República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019020959-0 A2

(22) Data do Depósito: 10/04/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 05/05/2020

(54) Título: PEPTÍDEOS E COMBINAÇÕES DOS MESMOS PARA USO NA IMUNOTERAPIA CONTRA CÂNCER

(51) Int. Cl.: A61K 39/00; C07K 14/47; G01N 33/50; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 10/04/2017 DE 10 2017 107 697.2; 10/04/2017 US 62/483,702.

(71) Depositante(es): IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH.

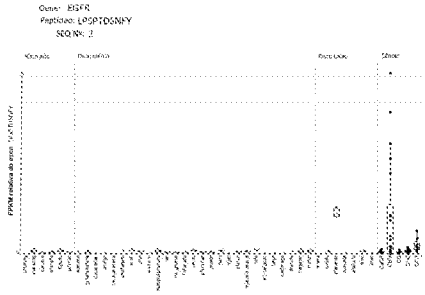
(72) Inventor(es): MORENO DI MARCO; SEBASTIAN HAEN; DANIEL KOWALEWSKI; MARKUS LÖFFLER; ANNIKA NELDE; HANS-GEORG RAMMENSEE; STEFAN STEVANOVIC; NICO TRAUTWEIN; JULIANE SARAH WALZ.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018059109 de 10/04/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/189148 de 18/10/2018

(85) Data da Fase Nacional: 04/10/2019

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



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PEPTÍDEOS E COMBINAÇÕES DOS MESMOS PARA USO NA IMUNOTERAPIA CONTRA CÂNCER".**

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

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

ASPECTOS GERAIS DA INVENÇÃO

[003] Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer foi uma das doenças não transmissíveis mais letais do mundo em 2012. Naquele ano, os cânceres colorretal, de mama e do trato respiratório estiveram entre as dez principais causas de morte em países de alta renda (http://www.who.int/mediacentre/factsheets /fs310/en/).

[004] Estima-se que em 2012 houve 14,1 milhões de casos novos, 32,6 milhões de pacientes com câncer (diagnosticado havia menos de

5 anos) e 8,2 milhões de óbitos por câncer no mundo inteiro (Ferlay *et al.*, 2013; Bray *et al.*, 2013).

[005] As incidências mundiais estimadas de diversos tipos de câncer em adultos de ambos os sexos em 2012 foram as seguintes (Ferlay *et al.*, 2013; Bray *et al.*, 2013): câncer do cérebro e do sistema nervoso central: 256213 casos; câncer colorretal: 1360602 casos; câncer renal: 337860 casos; câncer hepático: 782451 casos; e câncer gástrico: 951594 casos.

[006] Algumas incidências totais estimadas de vários tipos de câncer em adultos de ambos os sexos nos EUA, nos 28 países da União Europeia, na China e no Japão em 2012 são as seguintes (Ferlay *et al.*, 2013; Bray *et al.*, 2013): câncer do cérebro e do sistema nervoso central: 135884 casos; câncer colorretal: 845797 casos; câncer renal: 226733 casos; câncer hepático: 513172 casos; e câncer gástrico: 615641 casos.

[007] Alguns índices de mortalidade estimados para vários tipos de câncer em adultos de ambos os sexos no mundo inteiro em 2012 (Ferlay *et al.*, 2013; Bray *et al.*, 2013) são os seguintes: câncer do cérebro e do sistema nervoso central: 189382 casos; câncer colorretal: 693933 casos; câncer renal: 143406 casos; câncer hepático: 745533 casos; e câncer gástrico: 723073 casos.

[008] Alguns índices de mortalidade estimados para vários tipos de câncer em adultos de ambos os sexos nos EUA, nos 28 países da União Europeia, na China e no Japão em 2012 (Ferlay *et al.*, 2013; Bray *et al.*, 2013) são os seguintes: câncer do cérebro e do sistema nervoso central: 100865 casos; câncer colorretal: 396066 casos; câncer renal: 83741 casos; câncer hepático: 488485 casos; e câncer gástrico: 447735 casos.

[009] Dentre os subtipos de câncer cerebral, a presente invenção tem como foco o glioblastoma (GBM). O GBM é o tumor maligno mais

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

[0010] *Câncer colorretal* - Diversos tratamentos estão disponíveis contra o câncer colorretal (CaCR), e a abordagem terapêutica varia em função do estádio da doença. Alguns procedimentos comumente adotados para tratamento do CaCR são a cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapias direcionadas (Berman *et al.*, 2015a; Berman *et al.*, 2015b).

[0011] A excisão do tumor é parte essencial do tratamento do CaCR. Os carcinomas retais possuem características anatômicas diferentes do CaCR, pois o reto se encontra na pelve, o que dificulta o acesso ao tumor. Tumores retais pequenos e bem diferenciados (estádio T1) devem ser excisados, mas não requerem tratamento posterior com quimioterapia, ao passo que tumores em estádio T mais avançado são tratados radioquimioterapia neoajuvante com uma fluoropirimidina e depois submetidos a excisão mesorretal total (EMT) e quimioterapia adjuvante. Na quimioterapia desses tumores, são usadas a capecitabina e a 5-fluoruracila (5-FU). Para a poliquimioterapia, recomenda-se um coquetel com 5-FU, leucovorina e oxaliplatina (FOLFOX) (Stintzing, 2014; Berman *et al.*, 2015b).

[0012] O tratamento do carcinoma de cólon requer hemicolectomia radical com ressecção linfonodal. As formas precoces da doença (estádio 1 da UICC) não requerem tratamento adicional, e pacientes com tumores com estádio 2 da UICC são tratados com 5-FU ou capecitabina. O tratamento de pacientes no estádio 3 da UICC consiste nos esquemas quimioterápicos FOLFOX e XELOX (capecitabina e oxaliplatina) (Berman *et al.*, 2015a; Stintzing, 2014).

[0013] O CaCR metastático e irressecável é tratado com esquemas de quimioterapia como FOLFIRI (5-FU, leucovorina e irinotecana), FOLFOX, FOLFOXIRI (5-FU, irinotecana e oxaliplatina), FOLFOX/ capecitabina, FOLFOX/oxaliplatina, FOLFIRI/capecitabina e irinotecana ou UFT (5-FU e tegafur-uracila) (Stintzing, 2014).

[0014] Além da quimioterapia, a doença em estádio avançado pode ser tratada com uma série de anticorpos monoclonais contra o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), como o cetuximabe e o panitumumabe, ou contra o fator de crescimento endotelial vascular tipo A (VEGF-A), como o bevacizumabe. No tratamento de segunda linha ou posteriores, pode-se usar o inibidor de VEGF aflibercepte, o inibidor de tirosina quinase regorafenibe, o inibidor de timidilato sintetase TAS-102 e o inibidor de dUTPase TAS-114 (Stintzing, 2014; Wilson *et al.*, 2014).

[0015] Ensaios clínicos mais recentes analisaram o tratamento do CaCR com imunoterapia ativa. Essas estratégias usam vacinação com peptídeos e antígenos associados a tumores (AATs), células tumorais inteiras, células dendríticas (CD) e vetores virais (Koido *et al.*, 2013).

[0016] Até agora foram desenvolvidas vacinas peptídicas contra o antígeno carcinoembrionário (CEA), mucina 1, EGFR, antígeno de carcinoma de células escamosas reconhecido por células T 3 (SART3), beta-gonadotropina coriônica humana (beta-hCG), antígeno 1 do tumor de Wilms (WT1), survivina 2B, MAGE3, p53, proteína c 43 e translocase da membrana mitocondrial externa 34 (TOMM34), também denominada KRAS mutante. Em vários ensaios clínicos de fases I e II, os pacientes apresentaram respostas de LTC específicas ou produziram anticorpos contra os antígenos. Apesar dessas respostas imunológicas, muitos pacientes não obtiveram benefícios clínicos com as vacinas peptídicas (Koido *et al.*, 2013; Miyagi *et al.*, 2001; Moulton *et al.*, 2002; Okuno *et al.*, 2011).

[0017] As vacinas de células dendríticas compreendem células

dendríticas (CD) pulsadas com peptídeos derivados de AAT ou com lisados de células tumorais, células tumorais apoptóticas, RNA tumoral ou produtos de fusão de células tumorais com células dendríticas. Muitos pacientes em ensaios clínicos de fase I e II apresentaram respostas imunes específicas, mas poucos obtiveram benefícios clínicos (Koido *et al.*, 2013).

[0018] As vacinas tumorais de células inteiras, que consistem em células tumorais autólogas irradiadas ou infectadas por vírus e modificadas para secretar GM-CSF, não foram benéficas para a maioria dos pacientes em estudos de fase 2 e 3 (Koido *et al.*, 2013).

[0019] Alguns veículos usados em vacinas de vetor viral em ensaios clínicos de fase 1 foram vírus não replicantes de vacínia ou poxvírus aviário que codificam CEA junto com B7.1, ICAM-1 e LFA-3. Em outro estudo, foi usado um vírus de bouba canária não replicante que codifica CEA e B7.1. Esse tratamento induziu respostas de células T específicas para CEA e foi associado com respostas clínicas objetivas em 40% dos pacientes (Horig *et al.*, 2000; Kaufman *et al.*, 2008).

[0020] *Câncer gástrico* - A parede gástrica é formada por três camadas: mucosa (interna), muscular (intermediária) e serosa (externa). O câncer gástrico (CG) se inicia nas células que revestem a camada mucosa e se dissemina pelas camadas mais externas à medida que prolifera. O tratamento padrão pode envolver quatro modalidades: ressecção (cirúrgica ou endoscópica), quimioterapia, radioterapia ou radioquimioterapia. A cirurgia é o principal tratamento do câncer gástrico e é a única modalidade capaz de curar a doença. Em sua fase inicial, o câncer gástrico é geralmente assintomático; portanto, a doença costuma ser diagnosticada em estádio avançado. Ainda não existe um esquema de quimioterapia padrão aceito globalmente para o câncer gástrico metastático. O esquema mais aceito é a associação de 5-FU e um análogo da platina, podendo-se substituir o 5-FU pela capecitabina

ou a irinotecana e a cisplatina pela oxaliplatina. Podem-se usar também esquemas tríplices com cisplatina, 5-FU e docetaxel ou, em tumores que sobrexpressam HER-2, cisplatina, 5-FU e trastuzumabe (Leitlinie Magenkarzinom, 2012).

[0021] Os esquemas usados atualmente contra o CG avançado são pouco eficazes e a sobrevida em 5 anos é baixa. A imunoterapia pode ser uma opção para melhorar a sobrevida de pacientes com CG. Em ensaios clínicos, mostraram-se promissoras a transferência adotiva de linfócitos associados a tumores e células "killer" induzidas por citoquinas; vacinas à base de peptídeos contra HER2/neu, MAGE-3 ou fator de crescimento endotelial vascular 1 ou 2; e vacinas de células dendríticas contra HER2/neu. A inibição do "checkpoint" imunológico e as células T modificadas poderão vir a ser novas opções terapêuticas e vêm sendo avaliadas em ensaios pré-clínicos e clínicos (Matsueda and Graham, 2014).

[0022] *Glioblastoma* - Existem poucas opções terapêuticas para o glioblastoma (grau IV da OMS). Segundo as diretrizes da Sociedade Alemã de Neurologia, o tratamento padrão de pacientes jovens consiste em ressecção ou biópsia do tumor, radioterapia focal e quimioterapia com temozolomida. Outros esquemas quimioterápicos são a associação de CCNU com lomustina ou de procarbazina com CCNU e vincristina (PCV). Em pacientes idosos, a ressecção ou biópsia do tumor não são recomendadas e o tratamento consiste em radio ou quimioterapia dependendo do nível de metilação do promotor da O6-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT). A ausência de metilação é indicação de radioterapia focal; na presença de metilação, indica-se a temozolomida, com ou sem radioterapia focal. As recorrências também são tratadas com ressecção e quimio ou radioterapia. Nos EUA, Canadá e Suíça, o anticorpo anti-VEGF bevacizumabe foi aprovado para tratamento de glioblastoma recorrente (Leitlinien für Diagnostik und

Therapie in der Neurologie, 2014).

[0023] Diversas abordagens imunoterápicas vêm sendo investigadas para tratamento de glioblastoma (GB), incluindo inibição de "checkpoint" imunológico, vacinação e transferência adotiva de células T modificadas.

[0024] Demonstrou-se que anticorpos contra receptores inibitórios de células T ou os respectivos ligantes são eficazes em promover respostas imunes antitumorais mediadas por células T em vários tipos de câncer, incluindo melanoma e câncer de bexiga. Por isso, os efeitos de anticorpos ativadores de células T como o ipilimumabe e o nivolumabe foram avaliados em estudos clínicos de glioblastoma, mas dados preliminares indicam que houve eventos adversos relacionados à autoimunidade.

[0025] Várias estratégias vacinais vêm sendo investigadas em pacientes com GB, incluindo vacinas baseadas em peptídeos ou em proteína de choque térmico, vacinas à base de células tumorais autólogas ou de células dendríticas ou à base de proteínas virais. Em todas essas abordagens, os pacientes recebem peptídeos derivados de proteínas associadas ao GB (p.ex. variante III do receptor de fator de crescimento epidérmico, ou EGFR vIII), proteínas de choque térmico ou células dendríticas pulsadas com lisado de células tumorais autólogas ou componentes de citomegalovírus para induzir uma resposta imune antitumoral. Vários desses estudos mostraram perfis favoráveis de segurança e tolerabilidade, assim como dados indicando eficácia promissora.

[0026] A transferência adotiva de células T geneticamente modificadas é outra abordagem imunoterápica para o tratamento do GB. Vários estudos clínicos vêm avaliando a segurança e eficácia de células T com receptores antigênicos quiméricos contra HER2, o receptor α2 de IL-13 e EGFRv3 (Ampie *et al.*, 2015).

[0027] *Câncer de fígado* - O tratamento do câncer de fígado (CHC) depende do estágio do tumor no momento do diagnóstico e da condição geral do fígado. Quando possível, são retiradas cirurgicamente partes do fígado (hepatectomia parcial) ou todo o fígado (hepatectomia total). Pacientes com tumores pequenos ou totalmente ressecáveis geralmente são bons candidatos a transplante hepático.

[0028] Se não for possível o tratamento cirúrgico, pode-se optar por outras modalidades. Uma delas é a ablação tumoral, na qual uma sonda é introduzida no fígado e o tumor destruído por ondas de radiofrequência, microondas ou crioterapia. Outra opção é a embolização, no qual o suprimento vascular do tumor é bloqueado por meios mecânicos ou químicos. Uma terceira modalidade é radioterapia, na qual ondas eletromagnéticas de alta frequência são usadas para destruir o tumor.

[0029] A quimioterapia contra o CHC pode consistir em associações de doxorrubicina, 5-fluoruracila e cisplatina para tratamento sistêmico ou infusões na artéria hepática de doxorrubicina, floxuridina ou mitomicina C. Entretanto, a maioria dos CHC é altamente quimiorresistente (Enguita-German and Fortes, 2014).

[0030] Em casos de CHC avançado e irressecável, a única opção terapêutica é o sorafenibe, um inibidor de várias tirosina quinases (Chang *et al.*, 2007; Wilhelm *et al.*, 2004). O sorafenibe é o único medicamento sistêmico comprovadamente capaz de prolongar a sobrevida em cerca de 3 meses e, atualmente, é a única opção de tratamento experimental disponível para esses pacientes (Chapiro *et al.*, 2014; Llovet *et al.*, 2008).

[0031] Mais recentemente, foram realizados alguns estudos de imunoterapia para CHC. As citoquinas vêm sendo usadas para ativar subpopulações de células imunológicas e/ou promover a imunogenicidade antitumoral (Reinisch *et al.*, 2002; Sangro *et al.*, 2004).

Outros estudos focaram na infusão de linfócitos infiltradores de tumores ou linfócitos de sangue periférico ativados (Shi *et al.*, 2004; Takayama *et al.*, 1991; Takayama *et al.*, 2000).

[0032] Até agora, foram realizados poucos ensaios clínicos de vacinas terapêuticas. Butterfield *et al.* realizaram dois estudos de vacinas contendo peptídeos de alfa-fetoproteína (AFP) ou células dendríticas (CDs) carregadas *ex vivo* com peptídeos de AFP (Butterfield *et al.*, 2003; Butterfield *et al.*, 2006). Em dois estudos diferentes, células dendríticas (CDs) autólogas foram pulsadas *ex vivo* com lisado tumoral autólogo (Lee *et al.*, 2005) ou lisado da linhagem celular HepG2 de hepatoblastoma (Palmer *et al.*, 2009). Até agora, os estudos com vacinas produziram apenas pequenas melhoras na evolução clínica.

[0033] *Carcinoma de células renais* - Na maioria dos casos, o tratamento inicial consiste em retirada total ou parcial do(s) rim(ns) afetados, o que ainda é a principal modalidade de tratamento curativo (Rini *et al.*, 2008). Para tratamento de primeira linha de pacientes com indicadores de mau prognóstico, uma diretriz elaborada por várias entidades e sociedades de oncologia recomenda inibidores de receptores de tirosina quinase (TKI) sunitinibe e pazopanibe, o anticorpo monoclonal bevacizumabe em associação com interferon alfa (IFN-α) e o inibidor de mTOR temsirolimus. Segundo as diretrizes do NCCN nos EUA e da EAU e ESMO na Europa, os TKIs sorafenibe, pazopanibe e, mais recentemente, axitinibe são recomendados como tratamentos de segunda linha em pacientes no quais um tratamento com citoquinas (IFN-α, IL-2) não foi bem-sucedido. As diretrizes da NCCN também recomendam o sunitinibe nesses casos (evidência classificada como Categoria I, ou de alto nível, pela NCCN).

[0034] Segundo diretrizes estabelecidas, o everolimo e o axitinibe são indicados como tratamento de segunda linha de pacientes nos quais foram ineficazes tratamentos com inibidores de tirosina quinase

direcionados contra VEGF.

[0035] O CCR é sabidamente imunogênico, e isso serviu para fundamentar o uso de imunoterapia e vacinas anticâncer em CCR avançado. Existe uma interessante correlação entre a expressão de PD-1 em linfócitos e CCR avançado (em estágio, grau e prognóstico), bem como entre expressão seletiva de PD-L1 por células de CCR e evolução clínica desfavorável. Por isso, foram desenvolvidos novos agentes anti-PD-1/PD-L1, que podem ser usados isoladamente ou associados com outras drogas antiangiogênicas ou imunoterápicas para tratamento do CCR (Massari *et al.*, 2015). No CCR avançado, o estudo TRIST, um ensaio fase III de uma vacina anticâncer, avaliou se a TroVax (vacina que usa o antígeno tumoral 5T4 em um vetor de poxvírus) em associação com o tratamento de primeira linha padrão prolonga a sobrevida de pacientes com carcinoma de células renais localmente avançado ou metastático. A sobrevida mediana ainda não foi atingida em nenhum dos dois grupos, e 399 pacientes (54%) continuam sendo acompanhados no estudo. Entretanto, a análise dos dados existentes confirma os resultados clínicos anteriores, que mostraram que a TroVax é imunologicamente ativa e que existe uma correlação entre a intensidade da resposta de anticorpos específica para 5T4 e a melhora da sobrevida. Diversos outros ensaios estão pesquisando vacinas peptídicas usando epitopos sobrexpressos em CCR.

[0036] Várias abordagens de vacinação antitumoral vêm sendo investigadas. Alguns estudos realizados em pacientes com CCR usaram a totalidade do tumor, na forma de lisados de células, fusões de células dendríticas com células tumorais ou RNA tumoral inteiro. Em parte desses estudos, foram descritas algumas remissões de lesões tumorais (Avigan *et al.*, 2004; Holtl *et al.*, 2002; Marten *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2003; Wittig *et al.*, 2001).

[0037] Como o tratamento do câncer é dispendioso e produz graves

efeitos colaterais, existe uma necessidade de identificação de fatores que possam se usados no tratamento do câncer em geral e do câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais em particular. Também é necessário identificar fatores que sirvam como biomarcadores de câncer em geral e do câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais em particular. Isso permitiria melhorar o diagnóstico, avaliar o prognóstico e prever o sucesso do tratamento do câncer.

[0038] A imunoterapia é uma modalidade que age sobre antígenos associados a tumores existentes e serve como opção que age especificamente sobre as células tumorais e, ao mesmo tempo, minimiza os efeitos colaterais.

[0039] A classificação atual de antígenos associados a tumores (AATs) compreende os seguintes grupos principais:

[0040] Antígenos de câncer testicular: Os primeiros AATs reconhecíveis por células T a serem identificados pertencem a essa classe, que foi denominada inicialmente antígenos de câncer testicular (CT) porque seus membros são expressos em tumores humanos histologicamente diferentes ao passo que, em tecidos normais, ocorrem apenas em espermatócitos e espermatogônias nos testículos e, ocasionalmente, na placenta. Como as células testiculares não expressam moléculas de HLA classe I e II, esses antígenos não podem ser reconhecidos pelas células T em tecidos normais e podem, portanto, ser considerados imunologicamente específicos para o tumor. Alguns exemplos mais bem conhecidos de antígenos de CT são os membros da família MAGE e o NY-ESO-1.

[0041] Antígenos de diferenciação: Estes AATs são compartilhados por tumores e pelos tecidos normais dos quais o tumor se originou, e a maioria dos antígenos de diferenciação conhecidos se concentram em

melanomas e em melanócitos normais. Muitas dessas proteínas relacionadas à linhagem melanocitária participam da biossíntese da melanina e, portanto, não são específicas para tumores, embora sejam amplamente utilizadas para imunoterapia do câncer. Alguns exemplos são, entre outros, a tirosinase e Melan-A/MART-1 em melanoma e PSA em câncer de próstata.

[0042] AATs sobrexpressos: Os genes que codificam AATs amplamente expressos foram detectados tanto em tumores de diversos tipos histológicos como em muitos tecidos normais, geralmente com níveis de expressão mais baixos. É possível que muitos dos epitopos processados e que podem ser apresentados por tecidos normais estejam abaixo do limiar para reconhecimento pelas células T, ao passo que sua sobrexpressão em células tumorais pode desencadear uma resposta anticâncer ao quebrar a tolerância estabelecida anteriormente. Alguns exemplos conhecidos desta classe de AAT são o Her-2/neu, a survivina e a telomerase ou WT1.

[0043] Antígenos específicos para tumores: Estes AATs únicos se originam de mutações de genes normais (p.ex. β-catenina, CDK4, etc.). Algumas dessas alterações moleculares estão associadas a transformação e/ou progressão neoplásica. Os antígenos específicos para tumores são geralmente capazes de induzir fortes respostas imunológicas sem criar risco de reações imunes contra tecidos normais. Por outro lado, estes AATs são, na maioria dos casos, relevantes apenas ao tumor específico em que foram identificados e geralmente não são compartilhados por vários tumores individuais. Um peptídeo também pode ser específico para tumores (ou associado a tumores) se for originário de um éxon presente em ou associado a um tumor no caso de proteínas com isoformas específicas para ou associadas a tumores.

[0044] AATs originários de modificações pós-traducionais anormais: Estes AATs podem se originar de proteínas que não são nem

específicas nem sobrexpressas em tumores, mas mesmo assim tornam-se associadas a tumores por processos pós-traducionais que atuam preponderantemente em tumores. Alguns exemplos dessa classe surgem de alterações de padrões de glicosilação, que produzem novos epitopos em tumores como no MUC1 ou eventos como splicing de proteínas durante a degradação, que podem ou não ser específicos para tumores.

[0045] Proteínas oncovirais: Estes AATs são proteínas virais que podem desempenhar um importante papel no processo oncogênico e, por serem de origem estranha (não humana), podem produzir respostas de células T. São exemplos destas proteínas as proteínas do papilomavírus humano tipo 16, E6 e E7, que são expressas no carcinoma de colo do útero.

[0046] A imunoterapia baseada em células T age contra epitopos peptídicos derivados de proteínas associadas a ou específicas para tumores, que são apresentadas por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Os antígenos reconhecidos por linfócitos T específicos para tumores, ou seja, epitopos dos mesmos, podem ser moléculas derivadas de todas as classes de proteínas, como enzimas, receptores, fatores de transcrição, etc., que são expressas e normalmente apresentam regulação positiva em células do tumor em comparação com células inalteradas da mesma origem.

[0047] As moléculas de MHC podem ser de duas classes: MHC classe I e MHC classe II. As moléculas de MHC classe I consistem em uma cadeia pesada alfa e em uma beta-2 microglobulina, as moléculas de MHC classe II consistem em uma cadeia alfa e outra beta. Sua conformação tridimensional produz um sulco de ligação, que é usado na interação não covalente com peptídeos.

[0048] As moléculas de MHC classe I são encontradas na maioria das células nucleadas. Elas apresentam peptídeos derivados da

clivagem proteolítica de entidades predominantemente endógenas, incluindo proteínas, produtos ribossômicos defeituosos (DRIPs) e peptídeos maiores. Entretanto, os peptídeos derivados de compartimentos endossômicos ou de fontes exógenas também são frequentemente encontrados em moléculas de MHC classe I. Na literatura, essa apresentação não clássica de MHC classe I é denominada apresentação cruzada (Brossart and Bevan, 1997; Rock *et al.*, 1990). As moléculas de MHC classe II são encontradas predominantemente em células apresentadores de antígenos (CAA) "profissionais" e apresentam sobretudo peptídeos de proteínas exógenas ou de proteínas transmembrana, que são captadas pelas CAA, p.ex., durante a endocitose e depois processadas.

[0049] Os complexos formados por peptídeos e MHC classe I são reconhecidos por células T CD8-positivas que apresentam o receptor de célula (TCR) apropriado, ao passo que complexos de peptídeos com moléculas de MHC classe II são reconhecidos por células T auxiliares CD4-positivas que apresentam o TCR apropriado. É bem sabido que, em razão dessa modalidade o TCR, o peptídeo e o MHC estão presentes em proporções estequiométricas de 1:1:1.

[0050] As células T auxiliares CD4-positivas desempenham um importante papel em induzir e manter respostas eficazes de células T citotóxicas CD8-positivas. A identificação de epitopos CD4-positivos de células T derivados de antígenos associados a tumores (AAT) é de enorme importância para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos para desencadear respostas imunes antitumorais (Gnjatic *et al.*, 2003). No sítio do tumor, as células T auxiliares produzem citoquinas de modo a criar um meio apropriado para células T citotóxicas (LTC) (Mortara *et al.*, 2006) e atrair células efetoras como, p.ex., LTCs, células "natural killer" (NK), macrófagos e granulócitos (Hwang *et al.*, 2007).

[0051] Na ausência de inflamação, a expressão de moléculas de

MHC classe II restringe-se basicamente a células do sistema imunológico, especialmente células apresentadoras de antígenos (CAA) profissionais, como monócitos, células derivadas de monócitos, macrófagos e células dendríticas. Em pacientes com câncer, constatou-se que as células tumorais expressam moléculas de MHC classe II (Dengjel *et al.*, 2006).

[0052] Os peptídeos mais longos (prolongados) da invenção podem atuar como epitopos ativos de MHC classe II.

[0053] As células T auxiliares ativadas por epitopos de MHC classe II são importantes para orquestrar a função efetora de LTC na imunidade antitumoral. Os epitopos de células T auxiliares que desencadeiam a resposta de células T auxiliares do tipo TH1 auxiliam as funções efetoras de células T killer CD8-positivas, incluindo funções citotóxicas dirigidas contra células tumorais cujas superfícies apresentam complexos de peptídeos associados a tumor e MHC. Desse modo, os epitopos peptídicos em células T auxiliares associadas a tumores podem, isoladamente ou em associação com outros peptídeos associados a tumores, atuar como ingredientes farmacêuticos ativos de composições vacinais que estimulam respostas imunes antitumorais.

[0054] Mostrou-se em modelos animais mamíferos (p.ex. camundongos) que, mesmo na ausência de linfócitos T CD8-positivos, as células T CD4-positivas são suficientes para inibir a manifestação de tumores por meio da inibição da angiogênese mediada pela secreção de interferon gama (IFNγ) (Beatty and Paterson, 2001; Mumberg *et al.*, 1999). Algumas evidências indicam que as células T CD4 exercem efeitos antitumorais diretos (Braumuller *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2014).

[0055] Como a expressão constitutiva de moléculas de HLA classe II é geralmente limitada a células imunológicas, a possibilidade de isolar peptídeos de classe II diretamente de tumores primários era considerada implausível. Entretanto, Dengjel *et al.* conseguiram

identificar uma série de epitopos de MHC classe II diretamente em tumores (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).

[0056] Como ambos os tipos de resposta (a dependente de CD4 e a dependente de CD8) contribuem conjunta e sinergisticamente para o efeito antitumoral, a identificação e caracterização de antígenos associados a tumores reconhecidos tanto por células T CD8+ (cujo ligante é a molécula de MHC classe I e seu epitopo peptídico) como por células T auxiliares CD4-positivas (cujo ligante é a molécula de MHC classe II e seu epitopo peptídico) são importantes para o desenvolvimento de vacinas antitumorais.

[0057] Para que um peptídeo de MHC classe I possa desencadear (provocar) uma resposta imune celular, ele precisa se ligar a uma molécula de MHC. O processo depende do alelo da molécula de MHC e de polimorfismos específicos da sequência de aminoácidos do peptídeo. Os peptídeos ligantes de MHC classe I geralmente possuem 8 a 12 resíduos de aminoácidos de comprimento e geralmente contêm dois resíduos conservados ("âncoras") em suas sequências que interagem com o sulco de ligação correspondente da molécula de MHC. Dessa forma, cada alelo de MHC possui um "motivo de ligação" que determina quais peptídeos podem se ligar especificamente ao sulco de ligação.

[0058] Nas reações imunes dependentes do MHC classe I, os peptídeos precisam tanto ser capazes de se ligarem a certas moléculas de MHC classe I expressas em células tumorais como serem posteriormente reconhecidos por células T que apresentam receptores de células T (TCR) específicos.

[0059] Para as proteínas serem reconhecidas pelos linfócitos T como antígenos específicos para ou associados a tumores, e serem usadas como tratamentos, alguns pré-requisitos precisam ser atendidos. O antígeno deve ser expresso sobretudo por células

tumorais e ser expresso relativamente pouco ou nada por tecidos normais saudáveis. Em uma modalidade preferida, o peptídeo deve ser apresentado de maneira exacerbada pelas células tumorais em comparação com os tecidos normais. Outrossim, é desejável também que o respectivo antígeno esteja presente apenas em um determinado tipo de tumor, mas também em concentrações elevadas (isto é, números de cópias do respectivo peptídeo por célula). Os antígenos específicos para ou associados a tumores são frequentemente derivados de proteínas que participam diretamente da transformação de uma célula normal em uma célula tumoral devido à sua função; p.ex. controle do ciclo celular ou supressão da apoptose. Além disso, alvos distais da proteína que causa diretamente a transformação podem apresentar regulação positiva e, portanto, associarem-se indiretamente ao tumor. Tais antígenos associados indiretamente a tumores também podem ser alvos de abordagens vacinais (Singh-Jasuja *et al.*, 2004). É essencial que os epitopos estejam presentes na sequência de aminoácidos do antígeno para garantir que o peptídeo ("peptídeo imunogênico") derivado de um antígeno associado a tumor produza uma resposta de células T *in vivo* ou *in vitro*.

[0060] Basicamente, qualquer peptídeo capaz de se ligar a uma molécula de MHC pode funcionar como epitopo de célula T. Um pré-requisito para indução de resposta de células T *in vitro* ou *in vivo* é a presença de uma célula T com um TCR correspondente e ausência de tolerância imunológica para o epitopo em questão.

[0061] Portanto, os AATs servem como ponto de partida para desenvolver tratamentos à base de células T, incluindo, entre outros, vacinas antitumorais. Os métodos utilizados para identificar e caracterizar os AATs normalmente se baseiam na utilização de células T, que podem ser isoladas de pacientes ou de indivíduos saudáveis ou baseadas na geração de perfis diferentes de transcrição ou de

expressão peptídica em tumores e em tecidos normais. Entretanto, a identificação de genes sobrexpressos em tecidos tumorais ou em linhagens de tumores humanos ou expressos seletivamente em tais tecidos ou linhagens celulares não proporciona informações precisas sobre a utilização dos antígenos que são transcritos a partir desses genes em imunoterapia. Isso ocorre porque apenas uma determinada subpopulação de epitopos desses antígenos é apropriada para tal aplicação, pois é preciso que uma célula T com um TCR correspondente esteja presente e que haja pouca ou nenhuma tolerância imunológica ao epitopo em questão. Portanto, é importante, em uma modalidade bastante preferida da invenção, selecionar apenas peptídeos sobrexpressos ou apresentados seletivamente contra os quais se possa encontrar células T funcionais e/ou em proliferação. Tais células T funcionais são definidas como células T que, quando estimuladas por um antígeno específico, podem se expandir de forma clonal e são capazes de executar funções efetoras ("célula T efetora").

[0062] No caso de TCRs específicos contra complexos peptídeo-MHC (p.ex. TCRs solúveis) e anticorpos ou outras moléculas ligantes (suportes) de acordo com a invenção, a imunogenicidade dos peptídeos subjacentes é secundária. Nesses casos, o fator determinante é a apresentação.

[0063] Em um primeiro aspecto da presente invenção, a mesma refere-se a um peptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo formado por SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268 ou a uma sequência variante dos mesmos com pelo menos 77% de homologia, e preferencialmente pelo menos 88% de homologia (preferencialmente pelo menos 77% ou pelo menos 88% idêntica) com SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268, caracterizado pelo fato de que a referida variante se liga ao MHC e/ou induz reação cruzada de células T com o referido peptídeo, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo no

qual o referido peptídeo não corresponde ao polipeptídeo completo original.

[0064] A presente invenção refere-se a um peptídeo da presente invenção que compreende uma sequência selecionada do grupo formado por SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268 ou uma variante das mesmas que seja pelo menos 77%, e preferencialmente pelo menos 88%, homóloga (preferencialmente pelo menos 77% ou pelo menos 88% idêntica) à SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268, sendo que cada um dos peptídeos referidos ou variantes dos mesmos possui comprimento total de 8 a 100, preferencialmente de 8 a 30 e, mais preferencialmente, de 8 a 14 aminoácidos.

[0065] As tabelas a seguir mostram os peptídeos de acordo com a presente invenção, seus respectivos números de SEQ e os genes que podem originá-los (subjacentes). Na Tabela 1, os peptídeos com SEQ Nº 1 a SEQ Nº 37 se ligam ao HLA-A*01, peptídeos com SEQ Nº 38 a SEQ Nº 61 se ligam ao HLA-A*02, peptídeos com SEQ Nº 62 a SEQ Nº 112 se ligam ao HLA-A*03, peptídeos com SEQ Nº 113 a SEQ Nº 142 se ligam ao HLA-A*24, peptídeos com SEQ Nº 143 a SEQ Nº 175 se ligam ao HLA-B*07, peptídeos com SEQ Nº 176 a SEQ Nº 194 se ligam ao HLA-B*08, peptídeos com SEQ Nº 195 a SEQ Nº 241 se ligam ao HLA-B*44. Os peptídeos da Tabela 2 foram divulgados anteriormente em grandes listas geradas por metodologias de triagem de alto rendimento (mas com altas taxas de erro) ou calculados por algoritmos. Contudo, nenhum deles havia sido associado com câncer anteriormente. Na Tabela 2, os peptídeos com SEQ Nº 242 a SEQ Nº 248 se ligam ao HLA-A*01, peptídeos com SEQ Nº 249 a SEQ Nº 251 se ligam ao HLA-A*02, peptídeos com SEQ Nº 252 a SEQ Nº 254 se ligam ao HLA-A*03, peptídeos com SEQ Nº 255 a SEQ Nº 259 se ligam ao HLA-B*07, peptídeos com SEQ Nº 260 a SEQ Nº 266 se ligam ao HLA-B*44. Os peptídeos na Tabela 3 são peptídeos adicionais que

podem ser úteis em associação com outros peptídeos da invenção. Na Tabela 3, os peptídeos com SEQ Nº 267 se ligam ao HLA-A*02, peptídeos com SEQ Nº 268 se ligam ao HLA-A*24.

