a 15 dias e depois são eliminadas apenas em alguns dias no meio de um influxo de linfócitos e macrófagos (Uyttenhove *et al.*, J. Exp. Med. 152: 1175-1183 (1980)). Há outros argumentos entre os quais se refere a observação de que os murganhos adquirem uma memória imunitária que lhes permite resistir a estímulos subsequentes da mesma variante tum̄, mesmo quando quantidades imunossupressoras de radiação são administradas conjuntamente com o subsequente estímulo de células (Boon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 272- 275 (1977); Van Pel *et al.*, *supra*; Uyttenhove *et al.*, *supra*).

Pesquisas mais recentes permitiram concluir que foram geradas variantes imuno-génicas que não geraram uma resposta quando os tumores espontâneos foram submetidos a mutagénese. Com efeito, estas variantes foram capazes de suscitar uma resposta protectora imunitária contra o tumor original. Ver Van Pel *et al.*, J. Exp. Med. 157: 1992-2001 (1983). Assim sendo, demonstrou-se que é possível suscitar a apresentação daquilo a que se chama um “antigénio de rejeição tumoral” num tumor que constitua um alvo para uma resposta de rejeição singeneica. Foram conseguidos resultados idênticos quando os genes

exógenos foram transfectados para dentro de tumores espontâneos. A propósito deste assunto veja-se Fearson *et al.*, *Cancer Res.* 48: 2975-1980 (1988).

Foi já reconhecida uma classe de antígenos que se apresentam sobre a superfície de células tumorais e que são reconhecidos pelas células T citotóxicas, conduzindo à lise. Esta classe de antígenos irá ser referida doravante pela designação de “antígenos de rejeição tumoral” ou “ART, em inglês TRA”. Os ART podem suscitar ou não respostas de anticorpos. A abordagem ao estudo destes antígenos faz-se por meio de estudos de caracterização de células T citolíticas *in vitro*, isto é, o estudo da identificação do antígeno por um subconjunto particular de células T citolíticas, doravante designadas por “CTL”. O subconjunto prolifera ao reconhecer o antígeno de rejeição tumoral apresentado e as células que apresentem o antígeno são lisadas. Estudos de caracterização permitiram identificar clones de CTL que lisam de forma específica células que exprimem os antígenos. É possível encontrar exemplos deste trabalho nas obras de Levy *et al.*, *Adv. Cancer Res.* 24: 1-59 (1977); Boon *et al.*, *J. Exp. Med.* 152: 1184-1193 (1980); Brunner *et al.*, *J. Immunol.* 124: 1627-1634 (1980); Maryanski *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 124: 1627-1634 (1980); Maryanski *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 12: 406-412 (1982); Palladino *et al.*, *Canc. Res.* 47: 5074-5079 (1987). Este tipo de análise é necessário para outros tipos de antígenos reconhecidos pelas CTL, incluindo os antígenos secundários da histocompatibilidade, os antígenos H-Y específicos do homem e a classe de antígenos designada por antígenos “tum”, aqui descritos.

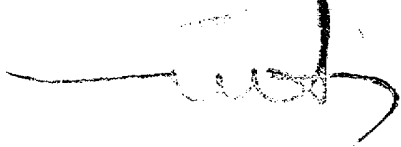
Como exemplo de um tumor que se insere no domínio descrito *supra* refere-se o P815. Ver DePlaen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2274-2278 (1988); Szikora *et al.*, *EMBO J.* 9: 1041-1050 (1990) e Sibille *et al.*, *J. Exp. Med.* 172: 35-45 (1990). O

tumor P815 é um mastocitoma induzido num murganho DBA/2 com metil-colantreno e criado em cultura quer como um tumor *in vitro* quer como linhagem celular. A linhagem do P815 gerou muitas variantes tum⁻ a seguir à mutagénese, incluindo as variantes designadas por P91A (DePlaen, *supra*), 35B (Szikora, *supra*) e P198 (Sibille, *supra*). Em contraste com os antígenios de rejeição tumoral - e isto constitui uma distinção fundamental - os antígenios tum⁻ apenas se encontram presentes depois de as células tumorais terem sido mutagenizadas. Os antígenios de rejeição tumoral encontram-se presentes nas células de um determinado tumor sem mutagénese. Assim sendo, tomando como referência a literatura, uma linhagem celular pode ser tum⁺, tal como a linhagem designada por "P1", e pode ser estimulada a produzir variantes tum⁻. Uma vez que o fenótipo tum⁻ difere do fenótipo da linhagem celular progenitora, admite-se que haja uma diferença no ADN das linhagens celulares tum⁻ comparativamente com as suas linhagens progenitoras tum⁺ e esta diferença pode ser explorada para se localizar o gene relevante em células tum⁻. Em consequência, descobriu-se que os genes das variantes tum⁻, tais como P91A, 35B e P198, diferem dos seus alelos normais por mutações pontuais nas regiões codificadoras do gene. Ver Szikora e Sibille, *supra*, e Lurquin *et al.*, Cell 58: 293-303 (1989). Demonstrou-se que não era este o caso com os ART da presente invenção. Nestes documentos também está demonstrado que os péptidos obtidos a partir do antígeno tum⁻ são apresentados pela molécula L^d para reconhecimento pelas CTL. A variante P91A é apresentada pela molécula L^d, a P35 pela D^d e a P198 pela K^d.

O pedido de patente de invenção PCT/US92/04354, depositado a 22 de Maio de 1992, concedido ao mesmo requerente do presente pedido de patente de invenção, explicita o caso de uma família de genes codificadores dos precursores antígenicos de rejeição de

tumores humanos, designada por família MAGE. Há vários destes genes que foram também estudados por Bruggen *et al.*, Science 254: 1643 (1991). É agora evidente que os diversos genes da família MAGE são expressos em células de tumores e que podem servir de marcadores para o diagnóstico desses tumores e também para outros fins aqui descritos. Veja-se também Traversari *et al.*, Immunogenetics 35: 145 (1992); Van der Bruggen *et al.*, Science 254: 1643 (1991). O mecanismo pelo qual uma proteína é transformada e apresentada sobre uma superfície de uma célula está agora bastante bem documentado. É possível encontrar uma resenha sobre o desenvolvimento desta matéria, escrita por Barinaga, "Getting Some 'Backbone': How MHC Binds Peptides", Science 257: 919 (1992); ver também Fremont *et al.*, Science 257: 919 (1992); Matsumura *et al.*, Science 257: 927 (1992); Latron *et al.*, Science 257: 964 (1992). Estes documentos apontam geralmente para a necessidade de o péptido que se liga a uma molécula de CPH/ALH (em inglês MHC/HLA) ter um comprimento de 9 aminoácidos (ser um "nonapeptido") e para a importância do primeiro e do nono resíduos do nonapeptido.