Tabela 1: Peptídeos de acordo com a presente invenção.

SEQ Nº	Sequência	Símbolo(s) oficial(is) do gene	Alótipo de HLA
1	RSDPVTLDV	CEACAM5	A*01
2	LPSPTDSNFY	EGFR	A*01
3	ASSTDSASYY	APOB	A*01
4	NSDLKYNAL	APOB	A*01
5	SILGSDVRVPSY	APOB	A*01
6	VLDLSTNVY	APOB	A*01
7	LITGDPKAAYDY	COL11A1	A*01/A*03
8	TPVTEFSLNTY	COL6A3	A*01
9	FITAQNHGY	CPS1	A*01
10	ITAQNHGY	CPS1	A*01
11	LSAGSGPGQY	CPT2	A*01
12	ITFGERFEY	CYP2J2	A*01
13	GSTMVEHNY	DCBLD2	A*01/A*03
14	YTERDGSAMVY	DCLK2	A*01
15	LTDYLKNTY	DPP4	A*01
16	LSLIDRLVLY	EGLN3	A*01
17	YTDKLQHY	EPHB2	A*01
18	EVSNGKWLLY	ITGA3	A*01/A*03
19	VSNGKWLLY	ITGA3	A*01/A*03
20	STDEITTRY	KLB	A*01
21	STDIGALMY	MMP1	A*01
22	TLEQVQLYY	MYO7B	A*01
23	TASEDVFQY	NOX1	A*01
24	YTHHLFIFY	NOX1	A*01

SEQ Nº	Sequência	Símbolo(s) oficial(is) do gene	Alótipo de HLA
25	LMKEVMEHY	PLOD2	A*01/B*15
26	EVLDSHIHAY	PTPRZ1	A*01
27	LDSHIHAY	PTPRZ1	A*01
28	LTDYINANY	PTPRZ1	A*01
29	SVTDLEMPHY	PTPRZ1	A*01/B*18
30	VLDSHIHAY	PTPRZ1	A*01
31	VTDLEMPHY	PTPRZ1	A*01
32	ATVGYFIFY	RNF128	A*01
33	FADKIHLAY	RNF128	A*01
34	ITDFNNIRY	RP11-1220K2.2	A*01
35	FASDLLHLY	SLC16A11	A*01
36	YAAYIIHAY	TLR3	A*01/A*29
37	LTDSFPLKV	TTPA	A*01
38	VMLNSNVLL	AC010879.1, NLGN4X, NLGN4Y	A*02
39	YLLPSVVLL	AGPAT5	A*02
40	KIDDIWNLEV	APOB	A*02
41	SLQDTKITL	APOB	A*02
42	KMMALVAEL	CCDC146	A*02
43	GLMTIVTSL	CCL24	A*02
44	SQTGFVVLV	CHI3L1	A*02
45	KLLDEVTYL	CYP2J2	A*02
46	VLITGLPLI	CYP2J2	A*02
47	YQDSWFQQL	CYP2J2	A*02
48	NLTFIIILI	F13B	A*02
49	NLASRPYSL	F5	A*02
50	ELMPRVYTL	FAT1	A*02

SEQ Nº	Sequência	Símbolo(s) oficial(is) do gene	Alótipo de HLA
51	ALAAELNQL	GFAP	A*02
52	YVSSGEMMV	GFAP	A*02
53	LLMTSLTES	LRRN1	A*02
54	YLPPTDPRMSV	MMP16	A*02
55	RLWQIQHHL	MTCP1	A*02
56	FLNQIYTQL	MUC5AC	A*02
57	GLTGVIMTI	NOX1	A*02
58	MLCLLLTL	PAEP	A*02
59	KLHEIYIQA	PCDHGC3	A*02
60	GLPDFVKEL	RP11-1220K2.2	A*02
61	RLFGLFLNNV	TLR3	A*02
62	GSYSALLAKK	ABCC2	A*03/A*11
63	KVLGPNGLLK	ABCC2	A*03
64	STTKLYLAK	ABCC2	A*03/A*11
65	VLGPNGLLK	ABCC2	A*03/A*68
66	ATYEGIQKK	ALDH1L1, ALDH1L2	A*03/A*11
67	ATALSLSNK	APOB	A*03
68	ATAYGSTVSK	APOB	A*03/A*11
69	ATAYGSTVSKR	APOB	A*03
70	ATWSASLKNK	APOB	A*03
71	KLGNNPVSK	APOB	A*03
72	KQVFPGLNY	APOB	A*03
73	KSFDRHFEK	APOB	A*03/A*11
74	QLYSKFLLK	APOB	A*03
75	QVPTFTIPK	APOB	A*03
76	SAFGYVFPK	APOB	A*03/A*11
77	SSASLAHMK	APOB	A*03/A*68

SEQ Nº	Sequência	Símbolo(s) oficial(is) do gene	Alótipo de HLA
78	STKSTSPPK	APOB	A*03
79	STNNEGNLK	APOB	A*03/A*11
80	STSHHLVSR	APOB	A*03/A*68
81	SVKLQGTSK	APOB	A*03/A*68
82	TAYGSTVSK	APOB	A*03
83	TAYGSTVSKR	APOB	A*03/A*68
84	TVASLHTEK	APOB	A*03/A*68
85	KMAAWPFSR	C4BPA	A*03
86	KTPSGALHRK	C4BPA	A*03/A*11
87	SSYSRSSAVK	DCLK2	A*03
88	MLLQQPLIY	DNAH11	A*03
89	KITDFGLAK	EGFR	A*03
90	GSRLGKYYVK	EGLN3	A*03
91	SLIDRLVLY	EGLN3	A*03
92	AVLDLGSLLAK	FAM149A	A*03
93	ALDKPGKSK	FAM181B	A*03
94	KTYVGHPVKM	FAT1	A*03
95	RLFESSFHY	GAL3ST1	A*03/A*29
96	FSLAGALNAGFK	GFAP	A*03
97	RMPPPLPTR	GFAP	A*03
98	KLYPTYSTK	GPLD1	A*03
99	ATMQSKLIQK	GRM8	A*03
100	ALLGVIIAK	HAVCR1	A*03
101	GVIIAKKYFFK	HAVCR1	A*03/A*11
102	IIAKKYFFK	HAVCR1	A*03
103	KSWTASSSY	LOXL2	A*03
104	STQDTLLIK	MXRA5	A*03

SEQ Nº	Sequência	Símbolo(s) oficial(is) do gene	Alótipo de HLA
105	GSAALYLLR	NDUFA4L2	A*03
106	RLSPNDQYK	NDUFA4L2	A*03
107	EIYGGHHAGF	OLIG2	A*03
108	LLKSSVGNFY	PCDHB8	A*03
109	KIIAPLVTR	PLOD2	A*03/A*11
110	GTESGTILK	SEMA5B	A*03/A*11
111	KIKEHVRSK	UBD	A*03
112	KMMADYGIRK	UBD	A*03
113	VWAKILSAF	ABCB4	A*24
114	KFLDSNIKF	APOB	A*24/A*23
115	YFEEAANFL	BAAT	A*24
116	LVLDYSKDYNHW	CPS1	A*24
117	NFLPPIIARF	DCBLD2	A*24
118	TYISKTIAL	EXOC3L2	A*24
119	YMKALGVGF	FABP7	A*24/B*15
120	MYAKEFDLL	FMO5	A*24
121	SYIEKVRFL	GFAP	A*24
122	KLYGMPTDFGF	GRB7	A*24/A*32
123	RQYLAINQI	ITPR2	A*24
124	EVYSPEADQW	KLHDC8A	A*24/A*25
125	IYGPKYIHPSF	MACC1	A*24/A*23
126	TFQDKTLNF	MACC1	A*24
127	IFINLSPEF	MUC5AC	A*24
128	SYTKVEARL	MUC5AC	A*24
129	VFLNQIYTQL	MUC5AC	A*24
130	VYGDGHYLTF	MUC5AC	A*24
131	KQLDHNLTF	NOX1	A*24/B*15

SEQ Nº	Sequência	Símbolo(s) oficial(is) do gene	Alótipo de HLA
132	VYNPVIYVF	OPN3	A*24
133	SFDSNLLSF	PIWIL1	A*24
134	TYLTGRQF	PLCB4	A*24
135	VIAPIISNF	SLC12A2	A*24/B*15
136	EYNNIQHLF	TLR3	A*24
137	KYLSLSNSF	TLR3	A*24
138	KYLSIPTVF	UGT1A3	A*24
139	PYASLASELF	UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5	A*24
140	KYLSIPAVF	UGT1A4, UGT1A5	A*24
141	KYLSIPAVFF	UGT1A4, UGT1A5	A*24
142	SSFPGAGNTW	WSCD1	A*24/A*25
143	FELPTGAGLQL	APOB	B*07
144	IPEPSAQQL	APOB	B*07
145	RVPSYTLIL	APOB	B*07
146	SPGDKRLAA	APOB	B*07
147	SPIKVPLLL	APOB	B*07
148	VPDGVSKVL	APOB	B*07
149	YPLTGDTRL	APOB	B*07
150	KPSSKALGTSL	ATP10B	B*07
151	VVHPRTLLL	CYP2J2	B*07/B*15
152	IPSRLLAIL	EFNA5	B*07
153	APAAVPSAPA	FEZF1	B*07
154	GPGTRLSL	GFAP	B*07
155	FPYPYAERL	GRIN2D	B*07/B*35
156	HPQVVILSL	HAVCR1	B*07/B*35
157	SPSPGKDPTL	HSF4	B*07

SEQ Nº	Sequência	Símbolo(s) oficial(is) do gene	Alótipo de HLA
158	VPERGEPEL	HSF4	B*07
159	FPAHPSLLL	ITGA3	B*07
160	RPAPADSAL	KISS1R	B*07
161	NPYEGRVEV	LOXL2	B*07/B*51
162	MPMISIPRV	LPPR5	B*07/B*51
163	RPASSLRP	MMP11	B*07
164	ISTPSEVSTPL	MUC17	B*07
165	TPIAKVSEL	NKD1	B*07
166	HDPDVGSNSL	PCDHGC3	B*07
167	YPSEVEHMF	PGF	B*07/B*35
168	IPTDKLLVI	PLOD2	B*07
169	FPTEVTPHAF	PTPRZ1	B*07
170	SPMWHVQQL	QRFPR	B*07
171	APKLFAVAF	SEC14L6	B*07
172	KPAHYPLIAL	TEX11	B*07
173	MVPSAGQLALF	TGFA	B*07
174	VPSLQRLML	TLR3	B*07
175	HPIETLVDIF	VEGFA	B*07/B*35
176	AAMSRYEL	APOB	B*08
177	DLKYNALDL	APOB	B*08
178	HAKEKLTAL	APOB	B*08
179	IQIYKKLRTSSF	APOB	B*08
180	LLKAEPLAF	APOB	B*08/B*15
181	YKKLRTSSF	APOB	B*08
182	LPFLRENDL	ASTN1	B*08/B*07
183	FQKLKLLSL	ATP10B	B*08
184	EPVKKSRL	CCND1	B*08

SEQ Nº	Sequência	Símbolo(s) oficial(is) do gene	Alótipo de HLA
185	NPNLKTLL	CHI3L1	B*08
186	SLIDRLVL	EGLN3	B*08/B*07
187	YVKERSKAM	EGLN3	B*08
188	SALDHVTRL	EXOC3L2	B*08
189	HIFLRTTL	ITPR2	B*08
190	SRSMRLLLL	REG4	B*08
191	LINLKYLSL	TLR3	B*08
192	LPMLKVLNL	TLR3	B*08
193	LSYNKYLQL	TLR3	B*08
194	EAKRHLLQV	UBD	B*08
195	AEAVLKTLQEL	APOB	B*44/B*40
196	AEQTGTWKL	APOB	B*44
197	EEAKQVLFL	APOB	B*44
198	FELPTGAGL	APOB	B*44/B*40
199	GEATLQRIY	APOB	B*44
200	GEELGFASL	APOB	B*44
201	GEHTSKATL	APOB	B*44
202	KEFNLQNMGL	APOB	B*44
203	KENFAGEATL	APOB	B*44
204	KESQLPTVM	APOB	B*44
205	QEVLLQTFL	APOB	B*44
206	SEPINIIDAL	APOB	B*44/B*40
207	TEATMTFKY	APOB	B*44
208	AEHDAVRNAL	ASCL2	B*44
209	YEVDTVLRY	BCAN	B*44
210	SENIVIQVY	C5	B*44
211	TEKEMIQKL	CCDC146	B*44

SEQ Nº	Sequência	Símbolo(s) oficial(is) do gene	Alótipo de HLA
212	AEETCAPSV	CCND1	B*44/B*51
213	TTMDQKSLW	CHI3L2	B*44
214	AEQPDGLIL	CPS1	B*44
215	AFITAQNHGY	CPS1	B*44
216	LQEEKVPAIY	CPS1	B*44
217	NEINEKIAPSF	CPS1	B*44
218	AEGGKVPIKW	EGFR	B*44
219	AENAEYLRV	EGFR	B*44
220	KEITGFLLI	EGFR	B*44
221	AEERAEAKKKF	EGLN3	B*44
222	NEISTFHNL	GPC3	B*44
223	SEVPVARVW	IGFBP1	B*44
224	SESAVFHGF	ITGA3	B*44
225	SEAFPSRAL	KISS1R	B*44
226	EELLHGQLF	MUC5AC	B*44
227	TEHTQSQAAW	NXPH4	B*44
228	AEKQTPDGRKY	PCDHGB2	B*44
229	KESDGFHRF	PLOD2	B*44
230	AENLFRAFL	PRKDC	B*44
231	AEIHTAEI	PTHLH	B*44
232	AEKDGKLTDY	PTPRZ1	B*44
233	DESEKTTKSF	PTPRZ1	B*44
234	EEESLLTSF	PTPRZ1	B*44
235	EEFETLKEF	PTPRZ1	B*44
236	EEKLIIQDF	PTPRZ1	B*44
237	LEMPHYSTF	PTPRZ1	B*44
238	SENPETITY	PTPRZ1	B*44

SEQ Nº	Sequência	Símbolo(s) oficial(is) do gene	Alótipo de HLA
239	TEVLDSHIHAY	PTPRZ1	B*44
240	HELENHSMY	TRIM9	B*44
241	REAEPIPKM	TRIO	B*44

[0066] Tabela 2: Outros peptídeos de acordo com a presente invenção que não apresentavam associação prévia conhecida com câncer

SEQ Nº	Sequência	Símbolo(s) oficial(is) do gene	Alótipo de HLA
242	FSDKELAAY	ABCB4	A*01
243	RSPNNFLSY	CCND1	A*01/A*03
244	RSDPVTLNV	CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7, PSG1, PSG4, PSG5, PSG7	A*01
245	ITEKNSGLY	CEACAM5	A*01
246	YSDLHAFYY	MANEAL	A*01
247	RSDPGGGGLAY	MEX3B	A*01
248	YSHAAGQGTGLY	SOX9	A*01
249	ALFPERITV	ATAT1	A*02
250	KMILKMVQL	PRAME	A*02
251	RLASRPLLL	PTGFRN	A*02
252	RIYNGIGVSR	DCBLD2	A*03
253	KLFGTSGQK	EGFR	A*03
254	AVATKFVNK	TRIO	A*03
255	LPDGSRVEL	ACTL8	B*07
256	LPALPQQLI	COL6A3	B*07
257	SPLRGGSSL	EFNA3, EFNA4	B*07
258	APSGTRVVQVL	PCDHGC3	B*07
259	RPAVGHSGL	ZC3H3	B*07
260	EEAPLVTKAF	ASPSCR1	B*44
261	IEALLESSL	CCND1	B*44
262	MELLLVNKL	CCND1	B*44
263	QQATPGPAY	CEA, CEACAM5, CEACAM6	B*44

SEQ Nº	Sequência	Símbolo(s) oficial(is) do gene	Alótipo de HLA
264	DEYLIPQQGF	EGFR	B*44
265	EEVDVPIKLY	EPHB1, EPHB2	B*44
266	ARLTPIPFGL	TMEM64	B*44

[0067] Tabela 3: Peptídeos da invenção úteis para, p.ex., tratamentos anticâncer personalizados.

SEQ Nº	Sequência	Símbolo(s) oficial(is) do gene	Alótipo de HLA
267	KTLGKLWRL	SOX10, SOX8, SOX9	A*02
268	DYIPYVFKL	APOB	A*24

[0068] A presente invenção geralmente se refere ao uso dos peptídeos de acordo com a presente invenção para tratamento de doenças proliferativas como, por exemplo, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide crônica ou aguda; outras neoplasias linfoides como, por exemplo, linfoma não Hodgkin, distúrbio linfoproliferativo pós-transplante (DLPT); outras neoplasias mieloides como mielofibrose primária, trombocitopenia essencial e policitemia vera; e outras neoplasias como câncer de esôfago, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de pulmão de pequenas células, câncer de pâncreas, câncer de próstata, melanoma, câncer de mama, câncer da vesícula biliar, colangiocarcinoma, câncer de bexiga, câncer do útero, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e mesotelioma.

[0069] São particularmente preferidos, isoladamente ou em associações, os peptídeos de acordo com a presente invenção selecionados do grupo formado por SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268. São mais preferidos, isoladamente ou em associações, os peptídeos selecionados do grupo formado por SEQ Nº 1 a SEQ Nº 241 (ver Tabela 1) e seu uso na imunoterapia do câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais, leucemia linfocítica crônica e leucemia mieloide crônica ou aguda;

outras neoplasias linfoides como, por exemplo, linfoma não Hodgkin e distúrbios linfoproliferativos pós-transplante (DLPT); outras neoplasias mieloides como mielofibrose primária, trombocitopenia essencial e policitemia vera; e outras neoplasias como câncer de esôfago, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de pulmão de pequenas células, câncer de pâncreas, câncer de próstata, melanoma, câncer de mama, câncer de útero, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, mesotelioma e, preferencialmente, câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais.

[0070] Outro aspecto da presente invenção se refere ao uso dos peptídeos de acordo com a presente invenção, preferencialmente em associações, para o tratamento de doenças proliferativas selecionadas do grupo formado por câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide crônica ou aguda; outras neoplasias linfoides como, por exemplo, linfoma não Hodgkin, distúrbios linfoproliferativos pós-transplante (DLPT); outras neoplasias mieloides como mielofibrose primária, trombocitopenia essencial, policitemia vera; e outras neoplasias como câncer de esôfago, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de pulmão de pequenas células, câncer de pâncreas, câncer de próstata, melanoma, câncer de mama, câncer da vesícula biliar, colangiocarcinoma, câncer da bexiga, câncer do útero, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e mesotelioma.

[0071] A presente invenção refere-se também aos peptídeos de acordo com a presente invenção que possuem a capacidade de se ligarem a uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano classe I ou, em uma forma alongada, a uma variante de comprimento diferente do MHC classe II.

[0072] A presente invenção refere-se também aos peptídeos de acordo com a presente invenção, onde cada um de tais peptídeos consiste ou consiste principalmente em uma sequência de aminoácidos de acordo com SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268.

[0073] A presente invenção refere-se também aos peptídeos de acordo com a presente invenção nos quais os referidos peptídeos são modificados e/ou incluem ligações não peptídicas.

[0074] A presente invenção refere-se também aos peptídeos de acordo com a presente invenção, nos quais os referidos peptídeos constituem parte de uma proteína de fusão, em particular fusão com aminoácidos N-terminais da cadeia invariante associada ao antígeno do HLA-DR (Ii) ou fundido a (ou incorporado à sequência de) um anticorpo, tal como, por exemplo, um anticorpo específico para células dendríticas.

[0075] A presente invenção refere-se também a um ácido nucleico que codifica os peptídeos de acordo com a presente invenção. A presente invenção refere-se também ao ácido nucleico de acordo com a presente invenção que consista em DNA, cDNA, PNA, RNA ou combinações destes.

[0076] A presente invenção refere-se também a um vetor de expressão capaz de expressar e/ou que expresse um ácido nucleico de acordo com a presente invenção.

[0077] A presente invenção refere-se também a um peptídeo de acordo com a presente invenção, um ácido nucleico de acordo com a presente invenção ou um vetor de expressão de acordo com a presente invenção para uso no tratamento de doenças e em medicina, em especial para o tratamento de câncer.

[0078] A presente invenção refere-se também aos anticorpos específicos contra os peptídeos de acordo com a presente invenção ou complexos de tais peptídeos de acordo com a presente invenção com MHC e métodos para produzi-los.

[0079] A presente invenção refere-se também a receptores de células T (TCR, "T-cell receptors") e em particular a TCRs solúveis (sTCR) e a TCRs clonados introduzidos por engenharia genética em células T autólogas ou alogênicas, assim como a métodos de produzi-las, além de células NK ou outras células que apresentam o referido TCR ou que participem de reações cruzadas com os referidos TCRs.

[0080] Os anticorpos e os TCRs são modalidades adicionais do uso imunoterapêutico dos peptídeos de acordo com a invenção ora em pauta.

[0081] A presente invenção refere-se também a células hospedeiras que compreendem um ácido nucleico de acordo com a presente invenção ou um vetor de expressão conforme descrito anteriormente. A presente invenção refere-se também as células hospedeiras de acordo com a presente invenção, que são células apresentadoras de antígenos e, preferencialmente, células dendríticas.

[0082] A presente invenção refere-se também a um método de produção de um peptídeo de acordo com a presente invenção, sendo que o referido método compreende o cultivo da célula hospedeira de acordo com a presente invenção e o isolamento do peptídeo da referida célula hospedeira ou do respectivo meio de cultura.

[0083] A presente invenção refere-se também ao referido método de acordo com a presente invenção, sendo que o antígeno é carregado em moléculas de MHC classe I ou II expressas na superfície de uma célula apresentadora de antígenos apropriada ou de uma célula apresentadora de antígenos artificial colocando-se uma quantidade suficiente do antígeno em contato com uma célula apresentadora de antígenos.

[0084] A presente invenção refere-se também a um método de acordo com a presente invenção, no qual a célula apresentadora de antígenos compreende um vetor de expressão que expressa ou é capaz

de expressar o referido peptídeo contendo as sequências SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268, preferencialmente contendo SEQ Nº 1 a SEQ Nº 241, ou uma sequência de aminoácidos variante das mesmas.

[0085] A presente invenção relaciona-se também com células T ativadas produzidas de acordo com o método da presente invenção, sendo que as referidas células T reconhecem seletivamente células que expressam um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos de acordo com a presente invenção.

[0086] A presente invenção refere-se também a um método para destruir células-alvo em um paciente no qual as células-alvo expressam de forma aberrante um polipeptídeo que compreende qualquer sequência de aminoácidos de acordo com a presente invenção, sendo que o método compreende a administração ao paciente de um número eficaz de células T produzidas de acordo com a presente invenção.

[0087] A presente invenção refere-se também ao uso de qualquer peptídeo conforme descrito, ao ácido nucleico de acordo com a presente invenção, ao vetor de expressão de acordo com a presente invenção, à célula de acordo com a presente invenção, ao linfócito T ativado, ao receptor de célula T ou ao anticorpo ou a outro peptídeo e/ou a moléculas ligantes de peptídeo e MHC de acordo com a presente invenção como medicamento ou para fabricação de um medicamento. Preferencialmente, o medicamento possui atividade anticâncer.

[0088] Preferencialmente, o referido medicamento destina-se a terapia celular, uma vacina ou proteína à base de um TCR solúvel ou anticorpo.

[0089] A presente invenção se refere ainda a um uso de acordo com a presente invenção onde as referidas células cancerosas são de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide crônica ou aguda; outras neoplasias linfoides como,

por exemplo, linfoma não Hodgkin, distúrbios linfoproliferativos pós-transplante (DLPT); outras neoplasias mieloides como mielofibrose primária, trombocitopenia essencial e policitemia vera; e outras neoplasias como câncer de esôfago, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de pulmão de pequenas células, câncer de pâncreas, câncer de próstata, melanoma, câncer de mama, câncer da vesícula biliar, colangiocarcinoma, câncer da bexiga, câncer do útero, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, mesotelioma e, preferencialmente, câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais.

[0090] A presente invenção refere-se também a biomarcadores baseados nos peptídeos de acordo com a presente invenção, doravante denominados "alvos", que podem ser utilizados para diagnóstico de câncer, preferencialmente de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais. O marcador pode ser a sobreapresentação do(s) peptídeo(s) em si ou a sobrexpressão do(s) gene(s) correspondente(s). Os marcadores também podem ser usados para prever a possibilidade de sucesso de um determinado tratamento, preferencialmente uma imunoterapia, sendo mais preferida uma imunoterapia que atue sobre os alvos identificados pelo biomarcador. Pode-se, por exemplo, usar um anticorpo ou TCR solúvel para corar cortes de um tumor para detectar um peptídeo relevante em complexo com MHC.

[0091] Opcionalmente, o anticorpo exerce outra função efetora, como um domínio de estimulação imunológica ou uma toxina.

[0092] A presente invenção refere-se também ao uso desses novos alvos no âmbito do tratamento do câncer.

[0093] A estimulação de uma resposta imune depende da presença de antígenos reconhecidos como estranhos pelo sistema imune do hospedeiro. A descoberta da existência de antígenos associados a

tumores levantou a possibilidade de usar o sistema imune do hospedeiro para intervir no crescimento tumoral. Vários mecanismos para acionar tanto a imunidade humoral como a celular vêm sendo explorados para imunoterapia do câncer.

[0094] Alguns elementos específicos da resposta imune celular são capazes de reconhecer e destruir especificamente células tumorais. O isolamento de células T de populações de células infiltrantes de tumor ou do sangue periférico sugere que tais células podem desempenhar um importante papel nas defesas imunes naturais contra o câncer. Em particular, as células T CD8-positivas que reconhecem moléculas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), que normalmente possuem 8 a 10 resíduos de aminoácidos derivados de proteínas ou proteínas produtos de defeitos ribossômicos (DRIPS, "defect ribosomal products") localizadas no citossol, desempenham um importante papel nessa resposta. As moléculas de MHC humanas também são designadas antígenos leucocitários humanos (HLA, "human leucocyte antigen").

[0095] O termo "resposta de célula T" significa a proliferação específica e a ativação das funções efetoras induzidas por peptídeos *in vitro* ou *in vivo*. No caso de células T citotóxicas restritas por MHC classe I, as funções efetoras podem consistir em lise de células-alvo que foram pulsadas com peptídeos ou com precursores de peptídeos ou que apresentam os peptídeos naturalmente; em secreção de citoquinas induzida por peptídeos, preferencialmente interferon gama, TNF-α ou IL-2; em secreção induzida por peptídeos de moléculas efetoras, preferencialmente granzimas ou perforinas; ou em degranulação.

[0096] O termo "peptídeo" é aqui utilizado para designar uma série de resíduos de aminoácidos conectados uns aos outros, tipicamente por ligações peptídicas entre os grupamentos alfa-amino e carbonila de aminoácidos adjacentes. Preferencialmente, os peptídeos possuem 9

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

[0097] O termo "peptídeo" designa também sais de uma série de resíduos de aminoácidos conectados uns aos outros, tipicamente por ligações peptídicas entre os grupamentos alfa-amino e carbonila de aminoácidos adjacentes. Preferencialmente, tais sais são sais farmaceuticamente aceitáveis de peptídeos como, por exemplo, sais de cloreto ou acetato (trifluoracetato). Cabe notar que os sais dos peptídeos de acordo com a presente invenção diferem substancialmente dos peptídeos em seu estado *in vivo*, pois esses peptídeos não se apresentam como sais *in vivo*.

[0098] O termo "peptídeo" abrange também "oligopeptídeo". O termo "oligopeptídeo" é aqui utilizado para designar uma série de resíduos de aminoácidos conectados uns aos outros, tipicamente por ligações peptídicas entre os grupamentos alfa-amino e carbonila de aminoácidos adjacentes. O comprimento do oligopeptídeo não é essencial para a invenção, conquanto o epitopo ou epitopos corretos sejam nele mantidos. Os oligopeptídeos tipicamente possuem mais de cerca de 15 e menos de cerca de 30 resíduos de aminoácidos de comprimento.

[0099] O termo "polipeptídeo" designa uma série de resíduos de aminoácidos conectados uns aos outros, tipicamente por ligações peptídicas entre os grupamentos alfa-amino e carbonila de aminoácidos adjacentes. O comprimento do polipeptídeo não é essencial para a invenção, conquanto os epitopos corretos sejam nele mantidos. Ao contrário dos termos peptídeo e oligopeptídeo, o termo polipeptídeo designa apenas moléculas com mais de cerca de 30 resíduos de

aminoácidos.

[00100] Um peptídeo, oligopeptídeo, proteína ou polinucleotídeo que codifica tal molécula é "imunogênico" (e, portanto, "imunogênico" no escopo da presente invenção) se for capaz de induzir uma resposta imune. No caso da presente invenção, a imunogenicidade é definida mais especificamente como a capacidade de induzir uma resposta de células T. Portanto, um "imunogênio" é uma molécula capaz de induzir uma resposta imune e, no caso da presente invenção, uma molécula capaz de induzir uma resposta de células T. Em outro aspecto, o imunogênio pode ser o peptídeo, o complexo formado pelo peptídeo com MHC, o oligopeptídeo e/ou proteína usada para produzir anticorpos específicos ou TCRs contra ele.

[00101] Um "epitopo" de células T classe I requer um peptídeo curto ligado a um receptor de MHC classe I formando um complexo ternário (cadeia alfa de MHC classe I, beta-2 microglobulina e peptídeo), que pode ser reconhecido por receptores de células T que se ligam com afinidade apropriada ao complexo de MHC com peptídeo. Os peptídeos que se ligam a moléculas de MHC classe I geralmente possuem 8-14 aminoácidos de comprimento, e mais tipicamente 9 aminoácidos de comprimento.

[00102] Em seres humanos, três lócus genéticos diferentes codificam as moléculas de MHC classe I. (As moléculas de MHC de seres humanos também são designadas antígenos leucocitários humanos (HLA, "human leukocyte antigens")). O HLA-A, HLA-B e HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 e HLA-B*07 são exemplos de alelos de MHC classe I diferentes que podem ser expressos a partir desses lócus.

[00103] Tabela 4: Frequências de expressão (F) dos sorotipos de HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 e HLA-B*44. As frequências dos haplótipos (Gf) são derivadas de um estudo que usou dados de tipagem de HLA de um registro com mais de

6,5 milhões de doadores voluntários nos EUA (Gragert *et al.*, 2013). A frequência de haplótipos é a frequência de um alelo distinto em um cromossomo individual. Como as células mamíferas possuem um conjunto diploide de cromossomos, a frequência de ocorrência genotípica deste alelo será maior e pode ser calculada usando-se o princípio de Hardy-Weinberg ($F = 1 – (1 – Gf)^2$).

Alelo	População	Fenótipo calculado a partir da frequência de alelos (F)
A*02	Africano (N=28557)	32,3%
	Caucasiano europeu (N=1242890)	49,3%
	Japonês (N=24582)	42,7%
	Hispânico (América do Sul e Central) (N=146714)	46,1%
	Sudeste Asiático (N=27978)	30,4%
A*01	Africano (N=28557)	10,2%
	Caucasiano europeu (N=1242890)	30,2%
	Japonês (N=24582)	1,8%
	Hispânico (América do Sul e Central) (N=146714)	14,0%
	Sudeste Asiático (N=27978)	21,0%
A*03	Africano (N=28557)	14,8%
	Caucasiano europeu (N=1242890)	26,4%
	Japonês (N=24582)	1,8%
	Hispânico (América do Sul e Central) (N=146714)	14,4%
	Sudeste Asiático (N=27978)	10,6%
A*24	Africano (N=28557)	2,0%
	Caucasiano europeu (N=1242890)	8,6%
	Japonês (N=24582)	35,5%

Alelo	População	Fenótipo calculado a partir da frequência de alelos (F)
	Hispânico (América do Sul e Central) (N=146714)	13,6%
	Sudeste Asiático (N=27978)	16,9%
B*07	Africano (N=28557)	14,7%
	Caucasiano europeu (N=1242890)	25,0%
	Japonês (N=24582)	11,4%
	Hispânico (América do Sul e Central) (N=146714)	12,2%
	Sudeste Asiático (N=27978)	10,4%
B*08	Africano (N=28557)	6,0%
	Caucasiano europeu (N=1242890)	21,6%
	Japonês (N=24582)	1,0%
	Hispânico (América do Sul e Central) (N=146714)	7,6%
	Sudeste Asiático (N=27978)	6,2%
B*44	Africano (N=28557)	10,6%
	Caucasiano europeu (N=1242890)	26,9%
	Japonês (N=24582)	13,0%
	Hispânico (América do Sul e Central) (N=146714)	18,2%
	Sudeste Asiático (N=27978)	13,1%

[00104] Os peptídeos da invenção, preferencialmente quando incluídos em uma vacina da invenção conforme aqui descrita, ligam-se a A*02, A*01, A*03, A*24, B*07, B*08 ou B*44. Uma vacina também pode apresentar ligação a todos os peptídeos de MHC classe II. Portanto, a vacina da invenção pode ser usada para tratar o câncer em pacientes positivos para A*02-, A*01-, A*03-, A*24-, B*07-, B*08- ou

B*44, ao passo que nenhuma seleção de alótipos de MHC classe II é necessária porque esses peptídeos se ligam a todos os MHC classe II.

[00105] Se os peptídeos A*02 da invenção forem combinados com peptídeos que se ligam a outro alelo (p.ex. A*24), uma porcentagem maior de qualquer população de pacientes poderá ser tratada que com a abordagem de apenas um dos alelos de MHC classe I. Enquanto na maioria das populações menos de 50% dos pacientes poderia ser tratada com qualquer desses alelos isoladamente, uma vacina compreendendo epitopos de HLA-A*02 e HLA-A*24 pode tratar pelo menos 60% dos pacientes em qualquer população relevante. Mais especificamente, os seguintes porcentuais de pacientes serão positivos para pelo menos um desses alelos em várias regiões: EUA 61%, Europa Ocidental 62%, China 75%, Coreia do Sul 77% e Japão 86% (porcentagens calculadas a partir de www.allelefrequencies.net).

[00106] Tabela 5: Cobertura de alelos de HLA em uma população caucasiana europeia (calculada segundo Gragert *et al.*, 2013).

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

[00107] Em uma modalidade preferida, o termo "sequência de nucleotídeos" refere-se a um heteropolímero de

desoxirribonucleotídeos.

[00108] A sequência de nucleotídeos que codifica um determinado peptídeo, oligopeptídeo ou polipeptídeo pode ocorrer naturalmente ou ser construída por meios sintéticos. Em geral, os segmentos de DNA que codificam peptídeos, polipeptídeos e proteínas desta invenção são construídos a partir de fragmentos de cDNA, de oligonucleotídeos ligantes curtos ou de uma série de oligonucleotídeos de modo a fornecer um gene sintético que pode ser expresso em uma unidade de transcrição recombinante que compreende elementos regulatórios derivados de um operon microbiano ou viral.

[00109] Conforme aqui utilizado, o termo "nucleotídeo codificador (ou que codifica) um peptídeo" refere-se a uma sequência de nucleotídeos que codifica o peptídeo, incluindo códons de início e parada artificiais (produzidos pelo homem) compatíveis com o sistema biológico que será expresso, por exemplo, por uma célula dendrítica ou por outro sistema celular útil para a produção de TCRs.

[00110] Conforme aqui utilizadas, referências a uma sequência de ácido nucleico abrangem tanto ácidos nucleicos de fita única como de dupla fita. Portanto, por exemplo, para DNA, a sequência específica refere-se, salvo indicação em contrário no contexto, ao DNA de fita única que possui a sequência em questão, à forma dúplex formada pela sequência em questão junto com o respectivo complemento (DNA de dupla fita) e ao complemento de tal sequência.

[00111] O termo "região codificadora" refere-se à porção do gene que, natural ou normalmente, codifica o produto expresso pelo gene em questão em seu ambiente genômico natural, isto é., a região codificadora *in vivo* do produto de expressão nativo do gene em questão.

[00112] A região codificadora pode ser derivada de um gene não mutante ("normal"), mutante ou alterado e pode até mesmo ser derivada

de uma sequência de DNA ou gene sintetizado inteiramente em laboratório usando métodos bem conhecidos dos versados na técnica de síntese de DNA.

[00113] O termo "produto de expressão" significa o polipeptídeo ou proteína que é o produto de tradução natural do gene e de quaisquer sequências de ácidos nucleicos que produzam codificação equivalente resultantes da natureza degenerada do código genético produzindo o(s) mesmo(s) aminoácido(s).

[00114] O termo "fragmento" significa, quando se refere a uma sequência codificante, uma porção do DNA que compreende menos que a região codificadora completa, cujo produto de expressão retém basicamente a mesma função ou atividade biológica que o produto de expressão da região codificante completa.

[00115] O termo "segmento de DNA" refere-se a um polímero de DNA, seja como fragmento separado ou como componente de uma estrutura de DNA maior, derivado do DNA isolado pelo menos uma vez de forma basicamente pura, isto é, livre de contaminantes endógenos e em quantidade ou concentração suficientes para permitir identificação, manipulação e recuperação do segmento e das sequências de nucleotídeos componentes por meio de métodos bioquímicos padrão como, por exemplo, um vetor de clonagem. Tais segmentos são fornecidos como um "frame" (matriz) de leitura aberto sem interrupções de sequências internas não traduzidas, denominadas íntrons, que geralmente estão presentes em genes eucarióticos. As sequências de DNA não traduzido podem estar presentes em posição distal à matriz de leitura aberta, onde a mesma não interfere na manipulação nem na expressão das regiões codificantes.

[00116] O termo "primer" significa uma sequência curta de ácidos nucleicos que pode ser pareada com uma fita de DNA e fornece uma terminação 3'OH livre na qual a DNA polimerase inicia a síntese de uma

cadeia de desoxirribonucleotídeos.

[00117] O termo "promotor" significa uma região do DNA envolvida em ligar a RNA polimerase para iniciar a transcrição.

[00118] O termo "isolado" significa que o material foi retirado de seu ambiente original (p.ex. o ambiente original em que ocorria naturalmente). Por exemplo, polinucleotídeos que ocorrem na natureza ou que estão presentes em um animal vivo não são considerados isolados, mas o mesmo polinucleotídeo ou polipeptídeo é considerado isolado quando é separado de alguns ou de todos os materiais que com ele coexistem em um sistema natural. Tais polinucleotídeos podem formar parte de um vetor e/ou tais polinucleotídeos ou polipeptídeos podem ser parte de uma composição e mesmo assim ser isolados, mesmo que tal vetor ou composição não seja parte de seu ambiente natural.

[00119] Os polinucleotídeos e polipeptídeos recombinantes ou imunogênicos divulgados de acordo com a presente invenção também podem estar em forma "purificada". O termo "purificado" não requer pureza absoluta; é uma definição relativa e abrange tanto preparações altamente purificadas como preparações apenas parcialmente purificadas, conforme tais termos são compreendidos pelos versados na técnica pertinente. Por exemplo, clones individuais isolados de uma biblioteca de cDNA foram purificados usando-se técnicas convencionais para se obter homogeneidade eletroforética. A purificação de um material inicial ou de material natural em pelo menos uma ordem de grandeza, e preferencialmente em duas ou três ordens, e mais preferencialmente em quatro a cinco ordens de magnitude é expressamente contemplada. Outrossim, o polipeptídeo reivindicado que possui pureza de, preferencialmente 99,999% ou pelo menos 99,99% ou 99,9% e, ainda desejavelmente, 99% por peso ou mais, fica expressamente incluído.

[00120] Os ácidos nucleicos e produtos da expressão de polipeptídeos divulgados de acordo com a presente invenção, assim com os vetores de expressão que contêm tais ácidos nucleicos e/ou tais polipeptídeos, podem estar presentes em "forma enriquecida". Conforme aqui utilizado, o termo "enriquecido" significa que a concentração do material é de pelo menos 2, 5, 10, 100 ou 1000 vezes sua concentração natural (por exemplo), vantajosamente 0,01% por peso e preferencialmente pelo menos 0,1% por peso. Preparações enriquecidas contendo cerca de 0,5%, 1%, 5%, 10% e 20% por peso também são contempladas. As sequências, produtos de construção, vetores, clones e outros materiais que compreendem a presente invenção podem, vantajosamente, estar em forma enriquecida ou isolada. O termo "fragmento ativo" significa um fragmento, normalmente de um peptídeo, polipeptídeo ou sequência de ácido nucleico, que gera uma resposta imune (isto é, possui atividade imunogênica) quando administrado — isolado ou, opcionalmente, com um adjuvante apropriado ou em um vetor — a um animal como um mamífero (p.ex. coelho, camundongo) ou a um ser humano. A resposta imune assume a forma de estimulação da resposta de células T em um animal receptor como, por exemplo, um ser humano. Alternativamente, o "fragmento ativo" também pode ser usado para induzir uma resposta de células T *in vitro*.

[00121] Conforme aqui utilizados, os termos "porção", "segmento" e "fragmento" referem-se, quando usados em relação a peptídeos, a uma sequência contínua de resíduos, como resíduos de aminoácidos, que forma um subconjunto de uma sequência maior. Por exemplo, se um polipeptídeo for tratado com qualquer uma das endopeptidases comuns (p.ex. tripsina ou quimotripsina), os oligopeptídeos resultantes de tal tratamento representariam porções, segmentos ou fragmentos do polipeptídeo inicial. Quando utilizados em relação a polinucleotídeos,

esses termos referem-se a produtos produzidos pelo tratamento dos referidos nucleotídeos com qualquer uma das endonucleases.

[00122] De acordo com a presente invenção, os termos "porcentual de identidade" e "porcentagem de idênticos" significam, quando usados em referência a uma sequência, que uma sequência é comparada com uma sequência reivindicada ou descrita após alinhamento da sequência a ser comparada ("Sequência de Comparação") com a sequência descrita ou reivindicada ("Sequência de Referência"). O porcentual de identidade é então determinado de acordo com a seguinte fórmula:

Porcentual de identidade = 100 [1 - (C/R)]

[00123] Onde C é o número de diferenças entre a Sequência de Referência e a Sequência de Comparação ao longo do alinhamento entre a Sequência de Referência e a Sequência de Comparação, onde são considerados diferenças:

[00124] cada base ou aminoácido da Sequência de Referência que não possui uma base ou aminoácido alinhado correspondente na Sequência de Comparação;

[00125] cada lacuna na sequência; e

[00126] cada base ou aminoácido da Sequência de Referência diferente da base ou aminoácido alinhado correspondente na Sequência de Comparação; sendo que:

[00127] o alinhamento deve começar na posição 1 das sequências alinhadas; e R é o número de bases ou aminoácidos na Sequência de Referência ao longo do comprimento do alinhamento com a Sequência de Comparação, sendo que quaisquer lacunas criadas na Sequência de Referência também são contadas como uma base ou aminoácido.

[00128] Se existir um alinhamento entre a Sequência de Comparação e a Sequência de Referência para o qual o porcentual de identidade calculado acima for igual ou superior a um porcentual de identidade mínimo especificado, isso significa que a Sequência de

Comparação possuirá o porcentual de identidade mínimo especificado em relação à Sequência de Referência, mesmo que possa haver alinhamentos em que o porcentual de identidade calculado acima seja inferior à identidade porcentual especificada.

[00129] Conforme mencionado anteriormente, a presente invenção refere-se, portanto, a um peptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo formado por SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268 ou a uma variante dos mesmos com 88% de homologia com SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268 ou uma variante da mesma que induz reação cruzada de células T com o referido peptídeo. Os peptídeos da presente invenção possuem capacidade de ligação com uma das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade humano (MHC) de classe I ou com versões alongadas dos referidos peptídeos a moléculas de classe II.

[00130] Na presente invenção, o termo "homólogo" refere-se ao grau de identidade (ver o conceito de percentual de identidade descrito anteriormente) entre duas sequências de aminoácidos, isto é, sequências de peptídeos ou de polipeptídeos. A "homologia" mencionada anteriormente é determinada comparando-se duas sequências alinhadas sob condições ideais com as sequências a serem comparadas. Tal homologia entre sequências pode ser calculada criando-se um alinhamento utilizando-se, por exemplo, o algoritmo ClustalW. Alguns softwares de análise de sequências comumente disponíveis, mais especificamente o Vector NTI, o GENETYX e outras ferramentas de análise, são disponibilizados por bancos de dados abertos ao público.

[00131] Os versados na técnica saberão avaliar se as células T induzidas por um peptídeo variante de um peptídeo específico podem apresentar reação cruzada com o peptídeo original (Appay *et al.*, 2006; Colombetti *et al.*, 2006; Fong *et al.*, 2001; Zaremba *et al.*, 1997).

[00132] Por "variante" de uma determinada sequência de

aminoácidos, os inventores entendem que as cadeias laterais de, por exemplo, um ou dois resíduos de aminoácidos são alterados (p.ex. substituindo-os pela cadeia lateral de outro resíduo de aminoácido encontrado na natureza ou alguma outra cadeia lateral) de modo que o peptídeo continue sendo capaz de se ligar a uma molécula de HLA basicamente da mesma maneira que um peptídeo com a mesma sequência de aminoácidos que as SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268. Por exemplo, um peptídeo pode ser modificado de modo a melhorar ou pelo menos manter sua capacidade de interagir com e se ligar ao sulco de ligação de uma molécula de MHC apropriada, tal como HLA-A*02 ou -DR, e dessa forma pelo menos manter, ou até melhorar, a capacidade de ligar-se ao TCR de células T ativadas.

[00133] Em seguida, essas células T ativadas podem participar de reação cruzada com outras células e destruir células que expressam um polipeptídeo que contém a sequência natural de aminoácidos do peptídeo cognato, conforme definido nos aspectos da invenção. Como se pode depreender da literatura e de bancos de dados científicos (Rammensee *et al.*, 1999; Godkin *et al.*, 1997), determinadas posições em peptídeos ligantes de HLA são geralmente resíduos de ancoragem que formam uma sequência central que se fixa ao motivo ligante do receptor de HLA, que é definido por propriedades de polaridade, eletrofísicas, hidrofóbicas e espaciais das cadeias polipeptídicas que constituem o sulco de ligação. Assim, os versados na técnica saberão modificar as sequências de aminoácidos apresentadas em SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268 mantendo os resíduos de ancoragem conhecidos e serão capazes de determinar se tais variantes preservam sua capacidade de ligação com moléculas de MHC classe I ou classe II. As variantes da presente invenção preservam a capacidade de ligação ao TCR de células T ativadas, que podem participar posteriormente de reações cruzadas e destruir células que expressam um polipeptídeo contendo a

sequência natural de aminoácidos do peptídeo cognato, conforme definido nos aspectos da invenção.

[00134] Os peptídeos originais (não modificados) aqui divulgados podem ser modificados por substituição de um ou mais resíduos em sítios diferentes, e possivelmente seletivos, dentro da cadeia peptídica, salvo indicação em contrário. Preferencialmente, essas substituições se encontram no final da cadeia de aminoácidos. Tais substituições podem ser de natureza conservadora, substituindo-se, por exemplo, um aminoácido por outro que possua estrutura e características semelhantes (p.ex. substituir um aminoácido hidrofóbico por outro aminoácido hidrofóbico). Ainda mais conservador seria substituir aminoácidos de tamanho e natureza química semelhantes ou idênticos (p.ex. substituir leucina por isoleucina). Em estudos de variações de sequências em famílias de proteínas homólogas que ocorrem naturalmente, determinadas substituições de aminoácidos são toleradas com muito mais frequência que outras, e estas frequentemente mostram correlação com semelhanças de tamanho, carga, polaridade e hidrofobicidade entre o aminoácido original e seu substituto, sendo esta a base para definição de "substituições conservadoras".

[00135] As substituições conservadoras são aqui definidas como trocas dentro de um dos seguintes grupos: grupo 1: resíduos pequenos alifáticos, apolares ou ligeiramente polares (Ala, Ser, Tre, Pro, Gli); grupo 2: resíduos polares com carga negativa e as respectivas amidas (Asp, Asn, Glu, Gln); grupo 3: resíduos polares com carga positiva (His, Arg, Lis); grupo 4: resíduos alifáticos grandes e apolares (Met, Leu, Ile, Val, Cis); e grupo 5: resíduos aromáticos grandes (Fen, Tir, Trp).

[00136] Uma substituição menos conservadora seria substituir de um aminoácido por outro com características semelhantes porém de tamanho um pouco diferente, tal como a substituição de um resíduo de

alanina por outro de isoleucina. Seria uma substituição pouquíssimo conservadora substituir um aminoácido ácido por outro polar ou até mesmo por outro básico. Entretanto, nem todas as substituições "radicais" podem ser descartadas como ineficazes, pois algumas delas produzem efeitos químicos não totalmente previsíveis e com propriedades desejáveis inesperadas, que não podem ser previstas a partir de princípios químicos simples.

[00137] Evidentemente, tais substituições podem envolver outras estruturas que não os L-aminoácidos comuns. Portanto, os D-aminoácidos podem ser substituídos pelos L-aminoácidos comumente encontrados em peptídeos antigênicos da invenção, não deixando de ser contemplados pela presente divulgação. Além disso, outros aminoácidos que não os comuns (isto é, outros aminoácidos que não os 20 aminoácidos proteinogênicos naturais) também podem ser usados para finalidades de substituição de modo a produzir imunogênios e polipeptídeos imunogênicos de acordo com a presente invenção.

[00138] Se for constatado que substituições em mais de uma posição produzem peptídeos com atividade antigênica substancialmente equivalente ou maior conforme definido a seguir, combinações dessas substituições serão testadas para determinar se as substituições combinadas produzem efeitos aditivos ou sinergísticos sobre a antigenicidade do peptídeo. No máximo, não mais de quatro posições no peptídeo devem ser substituídas simultaneamente.

[00139] Um peptídeo que consiste essencialmente na sequência de aminoácidos aqui indicada pode apresentar substituições de um ou dois aminoácidos fora do domínio de ancoragem (que é descrito mais detalhadamente a seguir), sem que isto afete significativamente a capacidade de ligação a uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano classe I ou II ou a diminua em

comparação com o peptídeo não modificado. Em outra modalidade, que consiste essencialmente na sequência de aminoácidos aqui indicada, podem-se efetuar uma ou duas substituições conservadoras de aminoácidos (ver adiante), sem que isto afete significativamente a capacidade de ligação a uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano classe I ou II ou a diminua em comparação com o peptídeo não modificado.

[00140] Os resíduos de aminoácidos que não contribuem significativamente para as interações com receptores de células T podem ser modificados por meio de uma substituição de aminoácido que não afeta significativamente a reatividade com células T nem elimina a ligação ao MHC relevante. Assim, considerando-se a condição acima, o peptídeo da invenção pode ser qualquer peptídeo (termo sob o qual os inventores incluem oligopeptídeo e polipeptídeo), incluindo sequência de aminoácidos ou uma porção ou variante das mesmas conforme apresentadas.

Tabela 6: Variantes e motivos dos peptídeos de acordo com as SEQs Nº 1, 21, 48, 250, 91, 253, 117, 125, 160, 255, 178, 183, 229 e 232

Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ Nº 1	R	S	D	P	V	T	L	D	V		
Variante									Y		
									A		
			E						Y		
			E						A		
		T							Y		
		T							A		
		T	E						Y		
		T	E						A		
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ Nº 21	S	T	D	I	G	A	L	M	Y		
Variante		S									
		S							A		
		S	E								

Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
		S	E						A		
									A		
			E								
			E						A		
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ Nº 48	N	L	T	F	I	I	I	L	I		
Variante									V		
									L		
									A		
		M							V		
		M									
		M							L		
		M							A		
		A							V		
		A									
		A							L		
		A							A		
		V							V		
		V									
		V							L		
		V							A		
		T							V		
		T									
		T							L		
		T							A		
		Q							V		
		Q									
		Q							L		
		Q							A		
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ Nº 250	K	M	I	L	K	M	V	Q	L		
Variante		L							V		
		L							I		
		L									
		L							A		
									V		
									I		

Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
									A		
		A							V		
		A							I		
		A									
		A							A		
		V							V		
		V							I		
		V									
		V							A		
		T							V		
		T							I		
		T									
		T							A		
		Q							V		
		Q							I		
		Q									
		Q							A		
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ Nº 91	S	L	I	D	R	L	V	L	Y		
Variante									K		
									R		
									F		
		I							K		
		I									
		I							R		
		I							F		
		M							K		
		M									
		M							R		
		M							F		
		V							K		
		V									
		V							R		
		V							F		
		T							K		
		T									
		T							R		

Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
		T							F		
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ Nº 253	K	L	F	G	T	S	G	Q	K		
Variante									Y		
									R		
									F		
		I									
		I							Y		
		I							R		
		I							F		
		M									
		M							Y		
		M							R		
		M							F		
		V									
		V							Y		
		V							R		
		V							F		
		T									
		T							Y		
		T							R		
		T							F		
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
SEQ Nº 117	N	F	L	P	P	I	I	A	R	F	
Variante		Y								I	
		Y								L	
		Y									
										I	
										L	
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SEQ Nº 125	I	Y	G	P	K	Y	I	H	P	S	F
Variante											I
											L
		F									I
		F									L
		F									
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9		

Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ Nº 160	R	P	A	P	A	D	S	A	L		
Variante									F		
									V		
									M		
									A		
									I		
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ Nº 255	L	P	D	G	S	R	V	E	L		
Variante									F		
									V		
									M		
									A		
									I		
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ Nº 178	H	A	K	E	K	L	T	A	L		
Variante									V		
									I		
									M		
									F		
					R						
					R				V		
					R				I		
					R				M		
					R				F		
					H						
					H				V		
					H				I		
					H				M		
					H				F		
			R								
			R						V		
			R						I		
			R						M		
			R						F		
			R		R						
			R		R				V		
			R		R				I		

Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
			R		R				M		
			R		R				F		
			R		H						
			R		H				V		
			R		H				I		
			R		H				M		
			R		H				F		
			L								
			L						V		
			L						I		
			L						M		
			L						F		
			L		R						
			L		R				V		
			L		R				I		
			L		R				M		
			L		R				F		
			L		H						
			L		H				V		
			L		H				I		
			L		H				M		
			L		H				F		
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ Nº 183	F	Q	K	L	K	L	L	S	L		
Variante									V		
									I		
									M		
									F		
					R						
					R				V		
					R				I		
					R				M		
					R				F		
					H						
					H				V		
					H				I		
					H				M		

Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
					H				F		
			R								
			R						V		
			R						I		
			R						M		
			R						F		
			R		R						
			R		R				V		
			R		R				I		
			R		R				M		
			R		R				F		
			R		H						
			R		H				V		
			R		H				I		
			R		H				M		
			R		H				F		
			L								
			L						V		
			L						I		
			L						M		
			L						F		
			L		R						
			L		R				V		
			L		R				I		
			L		R				M		
			L		R				F		
			L		H						
			L		H				V		
			L		H				I		
			L		H				M		
			L		H				F		
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
SEQ Nº 229	K	E	S	D	G	F	H	R	F		
Variante									W		
									Y		
									L		
		D									

Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
		D							W		
		D							Y		
		D							L		
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
SEQ Nº 232	A	E	K	D	G	K	L	T	D	Y	
Variante										F	
										W	
										L	
		D								F	
		D								W	
		D									
		D								L	

[00141] Peptídeos mais longos (prolongados) também podem ser apropriados. Também é possível que epitopos de MHC classe I, embora normalmente tenham de 8 a 11 aminoácidos de comprimento, sejam gerados pelo processamento de peptídeos mais longos ou por proteínas que incluam o epitopo real. É preferível que os resíduos que flanqueiam o epitopo sejam resíduos que não afetem significativamente a clivagem proteolítica necessária para expor o epitopo durante o processamento.

[00142] Os peptídeos da invenção podem ser prolongados em até quatro aminoácidos, ou seja, podem-se adicionar 1, 2, 3 ou 4 aminoácidos a qualquer extremidade em qualquer combinação entre 4:0 e 0:4. A Tabela 7 apresenta combinações de prolongamentos de acordo com a invenção:

Tabela 7: Algumas combinações de peptídeos prolongados da presente invenção

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

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

[00143] Os aminoácidos do prolongamento/extensão podem ser os peptídeos da sequência original da proteína ou quaisquer outros aminoácidos. Os peptídeos podem ser prolongados a fim de torna-los mais estáveis ou mais solúveis.

[00144] Portanto, os epitopos da presente invenção podem ser idênticos a epitopos que ocorrem naturalmente e que são associados a ou específicos para tumores, ou podem incluir epitopos que diferem em no máximo quatro resíduos do peptídeo de referência, conquanto apresentem atividade antigênica substancialmente idêntica.

[00145] Em uma modalidade alternativa, o peptídeo é alongado em mais de quatro aminoácidos em um ou ambos os lados, preferivelmente até atingir um comprimento total de até 30 aminoácidos. Assim, podem-se criar peptídeos ligantes de MHC classe II. A ligação ao MHC classe II pode ser testada por métodos conhecidos na técnica.

[00146] Dessa forma, a presente invenção fornece peptídeos e variantes de epitopos de MHC classe I nas quais o peptídeo ou variante tem comprimento total entre 8 e 100, preferivelmente entre 8 e 30, mais preferivelmente entre 8 e 14, especificamente, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14 aminoácidos; no caso de peptídeos ligantes de classe II prolongados o comprimento também pode ser de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 aminoácidos.

[00147] Evidentemente, o peptídeo ou variante de acordo com a presente invenção terá a capacidade de se ligar a uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I ou II. A ligação de um peptídeo ou variante a um complexo de MHC pode ser testada por métodos conhecidos na técnica.

[00148] Preferivelmente, quando células T específicas para um peptídeo de acordo com a presente invenção são testadas contra peptídeos substituídos, a concentração de peptídeos substituídos que produz metade do aumento máximo de lise em relação aos níveis basais é de não mais que cerca de 1 mM, preferivelmente não mais que cerca de 1 μM, mais preferivelmente não mais que cerca de 1 nM e ainda mais preferivelmente não mais que cerca de 100 pM e, mais preferivelmente, não mais que 10 pM. É preferível também que o peptídeo substituído possa ser reconhecido por células T citotóxicas de mais de um indivíduo, de pelo menos dois e, mais preferivelmente, de três indivíduos.

[00149] Em uma modalidade especialmente preferida da invenção, o(s) peptídeo(s) consiste(m) basicamente em uma sequência de aminoácidos de acordo com SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268.

[00150] "Consiste essencialmente em" significa que um peptídeo de acordo com a presente invenção contém, além da sequência de acordo com qualquer sequência de SEQ Nº 1 a SEQ ID Nº 268 ou variante das mesmas, outros prolongamentos formados por segmentos aminoácidos N- e/ou C-terminais, que não necessariamente formam parte do peptídeo que funciona como epitopo em epitopos que incluem moléculas de MHC.

[00151] Contudo, esses segmentos podem ser importantes para tornar eficiente a introdução do peptídeo de acordo com a presente invenção em células. Em uma modalidade da presente invenção, o peptídeo é parte de uma proteína de fusão que compreende, por

exemplo, os 80 aminoácidos N-terminais da cadeia invariante associada ao antígeno HLA-DR (p33, no seguinte "Ii") conforme derivado do NCBI, GenBank número de acesso X00497. Em outras fusões, os peptídeos da presente invenção podem ser fundidos com um anticorpo conforme aqui descrito ou com uma porção funcional de um anticorpo, e em particular com uma sequência de um anticorpo, de modo a torná-lo um alvo específico do referido anticorpo ou, por exemplo, em ou dentro de um anticorpo específico para células dendríticas, conforme aqui descrito.

[00152] O peptídeo ou variante também pode ser modificado ainda mais para melhorar a estabilidade e/ou a ligação a moléculas de MHC a fim de produzir uma resposta imune mais intensa. Os métodos de otimização de tais sequências peptídicas são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, a introdução de ligações peptídicas reversas ou de ligações não peptídicas.

[00153] Em uma ligação peptídica reversa, os aminoácidos não se ligam por meio de ligações peptídicas (–CO–NH–), mas por uma ligação peptídica invertida. Tal peptideomimetismo retroinvertido pode ser produzido usando-se métodos conhecidos na técnica, como, por exemplo, os descritos por Mezière *et al* (1997), que fica aqui incorporado por referência. Esta abordagem inclui criar pseudopeptídeos contendo alterações na cadeia básica e não na orientação das cadeias laterais. Mezière *et al*. (1997) demonstraram que esses pseudopeptídeos podem contribuir para respostas de ligação de MHC e de células T auxiliares. Os peptídeos retroinvertidos, que contêm ligações NH–CO em vez de CO–NH, são muito mais resistentes à proteólise.

[00154] São exemplos de ligações não peptídicas $–CH_2–NH$, $–CH_2S–$, $–CH_2CH_2–$, $–CH{=}CH–$, $–COCH_2–$, $–CH(OH)CH_2–$ e $–CH_2SO–$. US 4.897.445 fornece um método para síntese em fase sólida de ligações não-peptídicas ($–CH_2–NH–$) em cadeias polipeptídicas

envolvendo polipeptídeos sintetizados por procedimentos padrão, onde a ligação não peptídica é sintetizada pela reação de um aminoaldeído com um aminoácido na presença de $NaCNBH_3$.

[00155] Os peptídeos que compreendem as sequências descritas acima podem ser sintetizados com outros grupamentos químicos presentes em suas terminações amina ou carboxila para melhorar a estabilidade, biodisponibilidade e/ou afinidade dos peptídeos. Por exemplo, grupamentos hidrofóbicos como a carbobenzoxila, dansila ou t-butiloxicarbonila podem ser adicionados à amina terminal dos peptídeos. Da mesma forma, um grupamento acetila ou um grupamento 9-fluorenilmetóxi-carbonila pode ser adicionado à amina terminal dos peptídeos. Além disso, o grupamento hidrofóbico t-butiloxicarbonila ou um grupamento amida podem ser adicionados às carboxilas terminais dos peptídeos.

[00156] Outrossim, os peptídeos descritos podem ser sintetizados de forma a alterar suas configurações estéricas. Por exemplo, pode-se substituir o L-isômero de um ou mais resíduos de aminoácidos do peptídeo pelo respectivo D-isômero. Pode-se também substituir um ou mais resíduos de aminoácidos dos peptídeos da invenção por resíduos de aminoácidos bem conhecidos e que não ocorrem naturalmente. Alterações como essas podem contribuir para tornar os peptídeos da invenção mais estáveis ou melhorar a biodisponibilidade ou a ação ligante dos mesmos.

[00157] Da mesma forma, um peptídeo da invenção ou variante do mesmo pode ser modificado quimicamente por meio de reações com aminoácidos específicos antes ou depois da síntese do peptídeo. Alguns exemplos de tais modificações são bem conhecidos na técnica e resumidos em, por exemplo, R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2004 (Lundblad, 2004), que fica aqui incorporado por referência. A modificação química de aminoácidos

inclui, entre outras, modificação por acilação, amidinação, piridoxilação de lisina, alquilação redutora, trinitrobenzilação de grupamentos amina com ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), modificação amídica de grupamentos carboxila e modificações sulfidrila mediante oxidação por ácido perfórmico de cisteína formando ácido cisteico, formação de derivados mercuriais, formação de dissulfetos mistos com outros compostos de tiol, reação com maleimida, carboximetilação com ácido iodoacético ou iodoacetamida e carbamoilação com cianato em pH alcalino, sem limitar-se a estes. Em relação a isso, os versados na técnica podem referir-se ao Capítulo 15 de Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan *et al.* (John Wiley & Sons NY 1995-2000) (Coligan *et al.*, 1995) para obter mais detalhes sobre as metodologias de modificação química de proteínas.

[00158] Sumariamente, a modificação de, por exemplo, resíduos de arginila em proteínas baseia-se muitas vezes na reação de compostos com dicarbonilas vicinais como o fenilglioxal, o 2,3-butanediona e o 1,2-ciclo-hexanediona para formar um adutor. Outro exemplo é a reação de metilglioxal com resíduos de arginina. A cisteína pode ser modificada sem alteração concomitante de outros sítios nucleofílicos como a lisina e a histidina. Com isso, muitos reagentes estão disponíveis para modificar a cisteína. Os websites de empresas como a Sigma-Aldrich (http://www.sigma-aldrich.com) apresentam informações sobre reagentes específicos.

[00159] A redução seletiva de ligações dissulfeto em proteínas também é comum. As ligações dissulfeto podem ser encontradas e oxidadas durante o tratamento térmico de produtos biofarmacêuticos. O Reagente K de Woodward pode ser usado para modificar resíduos específicos de ácido glutâmico. A N-(3-(dimetilamino)propil)-N'-etilcarbodi-imida pode ser usada para formar ligações cruzadas intramoleculares entre um resíduo de lisina e outro de ácido glutâmico.

Por exemplo, o dietilpirocarbonato é um reagente para modificação de resíduos histidil em proteínas. A histidina também pode ser modificada usando-se 4-hidroxi-2-nonenal. A reação de resíduos de lisina com outros grupamentos α-amino é útil, por exemplo, para ligar peptídeos a superfícies ou para ligação cruzada entre proteínas ou peptídeos. A lisina é o local de fixação do poli(etileno)glicol e é o principal sítio modificado na glicosilação de proteínas. Os resíduos de metionina das proteínas podem ser modificados por, por exemplo, iodoacetamida, bromoetilamina e cloramina T.

[00160] O tetranitrometano e o N-acetilimidazol podem ser usados para modificar os resíduos de tirosila. A ligação cruzada por meio da formação de ditirosina pode ser efetuada com peróxido de hidrogênio e íons de cobre.

[00161] Estudos recentes sobre a modificação do triptofano vêm usando a N-bromosuccinimida, 2-hidróxi-5-nitrobenzil brometo ou 3-bromo-3-metil-2-(2-nitrofenilmercapto)-2H-indol (BPNS-escatol).

[00162] A modificação bem-sucedida de proteínas e peptídeos terapêuticos com PEG frequentemente prolonga a meia-vida desses compostos na circulação, e a ligação cruzada de proteínas com glutaraldeído, polietilenoglicol diacrilato e formaldeído é usada para preparar hidrogéis. Muitos alergênios são modificados para imunoterapia por carbamilação com cianato de potássio.

[00163] Um peptídeo ou variante onde o peptídeo é modificado ou inclui ligações não peptídicas é uma modalidade preferida da invenção.

[00164] Outra modalidade da presente invenção se refere a um peptídeo que não é encontrado naturalmente, sendo que o referido peptídeo consiste ou consiste essencialmente em uma sequência de aminoácidos de acordo com SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268 e foi produzido sinteticamente (por exemplo sintetizado) na forma de um sal farmaceuticamente aceitável. Os métodos de produção sintética de

peptídeos são bem conhecidos na técnica. Os sais dos peptídeos de acordo com a presente invenção diferem substancialmente dos peptídeos em seu estado *in vivo*, pois esses peptídeos não se apresentam como sais *in vivo*. A forma de sal não-natural torna o peptídeo mais solúvel, sobretudo no âmbito de composições farmacêuticas que compreendem os peptídeos (por exemplo as vacinas peptídicas aqui divulgadas). Para que se possa fornecer os peptídeos ao indivíduo a ser tratado de forma eficiente, eles precisam ser suficientemente solúveis, o que requer solubilidade substancial. Preferivelmente, os sais são sais farmaceuticamente aceitáveis dos peptídeos. Os referidos sais de acordo com a invenção incluem sais alcalinos e alcalino-terrosos, tais como os sais da série de Hofmeister, que compreendem os ânions PO_4^{3-}, SO_4^{2-}, CH_3COO^-, Cl^-, Br^-, NO_3^-, ClO_4^-, I^-, SCN^- e os cátions NH_4^+, Rb^+, K^+, Na^+, Cs^+, Li^+, Zn^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+} e Ba^{2+}. Sais específicos são selecionados entre $(NH_4)_3PO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4CH_3COO, NH_4Cl, NH_4Br, NH_4NO_3, NH_4ClO_4, NH_4I, NH_4SCN, Rb_3PO_4, Rb_2HPO_4, RbH_2PO_4, Rb_2SO_4, Rb_4CH_3COO, Rb_4Cl, Rb_4Br, Rb_4NO_3, Rb_4ClO_4, Rb_4I, Rb_4SCN, K_3PO_4, K_2HPO_4, KH_2PO_4, K_2SO_4, KCH_3COO, KCl, KBr, KNO_3, $KclO_4$, KI, KSCN, Na_3PO_4, Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, Na_2SO_4, $NaCH_3COO$, NaCl, NaBr, $NaNO_3$, $NaClO_4$, NaI, NaSCN, $ZnCl_2$ Cs_3PO_4, Cs_2HPO_4, CsH_2PO_4, Cs_2SO_4, $CsCH_3COO$, CsCl, CsBr, $CsNO_3$, $CsClO_4$, CsI, CsSCN, Li_3PO_4, Li_2HPO_4, LiH_2PO_4, Li_2SO_4, $LiCH_3COO$, LiCl, LiBr, $LiNO_3$, $LiClO_4$, LiI, LiSCN, Cu_2SO_4, $Mg_3(PO_4)_2$, Mg_2HPO_4, $Mg(H_2PO_4)_2$, Mg_2SO_4, $Mg(CH_3COO)_2$, $MgCl_2$, $MgBr_2$, $Mg(NO_3)_2$, $Mg(ClO_4)_2$, MgI_2, $Mg(SCN)_2$, $MnCl_2$, $Ca_3(PO_4)$,, Ca_2HPO_4, $Ca(H_2PO_4)_2$, $CaSO_4$, $Ca(CH_3COO)_2$, $CaCl_2$, $CaBr_2$, $Ca(NO_3)_2$, $Ca(ClO_4)_2$, CaI_2, $Ca(SCN)_2$, $Ba_3(PO_4)_2$, Ba_2HPO_4, $Ba(H_2PO_4)_2$, $BaSO_4$, $Ba(CH_3COO)_2$, $BaCl_2$, $BaBr_2$, $Ba(NO_3)_2$, $Ba(ClO_4)_2$, BaI_2, e $Ba(SCN)_2$. São particularmente preferidos o acetato de NH, $MgCl_2$, KH_2PO_4, Na_2SO_4, KCl, NaCl e $CaCl_2$, tais como, por

exemplo, sais cloreto ou acetato (trifluoracetato).

[00165] Geralmente, os peptídeos e variantes (pelo menos aquelas que contêm ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos) podem ser sintetizadas pelo método Fmoc-poliamida ou por síntese de peptídeos em fase sólida, conforme divulgado por Lukas *et al.* (1981) e nas respectivas referências. O grupamento 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc) protege temporariamente o grupamento N-amino. A clivagem repetitiva do grupamento protetor altamente base-lábil é efetuada usando-se 20% piperidina em N, N-dimetilformamida. Os grupamentos em cadeias laterais podem ser protegidos mediante formação dos respectivos éteres butílicos (para treonina e tirosina), ésteres butílicos (para ácido glutâmico e ácido aspártico), derivados butiloxicarbonila (para lisina e histidina), derivados tritila (para cisteína) e derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzenossulfonil (para arginina). Se houver resíduos C-terminais de glutamina ou asparagina, o grupamento 4,4'-dimetoxibenzidrila é usado para proteger os grupamentos amido das cadeias laterais. O suporte de fase sólida é baseado em um polímero de polidimetil-acrilamida constituído a partir de três monômeros: dimetilacrilamida (monômero da cadeia básica), bisacriloiletileno diamina (ligante cruzado) e acriloilsarcosina metil éster (agente funcionalizante). O agente clivável da ligação peptídeo-resina usado é um derivado ácido-lábil do ácido 4-hidroximetil-fenoxiacético. Todos os derivados de aminoácidos são adicionados na forma de anidridos simétricos pré-formados, com exceção de asparagina e glutamina, que são adicionadas usando-se um procedimento de acoplamento reverso mediado por N, N-diciclohexilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol. Todas as reações de acoplamento e desproteção são monitoradas por procedimentos de teste com ninhidrina, ácido trinitrobenzenossulfônico ou isotina. Ao final da síntese, os peptídeos são clivados da resina de suporte e, ao mesmo tempo, os grupamentos protetores das cadeias

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

[00166] O ácido trifluoracético é removido por evaporação a vácuo seguida de trituração com éter dietílico para produzir o peptídeo bruto. Quaisquer captantes que ainda estiverem presentes serão retirados por um procedimento de extração simples, no qual a liofilização da fase aquosa produz o peptídeo bruto livre de captantes. Os reagentes para síntese de peptídeos são geralmente fornecidos por, por exemplo, Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, Reino Unido).