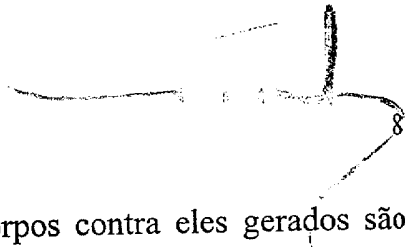
O documento WO 94 03205 divulga o princípio geral das composições nonapeptídicas ou decapeptídicas com resíduos conservados nas posições 2 e 9 capazes de se ligarem de forma específica a alelos seleccionados do CPH e de induzirem a activação de células T em células T restringidas pelo alelo do CPH. Os péptidos são úteis para suscitar uma resposta imunitária contra um antígeno desejado. Nesse documento são descritos epítomos provenientes de diversas proteínas destinatárias imunogénicas, incluindo os péptidos provenientes do antígeno específico do cancro da próstata, os antígenos da superfície e do núcleo da hepatite B, os antígenos do melanoma, os antígenos do vírus da imunodeficiência humana e os antígenos do vírus do papiloma humano.



Estudos feitos sobre a família de genes MAGE vieram agora revelar que há geralmente um nonapeptido particular que é apresentado sobre a superfície de algumas células tumorais e que a apresentação do nonapeptido exige que a molécula apresentadora seja a ALH-A1. Os complexos do antígeno de rejeição tumoral (o “ART” ou “nonapeptido”) de MAGE-1 conduz à lise das células que o apresentem, por acção das células T citolíticas (“CTL”).

Chama-se a atenção, *v.g.*, para o pedido de patente de invenção depositado em simultaneidade com o nº de série 217 187 (patente de invenção nº 5 554 506) de Traversari *et al.* e também para o pedido de patente de invenção com o nº de série 217 186 (patente de invenção nº 5 585 461) de Townsend *et al.*, documentos estes que apresentam um estudo sobre outros péptidos derivados de MAGE.

O trabalho de pesquisa apresentado, *v.g.*, no pedido de patente de invenção norte-americana com o nº de série 07/938 334 (patente de invenção norte-americana 5 405 940), depositado a 31 de Agosto de 1992, e no pedido de patente de invenção norte-americana com o nº de série 073 103 (patente de invenção norte-americana nº 5 462 871), depositado a 7 de Junho de 1993, nas partes em que são comparadas regiões homólogas de diversos genes de MAGE com a região do gene de MAGE-1 que codifica o nonapeptido relevante, conclui-se que há uma grande homologia. Com efeito, estas observações conduziram a um dos aspectos da invenção aqui descritos e reivindicados, designadamente uma família de nonapeptidos em que todos possuem os mesmos aminoácidos no terminal N e no terminal C. Sobre estes nonapeptidos se afirma que são úteis para diversos fins entre os quais se inclui a sua utilização como imunogénios, quer por si sós quer acoplados a péptidos portadores. Os nonapeptidos têm um tamanho suficiente para constituírem um



epítopo antigénico e há textos que afirmam que os anticorpos contra eles gerados são úteis para a identificação do nonapeptido, quer este exista por si só quer exista como parte de um polipeptido maior.

Nestas obras, em especial na que tem o nº de série 073 103 (patente de invenção norte-americana nº 5 462 871), está demonstrada uma ligação entre a ALH-A1 e a MAGE-3; no entanto, apenas cerca de 26% da população caucasiana e 17% da população negróide apresenta moléculas ALH-A1 sobre as superfícies das células. Assim, seria útil se houvesse mais informação sobre os péptidos apresentados por outros tipos de moléculas do CPH, por forma a que partes adequadas da população pudessem beneficiar das pesquisas referidas *supra*.

Concluiu-se agora que a existência de antigénios de péptidos derivados de MAGE-2, conforme exarado no texto subsequente, identifica péptidos que formam complexos com a molécula ALH-A2 da classe I do CPH. As diversas ramificações desta descoberta, entre as quais estão incluídas as aplicações terapêuticas e de diagnóstico, fazem parte dos objectivos da presente invenção, conforme consta do texto subsequente.

DESCRICÃO MINUCIOSA DOS CASOS PREFERIDOS

EXEMPLO 1

Condições experimentais

Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente, salvo quando especificado de outro modo. Todos os aminoácidos protegidos com Fmoc, os polímeros de síntese, os péptidos e o ATF (o mesmo que TFA) foram guardados a -20°C.

Síntese de péptidos

Os péptidos foram sintetizados por meio de estratégias em fase sólida num sintetizador de péptidos automático e múltiplo (Abimed AMS 422) (ver Gausepohl e Frank, 1990; Gausepohl *et al.*, (1990)).

Os péptidos foram produzidos em várias experiências, tendo sido em cada uma delas sintetizados simultaneamente 48 péptidos diferentes.

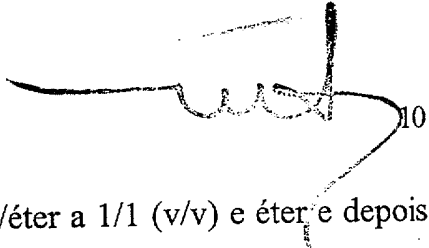
Utilizou-se como resina o produto 'Tentagel S AC' (Rapp *et al.*, 1990; Sheppard e Williams, 1982), que é um polímero de enxerto com braços separadores de polietileno-glicol numa matriz de polistireno (40-60 mg por péptido, carga de aminoácidos protegidos com Fmoc 10 μ M).

Foram realizados acoplamentos repetitivos mediante a adição de uma mistura de 90 μ L de BOP 0,67 M (Gausepohl *et al.*, 1988; Castro *et al.*, 1975) em NMP, 20 μ L de NMM em NMP a 2/1 (v/v) e 100 μ L de uma solução 0,60 M do aminoácido adequado protegido com Fmoc (Fields e Noble, 1990) em NMP (num excesso 6 vezes superior) a cada vaso de reacção. Depois de decorrido aproximadamente 70% do período de reacção, acrescentou-se a cada vaso de reacção 50 μ L de diclorometano.

Efectuou-se a desprotecção por remoção do Fmoc adicionado 3 vezes 0,8 mL de piperidina/DMA a 1/4 (v/v) a cada vaso de reacção.

Aumentou-se os períodos de acoplamento e de desprotecção à medida que a síntese foi progredindo, começando respectivamente com 30 minutos e 3 vezes 3 minutos.