[00167] A purificação pode ser realizada por qualquer uma ou por uma combinação de técnicas como recristalização, cromatografia de exclusão por tamanho molecular, cromatografia de troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica e (geralmente) cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa usando, por exemplo, um gradiente de separação de acetonitrilo/água.

[00168] A análise dos peptídeos pode ser realizada usando-se cromatografia em camada fina, eletroforese — sobretudo a eletroforese capilar com extração em fase sólida (CSPE, "capillary solid phase extraction") —, cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa, análise de aminoácidos após hidrólise ácida e por espectrometria de massa com bombardeio por átomos rápidos (FAB, "fast atom bombardment"), assim como análise espectrométrica de massa por MALDI e ESI-Q-TOF.

[00169] Para identificação e quantificação relativa de ligantes de HLA por espectrometria de massa, moléculas de HLA de amostras de tecido

congeladas criogenicamente foram purificadas e peptídeos associados ao HLA foram isolados. Os peptídeos isolados foram separados e suas sequências foram identificadas por ensaios de cromatografia líquida com espectrometria de massa (LC-EM) com ionização por nanoeletrospray (nanoESI). As sequências peptídicas resultantes foram verificadas comparando-se o padrão de fragmentação dos peptídeos associados a tumores (TUMAPs, "tumor-associated peptides") naturais registrado em amostras de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais (N = 35 amostras de CHC, 12 de GBM, 10 de CG, 22 de CHC e 79 de CCR) com os padrões de fragmentação de peptídeos de referência sintéticos correspondentes cujas sequências eram idênticas. Como os peptídeos foram identificados diretamente como ligantes de moléculas de HLA de tumores primários, esses resultados constituem uma evidência direta de que os peptídeos identificados são processados e apresentados naturalmente nos tecidos cancerosos primários obtidos de 158 pacientes com câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais (ver Exemplo 1).

[00170] O pipeline de descoberta XPRESIDENT® v2.1 (ver, por exemplo, US 2013-0096016, que fica aqui integralmente incorporada por referência) permite identificar e selecionar peptídeos sobrapresentados relevantes que podem ser candidatos a uso vacinal com base na quantificação relativa direta dos níveis de peptídeo restrito por HLA em tecidos cancerosos em comparação com outros tecidos e órgãos não cancerosos. Para essa finalidade, foram desenvolvidos métodos de quantificação diferencial sem marcadores com emprego de dados adquiridos por cromatografia líquida com espectrometria de massa (LC-EM), que foram processados por um pipeline de dados exclusivo que combina algoritmos de identificação de sequências, agregação espectral, contagem de íons, alinhamento de tempos de

retenção e desconvolução e normalização de estados de carga.

[00171] Complexos HLA-peptídeo em amostras de tecido de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais foram purificados e os peptídeos associados ao HLA foram isolados e analisados por LC-EM (ver Exemplo 1). Essa abordagem identificou todos os TUMAPs mencionados no presente documento em amostras de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais, confirmando que são apresentados em câncer colorretal primário, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais.

[00172] Além da apresentação do peptídeo, a expressão do mRNA do gene subjacente também foi testada. Os dados de mRNA foram obtidos por meio de análises de sequenciamento de RNA de tecidos normais e de tecidos cancerosos (cf. Exemplo 2 na Figura 2). Preferivelmente, foram incluídos na presente invenção peptídeos derivados de proteínas codificadas por mRNAs expressos de forma acentuada em tecidos cancerosos e pouco ou nada expressos em tecidos normais.

[00173] A presente invenção fornece peptídeos úteis para o tratamento de cânceres e tumores, preferivelmente câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais que apresentam os peptídeos da invenção de forma exacerbada ou exclusiva. A espectrometria de massa mostrou que esses peptídeos são apresentados naturalmente por moléculas de HLA em amostras de câncer humano primário dos tipos colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais.

[00174] Muitas das proteínas e/ou genes fonte (também designada "proteínas completas" ou "proteínas subjacentes") dos quais os

peptídeos são derivados apresentaram altos níveis de sobrexpressão no câncer em comparação com tecidos normais. Para fins desta invenção, "tecidos normais" são células saudáveis de origem cerebral, renal, hepática, gástrica, do intestino grosso ou outros tecidos normais, que demonstram a existência de níveis elevados de associação com os genes originais (ver Exemplo 2). Os peptídeos também estão presentes em tecido tumoral. Para fins desta invenção, "tecido tumoral" são amostras de pacientes que sofrem de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais.

[00175] Os peptídeos ligados ao HLA podem ser reconhecidos pelo sistema imunológico, especificamente pelos linfócitos T. As células T podem destruir as células que apresentam o complexo HLA/peptídeo reconhecido, por exemplo células de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular ou carcinoma de células renais que apresentam os peptídeos derivados.

[00176] Os peptídeos da presente invenção mostraram-se capazes de estimular respostas de células T e/ou são sobreapresentados; portanto, pode-se usá-los para produzir anticorpos e/ou TCRs, tais como os sTCRs solúveis de acordo com a presente invenção (ver Exemplo 3 e Exemplo 4). Além disso, os peptídeos da presente invenção também podem ser usados, quando formam complexos com os respectivos MHCs, para produzir anticorpos e/ou sTCRs, sobretudo sTCRs, de acordo com a presente invenção. Os respectivos métodos são bem conhecidos de indivíduos versados na técnica e também podem ser encontrados na respectiva literatura (ver também adiante). Assim, os peptídeos da presente invenção são úteis para gerar uma resposta imune em um paciente, por meio da qual as células tumorais podem ser destruídas. Pode-se induzir uma resposta imune em um paciente administrando-se os peptídeos descritos ou substâncias precursoras apropriadas (por exemplo peptídeos alongados, proteínas

ou ácidos nucleicos que codificam tais peptídeos) diretamente ao paciente, idealmente em combinação com agentes que promovem a imunogenicidade (isto é, um adjuvante). Pode-se esperar que a resposta imune originária de tal vacinação terapêutica seja altamente específica contra células tumorais porque os peptídeos-alvo da presente invenção não são apresentados em tecidos normais em números de cópias semelhantes, evitando o risco de reações autoimunes indesejadas contra células normais do paciente.

[00177] A presente descrição refere-se também a receptores de células T (TCRs) que compreendem uma cadeia alfa e uma cadeia beta (TCRs alfa/beta). Também são fornecidos peptídeos de acordo com a invenção capazes de se ligar a TCR e anticorpos quando apresentados por uma molécula de MHC.

[00178] A presente descrição se refere também a fragmentos dos TCRs de acordo com a presente invenção que são capazes de se ligarem a um antígeno peptídico de acordo com a presente invenção quando estes são apresentados por uma molécula de HLA. O termo se refere em particular a fragmentos de TCR solúveis (por exemplo, TCRs sem as porções transmembrana e/ou sem as regiões constantes, TCRs de cadeia única e fusões dos mesmos, por exemplo, com imunoglobulinas).

[00179] A presente descrição refere-se também a ácidos nucleicos, vetores e células hospedeiras para expressão de TCRs e peptídeos da presente descrição, assim como a métodos de usar os mesmos.

[00180] O termo "receptor de células T" (abreviatura TCR) refere-se a uma molécula heterodimérica que compreende uma cadeia polipeptídica alfa (cadeia alfa) e uma cadeia polipeptídica beta (cadeia beta), na qual o receptor heterodimérico é capaz de se ligar a um antígeno peptídico apresentado por uma molécula de HLA. O termo também inclui os chamados TCRs gama/delta.

[00181] Em uma modalidade, a descrição fornece um método de produção de um TCR conforme aqui descrito, sendo que o método compreende cultivar células hospedeiras capazes de expressar o TCR em condições apropriadas para promover a expressão do TCR.

[00182] Em outro aspecto, a descrição refere-se a métodos de acordo com a presente descrição, sendo que o antígeno é carregado em moléculas de MHC classe I ou II expressas na superfície de uma célula apresentadora de antígenos apropriada ou de uma célula apresentadora de antígenos artificial colocando-se uma quantidade suficiente do antígeno em contato com uma célula apresentadora de antígenos ou o antígeno é carregado em tetrâmetros de MHC classe I ou II por meio da tetramerização de monômeros de complexos de MHC classe I ou II com antígenos.

[00183] As cadeias alta e beta dos TCRs alfa/beta e as cadeias gama e delta dos TCRs gama/delta são geralmente consideradas como possuindo dois "domínios" cada: o domínio variável e o domínio constante. O domínio variável consiste na concatenação de uma região variável (V) com uma região juncional (J). O domínio variável também pode incluir uma região líder (L), e as cadeias beta e delta também podem apresentar uma região de diversidade (D). Os domínios constantes das cadeias alfa e beta também podem incluir domínios transmembrana C-terminais que ancoram as cadeias alfa e beta à membrana celular.

[00184] Em relação aos TCRs gama/delta, o termo "domínio variável do TCR gama" conforme aqui utilizado refere-se à concatenação da região gama V do TCR (TRGV) sem região líder (L) com a região TCR gama J (TRGJ), e o termo TCR gama de domínio constante refere-se à região extracelular do TRGC ou a uma sequência de TRGC com truncamento C-terminal. Da mesma forma, o termo "domínio variável de TCR delta" refere-se à concatenação da região TCR delta V (TRDV)

sem região líder (L) com a região TCR delta D/J (TRDD/TRDJ), e o termo "domínio constante do TCR delta" refere-se à região extracelular do TRDC ou a uma sequência de TRDC com truncamento C-terminal.

[00185] Os TCRs da presente invenção se ligam preferivelmente a um complexo de peptídeo com HLA com afinidade de ligação (K_D) de cerca de 100 µM ou menos, cerca de 50 µM ou menos, cerca de 25 µM ou menos ou cerca de 10 µM ou menos. São mais preferíveis os TCRs de alta afinidade cujas afinidades de ligação sejam de aproximadamente 1 µM ou menos, cerca de 100 nM ou menos, cerca de 50 nM ou menos ou cerca de 25 nM ou menos. São exemplos não limitantes dos intervalos de afinidade de ligação preferidos de TCRs da presente invenção cerca de 1 nM a cerca de 10 nM; cerca de 10 nM a cerca de 20 nM; cerca de 20 nM a cerca de 30 nM; cerca de 30 nM a cerca de 40 nM; cerca de 40 nM a cerca de 50 nM; cerca de 50 nM a cerca de 60 nM; cerca de 60 nM a cerca de 70 nM; cerca de 70 nM a cerca de 80 nM; cerca de 80 nM a cerca de 90 nM; e cerca de 90 nM a cerca de 100 nM.

[00186] Conforme aqui utilizado em relação aos TCRs da presente descrição, "ligação específica" e variações gramaticais do termo são usados para designar um TCR com afinidade de ligação (K_D) de 100 µM ou menos para um complexo de HLA com peptídeo.

[00187] Os TCRs alfa/beta heterodiméricos da presente descrição podem ter uma ligação dissulfeto introduzida entre seus domínios constantes. Os TCRs preferidos deste tipo incluem aqueles com uma sequência de domínio TRAC constante e uma sequência de TRBC1 ou TRBC2 constante, exceto que a Tre 48 do TRAC e a Ser 57 do TRBC1 ou TRBC2 são substituídas por resíduos de cisteína, e essas cisteínas formam uma ponte dissulfeto entre a sequência de domínio constante do TRAC e a sequência de domínio constante do TRBC1 ou TRBC2 do TCR.

[00188] Com ou sem a introdução da ligação entre cadeias mencionada anteriormente, os TCRs alfa/beta heterodiméricos da presente descrição podem apresentar um domínio com sequência constante codificado pelo gene TRAC e um domínio TRBC1 ou TRBC2 com sequência constante, e as sequências do domínio constante TRAC e dos domínios constantes TRBC1 ou TRBC2 do TCR podem ser ligadas uma à outra pela ligação dissulfeto nativa entre a Cis4 do éxon 2 da TRAC e a Cis2 do éxon 2 da TRBC1 ou da TRBC2.

[00189] Os TCRs da presente descrição podem compreender um marcador detectável, selecionado do grupo formado por um radionuclídeo, um fluoróforo e biotina. Os TCRs da presente descrição podem ser conjugados com um agente terapeuticamente ativo, como um radionuclídeo, um agente quimioterápico ou uma toxina.

[00190] Em uma modalidade, um TCR da presente descrição que apresenta pelo menos uma mutação na cadeia alfa e/ou pelo menos uma mutação na cadeia beta exibe glicosilação modificada em comparação com o TCR sem mutação.

[00191] Em uma modalidade, um TCR que compreende pelo menos uma mutação na cadeia alfa do TCR e/ou na cadeia beta do TCR possui afinidade de ligação por e/ou meia-vida de ligação a um complexo de peptídeo com molécula de HLA que corresponde a pelo menos o dobro da de um TCR que compreende a cadeia alfa não mutante do TCR e/ou a cadeia beta não-mutante do TCR. A melhora da afinidade de TCRs específicos para tumores e sua exploração depende da existência de uma janela na qual o TCR apresenta máxima afinidade. A existência dessa janela baseia-se em observações de que TCRs específicos para patógenos restritos por HLA-A2 geralmente possuem valores de K_D 10 vezes menores que os de TCRs específicos para autoantígenos associados a tumor restritos por HLA-A2. Sabe-se atualmente que, embora os antígenos tumorais tenham potencial imunogênico, apenas

proteínas mutantes ou cujo processamento pós-tradução foi alterado serão consideradas estranhas pelo sistema imune; afinal, os tumores se originam de células do próprio indivíduo. Os antígenos sobrerregulados ou sobrexpressos (os chamados autoantígenos) nem sempre induzem uma resposta imune funcional contra o tumor. As células T que expressam TCRs reativos a esses antígenos são selecionadas negativamente no timo por um processo conhecido como tolerância central, que permite a sobrevida apenas de células T com TCRs de baixa afinidade para autoantígenos. Portanto, a afinidade dos TCRs ou de variantes da presente descrição dos peptídeos pode ser melhorada por métodos bem conhecidos na técnica.

[00192] A presente descrição se refere também a um método de identificação de isolamento de um TCR de acordo com a presente invenção, sendo que o referido método compreende a incubação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de doadores negativos para HLA-A*02 com monômeros de peptídeo-A2, incubação das CMSPs com ficoeritrina tetramérica (PE) e isolamento das células T que apresentam avidez elevada por separação celular ativada por fluorescência (FACS)-Calibur.

[00193] A presente descrição refere-se também a um método de identificação e isolamento de TCR de acordo com a presente descrição, sendo que o referido método compreende a obtenção de um camundongo transgênico portador da totalidade dos lócus do gene TCRαβ humano (1,1 e 0,7 Mb), no qual as células T expressam um repertório diversificado de TCRs humanos, o que compensa a deficiência de TCR de camundongo e imuniza o animal com o peptídeo de interesse; refere-se também à incubação de CMSP obtidas de camundongos transgênicos com ficoeritrina tetramérica (PE) e isolamento de células T de alta avidez por uma técnica de separação de células ativada por fluorescência denominada FACS-Calibur.

[00194] Em um aspecto, para obter células T que expressem TCRs da presente descrição, realiza-se a clonagem de ácidos nucleicos que codificam as cadeias TCR-alfa e/ou TCR-beta da presente descrição em vetores de expressão, como retrovírus gama ou lentivírus. Uma vez gerados, os vírus recombinantes têm sua funcionalidade testada, incluindo especificidade para antígenos e avidez funcional. Em seguida, uma alíquota do produto final é utilizada para transdução da população de células T alvo (geralmente purificada de CMSP do paciente), que é então expandida antes de ser infundida no paciente.

[00195] Em outro aspecto, para se obter TCRs que expressam células T da presente descrição, RNAs de TCR são sintetizados por meio de procedimentos conhecidos na técnica, por exemplo sistemas de transcrição *in vitro*. Os RNAs de TCRs sintetizados *in vitro* são então introduzidos em células T CD8+ primárias obtidas de doadores saudáveis por eletroporação para que reexpressem as cadeias TCR-alfa e/ou TCR-beta específicas para tumores.

[00196] Para aumentar a expressão, os ácidos nucleicos que codificam os TCRs da presente descrição podem ser ligados operacionalmente a promotores fortes, tais como repetição terminal longa (LTRs) em retrovírus, citomegalovírus (CMV), vírus de células tronco murinas (MSCV) U3, fosfoglicerato quinase (PGK), β-actina, ubiquitina e um promotor composto de vírus símio 40 (SV40)/CD43, fator de alongamento (EF)-1a e o promotor do vírus formador de foco esplênico (SFFV). Em uma modalidade preferida, o promotor é heterólogo em relação ao ácido nucleico expresso.

[00197] Além dos promotores fortes, os cassetes de expressão de TCR da presente descrição podem conter outros elementos que podem incentivar a expressão de transgenes, tais como um trato central de polipurina (cPPT), que promove a translocação central de estruturas lentivirais (Follenzi *et al.*, 2000), e o elemento regulatório pós-

transcricional do vírus da hepatite da marmota (wPRE), que aumenta os níveis da expressão do transgene ao melhorar a estabilidade do RNA (Zufferey *et al.*, 1999).

[00198] As cadeias alfa e beta de um TCR da presente invenção podem ser codificadas por ácidos nucleicos localizados em vetores separados ou por polinucleotídeos localizados no mesmo vetor.

[00199] Para obter níveis elevados de expressão superficial de TCR, tanto a cadeia TCR-alfa como a TCR-beta do TCR introduzido precisam ser transcritas em volumes elevados. Isso requer que as cadeias TCR-alfa e TCR-beta da presente descrição sejam clonadas com formação de estruturas bicistrônicas em um único vetor, o que se mostrou suficiente para superar esse obstáculo. O uso de um sítio de entrada intra-ribossômico de origem viral (IRES) entre as cadeias TCR-alfa e TCR-beta induz a expressão coordenada das duas cadeias, pois nesse caso as cadeias TCR-alfa e TCR-beta são ambas geradas a partir de um único produto de transcrição, que é clivado em duas proteínas durante a tradução, garantindo que as cadeias TCR-alfa e TCR-beta sejam produzidas em proporção equimolar (Schmitt *et al.*, 2009).

[00200] Os ácidos nucleicos que codificam os TCRs da presente descrição podem ser otimizados ao nível de seus códons para aumentar a expressão em uma célula hospedeira. O código genético é redundante e permite que alguns aminoácidos sejam codificados por mais de um códon, mas alguns códons são menos adequados que outros devido a fatores como, por exemplo, a disponibilidade relativa dos tRNAs correspondentes (Gustafsson *et al.*, 2004). Demonstrou-se que a modificação das sequências dos genes TCR-alfa e TCR-beta de modo que cada aminoácido seja codificado pelo códon ideal para expressão em genes de mamíferos e de modo a eliminar a instabilidade de motivos ou de sítios de splicing crípticos aumenta significativamente a expressão de genes de TCR-alfa e TCR-beta (Scholten *et al.*, 2006).

[00201] Além disso, erros de pareamento entre a cadeia de TCR endógena e a cadeia de TCR introduzida podem criar especificidades que acarretam risco significativo de autoimunidade. Por exemplo, a formação de dímeros mistos de TCR pode reduzir o número de moléculas CD3 disponíveis para formar complexos TCR devidamente pareados, o que diminui significativamente a avidez funcional das células que expressam o TCR introduzido (Kuball *et al.*, 2007).

[00202] Para reduzir erros de pareamento, pode-se modificar o domínio C-terminal das cadeias do TCR apresentadas na presente descrição a fim de promover afinidade entre cadeias e, ao mesmo tempo, reduzir a capacidade das cadeias introduzidas de emparelhar com o TCR endógeno. Essas estratégias podem consistir em substituição dos domínios C-terminais de TCR-alfa e TCR-beta humanos por seus correspondentes murinos (domínio C-terminal murinizado), geração de uma segunda ponte dissulfeto entre as cadeias no domínio C-terminal introduzindo-se um segundo resíduo de cisteína tanto na cadeia TCR-alfa como na cadeia TCR-beta do TCR introduzido (modificação por cisteína), troca de resíduos que interagem nos domínios C-terminais das cadeias TCR-alfa TCR-beta ("knob in hole") e fusão dos domínios variáveis das cadeias TCR-alfa e TCR-beta diretamente no CD3ζ (fusão de CD3ζ) (Schmitt *et al.*, 2009).

[00203] Em uma modalidade, uma célula hospedeira é modificada para expressar um TCR da presente descrição. Em algumas configurações preferidas, a célula hospedeira é uma célula T humana ou um progenitor de célula T. Em algumas configurações, a célula T ou a célula progenitora de célula T é obtida de um paciente com câncer. Em outras configurações, a célula T ou a célula progenitora de célula T é obtida de um doador saudável. As células hospedeiras da presente descrição podem ser alogênicas ou autólogas em relação ao paciente a ser tratado. Em uma modalidade a célula hospedeira é uma célula T

gama/delta transformada para expressar um TCR alfa/beta.

[00204] Uma "composição farmacêutica" significa uma composição apropriada para administração a um ser humano em um ambiente clínico. Preferivelmente, a composição farmacêutica é estéril e produzida de acordo com as diretrizes de Boas Práticas de Fabricação.

[00205] As composições farmacêuticas compreendem os peptídeos tanto em forma livre como na forma de um sal farmaceuticamente aceitável (ver também o texto anterior). Conforme aqui utilizado, "sal farmaceuticamente aceitável" refere-se a um derivado dos peptídeos divulgados onde o peptídeo é modificado elaborando-se sais ácidos ou básicos do agente. Por exemplo, os sais ácidos são preparados a partir da base livre (geralmente onde a forma neutra da droga possui um grupamento NH_2 neutro) envolvendo reação com um ácido apropriado. Os ácidos apropriados para preparar sais ácidos podem ser ácidos orgânicos (por exemplo ácido acético, ácido propiônico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malônico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinâmico, ácido mandélico, ácido metanossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido p-toluenossulfônico, ácido salicílico e assemelhados) ou inorgânicos (por exemplo ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico e assemelhados). Por outro lado, a preparação de sais básicos de grupamentos ácidos que podem estar presentes em um peptídeo usa uma base farmaceuticamente aceitável como hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de amônia, hidróxido de cálcio, trimetilamina ou assemelhados.

[00206] Em uma modalidade especialmente preferida, as composições farmacêuticas compreendem os peptídeos na forma de sais do ácido acético (acetatos), de trifluoracetatos ou do ácido clorídrico (cloretos).

[00207] Preferivelmente, o medicamento da presente invenção é um imunoterápico como uma vacina. Ela pode ser administrada ao paciente, seja no órgão afetado ou por via sistêmica i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. ou aplicada *ex vivo* em células derivadas do paciente ou de linhagens celulares humanas que são posteriormente administradas ao paciente ou usadas *in vitro* para selecionar uma subpopulação de células imunes derivadas do paciente, que são então readministradas ao paciente. Se o ácido nucleico for administrado a células *in vitro*, pode ser útil que as células sejam transfectadas para que coexpressem citoquinas imunoestimulatórias como a interleucina 2. O peptídeo pode ser basicamente puro ou associado a um adjuvante imunoestimulatório (ver adiante) ou usado em associação com citoquinas imunoestimulatórias ou ser administrado por um sistema de administração apropriado como, por exemplo, lipossomos. O peptídeo também pode ser conjugado com um transportador apropriado, como a hemocianina de lapa (KLH, "keyhole limpet hemocyanin") ou manana (ver WO 95/18145 e (Longenecker *et al.*, 1993)). O peptídeo também pode ser marcado por uma proteína de fusão ou ser uma molécula híbrida. Espera-se que os peptídeos cujas sequências são mostradas na presente invenção sejam capazes de estimular células T CD4 ou CD8. Entretanto, a estimulação de células T CD8 é mais eficiente na presença do auxílio proporcionado por células T auxiliares CD4. Portanto, para epitopos de MHC classe I que estimulam células T CD8, o elemento de fusão ou seções de uma molécula híbrida proporcionam epitopos de maneira apropriada, que estimulam células T CD4-positivas. Os epitopos estimulantes de CD4 e CD8 são bem conhecidos na técnica e incluem aqueles identificados na presente invenção.

[00208] Em um aspecto, a vacina compreende pelo menos um peptídeo cuja sequência de aminoácidos é apresentada em SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268 e pelo menos mais um peptídeo, preferivelmente de 2 a

50, mais preferivelmente de 2 a 25, ainda mais preferivelmente de 2 a 20 e, mais preferivelmente de todos, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 peptídeos. Os peptídeos podem ser derivados de um ou mais AATs específicos e podem se ligar a moléculas de MHC classe I.

[00209] Outro aspecto da invenção proporciona um ácido nucleico (por exemplo, um polinucleotídeo) que codifica um peptídeo ou variante de um peptídeo da invenção. O polinucleotídeo pode ser, por exemplo, DNA, cDNA, PNA, RNA ou combinações dos mesmos, tanto de fita única como de dupla fita, ou formas nativas ou estabilizadas de polinucleotídeos como, por exemplo, polinucleotídeos com uma cadeia básica de fosforotioato, e pode ou não conter íntrons, contanto que codifique o peptídeo. Evidentemente, apenas peptídeos que contenham os resíduos de aminoácidos que ocorrem naturalmente e unidos por ligações peptídicas que ocorrem naturalmente podem ser codificados por um polinucleotídeo. Outro aspecto da invenção fornece um vetor de expressão capaz de expressar um polipeptídeo de acordo com a invenção.

[00210] Diversos métodos foram desenvolvidos para ligar polinucleotídeos, sobretudo de DNA, a vetores usando, por exemplo, terminações coesivas complementares. Por exemplo, trechos de homopolímeros complementares podem ser adicionados ao segmento de DNA a ser inserido no DNA do vetor. Em seguida, o vetor e o segmento de DNA são unidos pela ponte de hidrogênio entre as caudas homopoliméricas complementares para formar moléculas de DNA recombinante.

[00211] Ligantes sintéticos que contêm um ou mais sítios de restrição constituem um método alternativo de unir o segmento de DNA aos vetores. Ligantes sintéticos contendo diversos sítios de endonucleases de restrição estão disponíveis comercialmente de diversas fontes, tais

como a International Biotechnologies Inc. (New Haven, CN, EUA).

[00212] Um método desejável de modificar o DNA que codifica o polipeptídeo da invenção usa a reação em cadeia de polimerase, conforme descrita por Saiki RK, *et al* (1988). Esse método pode ser usado introduzindo-se DNA em um vetor apropriado, por exemplo, mediante engenharia de sítios de restrição apropriados, ou para modificar o DNA de outras formas úteis, como é conhecido na técnica. Se forem usados vetores virais, são preferidos os vetores de varíola ou adenovírus.

[00213] O DNA (ou RNA, no caso de vetores retrovirais) pode então ser expresso em um hospedeiro apropriado para produzir um polipeptídeo que compreende um peptídeo da invenção ou variante do mesmo. Portanto, o DNA que codifica o peptídeo da invenção ou variante do mesmo pode ser usado de acordo com técnicas conhecidas e modificado apropriadamente conforme aqui ensinado para construir um vetor de expressão, que é então utilizado para transformar uma célula hospedeira apropriada e produzir o polipeptídeo da invenção. Tais técnicas incluem as divulgadas nas, por exemplo, em US 4.440.859, 4.530.901, 4.582.800, 4.677.063, 4.678.751, 4.704.362, 4.710.463, 4.757.006, 4.766.075 e 4.810.648.

[00214] O DNA (ou, no caso de vetores retrovirais, RNA) que codifica o polipeptídeo que constitui o composto da invenção pode ser unido a várias outras sequências de DNA para introdução em um hospedeiro apropriado. O DNA acompanhante dependerá da natureza do hospedeiro, do modo como o DNA é introduzido no hospedeiro e em se o desejado é a manutenção epissômica ou a integração.

[00215] Em geral, o DNA é inserido em um vetor de expressão como um plasmídio na orientação correta e no "frame" de leitura correto para expressão. Se necessário, o DNA pode ser ligado às sequências de nucleotídeos de controle regulatória da transcrição e tradução

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

[00216] Como alternativa, o gene para tal característica selecionável pode estar em outro vetor, que é usado conjuntamente para transformar a célula hospedeira desejada.

[00217] As células hospedeiras transformadas pelo DNA recombinante da invenção são então cultivadas por um período de tempo suficiente e sob condições apropriadas, bem conhecidas dos versados na técnica em vista dos ensinamentos aqui divulgados, para permitir a expressão do polipeptídeo, que poderá então ser recuperado.

[00218] Muitos vetores de expressão são conhecidos, incluindo bactérias (por exemplo *E. coli* e *Bacillus subtilis*), leveduras (por exemplo *Saccharomyces cerevisiae*), fungos filamentosos (por exemplo *Aspergillus sp.*), células vegetais, células animais e células de insetos. Preferivelmente, o sistema pode consistir em células mamíferas como células CHO disponibilizadas pela ATCC Cell Biology Collection.

[00219] Um vetor plasmídio típico para expressão constitutiva em célula mamífera compreende o promotor de CMV ou SV40 com uma cauda poli-A apropriada e um marcador de resistência como a neomicina. Um exemplo é o pSVL, disponibilizado pela Pharmacia (Piscataway, NJ, EUA). Um exemplo de vetor de expressão induzível para células mamíferas é o pMSG, também fornecido pela Pharmacia. O pRS403-406 e o pRS413-416 são vetores plasmídicos úteis, que são

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

[00220] A região regulatória promotora forte do citomegalovírus humano (CMV) promove a expressão de níveis constitutivos de proteína de até 1 mg/L em células COS. Em linhagens celulares menos potentes, os níveis proteicos são geralmente de cerca de 0,1 mg/L. A presença da origem de replicação do SV40 proporciona níveis elevados de replicação de DNA em células COS que permitem a replicação de SV40. Os vetores de CMV podem conter, por exemplo, a origem pMB1 (derivada de pBR322) para permitir a replicação em células bacterianas, o gene de β-lactamase para seleção de resistência à ampicilina em bactérias, poli-A de hGH e a origem f1. Os vetores que contêm a sequência líder de preprotripsina (PPT) podem direcionar a secreção de proteínas de fusão FLAG no meio de cultura para purificação mediante o uso de anticorpos anti-FLAG, resinas e placas. Outros vetores e sistemas de expressão são bem conhecidos na técnica para emprego com diversas células hospedeiras.

[00221] Em outra modalidade, dois ou mais peptídeos ou variantes de peptídeos da invenção são codificados e, portanto, expressos em

ordem sucessiva, numa estrutura semelhante a "contas em um colar". Ao fazê-lo, os peptídeos ou variantes de peptídeos podem ser ligados ou fundidos por trechos de aminoácidos ligantes, como, por exemplo, LLLLLL, ou podem ser ligados um ao outro sem nenhum outro peptídeo entre eles. Essas estruturas podem ser usadas para tratamento do câncer e podem induzir respostas imunes que envolvem tanto MHC I como MHC II.

[00222] A presente invenção refere-se também a uma célula hospedeira transformada por uma estrutura de vetor polinucleotídeo da presente invenção. A célula hospedeira pode ser procariota ou eucariota. As células bacterianas, que podem ser, preferivelmente, procariotas em algumas situações e normalmente são uma cepa de *E. coli* como, por exemplo, as cepas de *E. coli* DH5 fornecidas por Bethesda Research Laboratories Inc. (Bethesda, MD, EUA) e RR1, fornecidas pela American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, EUA) (ATCC Nº 31343). As células eucariotas preferidas são as de levedura, inseto e mamífero, preferivelmente células de vertebrados como camundongo, rato, macaco ou linhagens celulares de fibroblastos ou cólon humano. São células hospedeiras de levedura YPH499, YPH500 e YPH501, que são geralmente disponibilizadas por Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, EUA). São células preferidas de hospedeiros mamíferos as de ovário de hamster chinês (CHO) fornecidas pela ATCC sob o número CCL61, células embrionárias NIH/3T3 de camundongo suíço do NIH fornecidas pela ATCC sob o número CRL 1658, células COS-1 derivadas de rim de macaco fornecidas pela ATCC sob o número CRL 1650 e células HEK-293 derivadas de rim embrionário humano. As células de inseto preferidas são as células Sf9, que podem ser transfectadas por vetores de expressão baseados em baculovírus. Uma visão geral da escolha de células hospedeiras apropriadas para expressão é apresentada, por

exemplo, no livro-texto de Paulina Balbás e Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols, Part One, Second Edition," ISBN 978-1-58829-262-9 e em outras publicações conhecidas dos versados na técnica.

[00223] A transformação de células hospedeiras apropriadas por uma estrutura de DNA da presente invenção é realizada por métodos bem conhecidos na técnica, que normalmente dependem do tipo de vetor utilizado. Em relação à transformação de células hospedeiras procariotas, ver, for exemplo, Cohen *et al.* (1972) e (Green and Sambrook, 2012). A transformação de células de levedura foi descrita por Sherman *et al.* (1986) - O método de Beggs (1978) também é útil. A Stratagene Cloning Systems e a Life Technologies Inc. (Gaithersburg, MD 20877, EUA) fornecem reagentes úteis para transfectar células de vertebrados (por exemplo fosfato de cálcio, DEAE-dextrana e formulações de lipossomos). A eletroporação também pode ser usada para transformar e/ou transfectar células e é bem conhecida na técnica como processo transformante de células de leveduras, células de bactérias, células de insetos e células de vertebrados.

[00224] As células cuja transformação foi bem-sucedida, isto é, células contendo uma estrutura de DNA da presente invenção, podem ser identificadas por técnicas bem conhecidas, como PCR. Alternativamente, a presença de proteínas no sobrenadante pode ser detectada usando-se anticorpos.

[00225] Perceber-se-á que algumas células hospedeiras da invenção são úteis na preparação dos peptídeos da invenção, como, por exemplo, células bacterianas, de levedura e de inseto. Entretanto, outras células hospedeiras podem ser úteis em determinados métodos terapêuticos. Por exemplo, células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, podem ser utilizadas com proveito para expressar os peptídeos da invenção de forma que possam ser

carregados em moléculas de MHC apropriadas. Portanto, a presente invenção fornece uma célula hospedeira que compreende um ácido nucleico ou um vetor de expressão de acordo com a invenção.

[00226] Em uma modalidade preferida, a célula hospedeira é uma célula apresentadora de antígenos, podendo ser uma célula dendrítica ou outra célula apresentadora de antígenos. Em 29 de abril de 2010, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou o sipuleucel-T, que consiste em CAAs carregadas com uma proteína de fusão recombinante que contém fosfatase ácida prostática (PAP), para tratamento de CPRC assintomático ou oligossintomático (Rini *et al.*, 2006; Small *et al.*, 2006).

[00227] Outro aspecto da invenção fornece um método de produção de um peptídeo ou de uma variante do mesmo, sendo que o método compreende o cultivo de uma célula hospedeira descrita e isolamento do peptídeo da célula hospedeira ou do meio de cultura da mesma.

[00228] Em outra modalidade, o peptídeo, o ácido nucleico ou o vetor de expressão da invenção são usados em medicina. Por exemplo, o peptídeo ou uma variante do mesmo podem ser preparados para injeção intravenosa (i.v.), injeção subcutânea (s.c.), injeção intradérmica (i.d.), injeção intraperitoneal (i.p.) ou injeção intramuscular (i.m.). Os métodos preferidos de injeção de peptídeos são s.c., i.d., i.p., i.m. e i.v. Os métodos preferidos de injeção de DNA são i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. Doses de, por exemplo, 50 µg a 1,5 mg e, preferivelmente 125 µg a 500 µg de peptídeo ou DNA, podem ser administradas, dependendo do peptídeo ou do DNA em questão. O uso de doses nesse intervalo já foi bem-sucedido em ensaios clínicos (Walter *et al.*, 2012).