As lavagens depois dos acoplamentos e das desprotecções por remoção do Fmoc foram realizadas com 6 vezes 1,2 mL de DMA. Depois de se ter obtido a sequência pretendida e de se ter removido a última protecção Fmoc, lavou-se a resina peptídica



exaustivamente com DMA, diclorometano, diclorometano/éter a 1/1 (v/v) e éter e depois secou-se.

Clivagem e isolamento do péptido

Efectuou-se a clivagem dos péptidos a partir da resina e a remoção dos grupos de protecção das cadeias laterais mediante a adição de 6 vezes 200 μ L de ATF/água a 19/1 (v/v) a intervalos de 5 minutos a cada vaso de reacção, para assim se obter os péptidos carboxílicos livres. No caso dos péptidos que continham Trp utilizou-se ATF/água/etanotiol a 18/1/1 (v/v/v).

Decorridas 2 horas após a primeira adição de ATF aos péptidos, estes precipitaram a partir dos filtrados combinados por adição de 10 mL de éter/pentano a 1/1 (v/v) e arrefecimento para -20°C . Os péptidos foram isolados por centrifugação (-20°C , 2500 g, 10 minutos).

Após o tratamento da massa obtida com éter/pentano a 1/1 (v/v) e isolamento graças ao mesmo procedimento de centrifugação, efectuo-se a secagem dos péptidos a 45°C durante 15 minutos.

Dissolveu-se cada um dos péptidos em 2 mL de água (ou 2 mL de ácido acético a 10% em volume), congelou-se a solução em azoto líquido durante 3 minutos e liofilizou-se enquanto decorria a centrifugação (1330 r.p.m., 8-16 horas).

Análise e purificação

Determinou-se a pureza dos péptidos por CLER de fase inversa; dissolveu-se uma alíquota de cerca de 50 nmol em 100 µL de ácido acético a 30% em volume. Desta solução aplicou-se uma quantidade de 30 µL a um sistema de CLER-FI equipado com um sistema solvente ternário; A: água, B: acetonitrilo, C: ATF a 2% em volume em água.

Efectuou-se uma eluição em gradiente (1,0 mL/minuto) a partir de 90% de A, 5% de B e 5% de C até 20% de A, 75% de B e 5% de C durante 30 minutos. Efectuou-se a detecção a 241 nm.

As amostras obtidas aleatoriamente foram analisadas por espectrometria de massa num 'PDMS'. Todos os 31 péptidos de ligação foram analisados por espectrometria de massa num 'PDMS' e por análise quantitativa dos aminoácidos após a hidrólise num equipamento 'HP Aminoquant'. Para todas as amostras analisadas a diferença entre a massa calculada e a massa medida estava dentro do erro experimental (0,1%), conforme especificado pelo produtor do equipamento utilizado. Todas as composições de aminoácidos estavam em conformidade com as previstas.

EXEMPLO 2

Péptidos

Da totalidade dos 71 péptidos de MAGE-2 que haviam sido liofilizados, pesou-se 1 mg e dissolveu-se em 10 µL de DMSO. De todos os péptidos dissolvidos fez-se uma diluição à razão de 0,5 mg/mL em NaCl a 0,9% e neutralizou-se o valor do pH para 7 com ácido acético a 5% diluído em água destilada (CH₃COOH, Merck Darmstadt, Alemanha: 56-1000) ou com NaOH 1 N diluído em água destilada (Merck Darmstadt, Alemanha: 6498).

Células

Foram criadas em cultura células 174CEM.T2 em meio de Dulbecco modificado por Iscove (Biochrom KG Seromed Berlim, Alemanha: F0465) enriquecido com penicilina à razão de 100 UI/mL (Biocades Pharma, Leiderdorp, Holanda), canamicina na concentração de 100 µg/mL (Sigma St. Louis, E.U.A.: K-0254), glutamina 2 mM (ICN Biomedicals Inc. Costa Mesa, CA, E.U.A.: 15-801-55) e 10% de soro fetal de vitelo (SFV) (em inglês FCS, Hyclone Laboratories Inc. Logan, Utah, E.U.A.: A-1115-L). Criou-se as células em cultura com uma densidade de $2,5 \times 10^5$ /mL durante três dias a 37°C em atmosfera de ar humidificado contendo 5% de CO₂.

Ligação dos péptidos

As células 174CEM.T2 foram lavadas 2 vezes no meio de cultura com SFV e depois foram colocadas em meio de cultura isento de soro até à densidade de 2×10^6 células/mL. Desta suspensão introduziu-se uma quantidade de 40 µL numa placa de 96 cavidades com o fundo em forma de V (Greiner GmbH, Frickenhausen, Alemanha: 651101) conjuntamente com 10 µL de diluições sequenciais, à razão de 1 para 2 em NaCl a 0,9%, das diluições peptídicas individuais (variando entre 500 µg/mL e 15,6 µg/mL). As concentrações finais estavam compreendidas entre 200 µg/mL e 3,1 µg/mL para os péptidos com 8×10^4 células 174CEM.T2. Agitou-se esta solução suavemente durante 3 minutos após o que teve lugar um período de incubação de 16 horas a 37°C em atmosfera de ar humidificado contendo 5% de CO₂. A seguir efectuou-se a lavagem das células uma vez com 100 µL de NaCl a 0,9%, albumina do soro de bovino a 0,5% (Sigma St. Louis, E.U.A.: A-7409), NaN₃ a 0,02% (Merck Darmstadt, Alemanha: 822335). Após uma

centrifugação a 1200 r.p.m. recolocou-se a massa obtida novamente em suspensão em 50 μL de quantidades saturantes de anticorpos BB7.2 monoclonais de murganho específicos de ALH-A2.1 durante 30 minutos a 4°C. A seguir efectuou-se a lavagem das células 2 vezes e realizou-se a sua incubação durante 30 minutos com fragmentos $\text{F}(\text{ac})_2$ (em inglês $\text{F}(\text{ab})_2$) de anti-IgG de murganho conjugada na cabra com isotiocianato de fluoresceína (Tago Inc. Burlingame, CA, E.U.A.: 4350) segundo uma diluição de 1:40 e um volume total de 25 μL .

Após a última incubação efectuou-se a lavagem das células 2 vezes e mediu-se a fluorescência a 488 nm num citómetro de fluxo de modelo 'FACScan' (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, E.U.A.). A concentração para a qual se conseguiu 0,5 da externalização máxima das ALH-A2.1 nas células 174CEM.T2 foi determinada utilizando os gráficos em que se traçou o índice de fluorescência em função da concentração dos péptidos. Os resultados estão agrupados no quadro I.