[00229] O polinucleotídeo usado para vacinação ativa pode ser basicamente puro ou ser encerrado em um sistema apropriado de vetor ou de transporte. Os ácidos nucleicos podem ser DNA, cDNA, PNA, RNA ou uma combinação dos mesmos. Os métodos usados para projetar e introduzir tais ácidos nucleicos são bem conhecidos na

técnica. Uma visão geral é apresentada em, por exemplo, Teufel *et al.* (2005) Vacinas de polinucleotídeos são fáceis de preparar, mas o modo de ação pelo qual esses vetores induzem uma resposta imune não é totalmente compreendido. Os vetores e sistemas de administração apropriados utilizam DNA e/ou RNA viral, tais como sistemas baseados em adenovírus, vírus da vacínia, retrovírus, herpesvírus, vírus associados ao adenovírus ou híbridos contendo elementos de mais de um vírus. Alguns sistemas não virais consistem em lipídios catiônicos e polímeros catiônicos, que são bem conhecidos na técnica de administração de DNA. A administração física por dispositivos como o "gene gun" (canhão gênico) também pode ser usada. O(s) peptídeo(s) codificado(s) pelos ácidos nucleicos pode(m) ser uma proteína de fusão, por exemplo, com um epitopo que estimula as células T do respectivo CDR oposto, conforme descrito anteriormente.

[00230] O medicamento da invenção também pode incluir um ou mais adjuvantes. Os adjuvantes são substâncias que promovem ou potencializam de maneira inespecífica a resposta imune (por exemplo a resposta imune mediada por células T CD8-positivas e células T auxiliares (TH)) contra um antígeno e que, portanto, seriam consideras úteis no medicamento da presente invenção. Alguns adjuvantes apropriados são, entre outros, 1018 ISS, sais de alumínio, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870.893, CpG7909, CyaA, dSLIM, flagelina ou ligantes TLR5 derivados da flagelina, ligante FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, imiquimode (ALDARA®), resiquimode, ImuFact IMP321, interleucinas como IL-2, IL-13, IL-21, interferons alfa ou beta ou derivados peguilados dos mesmos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, monofosforil lipídio A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsões de água-em-óleo ou óleo-em-água, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vetor PepTel®, micropartículas à base de

poli(lactídeo coglicolídeo) [PLG] e dextrana, talactoferrina, SRL172, virossomas e outras partículas semelhantes a vírus, YF-17D, armadilha de VEGF, R848, beta-glucana, Pam3Cys, estimulon QS21 de Áquila (derivado da saponina), extratos micobacterianos e simuladores da parede celular bacteriana e outros adjuvantes exclusivos como Ribi's Detox, Quil ou Superfos. São preferidos adjuvantes como o de Freund ou GM-CSF. Vários adjuvantes imunológicos (por exemplo MF59) específicos para células dendríticas e suas preparações já foram descritos anteriormente (Allison and Krummel, 1995). Citoquinas também podem ser usadas. Várias citoquinas (por exemplo TNF) foram associadas diretamente à influência sobre a migração de células dendríticas para tecidos linfoides, acelerando a maturação de células dendríticas de modo a formar células apresentadoras de antígenos que interagem de forma eficiente com linfócitos T (por exemplo GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Pat. EUA Nº 5.849.589, que fica específica e integralmente incorporada por referência) e que possuam atividade imunoadjuvante (por exemplo IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa e IFN-beta) (Gabrilovich *et al.*, 1996).

[00231] Descreveu-se também que os oligonucleotídeos CpG imunoestimulatórios podem potencializar os efeitos dos adjuvantes em situações vacinais. Sem restringir-se a nenhuma teoria, os oligonucleotídeos CpG agem ativando o sistema imune inato (não adaptativo) por meio de receptores do tipo Toll (TLR, "Toll-like receptors"), especialmente o TLR9. A ativação de TLR9 desencadeada pelo CpG promove respostas humorais e celulares específicas contra diversos antígenos, incluindo antígenos peptídicos ou proteicos, vírus vivos ou mortos, vacinas de células dendríticas, vacinas celulares autólogas e conjugados de polissacarídeos, em vacinas tanto profiláticas como terapêuticas. Ainda mais importante, o CpG promove a maturação e diferenciação de células dendríticas, ativando de células

TH1 e induzindo fortemente a geração de linfócitos T citotóxicos (LTC), mesmo na ausência de auxílio de células T CD4. O viés para TH1 induzido pela estimulação por TLR9 se mantém mesmo na presença de adjuvantes vacinais, tais como o alúmen ou o adjuvante de Freund incompleto (IFA), que normalmente promovem um viés para TH2. Os oligonucleotídeos CpG apresentam atividade adjuvante ainda mais acentuada quando formulados ou coadministrados com outros adjuvantes ou em formulações como micropartículas, nanopartículas, emulsões lipídicas ou formulações semelhantes, que são especialmente necessárias para induzir uma resposta acentuada a antígenos relativamente fracos. Eles também aceleram a resposta imune, permitindo reduzir as doses de antígenos em cerca de duas ordens de grandeza e obter uma resposta de anticorpos comparável à obtida com a dose plena da vacina sem CpG em alguns experimentos (Krieg, 2006). US 6.406.705 B1 descreve a utilização combinada dos oligonucleotídeos CpG, adjuvantes que não consistem em ácidos nucleicos e um antígeno para induzir uma resposta imune antígeno-específica. Um antagonista de CpG TLR9 é o dSLIM ("double Stem Loop Immunomodulator"), produzido pela Mologen (Berlim, Alemanha), que é o componente preferido para a composição farmacêutica da presente invenção. Outras moléculas ligantes de TLR como o TLR 7, TLR 8 e/ou TLR 9 ligantes de RNA também podem ser utilizadas.

[00232] Outros exemplos não limitantes de adjuvantes úteis são CpGs modificados quimicamente (por exemplo CpR, Idera), análogos de dsRNA como o Poli(I:C) e derivados do mesmo (por exemplo AmpliGen®, Hiltonol®, poli-(ICLC), poli(IC-R) e poli(I:C12U)), DNA ou RNA bacteriano sem CpG e moléculas pequenas ou anticorpos com atividade imunológica como a ciclofosfamida, sunitinibe, bevacizumabe®, nsemble, NCX-4016, sildenafila, tadalafila, vardenafila, sorafenibe, temozolomida, temsirolimus, XL-999, CP-547632,

pazopanibe, armadilha de VEGF, ZD2171, AZD2171 e anti-CTLA4, outros anticorpos contra estruturas-chave do sistema imune (por exemplo anti-CD40, anti-TGF-beta e antirreceptor de TNF-α) e SC58175, que podem exercer ação terapêutica ou como adjuvantes. As quantidades e concentrações de adjuvantes e aditivos úteis no contexto da presente invenção podem ser determinadas facilmente e sem experimentação excessiva por indivíduos praticantes da técnica.

[00233] São adjuvantes preferidos o anti-CD40, imiquimode, resiquimode, GM-CSF, ciclofosfamida, sunitinibe, bevacizumabe, interferon alfa, oligonucleotídeos CpG e derivados, poli-(I:C) e derivados, RNA, sildenafila e formações particuladas com PLG ou virossomos.

[00234] Em uma modalidade preferida da composição farmacêutica de acordo com a invenção, o adjuvante é selecionado de um grupo formado por fatores estimuladores de colônias como o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamida, imiquimode, resiquimode e interferon alfa.

[00235] Em uma modalidade preferida da composição farmacêutica de acordo com a invenção, o adjuvante é selecionado de um grupo formado por fatores estimuladores de colônias como o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamida, imiquimode e resiquimode. Em uma modalidade preferida da composição farmacêutica de acordo com a invenção, o adjuvante é a ciclofosfamida, o e ou o resiquimode. São adjuvantes ainda mais preferidos o Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poli-ICLC (Hiltonol®) e anticorpos monoclonais anti-CD40 ou combinações dos mesmos.

[00236] Esta composição é administrada por via parenteral (por exemplo por via subcutânea, intradérmica, intramuscular ou oral). Para este fim, os peptídeos e, opcionalmente, outras moléculas, são

dissolvidos ou suspensos em um veículo farmaceuticamente aceitável, preferivelmente um veículo aquoso. A composição também pode conter excipientes como tampões, agentes de ligação, agentes abrasivos, diluentes, flavorizantes, lubrificantes, etc. Os peptídeos também podem ser administrados conjuntamente com substâncias estimuladoras do sistema imune, como as citoquinas. Uma ampla lista de excipientes que podem ser usados em tais composições pode ser encontrada em, por exemplo Handbook of Pharmaceutical Excipients (Kibbe, 2000). A composição pode ser usada para prevenção, profilaxia e/ou tratamento de doenças adenomatosas ou cancerosas. Podem-se encontrar formulações exemplares em, por exemplo, EP2112253.

[00237] Cabe ressaltar que a resposta imune produzida pela vacina de acordo com a invenção ataca o câncer em diferentes estágios celulares e em vários estágios de desenvolvimento. Além disso, outras vias de sinalização associadas com o câncer também são atacadas. Isso constitui uma vantagem em relação às vacinas que agem sobre apenas um ou sobre poucos alvos, pois o tumor pode se adaptar a esse tipo de ataque (escape tumoral) e nem todos os tumores expressam o mesmo padrão de antígenos. Por isso, uma combinação de vários peptídeos associados a tumores garante que todos os tumores apresentarão pelo menos alguns dos alvos. A composição foi projetada para tumores que expressem vários dos antígenos e age sobre diversas vias independentes necessárias para o crescimento e a manutenção do tumor. Portanto, a vacina pode ser usada sem individualização em uma população maior de pacientes. Isso significa que os pacientes a serem tratados com a vacina podem ser selecionados apenas por tipagem de HLA e não requerem análise de outros biomarcadores de expressão antigênica. Mesmo assim, a resposta imune induzida ataca vários alvos ao mesmo tempo, o que é importante para a eficácia (Banchereau *et al.*, 2001; Walter *et al.*, 2012).

[00238] Conforme aqui utilizado, o termo "scaffold" (arcabouço) designa uma molécula que se liga especificamente a um determinante (por exemplo antigênico). Em uma modalidade, o arcabouço é capaz de direcionar a entidade à qual está vinculado (por exemplo um (segundo) grupamento ligante de antígeno) a um sítio alvo como, por exemplo, um tipo específico de célula tumoral ou estroma tumoral que apresenta um determinante antigênico (por exemplo um complexo de peptídeo com MHC de acordo com a aplicação ora contemplada). Em outra modalidade, o arcabouço é capaz de ativar a sinalização por meio de seu antígeno alvo, que pode ser, por exemplo, um antígeno de um complexo receptor de células T. Os arcabouços incluem, entre outros, anticorpos e fragmentos dos mesmos, domínios ligantes de antígenos em um anticorpo, que compreendem uma região de cadeia pesada do anticorpo e uma região de cadeia leve do anticorpo, proteínas ligantes que compreendem pelo menos um motivo repetitivo de anquirina e molécula ligantes de antígenos de domínio único (SDAB), aptâmeros, TCRs (solúveis) e células (modificadas) como, por exemplo, células T alogênicas ou autólogas. Para avaliar se uma molécula funciona como arcabouço e se liga a um alvo, podem ser realizados ensaios de ligação.

[00239] Por ligação "específica", entende-se uma ligação na qual o arcabouço se liga ao complexo de peptídeo com MHC relevante melhor que a outros complexos de peptídeo com MHC, de modo que um arcabouço dotado de uma molécula ativa capaz de destruir uma célula portadora de um alvo específico não seja capaz de destruir outra célula que não possui o alvo específico mas apresenta outros complexos de peptídeo com MHC. A ligação a outros complexos de peptídeo com MHC é irrelevante quando o peptídeo do complexo de peptídeo com MHC que produz reação cruzada não ocorre naturalmente, isto é, não é derivado do peptidoma do HLA humano. Os ensaios de avaliação da morte de células-alvo são bem conhecidos na técnica e devem ser

realizados usando células-alvo (células primárias ou linhagens celulares) nas quais o complexo de peptídeo com MHC seja apresentado inalterado ou células carregadas com peptídeos de modo que se atinjam os níveis observados naturalmente de complexos de peptídeo com MHC.

[00240] Um arcabouço pode incluir uma marcação que permite detectá-lo por meio da determinação da presença ou não do sinal fornecido pelo marcador. Por exemplo, o arcabouço pode ser marcado por um corante fluorescente ou qualquer outra molécula marcadora celular pertinente. Tais moléculas marcadoras são bem conhecidas na técnica. Por exemplo, a marcação fluorescente proporcionada, por exemplo, por um corante fluorescente, pode permitir a visualização do aptâmero ligado por meio de microscopia de fluorescência ou de varredura a laser ou detecção por citometria de fluxo.

[00241] Os arcabouços podem ser conjugados com uma segunda molécula ativa como, por exemplo, IL-21, anti-CD3 e anti-CD28.

[00242] Para mais informações sobre arcabouços polipeptídicos, ver, por exemplo, a seção geral de WO 2014/071978A1 e as referências nela citadas.

[00243] A presente invenção refere-se também a aptâmeros. Os aptâmeros (ver, por exemplo, WO 2014/191359 e a literatura nela citada) são moléculas curtas de ácido nucleico de fita única, que podem se dobrar formando estruturas tridimensionais e reconhecer estruturas-alvo específicas. Eles parecem ser opções apropriadas para o desenvolvimento de terapias direcionadas. Os aptâmeros se mostraram capazes de se ligar a diversos alvos complexos de forma seletiva e com alta afinidade e especificidade.

[00244] Na última década, foram identificados aptâmeros que reconhecem moléculas da superfície celular e proporcionam meios para o desenvolvimento de abordagens diagnósticas e terapêuticas. Como

são praticamente atóxicos e não imunogênicos, os aptâmeros são candidatos promissores para aplicações biomédicas. Com efeito, aptâmeros como aqueles que reconhecem o antígeno prostático específico na membrana celular foram usados com sucesso como terapias direcionadas e demonstraram sua funcionalidade em modelos de xenoenxerto *in vivo*. Também foram identificados aptâmeros que reconhecem linhagens específicas de células tumorais.

[00245] Podem-se selecionar aptâmeros de DNA que revelem propriedades de reconhecimento de amplo espectro para várias células oncológicas, sobretudo aquelas derivadas de tumores sólidos, e que não reconheçam células não tumorigênicas nem células saudáveis primárias. Se os aptâmeros identificados interagissem com diversos tumores, em vez de reconhecer um subtipo tumoral específico, isso os tornaria úteis para o diagnóstico e tratamento dito de amplo espectro.

[00246] Além disso, pesquisas sobre o comportamento de ligação celular, realizadas por citometria de fluxo, também mostraram que os aptâmeros apresentaram excelentes afinidades aparentes na faixa de nanomoles.

[00247] Os aptâmeros podem ter aplicações diagnósticas e terapêuticas. Também foi demonstrado que alguns aptâmeros são captados por células tumorais e, portanto, podem funcionar como veículos moleculares para administração dirigida de agentes anticâncer (por exemplo siRNA) a células tumorais.

[00248] Podem-se selecionar aptâmeros contra alvos complexos como células, tecidos e complexos de peptídeos que compreendem ou, preferivelmente, que consistem em uma sequência de acordo com SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268 da invenção ora em pauta com a molécula de MHC usando a técnica de seleção cell-SELEX ("Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment").

[00249] Os peptídeos da presente invenção podem ser usados para

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

[00250] Portanto, constitui outro aspecto da invenção o fornecimento de um método de produção de um anticorpo recombinante que se ligue especificamente a um complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano classe I ou II que forme um complexo com um antígeno restrito por HLA (preferivelmente um peptídeo de acordo com a presente invenção), sendo que o método compreende: imunizar um mamífero não humano modificado por engenharia genética com células que expressam o referido complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano classe I ou II com uma forma solúvel de uma molécula de MHC classe I ou II que forme complexo com o referido antígeno restrito por HLA; isolar moléculas de mRNA de células produtoras de anticorpo do referido mamífero não humano; produzir uma biblioteca de exposição em fagos que exiba as moléculas de proteína codificadas pelas referidas moléculas de mRNA; e isolar ao menos um fago da referida biblioteca de exposição em fagos, sendo que o pelo menos um fago referido expõe o referido anticorpo e se liga especificamente ao referido complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano classe I ou II em complexo com o referido antígeno restrito por HLA.

[00251] Constitui, portanto, outro aspecto da presente invenção o fornecimento de um anticorpo que se ligue especificamente a um complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano classe I ou II em complexo com um antígeno restrito por HLA, no qual o anticorpo é preferivelmente um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um

anticorpo biespecífico ou um anticorpo quimérico.

[00252] Os respectivos métodos usados para produzir tais anticorpos e complexos principais de histocompatibilidade classe I de cadeia única, assim como outras ferramentas usadas para produzir tais anticorpos, são divulgados em WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 e em publicações (Cohen *et al.*, 2003a; Cohen *et al.*, 2003b; Denkberg *et al.*, 2003) que, para as finalidades da presente invenção, ficam aqui integralmente incorporadas por referência.

[00253] Preferivelmente, o anticorpo se liga ao complexo com afinidade inferior a 20 nanomolares, e preferivelmente inferior a 10 nanomolares, o que é também considerado "específico" no contexto da presente invenção.

[00254] A presente invenção refere-se a um peptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo formado por SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268 ou a uma variante dos mesmos com pelo menos 88% de homologia (preferivelmente idêntico) com SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268 ou uma variante da mesma que induz reação cruzada de células T com o referido peptídeo, sendo que o referido peptídeo não é o peptídeo completo subjacente.

[00255] A presente invenção refere-se ainda a um peptídeo que compreende uma sequência selecionada do grupo formado por SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268 ou uma variante das mesmas que seja pelo menos 88% homóloga (preferivelmente idêntico) à SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268, sendo que cada um dos peptídeos referidos ou variantes possui comprimento total de 8 a 100, preferivelmente de 8 a 30 e, mais preferivelmente que todos, de 8 a 14 aminoácidos.

[00256] A presente invenção refere-se também aos peptídeos de acordo com a invenção que possuem a capacidade de se ligarem a uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano classe I ou II.

[00257] A presente invenção refere-se também aos peptídeos de acordo com a presente invenção, nos quais o referido peptídeo consiste ou consiste essencialmente em uma sequência de aminoácidos de acordo com SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268.

[00258] A presente invenção refere-se também aos peptídeos de acordo com a invenção, sendo que o peptídeo é modificado quimicamente e/ou inclui ligações não peptídicas.

[00259] A presente invenção refere-se também aos peptídeos de acordo com a invenção, nos quais o peptídeo constitui parte de uma proteína de fusão, compreendendo em particular aminoácidos N-terminais da cadeia invariante associada ao antígeno do HLA-DR (Ii), ou nos quais o peptídeo é fundido a (ou incorporado à sequência de) um anticorpo, tal como, por exemplo, um anticorpo específico para células dendríticas.

[00260] A presente invenção refere-se também a um ácido nucleico que codifica os peptídeos de acordo com a invenção, conquanto tal peptídeo não seja uma proteína humana completa (total).

[00261] A presente invenção refere-se também ao ácido nucleico de acordo com a invenção que consista em DNA, cDNA, PNA, RNA ou combinações dos mesmos.

[00262] A presente invenção refere-se também a um vetor de expressão capaz de expressar um ácido nucleico de acordo com a presente invenção.

[00263] A presente invenção refere-se também a um peptídeo de acordo com a presente invenção, um ácido nucleico de acordo com a presente invenção ou um vetor de expressão de acordo com a presente invenção para emprego em medicina, em especial para o tratamento de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais.

[00264] A presente invenção refere-se também a uma célula

hospedeira que compreende um ácido nucleico de acordo com a invenção ou um vetor de expressão de acordo com a invenção.

[00265] A presente invenção refere-se também a células hospedeiras de acordo com a presente invenção, que sejam células apresentadoras de antígenos e, preferivelmente, células dendríticas.

[00266] A presente invenção refere-se também a um método de produção de um peptídeo de acordo com a presente invenção, sendo que o referido método compreende o cultivo da célula hospedeira de acordo com a presente invenção e o isolamento do peptídeo da referida célula hospedeira ou do meio de cultura da mesma.

[00267] A presente invenção refere-se também ao método de acordo com a presente invenção, sendo que o referido antígeno é carregado em moléculas de MHC classe I ou II expressas na superfície de uma célula apresentadora de antígenos apropriada colocando-se uma quantidade suficiente do antígeno em contato com uma célula apresentadora de antígenos.

[00268] A presente invenção refere-se também ao método de acordo com a presente invenção, sendo que a célula apresentadora de antígenos compreende um vetor de expressão capaz de expressar o referido peptídeo contendo SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268 ou a referida sequência variante de aminoácidos.

[00269] A presente invenção relaciona-se também com células T ativadas produzidas de acordo com o método da presente invenção, sendo que as referidas células T reconhecem seletivamente células com expressão aberrante de um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos de acordo com a presente invenção.

[00270] A presente invenção refere-se também a um método para destruir células-alvo em um paciente no qual as células-alvo expressam aberrantemente um polipeptídeo que compreende qualquer sequência de aminoácidos de acordo com a presente invenção, sendo que o

método compreende a administração ao paciente de um número eficaz de células T ativadas de acordo com a presente invenção.

[00271] A presente invenção refere-se também à utilização de qualquer um dos peptídeos descritos, de um ácido nucleico de acordo com a presente invenção, de um vetor de expressão de acordo com a presente invenção, de uma célula de acordo com a presente invenção ou de um linfócito T citotóxico ativado de acordo com a presente invenção como medicamento ou para fabricação de um medicamento. A presente invenção refere-se também a uma utilização de acordo com a presente invenção, onde o medicamento possui atividade anticâncer.

[00272] A presente invenção refere-se também a uma utilização de acordo com a invenção, na qual o medicamento é uma vacina. A presente invenção refere-se também a uma utilização de acordo com a invenção, onde o medicamento possui atividade anticâncer.

[00273] A presente invenção se refere também a um uso de acordo com a invenção, onde as referidas células cancerosas são células de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular ou carcinoma de células renais; outros tumores sólidos ou hematológicos como leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide crônica ou aguda; outras neoplasias linfoides como, por exemplo, linfoma não Hodgkin, distúrbios linfoproliferativos pós-transplante (DLPT); outras neoplasias mieloides como mielofibrose primária, trombocitopenia essencial, policitemia vera; e outras neoplasias como câncer de esôfago, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de pulmão de pequenas células, câncer de pâncreas, câncer de próstata, melanoma, câncer de mama, câncer da vesícula biliar, colangiocarcinoma, câncer de bexiga, câncer do útero, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e mesotelioma.

[00274] A presente invenção refere-se também a proteínas marcadoras específicas e a biomarcadores baseados nos peptídeos de

acordo com a presente invenção, doravante denominados "alvos", que podem ser utilizados para diagnóstico e/ou determinação do prognóstico de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais. A presente invenção refere-se também ao uso desses novos agentes para tratamento do câncer.

[00275] O termo "anticorpo" ou "anticorpos" é aqui utilizado em sentido amplo e inclui tanto anticorpos policlonais como monoclonais. Além de moléculas de imunoglobulina intactas ou "completas", o termo "anticorpos" abrange também fragmentos (por exemplo fragmentos CDRs, Fv, Fab e Fc) ou polímeros dessas moléculas de imunoglobulina e versões humanizadas de moléculas de imunoglobulina, conquanto apresente qualquer uma das propriedades desejadas (por exemplo ligação específica a (poli)peptídeos marcadores de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular ou carcinoma de células renais, transporte de uma toxina a uma célula de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular ou carcinoma de células renais que expresse um gene marcador tumoral em níveis mais elevados e/ou inibição da atividade de um peptídeo marcador de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço) de acordo com a invenção.

[00276] Sempre que possível, os anticorpos da invenção podem ser adquiridos de fontes comerciais. Os anticorpos da invenção também podem ser gerados usando-se métodos bem conhecidos. Os versados na técnica compreenderão que os polipeptídeos marcadores de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais (completos ou em fragmentos) podem ser usados para gerar os anticorpos da invenção. Um polipeptídeo para uso na geração de um anticorpo da invenção pode ser total ou parcialmente purificado a partir de uma fonte natural ou pode ser produzido usando-

se técnicas de DNA recombinante.

[00277] Por exemplo, um peptídeo que codifica cDNA de acordo com a presente invenção, tais como os peptídeos de acordo com SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268 ou uma variante ou fragmento do mesmo pode ser expresso em células procariotas (por exemplo, bactérias) ou eucariotas (por exemplo, células de leveduras, insetos ou mamíferos). Em seguida, a proteína recombinante pode ser purificada e usada para gerar uma preparação de anticorpos monoclonais ou policlonais que se ligam especificamente ao peptídeo marcador de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais usado para gerar o anticorpo de acordo com a invenção.

[00278] Os versados na técnica perceberão que a geração de dois ou mais conjuntos diferentes de anticorpos monoclonais ou policlonais maximiza a possibilidade de obter um anticorpo com a especificidade e a afinidade necessárias para o uso pretendido (por exemplo, ELISA, imuno-histoquímica, imagem *in vivo*, imunoterapia com toxinas). Os anticorpos foram testados usando-se métodos conhecidos para avaliar se possuíam a atividade desejada de acordo com o propósito para o qual os anticorpos serão usados (por exemplo, ELISA, imuno-histoquímica, imunoterapia, etc.; para mais informações sobre a geração e teste de anticorpos, consulte, por exemplo, Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014)). Por exemplo, os anticorpos podem ser testados em ensaios ELISA, western blot ou coloração imuno-histoquímica de cânceres fixados em formalina ou cortes de tecido congelado. Após serem caracterizados inicialmente *in vitro*, os anticorpos destinados a emprego terapêutico ou diagnóstico *in vivo* são testados de acordo com métodos bem conhecidos de ensaio clínico.

[00279] Conforme aqui utilizado, o termo "anticorpo monoclonal" refere-se a um anticorpo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, isto é, os anticorpos individuais que

compreendem a população são idênticos, exceto por mutações que podem ocorrer naturalmente e estar presentes em pequenas quantidades. Os anticorpos monoclonais aqui descritos incluem especificamente anticorpos "quiméricos" nos quais uma parte das cadeias leves e/ou pesadas é idêntica ou homóloga às sequências correspondentes de anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencentes a uma classe ou subclasse de anticorpos específicos e o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo às sequências correspondentes de anticorpos derivados de outra espécie ou pertencentes a outra classe ou subclasse de anticorpos, assim como fragmentos de tais anticorpos, conquanto apresentem a atividade antagonista desejada (Pat. US 4.816.567, que fica aqui integralmente incorporada).

[00280] Os anticorpos monoclonais da invenção podem ser preparados usando métodos com hibridomas. Em um método com hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado é tipicamente imunizado com um agente imunizante para produzir linfócitos que produzam ou sejam capazes de produzir anticorpos que se ligam especificamente ao agente imunizante. Como alternativa, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*.

[00281] Os anticorpos monoclonais também podem ser produzidos por métodos de DNA recombinante, tais como os descritos em US 4.816.567. O DNA que codifica os anticorpos monoclonais da invenção pode ser prontamente isolado e sequenciado mediante procedimentos convencionais (por exemplo, usando sondas de oligonucleotídeos capazes de se ligar especificamente aos genes que codificam as cadeias leves e pesadas de anticorpos murinos).

[00282] Os métodos *in vitro* também são apropriados para preparar anticorpos monovalentes. A digestão de anticorpos para produzir fragmentos dos mesmos, sobretudo fragmentos Fab, pode ser realizada

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

[00283] Sejam ou não conectados a outras sequências, os fragmentos de anticorpos podem incluir inserções, deleções, substituições ou outras modificações selecionadas de regiões específicas ou de resíduos de aminoácidos específicos, com a condição de que a atividade do fragmento não seja significativamente alterada ou prejudicada em comparação com o anticorpo ou fragmento de anticorpo não modificado. Essas modificações podem proporcionar novas propriedades, como a retirada ou inclusão de aminoácidos capazes de formar pontes dissulfeto para aumentar a biolongevidade, alterar as caraterísticas secretórias, etc. Em qualquer caso, o fragmento de anticorpos deve possuir uma propriedade bioativa, como atividade de ligação, regulação da ligação no domínio de ligação, etc. As regiões funcionais ou ativas do anticorpo podem ser identificadas por mutagênese de uma região específica da proteína, seguida de expressão e teste do polipeptídeo expresso. Tais métodos, que serão prontamente evidentes para os versados na técnica, podem incluir mutagênese em sítios específicos do ácido nucleico codificador do fragmento de anticorpo.

[00284] Os anticorpos da invenção também podem compreender anticorpos humanizados ou anticorpos humanos. As formas humanizadas de anticorpos não humanos (por exemplo, murinos) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou fragmentos

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

[00285] Os métodos de humanização de anticorpos não humanos são bem conhecidos na técnica. De forma geral, um anticorpo humanizado recebe um ou mais resíduos de aminoácidos obtidos de uma fonte não humana. Esses resíduos de aminoácidos não humanos são frequentemente denominados resíduos "importados", pois são obtidos de um domínio variável "importado". Essencialmente, a humanização pode ser realizada usando-se CDRs ou sequências de CDR de roedores para substituir sequências correspondentes de um anticorpo humano. Portanto, tais anticorpos "humanizados" são

anticorpos quiméricos (Pat. US 4.816.567) nos quais uma porção substancialmente menor que um domínio variável humano intacto foi substituída pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos de CDR e talvez alguns resíduos de FR foram substituídos por resíduos de sítios análogos de anticorpos de roedores.

[00286] Podem ser usados animais transgênicos (por exemplo camundongos) capazes de, quando imunizados, produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigota do gene na região juncional da cadeia pesada dos anticorpos em camundongos quiméricos com mutação germinativa inibe completamente a produção endógena de anticorpos. Nesses camundongos com mutação germinativa, a transferência do conjunto de genes de imunoglobulina de linhagem germinativa humana leva à produção de anticorpos humanos após exposição antigênica. Também é possível produzir anticorpos humanos usando bibliotecas de exposição de fagos.

[00287] Preferivelmente, os anticorpos da invenção devem ser administrados a indivíduos em um veículo farmaceuticamente aceitável. Em geral, usa-se uma formulação contendo uma quantidade apropriada de um sal farmaceuticamente aceitável para tornar a formulação isotônica. Alguns exemplos de veículos farmaceuticamente aceitáveis são solução salina, solução de Ringer e solução de dextrose. O pH da solução é preferivelmente de cerca de 5 a cerca de 8, e mais preferivelmente de cerca de 7 a cerca de 7,5. Outros veículos possíveis são preparações de liberação prolongada como matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo, sendo que as matrizes possuem o formato de artigos

moldados (por exemplo, filmes, lipossomos ou micropartículas). Os versados na técnica perceberão que alguns veículos podem ser mais preferíveis, dependendo, por exemplo, da via de administração e da concentração do anticorpo a ser administrado.

[00288] Os anticorpos podem ser administrados ao indivíduo, paciente ou célula por injeção (por exemplo, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea ou intramuscular) ou por outros métodos (por exemplo, infusão) para garantir a introdução na circulação de forma eficaz. Os anticorpos também podem ser administrados pelas vias intra ou peritumoral para que produzam efeitos terapêuticos locais e sistêmicos. A injeção local ou intravenosa é preferida.

[00289] As doses efetivas e cronogramas de administração dos anticorpos podem ser determinados empiricamente, sendo que essas determinações são contempladas pelas habilidades conhecidas na técnica. Os versados na técnica compreenderão que a dose de anticorpos que precisa ser administrada variará dependendo, por exemplo, do indivíduo que receberá o anticorpo, da via de administração, do tipo específico de anticorpo utilizado e de outras drogas administradas. Uma dose diária típica do anticorpo usado isoladamente pode variar de cerca de 1 µg/kg até 100 mg/kg de peso corporal por dia, dependendo dos fatores mencionados anteriormente. Após administração de um anticorpo, preferivelmente para tratamento de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais, pode-se avaliar a eficácia do anticorpo terapêutico de várias maneiras bem conhecidas pelos versados na técnica. Por exemplo, o tamanho, o número e/ou a distribuição do câncer em um indivíduo em tratamento podem ser monitorados por técnicas padrão de imagem tumoral. Um anticorpo administrado com finalidade terapêutica que detenha o crescimento tumoral, faça o tumor encolher e/ou impeça que surjam novos tumores

(em relação a como a doença evoluiria se não se administrasse o anticorpo) constitui um anticorpo eficaz para tratamento de câncer.

[00290] Outro aspecto da invenção é o fornecimento de um método de produção de um receptor de células T solúvel (sTCR) capaz de reconhecer um complexo peptídeo-MHC específico. Esses receptores de células T solúveis podem ser gerados a partir de clones específicos de células T, e sua afinidade pode ser aumentada por mutagênese nas regiões determinantes de complementaridade. Para selecionar receptores de células T, pode-se usar a exibição em fagos (US 2010/0113300, (Liddy *et al.*, 2012)). Para estabilizar os receptores de células T durante a exibição em fagos e em aplicações práticas envolvendo sua utilização como droga, podem-se ligar as cadeias alfa e beta uma à outra por, por exemplo, ligações dissulfeto não nativas, outras ligações covalentes (receptor de células T de cadeia única) ou domínios de dimerização (Boulter *et al.*, 2003; Card *et al.*, 2004; Willcox *et al.*, 1999). O receptor de célula T pode ser ligado a toxinas, drogas, citoquinas (ver, por exemplo, US 2013/0115191), domínios de recrutamento de células efetoras (por exemplo domínio anti-CD3), etc., para executar funções específicas em células-alvo. O receptor também pode ser expresso em células T usadas para transferência adotiva. Para mais informações, consulte WO 2004/033685A1 e WO 2004/074322A1. Uma combinação de sTCRs é descrita em WO 2012/056407A1. Outros métodos para sua produção são divulgados em WO 2013/057586A1.

[00291] Os peptídeos e/ou TCRs ou anticorpos ou outras moléculas ligantes da presente invenção podem ser usadas também para verificar o diagnóstico de câncer de um patologista a partir de uma amostra de biópsia.

[00292] Os anticorpos ou TCRs também podem ser usados para ensaios diagnósticos *in vivo*. Geralmente, o anticorpo é marcado por um radionuclídeo (como ^{111}In, ^{99}Tc, ^{14}C, ^{131}I, ^{3}H, ^{32}P ou ^{35}S) para que se

possa localizar o tumor por imunocintigrafia. Em uma modalidade, anticorpos ou fragmentos dos mesmos se ligam aos domínios extracelulares de dois ou mais alvos de uma proteína selecionada do grupo formado pelas proteínas supramencionadas, e o coeficiente de afinidade (K_D) é menor que 1 × 10 μM.

[00293] Os anticorpos para uso diagnóstico podem ser marcados com sondas apropriadas para detecção por vários métodos de imagem. São métodos para detecção de sondas, entre outros, fluorescência, microscopia óptica, confocal ou eletrônica; imagem e espectroscopia de ressonância magnética; fluoroscopia; tomografia computadorizada; e tomografia por emissão de pósitrons. São sondas apropriadas, entre outras, fluoresceína, rodamina, eosina e outros fluoróforos, radioisótopos, ouro, gadolínio e outros lantanídeos, ferro paramagnético, flúor-18 e outros radionuclídeos emissores de pósitrons. As sondas também podem ser bi ou multifuncionais e os métodos de detecção podem incluir mais de um dos métodos listados anteriormente. Esses anticorpos podem ser marcados direta ou indiretamente pelas referidas sondas. A conexão das sondas aos anticorpos requer ligação covalente da sonda, incorporação da sonda ao anticorpo e ligação covalente de um composto quelante para ligação da sonda, entre outros procedimentos bem conhecidos na técnica. Para imuno-histoquímica, a amostra de tecido patológico pode ser fresca, congelada ou emblocada em parafina e fixada com um conservante como a formalina. O corte fixado ou emblocado contendo a amostra é colocado em contato com um anticorpo primário marcado e com um anticorpo secundário, sendo que o anticorpo é usado para detectar a expressão de proteínas *in situ.*

[00294] Outro aspecto da presente invenção inclui um método *in vitro* de produção de células T ativadas, sendo que o método compreende colocar células T em contato *in vitro* com moléculas de MHC humano expressas na superfície de uma célula apresentadora de antígenos por

um período suficientemente longo para ativar a célula T de forma específica para o antígeno, sendo que o antígeno é um peptídeo de acordo com a invenção. Preferivelmente, usa-se uma quantidade de antígeno apropriada junto com uma célula apresentadora de antígeno.