QUADRO I

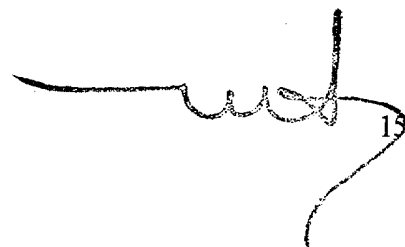
Afinidades de ligação dos péptidos obtidos a partir de proteína MAGE-2 associada ao melanoma humano, que se ajusta ao padrão da ALH-A2.1 (compilação de Falk *et al.*, 1991, Hunt *et al.*, 1992 e Nijman *et al.*, 1993).

Péptido nº	Sequência	resíduos	Concentração peptídica que induz 0,5 do IF máximo
	GLEARGEALGL	15-25	> 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	GLEARGEAL	15-23	> 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	ALGLVGAQA	22-30	45 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	GLVGAQAPA	24-32	> 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

			70 µg/mL
	DLESEFQAA	100-108	> 100 µg/mL
	DLESEFQAAI	100-109	> 100 µg/mL
	AISRKMVELV	108-117	65 µg/mL
	AISRKMVEL	108-116	80 µg/mL
2	KMVELVHFL	112-120	> 100 µg/mL
	KMVELVHFL	112-121	100 µg/mL
	KMVELVHFLLL	112-122	
	LLKYRAREPV	120-130	

QUADRO I (cont.)

Péptido nº	Sequência	resíduos	Concentração peptídica que induz 0,5 do IF máximo
	LLKYRAREPV	121-130	
	VLRNCQDFFPV	139-149	
3	VIFSKASEYL	149-158	
4	YLQLVFGIEV	157-166	
	YLQLVFGIEVV	157-167	
5	QLVFGIEVV	159-167	
6	QLVFGIEVVEV	159-169	
	GIEVVEVPI	163-172	
	PISHLIYL	171-179	
	HLIYLVTCL	174-182	
	HLIYLVTCLGL	174-184	
	IYLVTCLGL	176-184	
	CLGLSYDGL	181-189	
	CLGLSYDGLL	181-190	
	VMPKTGLLI	195-203	
	VMPKTGLLII	195-204	
	VMPKTGLLIIV	195-205	



	GLLIIVLAI	200-208
	GLLIIVLAIH	200-209
	GLLIIVLAIHA	200-210
	LLIIVLAIH	201-209
	LLIIVLAIHA	201-210
	LLIIVLAIHAI	201-211
	LIIVLAIHA	202-210
	LIIVLAIHAI	202-211
7	IIVLAIHAI	203-211
	IIAEIGDCA	208-216

QUADRO I (cont.)

Péptido nº	Sequência	resíduos	Concentração peptídica que induz 0,5 do IF máximo
	KIWEELSML	220-228	
8	KIWEELSMLEV	220-230	
	LMQDLVQENYL	246-256	
	FLWGPRALI	271-279	
9	ALIETSIVKV	277-286	
	ALIETSIVKVL	277-287	
10	LIETSIVKV	278-286	
	LIETSIVKVL	278-287	
	TLKIGGEPHI	290-299	
	HISYPPLHERA	298-308	

A linhagem de células 174CEM-T2 exprime a molécula ALH-A2.1 “vazia” e instável que pode ser estabilizada quando um péptido se está a ligar à depressão que apresenta o péptido, na hélice dupla dessas moléculas. Uma molécula estabilizada de ALH-A2.1 que não se degrade facilmente é o resultado da ligação de um péptido analisado. Isto leva a

um aumento da expressão da molécula ALH-A2.1 na superfície celular. O índice de fluorescência é uma medição da quantidade de externalização das moléculas de ALH-A2.1.

Calcula-se este índice de fluorescência de acordo com a expressão seguinte:

FM = fluorescência média

$$\text{IF} = \text{índice de fluorescência} = \frac{(FM)_{\text{experiência}} - (FM)_{\text{espontânea}}}{(FM)_{\text{espontânea}}}$$

O índice de fluorescência correspondente à fluorescência espontânea é igual a 0.

Resultados

Para se identificar os péptidos de MAGE-2 com eventual capacidade para se ligarem às moléculas de ALH-A2.1 expressas por células 174CEM.T2, examinou-se a sequência de aminoácidos de MAGE-2 (4). Foram examinados todos os péptidos com um comprimento de 9, 10 ou 11 aminoácidos que correspondiam ao padrão de ligação publicado das ALH-A2.1 (quadro I).

Apenas os péptidos números 1-11 do quadro II foram capazes de externalizar a expressão das moléculas de ALH-A2.1 para valores diminutos da concentração dos péptidos, indicando isso a sua ligação à molécula de ALH-A2.1, conforme descrito no exemplo 2. Nenhum dos outros 60 péptidos foi capaz de fazer isto. Os resultados das medições da fluorescência estão agrupados no quadro I. Determinou-se o valor igual a 0,5 do máximo de externalização das moléculas de ALH-A2.1 em células 174CEM.T2 utilizando gráficos em que se traçou os valores de IF em função da concentração dos péptidos para cada péptido individualizado.

Estas experiências indicam que apenas uma parcela limitada dos péptidos que correspondem ao padrão de ALH-A2.1 têm capacidade para se ligarem a esta molécula de ALH com elevada afinidade e que por tal motivo são os únicos candidatos da proteína de MAGE-2 elegíveis para serem reconhecidos pela CTL humana, uma vez que a CTL reconhece péptidos apenas quando estes estão ligados às moléculas de ALH.

QUADRO II

Afinidades de ligação de outros péptidos obtidos a partir da proteína MAGE-2 associada ao melanoma humano que se adaptam ao padrão prolongado de ALH-A2.1 (Ruppert *et al.*).

Péptido nº	Sequência	resíduos	Concentração peptídica que induz 0,5 do IF máximo
	QTASSSSTL	37-45	> 100 µg/mL
	QTASSSSTLV	37-46	> 100 µg/mL
1	STLVEVTLGEV	43-53	45 µg/mL
	VTLGEVPAA	48-56	> 100 µg/mL
	VTKAEMLESV	130-139	70 µg/mL
	VTKAEMLESVL	130-140	> 100 µg/mL
	VTCLGLSYDGL	179-189	> 100 µg/mL
	KTGLLIIVL	198-206	65 µg/mL
	KTGLLIIVLA	198-207	80 µg/mL
	KTGLLIIVLAI	198-208	> 100 µg/mL
	HTLKIGGEPHI	289-299	100 µg/mL

QUADRO III

Péptidos obtidos a partir da proteína MAGE-2 do melanoma que se liga à ALH-A2.1

Péptido nº	Sequência	região	SEQ ID NO
1	STLVEVTLGEV	resíduos 43-53	
-	LVEVTLGEV	resíduos 43-53	
3	VIFSKASEYL	resíduos 149-158	
5	QLVFGIEVV	resíduos 159-167	
6	QLVFGIEVVEV	resíduos 159-169	
7	IIVLAIHAI	resíduos 203-211	
8	KIWEELSMLEV	resíduos 220-230	
9	ALIETSYVKV	resíduos 277-286	
10	LIETSYVKV	resíduos 278-286	

EXEMPLO 3

Este exemplo ilustra a indução *in vitro* de uma resposta imunitária primária. Como ilustração da possibilidade de indução de respostas primárias em geral, incluindo os péptidos de MAGE-2, são apresentadas respostas desse tipo contra os péptidos VPH (em inglês HPV), utilizando para tal a linhagem de células 174CEM.T2 com insuficiências transformativas.

A expressão das células ALH-A2.1 (T2) é aumentada pela incubação das células T2 num meio que contenha o péptido relevante. As células T2 irão apresentar o péptido relevante ligado às ALH-A2.1 em quantidade elevada e por tal motivo são boas células possuidoras de antígenos (CPA, em inglês APC). No método indutor de resposta recentemente descrito (Kast *et al.*, 1993), utiliza-se a linhagem de células T2 como CPA e utiliza-se as células mononucleares pós-‘Ficoll’ como células respondedoras.

Método

1) Carregamento peptídico de ALH-A2.1 em T2

Manteve-se células T2, numa concentração de 2×10^6 células por mL, a incubar durante 13 horas a 37°C num balão T25 (Becton Dickinson, Falcon, Plymouth England nº de cat. 3013) em MDMI isento de soro (meio de Dulbecco modificado por Iscove: Biochrom KG Seromed Berlim, Alemanha: F0465) com glutamina (ICN Biomedicals Inc. Costa Mesa, CA, E.U.A.: 15-801-55), antibióticos (penicilina à razão de 100 UI/mL (Brocades Pharma, Leiderdorp, Holanda, canamicina (Sigma St. Louis, E.U.A.: K-0245)) e o péptido seleccionado MLDLQPETT numa concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$.

2) Tratamento das T2 (APC) com mitomicina C

Estas células T2 incubadas foram centrifugadas e tratadas depois, para uma densidade de 20×10^6 células/mL, com mitomicina C (50 $\mu\text{g/mL}$) em meio RPMI isento de soro (Gibco Paislan Escócia, nº da cat. 041-02409) durante 1 hora a 37°C . Depois lavou-se as células T2 três vezes em meio RPMI.

3) Preparação para a indução da resposta imunitária primária

Efectuou-se o enchimento de todas as cavidades de uma placa de 96 cavidades com o fundo em forma de U (Costar, Cambridge, E.U.A., nº de cat. 3799) com 100 000 células T2 tratadas com mitomicina C em 50 μL de meio RPMI completo e isento de soro (glutamina (2 mM, ICN Biomedicals Inc. Costa Mesa, CA, E.U.A., nº de cat. 15-801-55), penicilina (100 UI/mL, Brocades Pharma, Leiderdorp, Holanda), canamicina (na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, Sigma St. Louis, E.U.A., K-0245)) e o péptido seleccionado MLDLQPETT numa concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$.

4) Células respondedoras

As células respondedoras são linfócitos mononucleares do sangue periférico (LSP) de um dador de subtipo ALH-A2.1 (= C.B). Efectuou-se a separação dos LSP a partir de um revestimento amarelo-acastanhado, pelo procedimento de 'Ficoll' (preparação de Ficoll: 'Lymphoprep of Nycomedpharma', Oslo, Noruega, nº de cat. 105033), e efectuou-se a sua lavagem 2 vezes em meio RPMI. Após a separação e a lavagem colocou-se os LSP novamente em suspensão em meio RPMI completo com 30% de mistura de soro humano (MSH, em inglês HPS) (analisa-se o MSH para se pesquisar uma actividade de supressão em culturas mistas de linfócitos).

5) Incubação da resposta imunitária primária

Acrescentou-se 400 000 LSP-CB em 50 µL de meio (o meio descrito na alínea 4) a cada cavidade de uma placa de 96 cavidades de fundo em forma de U já preenchidas com células T2 e manteve-se tudo em cultura durante 7 dias a 37°C numa incubadora com atmosfera contendo 5% de CO₂ e humidade relativa de 90%.

6) Reestimulação (7º dia)

Ao 7º dia após a incubação dos LSP, do péptido MLDLQPETT e das células T2 (alíneas 1 a 5), reestimulou-se os LSP-CB com o péptido MLDLQPETT. Para este efeito efectuou-se a colheita de todas as células e do meio fora das 96 cavidades. Efectuou-se o isolamento das células viáveis pelo procedimento de 'Ficoll' e realizou-se a lavagem em meio RPMI. Inoculou-se uma nova placa de 96 cavidades de fundo em forma de U com 50 000 destas células viáveis em cada cavidade conjuntamente com 50 µL de meio RPMI completo contendo 15% de MSH. A cada cavidade acrescentou-se 20 000 LSP autólogos irradiados (3000 rad) e 50 000 linfócitos B autólogos, transformados por EBV e irradiados

(10 000 rad) (= EBV-C.B.) conjuntamente com 50 μ L de meio RPMI completo contendo 15% de MSH e o péptido MLDLQPETT numa concentração de 80 μ g/mL. Criou-se as células em cultura durante 7 dias a 37°C numa incubadora em atmosfera contendo 5% de CO₂ e com uma humidade relativa de 90%.

7) Reestimulação (14° dia)

Ao 14° dia após a incubação dos LSP, do péptido MLDLQPETT e das células T2 (alíneas 1 a 5), reestimulou-se os LSP-CB com o péptido MLDLQPETT. Para o efeito repetiu-se o procedimento da alínea 6.