[00295] Preferivelmente, as células de mamíferos possuem pouca ou nenhuma atividade transportadora de peptídeos TAP. Algumas células apropriadas, que não possuem o transportador de peptídeos TAP, são as células T2, RMA-S e células de drosófila. O TAP é o transportador associado ao processamento de antígenos.

[00296] A linhagem celular T2, que é deficiente em carregamento de peptídeos humanos, está disponível na American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EUA), sob o nº de catálogo CRL 1992; a linhagem celular de drosófila Schneider 2 está disponível na ATCC sob o nº de catálogo CRL 19863; e a linhagem celular de camundongo RMA-S foi descrita por Ljunggren *et al* (Ljunggren e Karre, 1985).

[00297] Preferivelmente, antes da transfecção a célula hospedeira praticamente não expressa moléculas de MHC classe I. Também é preferível que a célula estimulatória expresse uma molécula importante para o fornecimento de um sinal coestimulatório para células T, tais como qualquer um entre B7.1, B7.2, ICAM-1 e LFA 3. As sequências de ácidos nucleicos de várias moléculas de MHC classe I e de moléculas coestimulatórias estão disponíveis publicamente nos bancos de dados GenBank e EMBL.

[00298] No caso de epitopos de MHC classe I usados como antígeno, as células T são células T CD8-positivas.

[00299] Se uma célula apresentadora de antígeno for transfectada para expressar um desses epitopos, a célula deve compreender, preferivelmente, um vetor de expressão capaz de expressar um peptídeo contendo SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268 ou uma sequência de

aminoácidos variante dos mesmos.

[00300] Diversos outros métodos podem ser usados para gerar células T *in vitro*. Por exemplo, linfócitos autólogos infiltrantes de tumores podem ser usados para geração de LTC. Plebanski *et al.* (1995) utilizaram linfócitos autólogos de sangue periférico (PLBs) para preparar células T. Pode-se produzir células T citotóxicas autólogas pulsando células dendríticas com peptídeos ou polipeptídeos ou mediante infecção por um vírus recombinante. As células B também podem ser usadas para produzir células T autólogas. Macrófagos pulsados com peptídeos ou polipeptídeos ou infectados com vírus recombinantes também podem ser usados para preparar células T autólogas. S. Walter *et al.* (2003) descreveram a preparação ("priming") *in vitro* de células T por meio de células apresentadoras de antígenos (aCAAs) artificiais, que também são uma maneira apropriada de gerar células T contra o peptídeo escolhido. Na presente invenção, as aCAAs foram geradas acoplando-se complexos MHC-peptídeo pré-formados à superfície de partículas de poliestireno (microesférulas) por bioquímica de biotina: estreptavidina. Esse sistema permite controlar exatamente a densidade de MHC sobre as aCAAs, permitindo induzir, de forma seletiva e altamente eficiente, respostas de células T específicas para antígenos de avidez baixa ou elevada em amostras de sangue. Além dos complexos de MHC com peptídeo, as aCAAs devem transportar outras proteínas com atividade coestimulatória como anticorpos anti-CD28 acoplados à sua superfície. Além disso, tais sistemas à base de aCAA frequentemente requerem adição de fatores solúveis apropriados, como, por exemplo, citoquinas como a interleucina 12.

[00301] Células alogênicas também podem ser usadas para preparar células T, e um método é descrito detalhadamente em WO 97/26328, que fica aqui incorporada por referência. Por exemplo, além de células de drosófila e células T2, podem-se usar outras células para apresentar

antígenos, tais como células CHO, células de inseto infectadas por baculovírus, bactérias, leveduras e células-alvo infectadas por vacínia. Também podem ser usados vírus de plantas (ver, por exemplo, Porta *et al.* (Porta *et al.*, 1994), que descreve o desenvolvimento do vírus do mosaico de caupi como um sistema de alto rendimento para apresentação de peptídeos exógenos).

[00302] As células T ativadas direcionadas contra os peptídeos da invenção possuem utilidade terapêutica. Portanto, outro aspecto da invenção fornece células T ativadas que podem ser obtidas pelos métodos da invenção apresentados anteriormente.

[00303] As células T ativadas produzidas pelo método descrito anteriormente reconhecem seletivamente células com expressão aberrante de um polipeptídeo que compreende qualquer sequência de aminoácidos do grupo SEQ Nº 1 a SEQ Nº 268.

[00304] Preferivelmente, a célula T reconhecerá a célula ao interagir através de seu TCR com o complexo HLA-peptídeo (por exemplo ligação). As células T são úteis em um método de destruição de células-alvo em um paciente cujas células-alvo apresentem expressão aberrante de um polipeptídeo que compreenda uma sequência de aminoácidos da invenção, sendo que o paciente recebe um número eficaz de células T ativadas. As células T administradas ao paciente podem ser derivadas do próprio paciente e ativadas conforme descrito anteriormente (isto é, são células T autólogas). Alternativamente, as células T não são do paciente, mas de outro indivíduo. Evidentemente, prefere-se que o indivíduo seja um indivíduo saudável. Por "indivíduo saudável", os inventores designam um indivíduo com boa saúde geral, preferivelmente com um sistema imune competente e, mais preferivelmente, que não apresente nenhuma doença que possa ser facilmente detectada por exames.

[00305] *In vivo*, as células-alvo das células T CD8-positivas de

acordo com a presente invenção podem ser células tumorais (que às vezes expressam MHC classe II) e/ou células estromais que circundam o tumor (células tumorais) (que às vezes também expressam MHC classe II (Dengjel *et al.*, 2006)).

[00306] As células T da presente invenção podem ser utilizadas como ingredientes ativos de uma composição terapêutica. Portanto, a invenção fornece também um método de destruição de células-alvo em um paciente cujas células-alvo apresentam expressão aberrante de um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos da invenção, sendo que o método compreende administrar ao paciente um número eficaz de células T, conforme definido anteriormente.

[00307] Com o termo "expressão aberrante", os inventores também querem dizer que o polipeptídeo é sobrexpresso em comparação com os níveis de expressão em tecidos normais ou que o gene é expresso no tumor apesar de permanecer silencioso no tecido do qual o tumor é derivado. Com o termo "sobrexpresso", os autores querem dizer que o peptídeo está presente em níveis pelo menos 1,2 vez o nível encontrado no tecido normal, preferivelmente pelo menos 2 vezes e, mais preferivelmente pelo menos 5 ou 10 vezes o nível encontrado no tecido normal.

[00308] As células T podem ser obtidas por métodos conhecidos na técnica por exemplo, os métodos descritos anteriormente.

[00309] Os protocolos para a chamada transferência adotiva de células T são bem conhecidos na técnica. São apresentadas revisões em Gattioni *et al.* e Morgan *et al.* (Gattinoni *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2006)

[00310] Outro aspecto da presente invenção inclui o uso de peptídeos em complexo com MHC para gerar um receptor de células T cujo ácido nucleico seja clonado e introduzido na célula hospedeira, que é preferivelmente uma célula T. Essa célula T modificada pode então

ser introduzida em um paciente para tratamento do câncer.

[00311] Qualquer molécula da invenção, isto é, o peptídeo, ácido nucleico, anticorpo, vetor de expressão, célula, célula T ativada, receptor de célula T ou ácido nucleico que o codifique, é útil no tratamento de distúrbios caracterizados por células que escapam de uma resposta imune. Portanto, qualquer molécula da presente invenção pode ser usada como medicamento ou na fabricação de um medicamento. A molécula pode ser usada isoladamente ou combinada com outras moléculas da invenção ou com moléculas conhecidas.

[00312] A presente invenção refere-se também a um kit que compreende:

[00313] um recipiente que contém uma composição farmacêutica conforme descrito anteriormente, em solução ou em forma liofilizada;

[00314] opcionalmente, um segundo recipiente contendo um diluente ou solução para reconstituição de uma formulação liofilizada; e

[00315] opcionalmente, instruções de (i) uso da solução ou (ii) reconstituição e/ou uso da formulação liofilizada.

[00316] O kit pode compreender também um ou mais dentre (iii) um tampão, (iv) um diluente, (v) um filtro, (vi) uma agulha ou (v) uma seringa. O recipiente é preferivelmente um frasco, uma ampola, uma seringa ou um tubo de ensaio e pode ser um recipiente multiuso. A composição farmacêutica é preferivelmente liofilizada.

[00317] Kits da presente invenção, compreendendo preferivelmente uma formulação liofilizada da presente invenção em um recipiente apropriado e instruções para sua reconstituição e uso. São recipientes adequados, por exemplo, frascos, ampolas (por exemplo ampolas de câmara dupla), seringas (como seringas de câmara dupla) e tubos de ensaio. O recipiente pode ser constituído de diversos materiais como vidro ou plástico. Preferivelmente, o kit e/ou o recipiente contêm instruções no ou associadas ao recipiente que apresentam instruções

para reconstituição e/ou utilização. Por exemplo, o rótulo pode indicar que a formulação liofilizada pode ser reconstituída até atingir as concentrações peptídicas descritas anteriormente. O rótulo também pode indicar que a formulação é útil ou destina-se a administração subcutânea.

[00318] O recipiente contendo a formulação pode ser um frasco multiuso, que permite administrações repetidas (por exemplo de 2 a 6 administrações) da formulação reconstituída. O kit pode compreender também um segundo recipiente que contém um diluente apropriado (por exemplo solução de bicarbonato de sódio).

[00319] Ao misturar o diluente e a formulação liofilizada, a concentração final do peptídeo na formulação reconstituída é preferivelmente pelo menos 0,15 g/mL/peptídeo (75 µg) e preferivelmente não mais que 3 mg/mL/peptídeo (1500 µg). O kit pode incluir também outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do usuário, como outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e bulas com instruções de uso.

[00320] Os kits da presente invenção podem conter um único recipiente que contém a formulação das composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção, com ou sem outros componentes (por exemplo, outros compostos ou composições farmacêuticas desses outros compostos) ou pode possuir recipientes distintos para cada componente.

[00321] Preferivelmente, os kits da presente invenção contêm uma formulação farmacêutica embalada para uso em associação com a coadministração de um segundo composto (como os adjuvantes (por exemplo, GM-CSF), um agente quimioterápico, um produto natural, um hormônio ou antagonista, um agente antiangiogênese ou inibidor, um agente indutor de apoptose ou um quelante) ou uma composição farmacêutica dos mesmos. Os componentes do kit podem ser pré-

complexados ou cada componente pode ser fornecido em um recipiente diferente e separado antes da administração a um paciente. Os componentes do kit podem ser fornecidos em uma ou mais soluções líquidas, preferivelmente soluções aquosas e, mais preferivelmente, soluções aquosas estéreis. Os componentes do kit também podem ser fornecidos no estado sólido e serem convertidos em líquido adicionando-se solventes apropriados, que são preferivelmente fornecidos em outro recipiente separado.

[00322] O recipiente de um kit terapêutico pode ser uma ampola, tubo de ensaio, frasco, garrafa, seringa ou qualquer outro meio de envasar um sólido ou líquido. Usualmente, quando existe mais de um componente, o kit conterá um segundo frasco ou outro recipiente, que permitirá administração separada. O kit também pode conter outro recipiente para um líquido farmaceuticamente aceitável. Preferivelmente, um kit terapêutico contém um aparato (por exemplo, uma ou mais agulhas, seringas, conta-gotas, pipetas, etc.), que permite administrar os agentes da invenção que são componentes do presente kit.

[00323] A presente formulação é de um tipo apropriado para administração de peptídeos por qualquer via aceitável, como a oral (entérica), nasal, oftálmica, subcutânea, intradérmica, intramuscular, intravenosa ou transdérmica. A administração deve ser preferivelmente s.c. e, mais preferivelmente, i.d., podendo também ser realizada por uma bomba de infusão.

[00324] Como os peptídeos da invenção foram isolados de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais, o medicamento da invenção deve ser usado preferivelmente no tratamento de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais.

[00325] A presente invenção refere-se também a método de

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

[00326] "Medicamento personalizado" significa tratamentos adaptados especificamente a um paciente e que serão usados apenas para tratamento desse paciente, incluindo vacinas anticâncer personalizadas ativamente e terapias adotivas com células usando tecido autólogo do paciente.

[00327] Conforme aqui utilizado, o termo "depósito" refere-se a um grupo ou conjunto de peptídeos pré-selecionados por sua imunogenicidade e apresentação aumentada em um determinado tipo de tumor. O termo "depósito" não pretende sugerir que os peptídeos específicos incluídos na vacina foram pré-fabricados e armazenados em uma instalação física, embora se contemple essa possibilidade. Contempla-se expressamente que os peptídeos podem ser fabricados *de novo* para cada vacina individualizada fabricada ou podem ser pré-fabricados e armazenados. O depósito (por exemplo, na forma de um banco de dados) é formado por peptídeos associados a tumores que apresentam níveis elevados de sobrexpressão em tecidos tumorais de pacientes com câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais com diversos alelos de HLA-A, HLA-B e HLA-C. O depósito pode conter peptídeos de MHC classe I ou MHC classe II ou peptídeos alongados de MHC classe

I. Além dos peptídeos associados a tumores obtidos de diversos tecidos de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais, o depósito pode conter peptídeos marcadores de HLA-A*02, HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08 e HLA-B*44. Esses peptídeos permitem comparar quantitativamente a magnitude da imunidade mediada por células T induzida por TUMAPs, permitindo assim tirar importantes conclusões sobre a capacidade da vacina de produzir respostas antitumorais. Segundo, os peptídeos funcionam como importantes controles positivos derivados de um antígeno "não próprio" ("não self") nos casos em que não se observam respostas de células T induzidas pela vacina a TUMAPs derivados de antígenos "próprios" ("self") em um paciente. Terceiro, eles podem permitir tirar conclusões sobre o nível de imunocompetência do paciente.

[00328] Os TUMAPs usados para constituir o depósito foram identificados por meio de uma abordagem de genômica funcional integrada que combina análise de expressão gênica, espectrometria de massa e imunologia de células T (XPRESIDENT®). Essa abordagem garante que apenas TUMAPs que estejam realmente presentes em uma porcentagem elevada de tumores e sejam minimamente ou nada expressos em tecidos normais sejam selecionados para análises posteriores. Para seleção inicial de peptídeos, amostras de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais e sangue de doadores saudáveis foram analisados em etapas:

[00329] Ligantes de HLA do material maligno foram identificados por espectrometria de massa.

[00330] A análise da expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) em todo o genoma foi usada para identificar genes sobrexpressos em tecidos malignos (câncer colorretal, glioblastoma,

câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais) em comparação com uma série de órgãos e tecidos normais.

[00331] Os ligantes de HLA identificados foram comparados com os dados de expressão gênica. Os peptídeos apresentados de forma exacerbada ou seletivamente em tecidos tumorais, preferivelmente codificados por genes expressos seletivamente ou expressos de forma excessiva conforme detectados na etapa 2, foram considerados candidatos a TUMAPs apropriados para uma vacina multipeptídica.

[00332] Uma busca na literatura foi realizada para identificar mais evidências indicativas da relevância dos peptídeos identificados como TUMAPs.

[00333] A relevância da sobrexpressão ao nível de mRNA foi confirmada pela detecção dos TUMAPs selecionados na etapa 3 em tecido tumoral e pela detecção baixa ou ausente em tecidos saudáveis.

[00334] Para avaliar a viabilidade da indução de respostas de células T *in vivo* pelos peptídeos selecionados, foram realizados ensaios de imunogenicidade *in vitro* usando células T humanas de doadores saudáveis e de pacientes com câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais.

[00335] Em um aspecto, os peptídeos são pré-selecionados por sua imunogenicidade antes de serem incluídos no depósito. A título exemplificativo e não limitante, a imunogenicidade dos peptídeos incluídos no depósito é determinada por um método que compreende a preparação ("priming") *in vitro* de células T mediante estimulações repetidas de células T CD8+ de doadores saudáveis com células apresentadoras de antígenos artificiais carregadas com complexos de peptídeo com MHC e anticorpo anti-CD28.

[00336] Esse método é preferido para cânceres raros e pacientes com perfis de expressão raros. Ao contrário dos coquetéis multipeptídicos de composição fixa desenvolvidos atualmente, o

depósito permite obter correspondências significativamente melhores entre a vacina e a expressão antigênica efetiva do tumor. Peptídeos selecionados disponíveis comercialmente ou combinações dos mesmos serão usados para cada paciente em uma abordagem multialvo. Teoricamente, uma abordagem baseada na seleção de, por exemplo, 5 peptídeos antigênicos diferentes de uma biblioteca de 50 proporcionaria cerca de 17 milhões de possíveis composições de produtos medicamentosos (PM).

[00337] Em um aspecto, os peptídeos são selecionados para inclusão na vacina com base em sua adequação ao paciente individual baseado no método de acordo com a presente invenção conforme aqui descrito ou conforme apresentado a seguir.

[00338] Os dados de fenótipo de HLA, transcriptoma e peptidoma são coligidos do material obtido do tumor do paciente e de amostras de sangue para identificar os peptídeos mais apropriados para cada paciente contendo TUMAPs do depósito específicos para o paciente (isto é, mutantes). Serão selecionados peptídeos expressos de forma excessiva ou seletiva nos tumores dos pacientes e que, sempre que possível, mostrem forte imunogenicidade *in vitro* quando testados com células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) do paciente.

[00339] Preferivelmente, os peptídeos incluídos na vacina são identificados por um método que compreende: (a) identificação de peptídeos associados ao tumor (TUMAPs) apresentados por uma amostra tumoral de um paciente individual; (b) comparação dos peptídeos identificados em (a) com um depósito (banco de dados) de peptídeos conforme descrito anteriormente; e (c) seleção de pelo menos um peptídeo do depósito (banco de dados) que se correlacione com um peptídeo associado ao tumor identificado no paciente. Por exemplo, os TUMAPs apresentados em amostras tumorais são identificados da seguinte maneira: (a1) comparação dos dados de expressão da

amostra tumoral com os dados de expressão de uma amostra de tecido normal correspondente ao tipo de tecido da amostra tumoral para identificar proteínas que são sobrexpressas ou apresentam expressão aberrante na amostra tumoral; e (a2) correlação dos dados de expressão com sequências de ligantes de MHC ligados a moléculas de MHC classe I e/ou classe II na amostra tumoral para identificar ligantes de MHC derivados de proteínas sobrexpressas ou expressas de forma aberrante pelo tumor. Preferivelmente, as sequências dos ligantes de MHC são identificadas eluindo-se os peptídeos ligados das moléculas de MHC isoladas da amostra tumoral e sequenciando-se os ligantes eluídos. Preferivelmente, a amostra de tumor e a amostra de tecido normal devem ser obtidas do mesmo paciente.

[00340] Além de, ou como alternativa a, selecionar peptídeos usando um modelo de depósito (banco de dados), os TUMAPs podem ser identificados em pacientes *de novo* e incluídos na vacina. Como exemplo, os TUMAPs candidatos podem ser identificados no paciente da seguinte maneira: (a1) comparação dos dados de expressão da amostra tumoral com os dados de expressão de uma amostra de tecido normal correspondente ao tipo de tecido da amostra tumoral para identificar proteínas que são sobrexpressas ou apresentam expressão aberrante na amostra tumoral; e (a2) correlação dos dados de expressão com sequências de ligantes de MHC ligados a moléculas de MHC classe I e/ou classe II na amostra tumoral para identificar ligantes de MHC derivados de proteínas sobrexpressas ou expressas de forma aberrante pelo tumor. Como outro exemplo, podem-se identificar proteínas que contêm mutações específicas para a amostra tumoral em relação ao tecido normal correspondente de um paciente individual, e podem-se identificar TUMAPs que atuam especificamente sobre a mutação. Por exemplo, os genomas do tumor e do tecido normal correspondente podem ser sequenciados por sequenciamento de

genoma inteiro. Para descobrir mutações não sinônimas nas regiões codificadoras de proteínas dos genes, o DNA e o RNA genômicos são extraídos de tecidos tumorais e o DNA germinativo não mutante do genoma normal é extraído de células mononucleares do sangue periférico (CMSPs). A abordagem NGS aplicada restringe-se ao ressequenciamento de regiões codificadoras de proteínas (ressequenciamento do exoma). Para essa finalidade, o DNA exônico de amostras humanas é capturado usando kits de enriquecimento fornecidos comercialmente e depois sequenciado usando-se, por exemplo, um instrumento HiSeq2000 (Illumina). O mRNA tumoral também é sequenciado para quantificação direta da expressão gênica e validação do fato de que os tumores dos pacientes expressam os genes mutantes. As milhões de leituras de sequências assim produzidas são processadas por algoritmos em software. A lista produzida contém mutações e expressão gênica. As mutações somáticas específicas para tumores são determinadas comparando-se as variações germinativas derivadas de CMSP, e essas derivações recebem prioridade. Os peptídeos identificados *de novo* podem então ter sua imunogenicidade testada conforme descrito anteriormente em relação ao depósito, e os TUMAPs candidatos que possuírem imunogenicidade apropriada são selecionados para inclusão na vacina.

[00341] Em uma modalidade exemplar, os peptídeos incluídos na vacina são identificados pelo seguinte procedimento: (a) identificação de peptídeos associados a tumor (TUMAPs) apresentados por uma amostra tumoral de um paciente individual usando o método descrito anteriormente; (b) comparação dos peptídeos identificados na etapa a) com um depósito de peptídeos pré-selecionados de acordo com a imunogenicidade e apresentação aumentada em tumores em comparação com os tecidos normais correspondentes; (c) seleção de pelo menos um peptídeo do depósito que se correlaciona com um

peptídeo associado a tumores identificado no paciente; e (d) opcionalmente, seleção de pelo menos um peptídeo identificado *de novo* em (a) para confirmar sua imunogenicidade.

[00342] Em uma modalidade exemplar, os peptídeos incluídos na vacina são identificados pelo seguinte procedimento: (a) identificação de peptídeos associados a tumor (TUMAPs) apresentados por uma amostra tumoral de um paciente individual; e (b) seleção de pelo menos um peptídeo identificado de novo em (a) para confirmar sua imunogenicidade.

[00343] Uma vez selecionados os peptídeos para uma vacina peptídica personalizada, a vacina é produzida. Preferivelmente, a vacina é uma formulação líquida que consiste em peptídeos individuais dissolvidos em 20% a 40% de DMSO, preferivelmente de 30% a 35% de DMSO (por exemplo cerca de 33% de DMSO).

[00344] Todos os peptídeos a serem incluídos em um produto são dissolvidos em DMSO. A concentração das soluções de peptídeo único deve ser escolhida em função do número de peptídeos a serem incluídos no produto. Soluções de um peptídeo em DMSO são misturadas em partes iguais para criar uma solução contendo todos os peptídeos a serem incluídos no produto a uma concentração de cerca de 2,5 mg/ml por peptídeo. A solução misturada é então diluída 1:3 em água para injeção de modo a atingir uma concentração de 0,826 mg/ml por peptídeo em DMSO a 33%. A solução diluída é filtrada por um filtro estéril de 0,22 µm. A solução bruta final é obtida.

[00345] A solução bruta final é acondicionada em ampolas e armazenada a -20°C até o momento do uso. Cada ampola contém 700 µL de uma solução que contém 0,578 mg de cada peptídeo. Destes, 500 µL (aproximadamente 400 µg por peptídeo) serão administrados por injeção intradérmica.

[00346] Além de serem usados no tratamento do câncer, os

peptídeos da presente invenção também têm aplicações diagnósticas. Como os peptídeos foram gerados a partir de células de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais e como se determinou que esses peptídeos estão pouco ou nada presentes em tecidos normais, pode-se utilizá-los para diagnosticar a presença de um câncer.

[00347] A presença dos peptídeos reivindicados em biópsias de tecidos ou em amostras de sangue pode ajudar um patologista a diagnosticar câncer. A detecção de determinados peptídeos por meio de anticorpos, espectrometria de massa ou outros métodos conhecidos na técnica pode dizer ao patologista que a amostra de tecido é maligno, está inflamado ou apresenta patologia em geral ou pode ser usada como biomarcador de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais. A presença de grupos de peptídeos pode permitir a classificação ou subclassificação de tecidos patológicos.

[00348] A detecção de peptídeos em amostras de tecido patológico pode permitir a decisão sobre o benefício de tratamentos que envolvem o sistema imune, sobretudo se os linfócitos T participarem ou se esperar que participem do mecanismo de ação. A perda da expressão de MHC é um mecanismo bem descrito pelo qual células malignas infectadas escapam da vigilância do nsemb. Portanto, a presença dos peptídeos mostra que esse mecanismo não é explorado pelas células analisadas.

[00349] Os peptídeos da presente invenção podem ser usados para analisar respostas linfocitárias contra esses peptídeos, tais como respostas de células T ou de anticorpos contra o peptídeo ou contra o peptídeo em complexo com moléculas de MHC. Essas respostas podem ser usadas como marcadores prognósticos para tomar decisões sobre a condução do tratamento. Essas respostas também podem ser usadas como indicadores de resposta em abordagens imunoterápicas que

visam a induzir respostas linfocitárias por outros meios (por exemplo vacinação com proteínas, ácidos nucleicos, materiais autólogos e transferência adotiva de linfócitos). No âmbito de terapias gênicas, as respostas linfocitárias contra peptídeos podem ser consideradas na avaliação dos efeitos colaterais. O monitoramento das respostas linfocitárias também pode ser um valioso recurso para exames de acompanhamento de tratamentos envolvendo transplantes (por exemplo para detectar doença enxerto-versus-hospedeiro ou hospedeiro-versus-enxerto).

[00350] A presente invenção será agora descrita nos seguintes exemplos, que descrevem configurações preferidas da mesma, com referência às figuras apresentadas a seguir, mas sem limitar-se aos exemplos. Para os fins da presente invenção, todas as referências aqui citadas ficam integralmente incorporadas por referência.

FIGURAS

[00351] As Figuras 1A a 1P mostram perfis de expressão exemplares de genes fonte da presente invenção que são sobrexpressos em várias amostras de câncer. Os tumores (pontos pretos) e amostras normais (pontos cinzas) são agrupados de acordo com o órgão de origem. Os gráficos de caixa de bigodes representam a mediana, 25º e 75º percentis (caixa), mínima e máxima (bigodes) de RPKM. Os órgãos normais aparecem ordenados por categoria de risco. RPKM = leituras por quilobase por milhão de leituras mapeadas. Amostras normais: células sanguíneas, vasos sanguíneos, cérebro, coração, fígado, pulmão, tecido adiposo, gl. suprarr (glândula suprarrenal), ducto biliar; bexiga, MO (medula óssea), cartilagem, esôf. (esôfago), olho, vesb (vesícula biliar), cabeça-e-pescoço, rim; int.grosso (intestino grosso), LN (linfonodo), nervo, pâncreas, paratir (glândula paratireoide), perit: peritônio, hipóf (hipófise), mus.esquel (músculo esquelético); pele, int.delgado (intestino delgado), baço, estômago, tireoide, traqueia,

ureter, mama, ovário, placenta, próstata, testículo; timo e útero. Amostras tumorais: CaCR: câncer colorretal; GBM: glioblastoma; CG: câncer gástrico; CHC: carcinoma hepatocelular; CCR: carcinoma de células renais. Figura 1A) Símbolo do gene: EGFR; peptídeo LPSPTDSNFY (SEQ Nº 2). Figura 1B) Símbolo do gene: PTPRZ1; peptídeo LTDYINANY (SEQ Nº 28). Figura 1C) Símbolo do gene: CCDC146; peptídeo KMMALVAEL (SEQ Nº 42). Figura 1D) Símbolo do gene: MMP16; peptídeo YLPPTDPRMSV (SEQ Nº 54). Figura 1E) Símbolo do gene: RP11-1220K2.2; peptídeo GLPDFVKEL (SEQ Nº 60), Figura 1F) Símbolo do gene: GRM8; peptídeo ATMQSKLIQK (SEQ Nº 99), Figura 1G) Símbolo do gene: HAVCR1; peptídeo GVIIAKKYFFK (SEQ Nº 101), Figura 1H) Símbolo do gene: SEMA5B; peptídeo GTESGTILK (SEQ Nº 110), Figura 1I) Símbolo do gene: PIWIL1; peptídeo SFDSNLLSF (SEQ Nº 133), Figura 1J) Símbolo do gene: UGT1A3; peptídeo KYLSIPTVF (SEQ Nº 138), Figura 1K) Símbolo do gene: FEZF1; peptídeo APAAVPSAPA (SEQ Nº 153), Figura 1L) Símbolo do gene: MMP11; peptídeo RPASSLRP (SEQ Nº 163), Figura 1M) Símbolo do gene: QRFPR; peptídeo SPMWHVQQL (SEQ Nº 170), Figura 1N) Símbolo do gene: REG4; peptídeo SRSMRLLLL (SEQ Nº 190), Figura 1O) Símbolo do gene: PTHLH; peptídeo AEIHTAEI (SEQ Nº 231), Figura 1P) Símbolo do gene: EGFR; peptídeo DEYLIPQQGF (SEQ Nº 264).

[00352] A Figura 2 mostra exemplos de resultados de respostas de células T CD8+ *in vitro* em doadores saudáveis HLA-A*02+. As células T CD8+ foram preparadas usando-se CAAs artificiais revestidos por anticorpos monoclonais anti-CD28 e HLA-A*02 em complexo com o peptídeo ALYGKLLKL de SEQ Nº 267 (A, painel esquerdo). Depois de três ciclos de estimulação, as células que reagiam a peptídeos foram detectadas por coloração 2D para multímeros com A*02/SEQ Nº 267 (A). O painel à direita (B) mostra a coloração de células de controle

estimuladas por complexos irrelevantes de A*02 com peptídeos. As células singlete viáveis foram triadas para detecção de linfócitos CD8+. Portas booleanas ajudaram a descartar falsos positivos detectados por multímeros específicos para peptídeos diferentes. As frequências de células específicas positivas para multímeros em linfócitos CD8+ estão indicadas.

[00353] A Figura 3 mostra exemplos de resultados de respostas de células T CD8+ *in vitro* em doadores saudáveis HLA-A*24+. As células T CD8+ foram preparadas usando-se CAAs artificiais revestidos por anticorpos monoclonais anti-CD28 e HLA-A*24 em complexo com o peptídeo SEQ Nº 268 (A, painel esquerdo). Depois de três ciclos de estimulação, as células que reagiam a peptídeos foram detectadas por coloração com A*24/SEQ Nº 268 (DYIPYVFKL, SEQ Nº 268) (A). O painel direito (B) mostra a coloração de células de controle estimuladas por complexos irrelevantes de A*24 com peptídeos. As células singlete viáveis foram triadas para detecção de linfócitos CD8+. Portas booleanas ajudaram a descartar falsos positivos detectados por multímeros específicos para peptídeos diferentes. As frequências de células específicas positivas para multímeros em linfócitos CD8+ estão indicadas.

[00354] A Figura 4 mostra exemplos de resultados de respostas de células T CD8+ in vitro em doadores saudáveis HLA-A*01+. As células T CD8+ foram preparadas usando-se CAAs artificiais revestidas por anticorpos monoclonais anti-CD28 e HLA-A*01 em complexo com os peptídeos de SEQ Nº 6 (VLDLSTNVY, A, painel esquerdo) e SEQ Nº 245 (VLDLSTNVY, B, painel esquerdo), respectivamente. Depois de três ciclos de estimulação, as células que reagiam a peptídeos foram detectadas por coloração com multímeros 2D e A*01/SEQ Nº 6 (A) ou A*01/SEQ Nº 245 (B). Os painéis à direita (A e B) mostram a coloração de células de controle estimuladas por complexos irrelevantes de A*01

com peptídeos. As células singlete viáveis foram triadas para detecção de linfócitos CD8+. Portas booleanas ajudaram a descartar falsos positivos detectados por multímeros específicos para peptídeos diferentes. As frequências de células específicas positivas para multímeros em linfócitos CD8+ estão indicadas.

[00355] A Figura 5 mostra exemplos de resultados de respostas de células T CD8+ *in vitro* em doadores saudáveis HLA-A*02+. As células T CD8+ foram preparadas usando-se CAAs artificiais revestidas por anticorpos monoclonais anti-CD28 e HLA- A*02 em complexo com o peptídeo GMMKGGIRK de SEQ Nº 42 (A, painel esquerdo) e KVAGERYVYK de SEQ Nº 250 (B, painel esquerdo), respectivamente. Depois de três ciclos de estimulação, as células que reagiam a peptídeos foram detectadas por coloração com multímeros 2D e A*02/SEQ Nº 42 (A) ou A*02/SEQ Nº 250 (B). Os painéis à direita (A e B) mostram a coloração de células de controle estimuladas por complexos irrelevantes de A*02 com peptídeos. As células singlete viáveis foram triadas para detecção de linfócitos CD8+. Portas booleanas ajudaram a descartar falsos positivos detectados por multímeros específicos para peptídeos diferentes. As frequências de células específicas positivas para multímeros em linfócitos CD8+ estão indicadas.

[00356] A Figura 6 mostra exemplos de resultados de respostas de células T CD8+ *in vitro* em doadores saudáveis HLA-A*03+. As células T CD8+ foram preparadas usando-se CAAs artificiais revestidas por anticorpos monoclonais anti-CD28 e HLA-A*03 em complexo com o peptídeo KTYVGHPVKM de SEQ Nº 94 (A, painel esquerdo) e GTESGTILK de SEQ Nº 110 (B, painel esquerdo), respectivamente. Depois de três ciclos de estimulação, as células que reagiam a peptídeos foram detectadas por coloração com multímeros 2D e A*02/SEQ Nº 94 (A) ou A*03/SEQ Nº 110 (B). Os painéis à direita (A e

B) mostram a coloração de células de controle estimuladas por complexos irrelevantes de A*03 com peptídeos. As células singlete viáveis foram triadas para detecção de linfócitos CD8+. Portas booleanas ajudaram a descartar falsos positivos detectados por multímeros específicos para peptídeos diferentes. As frequências de células específicas positivas para multímeros em linfócitos CD8+ estão indicadas.

[00357] A Figura 7 mostra exemplos de resultados de respostas de células T CD8+ *in vitro* em doadores saudáveis HLA-A*24+. As células T CD8+ foram preparadas usando-se CAAs artificiais revestidas por anticorpos monoclonais anti-CD28 e HLA-A*24 em complexo com o peptídeo SEQ Nº 138 (KYLSIPTVF, painel esquerdo). Depois de três ciclos de estimulação, as células que reagiam a peptídeos foram detectadas por coloração com multímero 2D de A*02/SEQ Nº 138. O painel direito mostra a coloração de células de controle estimuladas por complexos irrelevantes de A*24 com peptídeos. As células singlete viáveis foram triadas para detecção de linfócitos CD8+. Portas booleanas ajudaram a descartar falsos positivos detectados por multímeros específicos para peptídeos diferentes. As frequências de células específicas positivas para multímeros em linfócitos CD8+ estão indicadas.

[00358] A Figura 8 mostra exemplos de resultados de respostas de células T CD8+ *in vitro* em doadores saudáveis HLA-B*07+. As células T CD8+ foram preparadas usando-se CAAs artificiais revestidas por anticorpos monoclonais anti-CD28 e HLA-B*07 em complexo com os peptídeos SPMWHVQQL de SEQ Nº 170 (A, painel esquerdo) e FPYPYAERL de SEQ Nº 155 (B, painel esquerdo), respectivamente. Depois de três ciclos de estimulação, as células que reagiam a peptídeos foram detectadas por coloração 2D com o multímero relevante (por exemplo B*07/SEQ Nº 170 ou B*07/SEQ Nº 155). Os

painéis à direita (A e B) mostram a coloração de células de controle estimuladas por complexos irrelevantes de B*07 com peptídeos. As células singlete viáveis foram triadas para detecção de linfócitos CD8+. Portas booleanas ajudaram a descartar falsos positivos detectados por multímeros específicos para peptídeos diferentes. As frequências de células específicas positivas para multímeros em linfócitos CD8+ estão indicadas.