8) Clonagem por diluição limitante

Ao 21° dia após a incubação dos LSP, do péptido MLDLQPETT e das células T2, efectuou-se a colheita das células e do meio fora das 96 cavidades. Efectuou-se o isolamento das células viáveis pelo procedimento de 'Ficoll' e efectuou-se a sua lavagem em meio RPMI completo contendo 15% de MSH. Efectuou-se a clonagem desta massa de células viáveis por diluição limitante. A cada cavidade de uma nova placa de 96 cavidades com o fundo em forma de U (Costar, Cambridge, E.U.A., nº de cat. 3799) acrescentou-se 50 μ L de meio RPMI completo contendo 15% de MSH conjuntamente com 100 células viáveis (= massa de HPV16 anti-MLDLQPETT). Com as outras novas placas de 96 cavidades com o fundo em forma de U repetiu-se exactamente este procedimento, excepto no que diz respeito ao número de células nas cavidades: as placas subsequentes continham, 10, 1 ou 0,3 células por cavidade. A todas as cavidades acrescentou-se 20 000 LSP reunidos e irradiados (3000 rad) provenientes de 4 dadores diferentes e 10 000 células B reunidas e irradiadas (10 000 rad), transformadas com EBV, provenientes de três dadores diferentes

de subtipo ALH-A2.1 (VU-4/518/JY) conjuntamente com 50 μ L de meio RPMI completo contendo 15% de MSH e o péptido MLDLQPETT numa concentração de 40 μ g/mL, leucoaglutinina numa concentração de 2% (Pharmacia, Uppsala, Suécia, nº de cat. 17-063-01) e IL-2 recombinante humana numa concentração de 120 UI/mL (Eurocetus, Amsterdão, Holanda).

9) Expansão de clones

Acrescentar a cada cavidade, num volume final de 100 μ L:

- 25 000 células viáveis,
- 20 000 LSP da mistura irradiada (tal como na alínea 8),
- 10 000 EBV da mistura irradiada (tal como na alínea 8),
- 2 μ g de péptido MLDLQPETT,
- 6 UI de IL-2 recombinante.

Ao 49º dia efectuou-se um ensaio de citotoxicidade com 65 clones e uma porção de células efectoras e uma porção de células T2 (na presença ou na ausência do péptido MLDLQPETT), enquanto células destinatárias. Define-se a aniquilação espontânea como sendo a aniquilação das células T2 incubadas com um péptido irrelevante GILGFVFTL, mas que se liga a ALH-A2.1. Este péptido derivado da proteína da matriz da gripe é o epítipo para as CTL específicas da gripe restringidas por ALH-A2.1.

A maior parte dos péptidos que se ligam à ALH-A2.1 foi encontrada utilizando o padrão ALH-A2.1 (compilação de Rammensee *et al.*, 1991, Hunt *et al.*, 1992 e Nijman *et al.*, 1993). Apenas foi encontrado mais um péptido de ligação a ALH-A2.1 utilizando o padrão ampliado de ALH-A2.1 (Ruppert *et al.*, 1993).

A presente invenção também diz respeito à utilização de polipeptidos gerados por todos os meios, quer sejam do âmbito da engenharia genética, da síntese peptídica com técnicas de fase sólida ou de outro tipo. Os péptidos anteriormente referidos podem experimentar diversas modificações químicas efectuadas nas extremidades dos terminais e mesmo assim continuarem abrangidos no âmbito da presente invenção. Também são possíveis outras modificações químicas, em particular as configurações cíclicas e diméricas. O termo “derivados” tem por objecto abranger todos estes péptidos modificados.

Os polipeptidos da presente invenção são úteis para o tratamento ou para a prevenção de doenças associadas a células que exprimam a molécula MAGE-2, incluindo as células dos melanomas e outras células cancerosas.

Em todas as aplicações os péptidos são administrados sob uma forma imunogénica. Uma vez que os péptidos são relativamente curtos, eventualmente poderá ser necessária a sua conjugação com um material portador que lhes confira imunogenicidade, por exemplo, lípidos ou outros materiais ou ainda a utilização de adjuvantes.

A intensidade de uma dose profilática ou terapêutica de polipeptidos da presente invenção irá variar, como é evidente, com o grupo de pacientes (idade, sexo, peso, etc.), com a natureza e a gravidade da doença que se pretenda tratar, com o polipeptido particular da presente invenção e com a via para a sua administração. É possível utilizar qualquer via adequada de administração para se conseguir uma dosagem eficaz de um polipeptido identificado pela presente invenção e também é possível utilizar qualquer forma de dosagem bem conhecida na especialidade farmacêutica. Além disso, os polipeptidos também podem ser administrados por sistemas e/ou dispositivos de administração controlada. Os polipeptidos também podem ser administrados em combinação com outras substâncias

activas tais como, em particular, os agentes activadores das células T, tais como a interleucina 2, etc..

Os péptidos da presente invenção também podem ser úteis para outros fins, por exemplo, para efeitos de diagnóstico. Por exemplo, podem ser utilizados para se confirmar se uma vacinação com um péptido de acordo com a presente invenção foi bem sucedida. Isto pode ser feito *in vitro*, efectuando um teste para se pesquisar se o referido péptido é capaz de activar as células T da pessoa vacinada.

Há outros aspectos da presente invenção que são evidentes para um especialista na matéria e que não é necessário repetir aqui.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

- (i) REQUERENTES: Melief, Cornelis J. M.
Visseren, M. J. W.
Kast, W. M.
van der Bruggen, Pierre
Boon-Falleur, Thierry

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO:

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 62

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

- (A) ENDEREÇO: Felfe & Lynch
(B) RUA: 805 Third Avenue
(C) CIDADE: Nova Iorque
(D) ESTADO: Nova Iorque
(E) PAÍS: E.U.A.

(F) CÓDIGO POSTAL: 10022

(v) FORMA LEGÍVEL POR COMPUTADOR:

- (A) SUPORTE: disquete, 5,25 polegadas, capacidade de armazenamento de 360 kb
- (B) COMPUTADOR: IBM PS/2
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS
- (D) PROGRAMA INFORMÁTICO: Wordperfect

(vi) DADOS ACTUAIS DO PEDIDO:

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

(vi) DADOS ACTUAIS DO PEDIDO:

- (A) NÚMERO DO PEDIDO: 08/ 217 188
- (B) DATA DE DEPÓSITO: 24-MARÇO-1994

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE O REPRESENTANTE/AGENTE:

- (A) NOME: Hanson, Norman D.
- (B) NÚMERO DO PEDIDO: 30 946
- (C) REFERÊNCIA/NÚMERO DO PROCESSO: LUD 5340-PCT

(ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:

- (A) TELEFONE: (212) 688-9200
- (B) TELEFAX: (212) 838-3884

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 11 resíduos de aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Ser	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Thr	Leu	Gli	Glu	Val
1				5					10	

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Leu	Val	Glu	Val	Thr	Leu	Gli	Glu	Val
1				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Lis	Met	Val	Glu	Leu	Val	His	Phe	Leu
1				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 10 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Val	Ile	Phe	Ser	Lis	Ala	Ser	Glu	Tir	Leu
1				5					10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 10 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Tir	Leu	Gln	Leu	Val	Phe	Gli	Ile	Glu	Val
1				5					10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Gln	Leu	Val	Phe	Gli	Ile	Glu	Val	Val
1				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Gln	Leu	Val	Phe	Gli	Ile	Glu	Val	Val	Glu	Val
1				5					10	