[00359] A Figura 9 mostra exemplos de resultados de respostas de células T CD8+ *in vitro* em doadores saudáveis HLA-B*44+. As células T CD8+ foram preparadas usando-se CAAs artificiais revestidas por anticorpos monoclonais anti-CD28 e HLA-B*44 em complexo com o peptídeo SEAFPSRAL de SEQ Nº 225 (A, painel esquerdo) e EEKLIIQDF de SEQ Nº 236 (B, painel esquerdo), respectivamente. Depois de três ciclos de estimulação, as células que reagiam a peptídeos foram detectadas por coloração 2D com o multímero relevante (por exemplo B*44/SEQ Nº 225 (A) ou B*44/SEQ Nº 236 (B)). Os painéis à direita (A e B) mostram a coloração de células de controle estimuladas por complexos irrelevantes de B*44 com peptídeos. As células singlete viáveis foram triadas para detecção de linfócitos CD8+. Portas booleanas ajudaram a descartar falsos positivos detectados por multímeros específicos para peptídeos diferentes. As frequências de células específicas positivas para multímeros em linfócitos CD8+ estão indicadas.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Identificação de peptídeos associados ao tumor apresentados na superfície celular

Amostras de tecido

[00360] Os tecidos tumorais e tecidos normais de pacientes foram obtidos do Hospital Universitário de Tübingen (Tübingen, Alemanha).

Todos os pacientes deram consentimento livre e esclarecido antes da cirurgia ou autópsia. Os tecidos foram criocongelados logo após a excisão e armazenados a -70ºC ou menos até o isolamento dos TUMAPs. Os números de amostras usadas para seleção de TUMAPs foi de N = 79 para câncer renal, N = 35 para câncer colorretal, N = 22 para carcinoma hepatocelular, N = 10 para câncer gástrico e N = 12 para glioblastoma.

Isolamento de peptídeos de HLA de amostras de tecido

[00361] Misturas de peptídeos HLA de amostras de tecido sujeitas a congelamento criogênico foram obtidas por imunoprecipitação de tecidos sólidos de acordo com um protocolo ligeiramente modificado (Falk *et al.*, 1991; Seeger *et al.*, 1999) usando o anticorpo BB7.2, que é específico para HLA-A*02; o anticorpo W6/32, que é específico para HLA-A, B ou C; o anticorpo L243, que é específico para HLA-DR; e o anticorpo Tü39, que é específico para HLA classe II em geral. Foram usadas sefarose ativada por CNBr, tratamento com ácido e ultrafiltração.

Análises por espectrometria de massa

[00362] Os agregados de peptídeos de HLA foram obtidos e separados de acordo com sua hidrofobicidade por cromatografia de fase reversa (sistema Ultimate 3000 RSLC de Nano UHPLC, Dionex) e os peptídeos eluídos foram analisados por espectrômetros de massa híbridos LTQ Orbitrap e Fusion Lumos (ThermoElectron) equipados com fontes ESI. Amostras de peptídeos foram carregadas com 3% de solvente B (20% H_2O, 80% acetonitrilo e 0,04% ácido fórmico) em uma coluna PepMap 100 C18 Nanotrap de 2 cm (Dionex) com taxa de fluxo de 4 µl/min por 10 minutos. A separação foi realizada em colunas PepMap C18 de 25 cm ou 50 cm com partículas de 2 µm (Dionex) montadas em um forno de colunas aquecido a 50°C. O gradiente aplicado variou de 3% a 32% de solvente B durante 90 minutos com

taxa de fluxo de 300 nl/min (colunas de 25 cm) ou 140 min com taxa de fluxo de 175 nl/min (colunas de 50 cm). (solvente A: H_2O 99%, ACN 1% e ácido fórmico 0,1%; solvente B: H_2O 20%, ACN 80% e ácido fórmico 0,1%).

[00363] As análises de espectrometria de massa foram realizadas em um modo de aquisição dependente de dados usando um método de atuação sobre os cinco maiores peptídeos, ou seja, um método no qual em cada varredura os cinco íons precursores mais abundantes são selecionados para fragmentação. Alternativamente, a análise empregou um método TopSpeed usando instrumentos Fusion Lumos.

[00364] As varreduras foram realizadas no Orbitrap a uma resolução de 60.000 (Orbitrap XL) ou 120.000 (Orbitrap Fusion Lumos). A análise EM/EM foi realizada com dissociação induzida por colisão (CID, "collision induced dissociation") com energia de colisão normalizada de 35%, tempo de ativação de 30 ms, largura de isolamento de 1,3 m/z) e análise subsequente em "trap" iônico linear quadripolar (LTQ). O intervalo de massas para ligantes de HLA classe I foi limitado em 400 a 650 m/z e os possíveis estados de carga 2+ e 3+ selecionados para fragmentação. Para HLA classe II, o intervalo de massas foi ajustado para 300 a 1500 m/z, permitindo fragmentação com todos os estados de carga positivos iguais ou maiores que 2.

[00365] Os espectros de massa em tandem foram interpretados por MASCOT ou SEQUEST com uma taxa fixa de descobertas falsas ($q \leq 0,05$) e suplementadas com controle manual. Em casos onde a sequência de peptídeos identificada era incerta, ela foi submetida a mais uma etapa de validação, na qual se comparou o padrão de fragmentação do peptídeo gerado naturalmente com o padrão de fragmentação de um peptídeo de referência sintético com a mesma sequência.

[00366] As Tabelas 8a e 8b mostram a apresentação associada a

várias entidades tumorais de peptídeos selecionados, ilustrando a relevância de cada um desses peptídeos para o diagnóstico e/ou tratamento dos cânceres listados (por exemplo peptídeo SEQ Nº 1 para câncer colorretal (Tabela 8a) e para CVB e CG (Tabela 8b), peptídeo SEQ Nº 50 para câncer colorretal e carcinoma hepatocelular (Tabela 8a) e para CCC, GBM, CCECP, LNH, CPCNPescam, CP, CPPC e CAU (Tabela 8b)).

[00367] Tabela 8a: Apresentação de alguns peptídeos associados a tumores selecionados da presente invenção em diversas entidades (doenças) exemplares e preferidas.

[00368] CaCR: câncer colorretal, CCR: carcinoma de células renais, CG: câncer gástrico, CHC: carcinoma hepatocelular, GBM: glioblastoma.

SEQ Nº	Sequência	Apresentação de peptídeos em entidades oncológicas
1	RSDPVTLDV	CaCR
2	LPSPTDSNFY	CCR
3	ASSTDSASYY	CHC
4	NSDLKYNAL	CHC
5	SILGSDVRVPSY	CHC
6	VLDLSTNVY	CHC
7	LITGDPKAAYDY	CaCR
8	TPVTEFSLNTY	CaCR
9	FITAQNHGY	CHC
10	ITAQNHGY	CHC
11	LSAGSGPGQY	CHC
12	ITFGERFEY	CCR
13	GSTMVEHNY	CCR
14	YTERDGSAMVY	GBM
15	LTDYLKNTY	CHC

SEQ Nº	Sequência	Apresentação de peptídeos em entidades oncológicas
16	LSLIDRLVLY	CCR
17	YTDKLQHY	CaCR
18	EVSNGKWLLY	CCR
19	VSNGKWLLY	CCR
20	STDEITTRY	CHC
21	STDIGALMY	CaCR
22	TLEQVQLYY	CaCR
23	TASEDVFQY	CaCR
24	YTHHLFIFY	CaCR
25	LMKEVMEHY	CCR
26	EVLDSHIHAY	GBM
27	LDSHIHAY	GBM
28	LTDYINANY	GBM
29	SVTDLEMPHY	GBM
30	VLDSHIHAY	GBM
31	VTDLEMPHY	GBM
32	ATVGYFIFY	CCR
33	FADKIHLAY	CCR
34	ITDFNNIRY	CaCR
35	FASDLLHLY	CHC
36	YAAYIIHAY	CCR
37	LTDSFPLKV	CHC
38	VMLNSNVLL	GBM
39	YLLPSVVLL	GBM
40	KIDDIWNLEV	CHC
41	SLQDTKITL	CHC
42	KMMALVAEL	CCR

SEQ Nº	Sequência	Apresentação de peptídeos em entidades oncológicas
43	GLMTIVTSL	CaCR
44	SQTGFVVLV	GBM
45	KLLDEVTYL	CCR
46	VLITGLPLI	CCR
47	YQDSWFQQL	CCR
48	NLTFIIILI	CHC
49	NLASRPYSL	CHC
50	ELMPRVYTL	CaCR, CHC
51	ALAAELNQL	GBM
52	YVSSGEMMV	GBM
53	LLMTSLTES	GBM
54	YLPPTDPRMSV	GBM
55	RLWQIQHHL	CCR
56	FLNQIYTQL	CG
57	GLTGVIMTI	CaCR
58	MLCLLLTL	CCR
59	KLHEIYIQA	GBM
60	GLPDFVKEL	CG
61	RLFGLFLNNV	CCR
62	GSYSALLAKK	CHC
63	KVLGPNGLLK	CHC
64	STTKLYLAK	CHC
65	VLGPNGLLK	CHC
66	ATYEGIQKK	CHC
67	ATALSLSNK	CHC
68	ATAYGSTVSK	CHC
69	ATAYGSTVSKR	CHC

SEQ Nº	Sequência	Apresentação de peptídeos em entidades oncológicas
70	ATWSASLKNK	CHC
71	KLGNNPVSK	CHC
72	KQVFPGLNY	CHC
73	KSFDRHFEK	CHC
74	QLYSKFLLK	CHC
75	QVPTFTIPK	CHC
76	SAFGYVFPK	CHC
77	SSASLAHMK	CHC
78	STKSTSPPK	CHC
79	STNNEGNLK	CHC
80	STSHHLVSR	CHC
81	SVKLQGTSK	CHC
82	TAYGSTVSK	CHC
83	TAYGSTVSKR	CHC
84	TVASLHTEK	CHC
85	KMAAWPFSR	CHC
86	KTPSGALHRK	CHC
87	SSYSRSSAVK	GBM
88	MLLQQPLIY	CCR
89	KITDFGLAK	CCR
90	GSRLGKYYVK	CCR
91	SLIDRLVLY	CCR
92	AVLDLGSLLAK	CCR
93	ALDKPGKSK	GBM
94	KTYVGHPVKM	CCR
95	RLFESSFHY	CCR
96	FSLAGALNAGFK	GBM

SEQ Nº	Sequência	Apresentação de peptídeos em entidades oncológicas
97	RMPPPLPTR	GBM
98	KLYPTYSTK	CHC
99	ATMQSKLIQK	CCR
100	ALLGVIIAK	CCR
101	GVIIAKKYFFK	CCR
102	IIAKKYFFK	CCR
103	KSWTASSSY	CCR
104	STQDTLLIK	CaCR
105	GSAALYLLR	CCR
106	RLSPNDQYK	CCR
107	EIYGGHHAGF	GBM
108	LLKSSVGNFY	GBM
109	KIIAPLVTR	CCR
110	GTESGTILK	CCR
111	KIKEHVRSK	CHC
112	KMMADYGIRK	CHC
113	VWAKILSAF	CHC
114	KFLDSNIKF	CHC
115	YFEEAANFL	CHC
116	LVLDYSKDYNHW	CHC
117	NFLPPIIARF	CCR
118	TYISKTIAL	CCR
119	YMKALGVGF	CCR
120	MYAKEFDLL	CHC
121	SYIEKVRFL	GBM
122	KLYGMPTDFGF	CG
123	RQYLAINQI	CHC

SEQ Nº	Sequência	Apresentação de peptídeos em entidades oncológicas
124	EVYSPEADQW	GBM
125	IYGPKYIHPSF	CG
126	TFQDKTLNF	CaCR
127	IFINLSPEF	CG
128	SYTKVEARL	CG
129	VFLNQIYTQL	CG
130	VYGDGHYLTF	CG
131	KQLDHNLTF	CaCR
132	VYNPVIYVF	CHC
133	SFDSNLLSF	CaCR
134	TYLTGRQF	CaCR
135	VIAPIISNF	CaCR
136	EYNNIQHLF	CCR
137	KYLSLSNSF	CCR
138	KYLSIPTVF	CHC
139	PYASLASELF	CHC
140	KYLSIPAVF	CHC
141	KYLSIPAVFF	CHC
142	SSFPGAGNTW	GBM
143	FELPTGAGLQL	CHC
144	IPEPSAQQL	CHC
145	RVPSYTLIL	CHC
146	SPGDKRLAA	CHC
147	SPIKVPLLL	CHC
148	VPDGVSKVL	CHC
149	YPLTGDTRL	CHC
150	KPSSKALGTSL	CaCR

SEQ Nº	Sequência	Apresentação de peptídeos em entidades oncológicas
151	VVHPRTLLL	CCR
152	IPSRLLAIL	CCR
153	APAAVPSAPA	GBM
154	GPGTRLSL	GBM
155	FPYPYAERL	CaCR
156	HPQVVILSL	CCR
157	SPSPGKDPTL	CCR
158	VPERGEPEL	CCR
159	FPAHPSLLL	CCR
160	RPAPADSAL	CCR
161	NPYEGRVEV	CCR
162	MPMISIPRV	CCR
163	RPASSLRP	CaCR, CHC
164	ISTPSEVSTPL	CG
165	TPIAKVSEL	CaCR
166	HDPDVGSNSL	GBM
167	YPSEVEHMF	CCR
168	IPTDKLLVI	CCR
169	FPTEVTPHAF	GBM
170	SPMWHVQQL	CCR
171	APKLFAVAF	CCR
172	KPAHYPLIAL	CCR
173	MVPSAGQLALF	CCR
174	VPSLQRLML	CCR
175	HPIETLVDIF	CCR
176	AAMSRYEL	CHC
177	DLKYNALDL	CHC

SEQ Nº	Sequência	Apresentação de peptídeos em entidades oncológicas
178	HAKEKLTAL	CHC
179	IQIYKKLRTSSF	CHC
180	LLKAEPLAF	CHC
181	YKKLRTSSF	CHC
182	LPFLRENDL	GBM
183	FQKLKLLSL	CaCR
184	EPVKKSRL	CCR
185	NPNLKTLL	GBM
186	SLIDRLVL	CCR
187	YVKERSKAM	CCR
188	SALDHVTRL	CCR
189	HIFLRTTL	CHC
190	SRSMRLLLL	CG
191	LINLKYLSL	CCR
192	LPMLKVLNL	CCR
193	LSYNKYLQL	CCR
194	EAKRHLLQV	CHC
195	AEAVLKTLQEL	CHC
196	AEQTGTWKL	CHC
197	EEAKQVLFL	CHC
198	FELPTGAGL	CHC
199	GEATLQRIY	CHC
200	GEELGFASL	CHC
201	GEHTSKATL	CHC
202	KEFNLQNMGL	CHC
203	KENFAGEATL	CHC
204	KESQLPTVM	CHC

SEQ Nº	Sequência	Apresentação de peptídeos em entidades oncológicas
205	QEVLLQTFL	CHC
206	SEPINIIDAL	CHC
207	TEATMTFKY	CHC
208	AEHDAVRNAL	CaCR
209	YEVDTVLRY	GBM
210	SENIVIQVY	CHC
211	TEKEMIQKL	CCR
212	AEETCAPSV	CCR
213	TTMDQKSLW	GBM
214	AEQPDGLIL	CHC
215	AFITAQNHGY	CHC
216	LQEEKVPAIY	CHC
217	NEINEKIAPSF	CHC
218	AEGGKVPIKW	GBM, CCR
219	AENAEYLRV	GBM
220	KEITGFLLI	GBM
221	AEERAEAKKKF	CCR
222	NEISTFHNL	CHC
223	SEVPVARVW	CHC
224	SESAVFHGF	CCR
225	SEAFPSRAL	CCR
226	EELLHGQLF	CG
227	TEHTQSQAAW	CCR
228	AEKQTPDGRKY	GBM
229	KESDGFHRF	CCR
230	AENLFRAFL	CaCR
231	AEIHTAEI	CCR

SEQ Nº	Sequência	Apresentação de peptídeos em entidades oncológicas
232	AEKDGKLTDY	GBM
233	DESEKTTKSF	GBM
234	EEESLLTSF	GBM
235	EEFETLKEF	GBM
236	EEKLIIQDF	GBM
237	LEMPHYSTF	GBM
238	SENPETITY	GBM
239	TEVLDSHIHAY	GBM
240	HELENHSMY	GBM
241	REAEPIPKM	GBM
242	FSDKELAAY	CHC
243	RSPNNFLSY	CCR
244	RSDPVTLNV	CaCR
245	ITEKNSGLY	CaCR
246	YSDLHAFYY	GBM
247	RSDPGGGGLAY	GBM
248	YSHAAGQGTGLY	CaCR
249	ALFPERITV	GBM
250	KMILKMVQL	CCR
251	RLASRPLLL	GBM
252	RIYNGIGVSR	CCR
253	KLFGTSGQK	GBM
254	AVATKFVNK	GBM
255	LPDGSRVEL	CaCR
256	LPALPQQLI	CaCR
257	SPLRGGSSL	CaCR
258	APSGTRVVQVL	GBM

SEQ Nº	Sequência	Apresentação de peptídeos em entidades oncológicas
259	RPAVGHSGL	CHC
260	EEAPLVTKAF	CHC
261	IEALLESSL	CCR
262	MELLLVNKL	CCR
263	QQATPGPAY	CaCR
264	DEYLIPQQGF	CCR
265	EEVDVPIKLY	CaCR
266	ARLTPIPFGL	CHC

[00369] Tabela 8b: Apresentação de alguns peptídeos associados a tumores da presente invenção em diversas entidades (doenças).

[00370] CAM: câncer de mama; CAU: câncer de útero.; CB: câncer de bexiga; CCC: câncer do ducto biliar; CCECP: carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, CHC: carcinoma hepatocelular; CCR: carcinoma de células renais; CE: câncer de esôfago; CG: câncer gástrico; CO: câncer de ovário; Cpr: câncer de próstata e hiperplasia benigna da próstata; CP: câncer de pâncreas; CPCNPadeno: câncer de pulmão de células não pequenas do tipo adenocarcinoma; CPCNPescam: câncer de pulmão de células não pequenas do tipo escamoso; CPCNPoutro: amostras de CPCNP que não puderam ser definitivamente caracterizadas como CPCNPadeno ou CPCNPescam; CPPC: câncer de pulmão de pequenas células; GBC: adenocarcinoma da vesícula biliar; GBM: câncer cerebral, CaCR: carcinoma colorretal; LNH: linfoma não Hodgkin; MEL: melanoma

SEQ Nº	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
1	RSDPVTLDV	CG, CVB
2	LPSPTDSNFY	CCC, CE

SEQ Nº	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
5	SILGSDVRVPSY	CP, CPCNPadeno
6	VLDLSTNVY	CCC, CVB
8	TPVTEFSLNTY	CAM, CAU, CB, CCC, CCECP, CCR, CE, CG, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CVB, MEL
9	FITAQNHGY	CG
10	ITAQNHGY	CG
12	ITFGERFEY	CaCR, CB, CCECP, CE, CG, CHC, CP, CPr, MEL
13	GSTMVEHNY	CP, CVB
14	YTERDGSAMVY	CAM, CAU, CPPC
15	LTDYLKNTY	CAU, CCR, CG, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CVB
16	LSLIDRLVLY	CAU, CHC, CPCNPescam
17	YTDKLQHY	CAM, CCECP, CPCNPadeno, CPPC
21	STDIGALMY	CAM, CB, CCECP, CCR, CE, CG, CJEG, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CVB, MEL
22	TLEQVQLYY	CG
25	LMKEVMEHY	CO, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPPC, MEL
26	EVLDSHIHAY	CaCR, CAM, CB, CCECP, CE, CG, CP, CPCNPescam, CPPC, CPr, LNH, MEL
27	LDSHIHAY	MEL
28	LTDYINANY	CE, CG, CPCNPescam, MEL
29	SVTDLEMPHY	CPCNPescam, CE
30	VLDSHIHAY	CCECP, CE, CG, CPCNPescam, MEL
31	VTDLEMPHY	CCECP, CE, CG, CPCNPescam, MEL
33	FADKIHLAY	CE, CG, CVB
34	ITDFNNIRY	CAM, CCECP, CE, CG, CJEG, LNH, MEL

SEQ Nº	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
36	YAAYIIHAY	CAU, CCECP, CE, CO, CPCNPadeno, CPCNPescam
37	LTDSFPLKV	CCC
39	YLLPSVVLL	CaCR, CAM, CAU, CB, CCC, CCECP, CCR, CE, CG, CHC, CJEG, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, LLC, LMA, LNH, MEL
42	KMMALVAEL	CO
44	SQTGFVVLV	CaCR, CAM, CAU, CB, CCC, CCECP, CCR, CE, CG, CHC, CJEG, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, LLC, LMA, LNH, MEL
45	KLLDEVTYL	CaCR, CAM, CAU, CB, CCC, CCECP, CE, CG, CHC, CJEG, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, GBM, LNH, MEL
46	VLITGLPLI	CaCR, CAM, CB, CCC, CCECP, CHC, CPCNPescam
47	YQDSWFQQL	CB, CHC
50	ELMPRVYTL	CB, CCC, CCECP, CP, CPCNPescam, CPPC, GBM, LNH
51	ALAAELNQL	LNH
53	LLMTSLTES	CaCR, CAM, CAU, CB, CCECP, CE, CG, CHC, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, LLC, LMA, LNH
56	FLNQIYTQL	CaCR, CJEG, CP
60	GLPDFVKEL	CE, CVB, MEL
67	ATALSLSNK	CCC
68	ATAYGSTVSK	CaCR, CCC, CP, CVB

SEQ Nº	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
70	ATWSASLKNK	CCC
72	KQVFPGLNY	CaCR, CCC, CCR, CPPC
74	QLYSKFLLK	CCC, CCR, CE, CPPC
75	QVPTFTIPK	CCC, CE, CPPC, LMA
76	SAFGYVFPK	CaCR, CAM, CB, CCC, CCR, CE, CG, CP, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, LMA, MEL
82	TAYGSTVSK	CCC, LNH
85	KMAAWPFSR	CAM, CO, CPCNPadeno, CPCNPescam, CVB
89	KITDFGLAK	GBM
90	GSRLGKYYVK	CAU, CB, CCECP, CHC, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, GBM
91	SLIDRLVLY	CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPPC, CVB
92	AVLDLGSLLAK	CaCR, CAM, CAU, CB, CCC, CE, CG, CHC, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, GBM, LNH
94	KTYVGHPVKM	CaCR, CCECP, CP, CPCNPadeno, CVB, MEL
98	KLYPTYSTK	CE, CPPC
99	ATMQSKLIQK	CPPC
100	ALLGVIIAK	CaCR, CAU, CB, CCC, CO, CPCNPadeno
103	KSWTASSSY	CaCR
104	STQDTLLIK	CAM, CAU, CB, CCECP, CE, CG, CO, CP, CPCNPescam, CPPC, CVB, LNH
105	GSAALYLLR	CAU, CB, CPCNPescam
107	EIYGGHHAGF	CPPC
109	KIIAPLVTR	CAU, CHC, CO, CPCNPadeno
112	KMMADYGIRK	CaCR, CAM, CAU, CCC, CCR, CE, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CVB, LNH, MEL

SEQ Nº	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
113	VWAKILSAF	CVB, LLC, LNH
115	YFEEAANFL	CCC, CVB
117	NFLPPIIARF	CaCR, CAU, CCECP, CE, CO, CPCNPadeno, CVB, GBM, MEL
118	TYISKTIAL	CaCR, CAM, CB CAU, CCECP, CE, CG, CHC, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, GBM, LNH, MEL
119	YMKALGVGF	GBM
120	MYAKEFDLL	CaCR CVB, CAM, CAU, CCECP, CCR, CE, CG, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPr, LLC, LNH, MEL
121	SYIEKVRFL	CAM, CPPC, LNH
122	KLYGMPTDFGF	CaCR, CAM, CB, CCECP, CE, CO, CP, CPCNPescam, CPPC, CPr, LNH
123	RQYLAINQI	CaCR, CAM, CB, CCC, CCECP, CCR, CE, CG, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, GBM, LLC, LNH, MEL
124	EVYSPEADQW	CE
125	IYGPKYIHPSF	CPCNPadeno, CVP
126	TFQDKTLNF	CAU, CB, CE, CG, CPPC, CPr, MEL
127	IFINLSPEF	CCC, CP, CPCNPadeno, CVB
128	SYTKVEARL	CaCR, CCC, CP, CPCNPadeno, CVB
129	VFLNQIYTQL	CP, CVB
130	VYGDGHYLTF	CP, CPCNPadeno
132	VYNPVIYVF	CaCR, CAM, CAU, CB, CCC, CCECP, CCR, CE, CG, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, GBM, LLC, LMA, LNH, MEL

SEQ Nº	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
134	TYLTGRQF	CAU, CE, CG, CPPC, CPr
135	VIAPIISNF	CAM, CAU, CCC, CCR, CG, CHC, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, GBM, LLC, LMA, LNH, MEL
136	EYNNIQHLF	CAU, CB, CG, CHC, CO, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPr, CVB, GBM
137	KYLSLSNSF	CHC, CO, CP, CPr
138	KYLSIPTVF	CPCNPadeno
139	PYASLASELF	CG
140	KYLSIPAVF	CCC, CCECP, CG, CVB
141	KYLSIPAVFF	CCECP, CG, CPPC, CVB
142	SSFPGAGNTW	CE, CPPC
144	IPEPSAQQL	CaCR, CCC, CVB, LNH
145	RVPSYTLIL	CPCNPescam, CPr
147	SPIKVPLLL	CCR, CE, CG, CP, GBM
148	VPDGVSKVL	CCC
150	KPSSKALGTSL	CVB
151	VVHPRTLLL	CAU, CCC, CHC
155	FPYPYAERL	CCECP, CE, CG, CO, CP, CPCNPescam
156	HPQVVILSL	CVB
157	SPSPGKDPTL	CPCNPadeno, CPr
159	FPAHPSLLL	CPCNPadeno
160	RPAPADSAL	CPCNPadeno, CVP
161	NPYEGRVEV	CaCR, CG, CVB, GBM, MEL
162	MPMISIPRV	GBM, LNH
163	RPASSLRP	CO
165	TPIAKVSEL	CAU, CHC, CO
166	HDPDVGSNSL	CaCR, CAM, CB,CAU, CCECP, CE, CG, CHC, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, LNH

SEQ Nº	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
167	YPSEVEHMF	CAU, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPr, MEL
168	IPTDKLLVI	CaCR, CAM, CAU, CB, CCECP, CE, CG, CHC, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CVB, GBM, LNH, MEL
169	FPTEVTPHAF	CCECP, CPCNPescam, CPPC, MEL
171	APKLFAVAF	CPCNPadeno
173	MVPSAGQLALF	CCECP, CE, CG, CPPC
174	VPSLQRLML	CaCR, CPCNPadeno
175	HPIETLVDIF	CaCR, CAU, CB, CCC, CG, CO, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPPC, CVB, GBM, MEL
177	DLKYNALDL	CCC
178	HAKEKLTAL	CCC
180	LLKAEPLAF	CCC, CCC, CPPC, CVB
182	LPFLRENDL	CAU, CPr
183	FQKLKLLSL	CP, CVB
188	SALDHVTRL	CPr, LNH
190	SRSMRLLLL	CaCR
192	LPMLKVLNL	CCECP, CO, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro
193	LSYNKYLQL	CAU, CHC
194	EAKRHLLQV	CCC, CE, CO, CP, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, LNH, MEL
195	AEAVLKTLQEL	CCC
196	AEQTGTWKL	CCC
197	EEAKQVLFL	CCR
198	FELPTGAGL	CCC, CCECP, CCR, CPPC
199	GEATLQRIY	CaCR, CCC
200	GEELGFASL	CCC, CCR, CPPC

SEQ Nº	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
206	SEPINIIDAL	CCC, CCR, CPPC
207	TEATMTFKY	CCC, CVB
208	AEHDAVRNAL	CCECP, CG
209	YEVDTVLRY	CAM, MEL
210	SENIVIQVY	CCC, CPCNPoutro, MEL
212	AEETCAPSV	CAM, CAU, MEL
214	AEQPDGLIL	CCC, CPPC
218	AEGGKVPIKW	CAU, CCECP, CPCNPadeno, CPr
219	AENAEYLRV	CCR
220	KEITGFLLI	CAU, CPCNPadeno
223	SEVPVARVW	CaCR, CCC, CCR, CE, CPCNPadeno, CVB
224	SESAVFHGF	CaCR, CAM, CAU, CB, CCC, CCECP, CE, CG, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, GBM, LNH, MEL
226	EELLHGQLF	CaCR, CCC, CE, CP, CPCNPadeno
227	TEHTQSQAAW	CAU, CCECP, CHC, CPCNPadeno, LLC
229	KESDGFHRF	CaCR, CAM, CAU, CB, CCC, CCECP, CE, CG, CHC, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CVB, GBM, LNH, MEL
230	AENLFRAFL	CAU, CB, CCC, CCECP, CCR, CE, CG, CHC, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPr, CVB, LLC, LMA, LNH, MEL
232	AEKDGKLTDY	MEL
234	EEESLLTSF	CE, CPCNPescam
235	EEFETLKEF	CCECP, MEL
236	EEKLIIQDF	CCECP, CE, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPr, MEL
238	SENPETITY	CCECP

SEQ Nº	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
239	TEVLDSHIHAY	CE, CPCNPescam, MEL
240	HELENHSMY	CE
242	FSDKELAAY	CAM, CCC, CCC, CE, CE, CG, CG, CP, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CAM, CVB, CVB, GBM, GBM, LNH, LNH, MEL, MEL, NSCLCadeno, NSCLCescam
243	RSPNNFLSY	CVB
244	RSDPVTLNV	CAM, CG, CP, CPCNPadeno, CVB
245	ITEKNSGLY	CG, CVB
246	YSDLHAFYY	CaCR, CAM, CAU, CB, CCECP, CCR, CE, CG, CHC, CJEG, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, LLC, LMA, LNH, MEL
247	RSDPGGGGLAY	CaCR, CAM, CAU, CB, CCECP, CE, CG, CHC, CJEG, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, LMA, LNH, MEL
248	YSHAAGQGTGLY	CAM, CAU, CCECP, CE, CVB
249	ALFPERITV	CAM, CAU, CB, CCC, CCECP, CCR, CE, CG, CHC, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, GBM, LMA, LNH, MEL
251	RLASRPLLL	CE, CO, CPCNPescam
252	RIYNGIGVSR	CaCR, CPCNPadeno, GBM, MEL
254	AVATKFVNK	CaCR, CAM, CAU, CB, CCC, CCECP, CCR, CE, CG, CHC, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, LMA, LNH, MEL
255	LPDGSRVEL	CAM
256	LPALPQQLI	CAU, CE, CG, CP, CPCNPadeno,

SEQ Nº	Sequência	Tipos tumorais em que o peptídeo foi apresentado
		CPCNPescam, CPPC, CVB, GBM, LNH, MEL
257	SPLRGGSSL	CAM, CB, CCECP, CE, CG, CO, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPPC, LMA, LNH, MEL
258	APSGTRVVQVL	CaCR, CAM, CAU, CB, CCC, CCECP, CCR, CE, CG, CHC, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, LNH, MEL
259	RPAVGHSGL	CAM, CCECP, CCR, CE, CO, CPCNPadeno, CPCNPescam, LMA, LNH, MEL
260	EEAPLVTKAF	CaCR, CAU, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPr, LLC, LMA, LNH, MEL
261	IEALLESSL	CaCR, CAM, CAU, CB, CCC, CCECP, CCR, CE, CG, CHC, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPPC, CVB, GBM, LLC, LNH, MEL
262	MELLLVNKL	CAU, CCECP, CHC, CO, MEL
263	QQATPGPAY	CAM, CB, CCC, CE, CG, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CVB, LMA
264	DEYLIPQQGF	CaCR, CAM, CAU, CB, CCC, CCECP, CE, CG, CHC, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, CVB, GBM, LNH, MEL
265	EEVDVPIKLY	CAM, CAU, CCC, CCECP, CCR, CE, CG, CO, CP, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, CPr, LNH, MEL
266	ARLTPIPFGL	CAM, CAU, CB, CCECP, CCR, CO, CPCNPadeno, CPCNPescam, CPCNPoutro, CPPC, GBM, LNH, MEL

EXEMPLO 2

Perfil da expressão de genes que codificam peptídeos da invenção

[00371] A apresentação exacerbada ou específica de um peptídeo em células tumorais em comparação com células normais é suficiente para demonstrar a utilidade dos peptídeos para imunoterapia. Alguns peptídeos são específicos para tumores, mesmo quando a proteína da qual se originaram também está presente em tecidos normais. Contudo, o perfil de expressão de mRNA cria um nível adicional de segurança para selecionar peptídeos para uso em imunoterapia. Sobretudo para opções de tratamento mais arriscadas, como TCRs maturados por afinidade, o peptídeo-alvo ideal é derivado de uma proteína específica para o tumor e que não é encontrada em tecidos normais.

Fontes de RNA e preparação

[00372] Amostras de tecido retiradas cirurgicamente foram fornecidas conforme descrito anteriormente (ver Exemplo 1) após obtenção de consentimento livre e esclarecido de cada paciente. As amostras de tecido congeladas foram criocongeladas imediatamente após a cirurgia e depois homogeneizadas em cadinho com pistilo sob nitrogênio líquido. O RNA total foi preparado a partir dessas amostras usando-se o reagente TRI (Ambion, Darmstadt, Alemanha) seguido de limpeza com Rneasy (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Ambos os métodos foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante.

[00373] O RNA total de tecidos humanos saudáveis de experimentos de sequenciamento de RNA foi obtido de Asterand (Detroit, MI, EUA e Royston, Herts, Reino Unido), Bio-Options Inc. (Brea, CA, EUA); Geneticist Inc. (Glendale, CA, EUA), ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EUA) e Tissue Solutions Ltd. (Glasgow, Reino Unido). O RNA total de tecidos tumorais para experimentos de sequenciamento de RNA foi obtido de Asterand (Detroit, MI, EUA e Royston, Herts, Reino Unido), BioCat GmbH (Heidelberg, Alemanha, BioServe (Beltsville, MD, EUA),

Geneticist Inc. (Glendale, CA, EUA), Istituto Nazionale Tumori "Pascale" (Nápoles, Itália), ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EUA) e Hospital Universitário de Heidelberg (Heidelberg, Alemanha). A qualidade e a quantidade das amostras de RNA foram analisadas em um bioanalisador Agilent 2100 (Agilent, Waldbronn, Alemanha) usando um kit RNA 6000 Pico LabChip (Agilent).

Experimentos de sequenciamento de RNA

[00374] A análise de expressão gênica em amostras de RNA de tumores e tecidos normais foi realizada por sequenciamento de próxima geração (RNAseq) da CeGaT (Tübingen, Alemanha). Resumidamente, bibliotecas de sequenciamento foram preparadas usando o kit de reagentes Illumina HiSeq v4 de acordo com o protocolo do fornecedor (Illumina Inc., San Diego, CA, Estados Unidos), que inclui fragmentação de RNA, conversão em cDNA e adição de adaptadores de sequenciamento. Bibliotecas derivadas de várias amostras são misturadas em proporção equimolar e sequenciadas em um sequenciador Illumina HiSeq 2500 de acordo com as instruções do fabricante, gerando leituras de extremidade única com 50 bp cada. As leituras processadas foram mapeadas em relação ao genoma humano (GRCh38) usando-se o software STAR. Os dados de expressão ao nível de transcrição são fornecidos em RPKM (leituras por quilobase por milhões de leituras mapeadas, geradas pelo software Cufflinks) e ao nível de éxon (leituras totais, geradas pelo software Bedtools), baseado nas anotações do banco de dados nsemble (Ensembl77). As leituras de éxons foram normalizadas para o comprimento e alinhamento dos éxons para gerar valores de RKPM.