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Ile	Ile	Val	Leu	Ala	Ile	Ile	Ala	Ile
1				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:9:

Lis	Ile	Trp	Glu	Glu	Leu	Ser	Met	Leu	Glu	Val
1					5					10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 10 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Ala	Leu	Ile	Glu	Thr	Ser	Tir	Val	Lis	Val
				5					10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Leu	Ile	Glu	Thr	Ser	Tir	Val	Lis	Val
				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Gli	Leu	Glu	Ala	Arg	Gli	Glu	Ala	Leu	Gli	Leu
				5						10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Gli Leu Glu Ala Arg Gli Glu Ala Leu
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Ala Leu Gli Leu Val Gli Ala Gln Ala
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:15:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:15:

Gli Leu Val Gli Ala Gln Ala Pro Ala
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:16:

Asp	Leu	Glu	Ser	Glu	Phe	Gln	Ala	Ala
1				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 10 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:17:

Asp	Leu	Glu	Ser	Glu	Phe	Gln	Ala	Ala	Ile
1				5					10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 10 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:18:

Ala	Ile	Ser	Arg	Lis	Met	Val	Glu	Leu	Val
1				5					10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:19:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:19:

Ala	Ile	Ser	Arg	Lis	Met	Val	Glu	Leu
1				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:20:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 10 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:20:

Lis	Met	Val	Glu	Leu	Val	His	Phe	Leu	Leu
1				5					10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:21:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:21:

Lis	Met	Val	Glu	Leu	Val	His	Phe	Leu	Leu	Leu
1				5						10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:22:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:22:

Leu	Leu	Leu	Lis	Tir	Arg	Ala	Arg	Glu	Pro	Val
1				5					10	

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:23:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 10 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:23:

Leu	Lis	Tir	Arg	Ala	Arg	Glu	Pro	Val
1				5				10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:24:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:24:

Val	Leu	Arg	Asn	Cis	Gln	Asp	Phe	Phe	Pro	Val
1				5					10	

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:25:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:25:

Tir	Leu	Gln	Leu	Val	Phe	Gli	Ile	Glu	Val	Val
1				5					10	

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:26:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 10 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:26:

Gli	Ile	Glu	Val	Val	Glu	Val	Val	Pro	Ile
1				5					10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:27:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:27:

Pro	Ile	Ser	His	Leu	Tir	Ile	Leu	Val
1				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:28:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:28:

His	Leu	Tir	Ile	Leu	Val	Thr	Cis	Leu
1				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:29:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 11 resíduos de aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:29:

His	Leu	Tir	Ile	Leu	Val	Thr	Cis	Leu	Gli	Leu
1				5					10	

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:30:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:30:

Tir Ile Leu Val Thr Cys Leu Gli Leu
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:31:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:31:

Cis Leu Cys Leu Ser Thr Asp Gli Leu
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:32:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 10 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:32:

Cis Leu Gli Leu Ser Thr Asp Gli Leu Leu
1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:33:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:33:

Val	Met	Pro	Lis	Thr	Gli	Leu	Leu	Ile
1				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:34:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 10 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:34:

Val	Met	Pro	Lis	Thr	Gli	Leu	Leu	Ile	Ile
1				5					10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:35:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

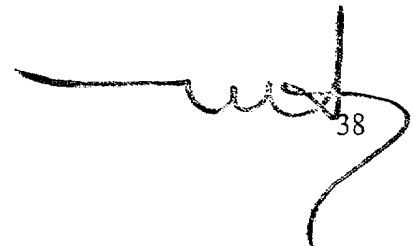
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:35:

Val	Met	Pro	Lis	Thr	Gli	Leu	Leu	Ile	Ile	Val
1				5					10	

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:36:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:



(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:36:

Gli	Leu	Leu	Ile	Ile	Val	Leu	Ala	Ile
1				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:37:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 10 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:37:

Gli	Leu	Leu	Ile	Ile	Val	Leu	Ala	Ile	Ile
1				5					10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:38:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:38:

Gli	Leu	Leu	Ile	Ile	Val	Leu	Ala	Ile	Ile	Ala
1				5					10	

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:39:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:39:

Leu	Leu	Ile	Ile	Val	Leu	Ala	Ile	Ile
1				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:40:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 10 resíduos de aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:40:

Leu	Leu	Ile	Ile	Val	Leu	Ala	Ile	Ile	Ala
1				5					10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:41:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 11 resíduos de aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:41:

Leu	Leu	Ile	Ile	Val	Leu	Ala	Ile	Ile	Ala	Ile
1				5					10	

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:42:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:42:

Leu	Ile	Ile	Val	Leu	Ala	Ile	Ile	Ala
1				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:43:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 10 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:43:

Leu	Ile	Ile	Val	Leu	Ala	Ile	Ile	Ala	Ile
1				5					10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:44:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:44:

Ile	Ile	Ala	Ile	Glu	Gli	Asp	Cis	Ala
1				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:45:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:45:

Lis	Ile	Trp	Glu	Glu	Leu	Ser	Met	Leu
1					5			

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:46:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:46:

Leu	Met	Gln	Asp	Leu	Val	Gln	Glu	Asn	Tir	Leu
1					5					10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:47:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:47:

Phe	Leu	Trp	Gli	Pro	Arg	Ala	Leu	Ile
1				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:48:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:48:

Leu	Ile	Glu	Thr	Ser	Tir	Val	Lis	Val
1				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:49:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 11 resíduos de aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:49:

Ala	Leu	Ile	Glu	Thr	Ser	Tir	Val	Lis	Val	Leu
1				5					10	

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:50:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 10 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:50:

Thr	Leu	Lis	Ile	Gli	Gli	Glu	Pro	His	Ile
1				5					10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:51:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:51:

His	Ile	Ser	Tir	Pro	Pro	Leu	His	Glu	Arg	Ala
1				5						10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:52:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:52:

Gln	Thr	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu
1				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:53:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 10 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:53:

Gln	Thr	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Leu	Val
1				5					10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:54:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:54:

Val	Thr	Leu	Gli	Glu	Val	Pro	Ala	Ala
1				5				

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:55:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 10 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:55:

Val	Thr	Lis	Ala	Glu	Met	Leu	Glu	Ser	Val
1				5					10

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:56:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:56:

Val	Thr	Lis	Ala	Glu	Met	Leu	Glu	Ser	Val	Leu
1				5					10	

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:57:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 resíduos de aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:57:

Val	Thr	Cis	Leu	Gli	Leu	Ser	Tir	Asp	Gli	Leu
1				5					10	

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:58:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:



- (A) COMPRIMENTO: 9 resíduos de aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:58:

Lis Thr Gli Leu Leu Ile Ile Val Leu
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:59:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 10 resíduos de aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:59:

Lis Thr Gli Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala
1 5 10


(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:60:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 11 resíduos de aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

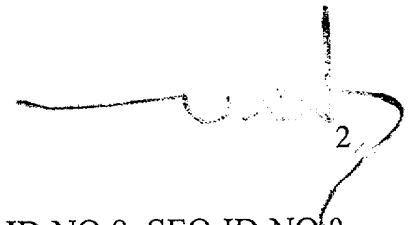
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:60:

Lis Thr Gli Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile



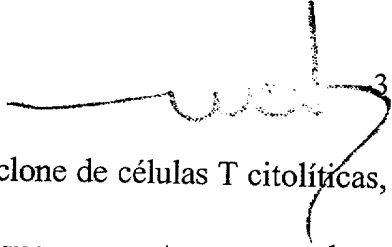
Reivindicações

1. Péptido isolado e seleccionado entre o conjunto constituído por SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:11.
2. Péptido isolado de acordo com a reivindicação 1, designado por SEQ ID NO:1.
3. Péptido isolado de acordo com a reivindicação 1, designado por SEQ ID NO:6.
4. Péptido isolado de acordo com a reivindicação 1, designado por SEQ ID NO:9.
5. Complexo isolado de ALH-A2 e o péptido isolado da reivindicação 1.
6. Complexo isolado da reivindicação 5, em que o referido péptido é designado por SEQ ID NO:1.
7. Complexo isolado da reivindicação 5, em que o referido péptido é designado por SEQ ID NO:6.
8. Complexo isolado da reivindicação 5, em que o referido péptido é designado por SEQ ID NO:9.
9. Clone isolado de células T citolíticas, específico para um complexo de ALH-A2 e um péptido seleccionado entre o conjunto constituído por SEQ ID NO:1, SEQ ID

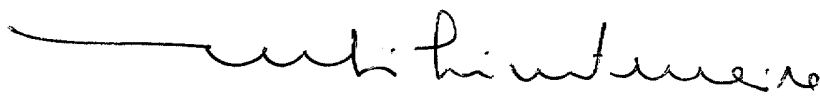


NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9,
SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:11.

10. Clone isolado de células T citolíticas da reivindicação 9, em que o referido péptido é a SEQ ID NO:1.
11. Clone isolado de células T citolíticas da reivindicação 9, em que o referido péptido é a SEQ ID NO:6.
12. Clone isolado de células T citolíticas da reivindicação 9, em que o referido péptido é a SEQ ID NO:9.
13. Anticorpo monoclonal que se liga de forma específica a um complexo de ALH-A2 e de um péptido seleccionado entre o conjunto constituído por SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:11.
14. Anticorpo monoclonal da reivindicação 13, em que o referido péptido é a SEQ ID NO:1.
15. Anticorpo monoclonal da reivindicação 13, em que o referido péptido é a SEQ ID NO:6.
16. Anticorpo monoclonal da reivindicação 13, em que o referido péptido é a SEQ ID NO:9.

- 
17. Composição terapêutica que compreende pelo menos um clone de células T citolíticas, suficiente para efectuar a lise de uma célula cancerosa que apresenta um complexo de ALH-A2 e de um péptido seleccionado entre as SEQ ID NO:1, 2, 4, 6-11 sobre a sua superfície celular.
18. Composição terapêutica da reivindicação 17, em que o referido péptido é a SEQ ID NO:1.
19. Composição terapêutica da reivindicação 17, em que o referido péptido é a SEQ ID NO:6.
20. Composição terapêutica da reivindicação 17, em que o referido péptido é a SEQ ID NO:9.

Lisboa, 19 JUN. 2001



Dra. Maria Silvana Ferreira
Apoio Oficial de Patentes e Inovação Industrial
Edifício 50 - 2.º - 1631-003 LISBOA
Tel. 213 851 300 - 213 81 50 50

Fig. 1

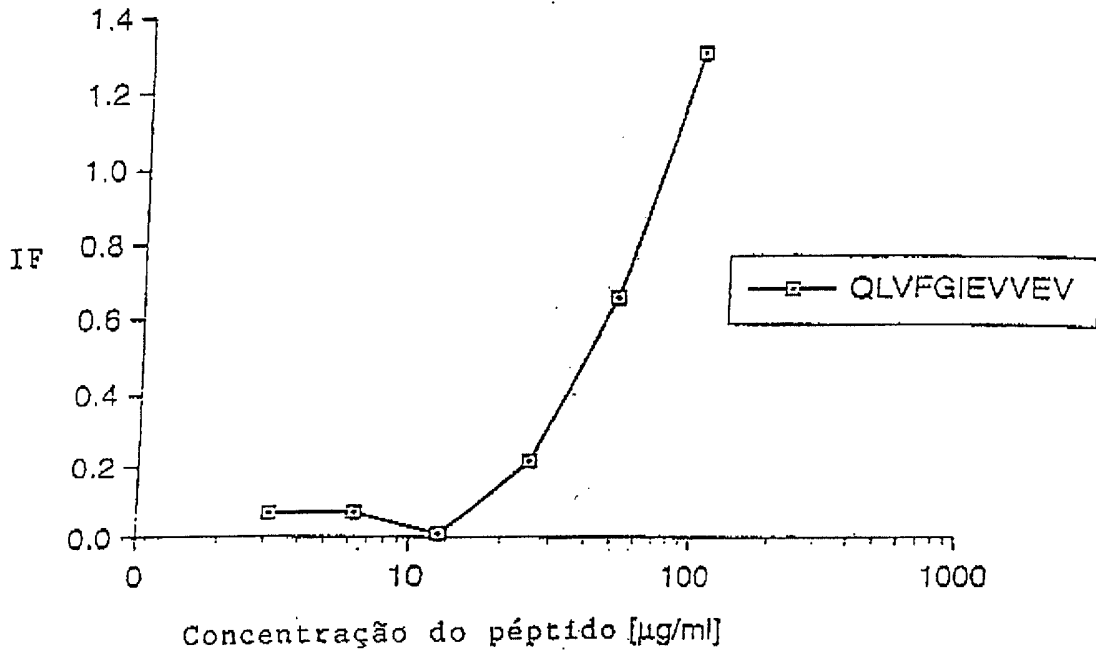


Fig. 2