[00375] A Figura 1 mostra alguns perfis de expressão exemplares da presente invenção que apresentam sobrexpressão acentuada ou exclusiva em câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais. Os escores de

expressão para outros genes exemplificativos são mostrados na Tabela 9.

[00376] Tabela 9: Escores de expressão. A tabela apresenta uma lista de peptídeos derivados de genes cuja expressão é, quando comparada com um painel de tecidos normais, fortemente acentuada (+++), acentuada (++) ou sobrexpressa (+). O nível basal das pontuações foi calculado a partir de mensurações realizadas nos seguintes tecidos normais: baço, bexiga, cabeça e pescoço, cartilagem, células sanguíneas, cérebro, coração, ducto biliar, esôfago, estômago, fígado, glândula surprarrenal, hipófise, intestino delgado, intestino grosso, linfonodo, medula óssea, músculo esquelético, nervo, olho, paratireoide, pâncreas, pele, peritônio, pleura, pulmão, rim, tecido adiposo, tireoide, traqueia, ureter, vasos sanguíneos e vesícula biliar. Em casos para os quais existiam dados para várias amostras de um mesmo tipo de tecido, a média aritmética de todas as respectivas amostras foi usada para o cálculo.

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica				
		CaCR	GBM	CG	CHC	CCR
1	RSDPVTLDV	+				
2	LPSPTDSNFY		+++			+
3	ASSTDSASYY				++	
4	NSDLKYNAL				+	
5	SILGSDVRVPSY				+	
6	VLDLSTNVY				++	
7	LITGDPKAAYDY	+	+	+		
8	TPVTEFSLNTY	+		+		
9	FITAQNHGY				+	
10	ITAQNHGY				+	
11	LSAGSGPGQY				+	
12	ITFGERFEY					+
13	GSTMVEHNY			+		+

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica				
		CaCR	GBM	CG	CHC	CCR
14	YTERDGSAMVY		+			
15	LTDYLKNTY				+	
16	LSLIDRLVLY					+
17	YTDKLQHY	+				
18	EVSNGKWLLY					+
19	VSNGKWLLY					+
20	STDEITTRY				++	
21	STDIGALMY	+		++		
22	TLEQVQLYY	+				
23	TASEDVFQY	+				
24	YTHHLFIFY	++				
25	LMKEVMEHY					+
26	EVLDSHIHAY		++			
27	LDSHIHAY		++			
28	LTDYINANY		+++			
29	SVTDLEMPHY		+++			
30	VLDSHIHAY		++			
31	VTDLEMPHY		+++			
32	ATVGYFIFY				+	+
33	FADKIHLAY				++	+
34	ITDFNNIRY	+		+		
35	FASDLLHLY				+++	
36	YAAYIIHAY					+
37	LTDSFPLKV				+	
38	VMLNSNVLL		+			
39	YLLPSVVLL		+			
40	KIDDIWNLEV				+	
41	SLQDTKITL				+	
42	KMMALVAEL					++
43	GLMTIVTSL	++				

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica				
		CaCR	GBM	CG	CHC	CCR
44	SQTGFVVLV		+			
45	KLLDEVTYL					+
46	VLITGLPLI					+
47	YQDSWFQQL					+
48	NLTFIIILI				+++	
49	NLASRPYSL				+	
50	ELMPRVYTL	+	+	+	+	+
51	ALAAELNQL		+			
52	YVSSGEMMV		+			
53	LLMTSLTES		+			
54	YLPPTDPRMSV		+++			
55	RLWQIQHHL					+
56	FLNQIYTQL			+		
57	GLTGVIMTI	++				
58	MLCLLLTL				++	+
59	KLHEIYIQA		+			
60	GLPDFVKEL	+++		++		
61	RLFGLFLNNV					+
62	GSYSALLAKK				+	
63	KVLGPNGLLK				+	
64	STTKLYLAK				+	
65	VLGPNGLLK				+	
66	ATYEGIQKK				+	
67	ATALSLSNK				+	
68	ATAYGSTVSK				++	
69	ATAYGSTVSKR				++	
70	ATWSASLKNK				+	
71	KLGNNPVSK				+	
72	KQVFPGLNY				++	
73	KSFDRHFEK				+	

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica				
		CaCR	GBM	CG	CHC	CCR
74	QLYSKFLLK				+	
75	QVPTFTIPK				++	
76	SAFGYVFPK				+	
77	SSASLAHMK				+	
78	STKSTSPPK				++	
79	STNNEGNLK				+	
80	STSHHLVSR				+	
81	SVKLQGTSK				+	
82	TAYGSTVSK				++	
83	TAYGSTVSKR				++	
84	TVASLHTEK				+	
85	KMAAWPFSR				+	
86	KTPSGALHRK				+	
87	SSYSRSSAVK		+			
88	MLLQQPLIY					+
89	KITDFGLAK		+++			+
90	GSRLGKYYVK					+
91	SLIDRLVLY					+
92	AVLDLGSLLAK					+
93	ALDKPGKSK		+			
94	KTYVGHPVKM	+	+	+	+	+
95	RLFESSFHY					++
96	FSLAGALNAGFK		+			
97	RMPPPLPTR		+			
98	KLYPTYSTK				+	
99	ATMQSKLIQK	+++				+
100	ALLGVIIAK					++
101	GVIIAKKYFFK					++
102	IIAKKYFFK					++
103	KSWTASSSY		+	+		+

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica				
		CaCR	GBM	CG	CHC	CCR
104	STQDTLLIK	+		+		
105	GSAALYLLR					++
106	RLSPNDQYK					++
107	EIYGGHHAGF		++			
108	LLKSSVGNFY		+			
109	KIIAPLVTR					+
110	GTESGTILK		++			+++
111	KIKEHVRSK				+	
112	KMMADYGIRK				+	
113	VWAKILSAF				+	
114	KFLDSNIKF				+	
115	YFEEAANFL				+	
116	LVLDYSKDYNHW				+	
117	NFLPPIIARF					+
118	TYISKTIAL					+
119	YMKALGVGF		+			+
120	MYAKEFDLL				+	
121	SYIEKVRFL		+			
122	KLYGMPTDFGF			+		
123	RQYLAINQI				+	
124	EVYSPEADQW		+++			
125	IYGPKYIHPSF	++		+		
126	TFQDKTLNF	++		+		
127	IFINLSPEF			+		
128	SYTKVEARL			+		
129	VFLNQIYTQL			+		
130	VYGDGHYLTF			+		
131	KQLDHNLTF	++				
132	VYNPVIYVF				+	
133	SFDSNLLSF	+++		+		

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica				
		CaCR	GBM	CG	CHC	CCR
134	TYLTGRQF	+				
135	VIAPIISNF	+				
136	EYNNIQHLF					+
137	KYLSLSNSF					+
138	KYLSIPTVF				+++	
139	PYASLASELF				+	
140	KYLSIPAVF				+	
141	KYLSIPAVFF				+	
142	SSFPGAGNTW		+			
143	FELPTGAGLQL				++	
144	IPEPSAQQL				++	
145	RVPSYTLIL				+	
146	SPGDKRLAA				++	
147	SPIKVPLLL				+	
148	VPDGVSKVL				++	
149	YPLTGDTRL				++	
150	KPSSKALGTSL	+				
151	VVHPRTLLL					+
152	IPSRLLAIL					+
153	APAAVPSAPA	++	++	+++	+	
154	GPGTRLSL		+			
155	FPYPYAERL	++		++		
156	HPQVVILSL					++
157	SPSPGKDPTL					+
158	VPERGEPEL					+
159	FPAHPSLLL					+
160	RPAPADSAL					+++
161	NPYEGRVEV					+
162	MPMISIPRV					+
163	RPASSLRP	++		+++	+	

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica				
		CaCR	GBM	CG	CHC	CCR
164	ISTPSEVSTPL			+		
165	TPIAKVSEL	+			+++	
166	HDPDVGSNSL		+			
167	YPSEVEHMF					+
168	IPTDKLLVI					+
169	FPTEVTPHAF		+++			
170	SPMWHVQQL					+++
171	APKLFAVAF					+
172	KPAHYPLIAL				+	++
173	MVPSAGQLALF					++
174	VPSLQRLML					+
175	HPIETLVDIF					+
176	AAMSRYEL				+	
177	DLKYNALDL				+	
178	HAKEKLTAL				+	
179	IQIYKKLRTSSF				+	
180	LLKAEPLAF				+	
181	YKKLRTSSF				+	
182	LPFLRENDL		+			
183	FQKLKLLSL	+				
184	EPVKKSRL					+
185	NPNLKTLL		+			
186	SLIDRLVL					+
187	YVKERSKAM					+
188	SALDHVTRL					+
189	HIFLRTTL				+	
190	SRSMRLLLL	++		+++		
191	LINLKYLSL					+
192	LPMLKVLNL					+
193	LSYNKYLQL					+

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica				
		CaCR	GBM	CG	CHC	CCR
194	EAKRHLLQV				+	
195	AEAVLKTLQEL				++	
196	AEQTGTWKL				+	
197	EEAKQVLFL				+	
198	FELPTGAGL				++	
199	GEATLQRIY				+	
200	GEELGFASL				++	
201	GEHTSKATL				+	
202	KEFNLQNMGL				++	
203	KENFAGEATL				+	
204	KESQLPTVM				++	
205	QEVLLQTFL				++	
206	SEPINIIDAL				+	
207	TEATMTFKY				++	
208	AEHDAVRNAL	++				
209	YEVDTVLRY		+++			
210	SENIVIQVY				+	
211	TEKEMIQKL					++
212	AEETCAPSV					+
213	TTMDQKSLW		+			
214	AEQPDGLIL				+	
215	AFITAQNHGY				+	
216	LQEEKVPAIY				+	
217	NEINEKIAPSF				+	
218	AEGGKVPIKW		+++			+
219	AENAEYLRV		++			
220	KEITGFLLI		+++			
221	AEERAEAKKKF					+
222	NEISTFHNL				+	
223	SEVPVARVW				+	

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica				
		CaCR	GBM	CG	CHC	CCR
224	SESAVFHGF					+
225	SEAFPSRAL					+++
226	EELLHGQLF			+		
227	TEHTQSQAAW					+
228	AEKQTPDGRKY		++			
229	KESDGFHRF					+
230	AENLFRAFL	+				
231	AEIHTAEI					+++
232	AEKDGKLTDY		+++			
233	DESEKTTKSF		+++			
234	EEESLLTSF		+++			
235	EEFETLKEF		++			
236	EEKLIIQDF		++			
237	LEMPHYSTF		+++			
238	SENPETITY		+++			
239	TEVLDSHIHAY		++			
240	HELENHSMY		+			
241	REAEPIPKM		+			
242	FSDKELAAY				+	
243	RSPNNFLSY					+
244	RSDPVTLNV	+				
245	ITEKNSGLY	++				
246	YSDLHAFYY		+			
247	RSDPGGGGLAY		+			
248	YSHAAGQGTGLY	+				
249	ALFPERITV		+			
250	KMILKMVQL	+		+		+++
251	RLASRPLLL		+			
252	RIYNGIGVSR			+		+
253	KLFGTSGQK		+++			

SEQ Nº	Sequência	Expressão gênica				
		CaCR	GBM	CG	CHC	CCR
254	AVATKFVNK		+			
255	LPDGSRVEL	++		+	+++	++
256	LPALPQQLI	+		+		
257	SPLRGGSSL	+				
258	APSGTRVVQVL		+			
259	RPAVGHSGL				+	
260	EEAPLVTKAF				+	
261	IEALLESSL					+
262	MELLLVNKL					+
263	QQATPGPAY	++				
264	DEYLIPQQGF		+++			+
265	EEVDVPIKLY	+				
266	ARLTPIPFGL				+	

EXEMPLO 3

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

[00377] Para obter informações sobre a imunogenicidade dos TUMAPs da presente invenção, os investigadores realizaram investigações usando um ensaio de priming *in vitro* de células T baseado em estimulações repetidas de células T CD8+ com células apresentadoras de antígenos artificiais (aCAAs) carregadas com complexos peptídeo/MHC e anticorpo anti-CD28. Assim, os inventores puderam demonstrar a imunogenicidade dos TUMAPs restritos por HLA- A*02:01, HLA-A*24:02, HLA-A*01:01, HLA-A*03:01, HLA-B*07:02 ou HLA-B*44:02 da invenção, demonstrando que esses peptídeos são epitopos de células T contra os quais existem células T CD8+ precursoras em humanos (Tabelas 10a e Tabela 10b).

Preparação *in vitro* de células T CD8+

[00378] Para realizar estimulações *in vitro* por células

apresentadoras de antígenos artificiais carregadas com complexo peptídeo-MHC (pMHC) e anticorpo anti-CD28, os inventores primeiramente isolaram células T CD8+ de produtos frescos de leucaférese de HLA-A*02, HLA-A*0201, HLA-A*24:02, HLA-A*01:01, HLA-A*03:01, HLA-B*07:02 ou HLA-B*44:02 usando seleção positiva com microesférulas de CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha) de doadores saudáveis, obtidas da Clínica Universitária de Mannheim, Alemanha, após consentimento livre e esclarecido.

[00379] As CMSPs e os linfócitos CD8+ isolados foram incubados por uma noite em um meio para células T (TCM, "T-cell medium") que consistia em RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) suplementado com 10% de soro humano AB termoinativado (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemanha), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml (Cambrex, Colônia, Alemanha), piruvato de sódio 1 mM (CC Pro, Oberdorla, Alemanha) e gentamicina 20 µg/ml (Cambrex). Nesta etapa, também foram adicionados ao TCM 2,5 ng/ml de IL-7 (PromoCell, Heidelberg, Alemanha) e 10 U/ml de IL-2 (Novartis Pharma, Nuremberg, Alemanha).

[00380] A geração de esférulas revestidas por pMHC/anti-CD28, a estimulação de células T e a leitura foram realizadas em um sistema *in vitro* muito bem definido, no qual foram usadas 4 moléculas de pMHC diferentes por condição de estimulação e 8 moléculas de pMHC diferentes por condição de leitura.

[00381] A IgG2a de camundongo anti-CD28 humano purificada e co-estimulatória de Ab 9.3 (Jung *et al.*, 1987)foi biotinilada quimicamente por sulfo-N-hidroxisuccinimidobiotina conforme recomendado pelo fabricante (Perbio, Bonn, Alemanha). Foram usadas esférulas que consistiam em partículas de poliestireno de 5,6 µm de diâmetro revestidas por estreptavidina (Bangs Laboratories, Illinois, EUA).

[00382] Os pMHCs usados para estimulações de controle positivo e

controle negativo foram A*0201/MLA-001 (peptídeo ELAGIGILTV, SEQ ID Nº 269 de Melan-A/MART-1 modificado) e A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5, SEQ ID Nº 270), respectivamente.

[00383] Um total de 800,000 esférulas/200 µl foram revestidas em placas de 96 cavidades na presença de 4 × 12,5 ng de complexos biotina-pMHC diferentes e lavados. Em seguida, 600 ng de anti-CD28 biotinilado foram adicionados até atingir o volume de 200 µl. As estimulações foram iniciadas em placas de 96 cavidades por incubação conjunta de $1x10^6$ células T CD8+ com 2 × 10^5 esférulas revestidas lavadas em 200 µl TCM suplementado com IL-12 5 ng/ml (PromoCell) por 3 dias a 37℃. Em seguida, metade do meio foi s uplementado por TCM fresco suplementado com IL-2 80 U/ml. A incubação foi mantida por 4 dias a 37℃, e o ciclo estimulatório foi real izado um total de três vezes. Para leitura do multímero pMHC com 8 moléculas diferentes de pMHC por condição, uma abordagem de codificação combinatória bidimensional foi usada conforme descrito anteriormente (Andersen *et al.*, 2012) com pequenas modificações relacionadas ao acoplamento com 5 fluorocromos diferentes. Finalmente, foram realizadas análises multiméricas por coloração das células com um corante quase-infravermelho indicativo de vitalidade celular (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha), clone SK1 de anticorpo contra CD8-FITC (BD, Heidelberg, Alemanha) e multímeros fluorescentes de pMHC. Para análise, foi usado um citômetro BD LSRII SORP equipado com lasers e filtros apropriados. As células específicas para peptídeos foram calculadas como porcentagem das células CD8+ totais. A avaliação da análise multimérica foi realizada pelo software FlowJo (Tree Star, Oregon, EUA). A ativação *in vitro* de linfócitos CD8+ específicos e positivos nos multímeros foi detectada por comparação com as estimulações de controles negativos. A imunogenicidade para um determinado antígeno foi detectada quando pelo menos uma cavidade estimulada *in vitro*

avaliável de um doador saudável apresentava uma linhagem específica de células T CD8+ após estimulação *in vitro* (istoé a cavidade continha no mínimo 1% do multímero+ específico entre as células T CD8+, e a porcentagem de células multímero+ positivas era pelo menos 10x a mediana das simulações em controles negativos).

Imunogenicidade *in vitro* contra peptídeos de câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células renais

[00384] Para peptídeos de HLA classe I testados, a imunogenicidade *in vitro* pôde ser demonstrada pela geração de linhagens de células T específicas para os peptídeos. A Figura 9 mostra resultados exemplares de citometria de fluxo após coloração específica para multímeros TUMAP de 13 peptídeos da invenção mostrados nas Figuras 3 a 9 junto com os controles negativos correspondentes. As Tabelas 10a e 10b resumem os resultados obtidos com os 56 peptídeos da invenção.

[00385] Tabela 10a: Imunogenicidade *in vitro* de peptídeos de HLA classe I da invenção

[00386] Exemplos de resultados de experimentos de imunogenicidade *in vitro* realizados pelo depositante com os peptídeos da invenção. <20%= +; 20% a 49%= ++; 50% a 69%= +++; ≥ 70%= ++++

SEQ Nº	Sequência	Cavidades positivas [%]
267	KTLGKLWRL	++++
268	DYIPYVFKL	++++

[00387] Tabela 10b: Imunogenicidade *in vitro* de peptídeos de HLA classe I da invenção

[00388] Exemplos de resultados de experimentos de imunogenicidade *in vitro* realizados pelo depositante com os peptídeos da invenção. <20%= +; 20% a 49%= ++; 50% a 69%= +++; ≥ 70%= ++++

SEQ Nº	Sequência	Cavidades positivas [%]	HLA
1	RSDPVTLDV	"++"	A*01
6	VLDLSTNVY	"++"	A*01
20	STDEITTRY	"+"	A*01
24	YTHHLFIFY	"+"	A*01
28	LTDYINANY	"+"	A*01
31	VTDLEMPHY	"+"	A*01
33	FADKIHLAY	"++"	A*01
37	LTDSFPLKV	"+++"	A*01
245	ITEKNSGLY	"+++"	A*01
247	RSDPGGGGLAY	"+"	A*01
38	VMLNSNVLL	"+"	A*02
42	KMMALVAEL	"++++"	A*02
43	GLMTIVTSL	"++"	A*02
50	ELMPRVYTL	"+"	A*02
56	FLNQIYTQL	"+++"	A*02
57	GLTGVIMTI	"++++"	A*02
60	GLPDFVKEL	"++"	A*02
249	ALFPERITV	"++"	A*02
250	KMILKMVQL	"++"	A*02
64	STTKLYLAK	"+"	A*03
66	ATYEGIQKK	"+"	A*03
82	TAYGSTVSK	"+"	A*03
94	KTYVGHPVKM	"+"	A*03
105	GSAALYLLR	"+"	A*03
110	GTESGTILK	"+"	A*03
138	KYLSIPTVF	"+"	A*24
144	IPEPSAQQL	"+"	B*07
146	SPGDKRLAA	"++"	B*07

SEQ Nº	Sequência	Cavidades positivas [%]	HLA
148	VPDGVSKVL	"+++"	B*07
155	FPYPYAERL	"+++"	B*07
156	HPQVVILSL	"++"	B*07
164	ISTPSEVSTPL	"+"	B*07
170	SPMWHVQQL	"++++"	B*07
172	KPAHYPLIAL	"+++"	B*07
255	LPDGSRVEL	"++++"	B*07
195	AEAVLKTLQEL	"+"	B*44
198	FELPTGAGL	"++"	B*44
200	GEELGFASL	"+"	B*44
204	KESQLPTVM	"++"	B*44
205	QEVLLQTFL	"+"	B*44
208	AEHDAVRNAL	"+"	B*44
209	YEVDTVLRY	"+"	B*44
218	AEGGKVPIKW	"++"	B*44
219	AENAEYLRV	"+++"	B*44
220	KEITGFLLI	"++"	B*44
225	SEAFPSRAL	"+++"	B*44
232	AEKDGKLTDY	"+"	B*44
233	DESEKTTKSF	"++++"	B*44
235	EEFETLKEF	"+"	B*44
236	EEKLIIQDF	"++++"	B*44
237	LEMPHYSTF	"+++"	B*44
238	SENPETITY	"++"	B*44
239	TEVLDSHIHAY	"++++"	B*44
264	DEYLIPQQGF	"+"	B*44

EXEMPLO 4

Síntese de peptídeos

[00389] Todos os peptídeos foram sintetizados por técnicas

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

EXEMPLO 5

Ensaios de ligação a MHC

[00390] Os peptídeos candidatos para terapias à base de células T de acordo com a presente invenção foram testados também para sua capacidade (afinidade) de ligação ao MHC. Os complexos individuais de peptídeo com MHC foram produzidos por troca de ligantes induzida por UV, na qual um peptídeo sensível a UV é clivado por irradiação UV e trocado pelo peptídeo de interesse a ser analisado. Entre os peptídeos candidatos, apenas aqueles capazes de se ligar eficazmente e estabilizar as moléculas de MHC receptivas a peptídeos podem impedir a dissociação dos complexos de MHC. Para determinar o rendimento da reação de troca, foi realizado um ensaio ELISA baseado na detecção da cadeia leve (β2m) de complexos de MHC estabilizados. De forma geral, o ensaio foi realizado conforme descrito por Rodenko *et al* (Rodenko *et al.*, 2006).

[00391] Placas MAXISorp de 96 cavidades (NUNC) foram revestidas de um dia para outro com estreptavidina 2 □g/ml em PBS em temperatura ambiente, lavadas 4 vezes e bloqueadas por 1 h a 37℃ em BSA 2% contendo tampão bloqueador. Monômeros de HLA-A*02:01/MLA-001 foram usados como padrões, cobrindo o intervalo de 15 a 500 ng/ml. Os monômeros peptídeo-MHC da reação de troca induzida por UV foram diluídos 1:100 em um tampão bloqueador. As amostras foram incubadas por 1 h a 37ºC, lavadas 4 vezes, incubadas

com HRP 2 µg/ml conjugado com anti-β2m por 1 h a 37ºC, lavadas novamente e detectadas com solução de TMB, seguido de interrupção com NH_2SO_4. A absorbância foi medida a 450 nm. Os peptídeos candidatos que mostram altas taxas de trocas (preferivelmente maior que 50% e, mais preferivelmente, maior que 75%) são geralmente preferidos para geração e produção de anticorpos ou fragmentos de anticorpos e/ou de receptores de células T ou fragmentos dos mesmos, pois apresentam avidez suficiente pelas moléculas de MHC e impedem a dissociação dos complexos de MHC.

[00392] Tabela 11: Escores de ligação de MHC classe I. A ligação de peptídeos restritos por HLA classe I a HLA-A*01:01 foi determinada em função do rendimento de troca de peptídeos. ≥10%= +; ≥20%= ++; ≥50= +++; ≥75%= ++++

SEQ Nº	Sequência	Troca de peptídeo
1	RSDPVTLDV	"+++"
2	LPSPTDSNFY	"++"
3	ASSTDSASYY	"+++"
4	NSDLKYNAL	"++"
5	SILGSDVRVPSY	"++"
6	VLDLSTNVY	"+++"
7	LITGDPKAAYDY	"++"
8	TPVTEFSLNTY	"++"
9	FITAQNHGY	"++"
10	ITAQNHGY	"++"
11	LSAGSGPGQY	"+++"
12	ITFGERFEY	"+++"
13	GSTMVEHNY	"++"
14	YTERDGSAMVY	"+++"
15	LTDYLKNTY	"+++"
16	LSLIDRLVLY	"++"

SEQ Nº	Sequência	Troca de peptídeo
17	YTDKLQHY	"+++"
18	EVSNGKWLLY	"+++"
19	VSNGKWLLY	"+++"
20	STDEITTRY	"+++"
21	STDIGALMY	"+++"
22	TLEQVQLYY	"+++"
23	TASEDVFQY	"+"
24	YTHHLFIFY	"+"
25	LMKEVMEHY	"++"
26	EVLDSHIHAY	"+"
27	LDSHIHAY	"+"
28	LTDYINANY	"+++"
29	SVTDLEMPHY	"+"
30	VLDSHIHAY	"+++"
31	VTDLEMPHY	"++++"
32	ATVGYFIFY	"++"
33	FADKIHLAY	"+++"
34	ITDFNNIRY	"+++"
35	FASDLLHLY	"++"
36	YAAYIIHAY	"+++"
37	LTDSFPLKV	"+++"
242	FSDKELAAY	"++++"
243	RSPNNFLSY	"++"
244	RSDPVTLNV	"+++"
245	ITEKNSGLY	"+++"
246	YSDLHAFYY	"++++"
247	RSDPGGGGLAY	"+++"
248	YSHAAGQGTGLY	"+++"

[00393] Tabela 12: Escores de ligação de MHC classe I. A ligação de peptídeos restritos por HLA classe I a HLA-A*02:01 foi determinada em função do rendimento de troca de peptídeos. ≥10%= +; ≥20%= ++; ≥50= +++; ≥75%= ++++

SEQ Nº	Sequência	Troca de peptídeo
38	VMLNSNVLL	"++++"
39	YLLPSVVLL	"++++"
40	KIDDIWNLEV	"+++"
41	SLQDTKITL	"+++"
42	KMMALVAEL	"++++"
43	GLMTIVTSL	"++++"
44	SQTGFVVLV	"++"
45	KLLDEVTYL	"+++"
46	VLITGLPLI	"++++"
47	YQDSWFQQL	"+++"
49	NLASRPYSL	"++"
50	ELMPRVYTL	"+++"
51	ALAAELNQL	"+++"
52	YVSSGEMMV	"+++"
53	LLMTSLTES	"+++"
54	YLPPTDPRMSV	"++++"
55	RLWQIQHHL	"+++"
56	FLNQIYTQL	"++++"
57	GLTGVIMTI	"++++"
59	KLHEIYIQA	"++++"
60	GLPDFVKEL	"++++"
61	RLFGLFLNNV	"++++"
249	ALFPERITV	"++++"
250	KMILKMVQL	"+"
251	RLASRPLLL	"+++"

[00394] Tabela 13: Escores de ligação de MHC classe I. A ligação de

peptídeos restritos por HLA classe I a HLA-A*03:01 foi determinada em função do rendimento de troca de peptídeos. ≥10%= +; ≥20%= ++; ≥50= +++; ≥75%= ++++

SEQ Nº	Sequência	Troca de peptídeo
62	GSYSALLAKK	"+++"
63	KVLGPNGLLK	"++"
64	STTKLYLAK	"++"
65	VLGPNGLLK	"++"
66	ATYEGIQKK	"++"
67	ATALSLSNK	"+++"
68	ATAYGSTVSK	"++"
70	ATWSASLKNK	"+++"
71	KLGNNPVSK	"++"
73	KSFDRHFEK	"+++"
74	QLYSKFLLK	"+++"
75	QVPTFTIPK	"++"
76	SAFGYVFPK	"+++"
77	SSASLAHMK	"++"
78	STKSTSPPK	"++"
79	STNNEGNLK	"++"
80	STSHHLVSR	"++"
81	SVKLQGTSK	"++"
82	TAYGSTVSK	"+++"
84	TVASLHTEK	"++"
85	KMAAWPFSR	"+++"
86	KTPSGALHRK	"++"
87	SSYSRSSAVK	"+++"
88	MLLQQPLIY	"++"
89	KITDFGLAK	"++"

SEQ Nº	Sequência	Troca de peptídeo
90	GSRLGKYYVK	"+"
92	AVLDLGSLLAK	"+++"
93	ALDKPGKSK	"++"
94	KTYVGHPVKM	"+++"
95	RLFESSFHY	"+++"
96	FSLAGALNAGFK	"++"
97	RMPPPLPTR	"++"
98	KLYPTYSTK	"++"
99	ATMQSKLIQK	"+++"
100	ALLGVIIAK	"++"
101	GVIIAKKYFFK	"++"
102	IIAKKYFFK	"++"
104	STQDTLLIK	"++"
105	GSAALYLLR	"++"
106	RLSPNDQYK	"++"
109	KIIAPLVTR	"++"
110	GTESGTILK	"++"
111	KIKEHVRSK	"++"
112	KMMADYGIRK	"+++"
252	RIYNGIGVSR	"+++"
253	KLFGTSGQK	"+++"
254	AVATKFVNK	"++"

[00395] Tabela 14: Escores de ligação de MHC classe I. A ligação de peptídeos restritos por HLA classe I a HLA-A*24:02 foi determinada em função do rendimento de troca de peptídeos. ≥10%= +; ≥20%= ++; ≥50= +++; ≥75%= ++++

SEQ Nº	Sequência	Troca de peptídeo
113	VWAKILSAF	"+++"
114	KFLDSNIKF	"+++"
115	YFEEAANFL	"++"
116	LVLDYSKDYNHW	"+"
117	NFLPPIIARF	"++++"
118	TYISKTIAL	"+++"
120	MYAKEFDLL	"+++"
121	SYIEKVRFL	"+++"
122	KLYGMPTDFGF	"++"
123	RQYLAINQI	"+"
125	IYGPKYIHPSF	"++++"
126	TFQDKTLNF	"+++"
127	IFINLSPEF	"++++"
128	SYTKVEARL	"+++"
129	VFLNQIYTQL	"++"
130	VYGDGHYLTF	"+++"
133	SFDSNLLSF	"+"
134	TYLTGRQF	"++"
135	VIAPIISNF	"+++"
136	EYNNIQHLF	"+++"
137	KYLSLSNSF	"++++"
138	KYLSIPTVF	"++++"
139	PYASLASELF	"++++"
140	KYLSIPAVF	"++++"
141	KYLSIPAVFF	"++++"

[00396] Tabela 15: Escores de ligação de MHC classe I. A ligação de peptídeos restritos por HLA classe I a HLA-B*07:02 foi determinada em função do rendimento de troca de peptídeos. ≥10%= +; ≥20%= ++; ≥50=

+++; ≥75%= ++++

SEQ Nº	Sequência	Troca de peptídeo
143	FELPTGAGLQL	"++"
144	IPEPSAQQL	"++"
145	RVPSYTLIL	"+++"
146	SPGDKRLAA	"+++"
147	SPIKVPLLL	"+++"
148	VPDGVSKVL	"++"
149	YPLTGDTRL	"++"
150	KPSSKALGTSL	"+++"
151	VVHPRTLLL	"++"
152	IPSRLLAIL	"+++"
153	APAAVPSAPA	"+++"
154	GPGTRLSL	"++"
155	FPYPYAERL	"++"
156	HPQVVILSL	"+++"
157	SPSPGKDPTL	"++"
158	VPERGEPEL	"++"
159	FPAHPSLLL	"++"
160	RPAPADSAL	"+++"
161	NPYEGRVEV	"++"
162	MPMISIPRV	"++"
163	RPASSLRP	"++"
164	ISTPSEVSTPL	"++"
165	TPIAKVSEL	"+++"
166	HDPDVGSNSL	"++"
167	YPSEVEHMF	"++"
168	IPTDKLLVI	"++"
169	FPTEVTPHAF	"++"

SEQ Nº	Sequência	Troca de peptídeo
170	SPMWHVQQL	"+++"
171	APKLFAVAF	"+++"
172	KPAHYPLIAL	"+++"
173	MVPSAGQLALF	"++"
174	VPSLQRLML	"+++"
175	HPIETLVDIF	"++"
255	LPDGSRVEL	"++"
256	LPALPQQLI	"+++"
257	SPLRGGSSL	"++"
258	APSGTRVVQVL	"++"
259	RPAVGHSGL	"++"

[00397] Tabela 16: Escores de ligação de MHC classe I. A ligação de peptídeos restritos por HLA classe I a HLA-B*44:02 foi determinada em função do rendimento de troca de peptídeos. ≥10%= +; ≥20%= ++; ≥50= +++; ≥75%= ++++

SEQ Nº	Sequência	Troca de peptídeo
195	AEAVLKTLQEL	"+++"
196	AEQTGTWKL	"++"
197	EEAKQVLFL	"++"
198	FELPTGAGL	"++"
199	GEATLQRIY	"+"
200	GEELGFASL	"++"
201	GEHTSKATL	"++"
202	KEFNLQNMGL	"+++"
203	KENFAGEATL	"++"
204	KESQLPTVM	"++"
205	QEVLLQTFL	"++++"

SEQ Nº	Sequência	Troca de peptídeo
206	SEPINIIDAL	"++"
207	TEATMTFKY	"+++"
208	AEHDAVRNAL	"+++"
209	YEVDTVLRY	"++"
210	SENIVIQVY	"++"
211	TEKEMIQKL	"++"
212	AEETCAPSV	"++"
213	TTMDQKSLW	"+"
214	AEQPDGLIL	"++"
216	LQEEKVPAIY	"+"
217	NEINEKIAPSF	"+++"
218	AEGGKVPIKW	"+++"
219	AENAEYLRV	"++"
220	KEITGFLLI	"+++"
221	AEERAEAKKKF	"++"
222	NEISTFHNL	"+++"
223	SEVPVARVW	"++++"
224	SESAVFHGF	"+++"
225	SEAFPSRAL	"+++"
226	EELLHGQLF	"++"
227	TEHTQSQAAW	"+++"
228	AEKQTPDGRKY	"++"
229	KESDGFHRF	"+++"
230	AENLFRAFL	"+++"
231	AEIHTAEI	"++"
232	AEKDGKLTDY	"++"
233	DESEKTTKSF	"++"
234	EEESLLTSF	"+++"

SEQ Nº	Sequência	Troca de peptídeo
235	EEFETLKEF	"++"
236	EEKLIIQDF	"++"
237	LEMPHYSTF	"++++"
238	SENPETITY	"+++"
239	TEVLDSHIHAY	"++"
240	HELENHSMY	"++"
241	REAEPIPKM	"++"
260	EEAPLVTKAF	"++"
261	IEALLESSL	"++"
262	MELLLVNKL	"+++"
263	QQATPGPAY	"++"
264	DEYLIPQQGF	"+++"
265	EEVDVPIKLY	"++"
266	ARLTPIPFGL	"+"

EXEMPLO 6

Estabilidade de complexos de peptídeos com MHC classe I

[00398] A estabilidade da ligação de peptídeos com MHC do tipo HLA-B*08:01 foi medida pelo ensaio ImmunAware (Copenhagen, Dinamarca). Os dados foram obtidos a partir de um ensaio baseado em proximidade, que foi realizado de forma homogênea e em tempo real para medir a dissociação de peptídeos de moléculas de HLA classe I. Primeiramente HLA-B*08:01 e b2m humanos recombinantes foram expressos em *E. coli* e purificados em uma série de etapas baseadas em cromatografia líquida (Ferre *et al.*, 2003; Ostergaard *et al.*, 2001). Em seguida, determinou-se a estabilidade de um complexo de peptídeo com MHC (pMHC) medindo-se a quantidade de b2m associada a cadeias pesadas de MHC por um intervalo de tempo a 37°C (Harndahl *et al.*, 2012). A estabilidade dos pMHC (expressa como meia-vida do

b2m associado à respectiva cadeia pesada) foi calculada ajustando-se os dados a uma equação de dissociação monofásica.

[00399] A estabilidade do pMHC foi medida em três experimentos independentes com os peptídeos em questão. Constatou-se que com o HLA-B*08:01 a ligação pode ser de fraca (+) a muito intensa (++++). A meia-vida média ($t_{1/2}$) é mostrada na Tabela 17.

Tabela 17: Meia-vida média ($t_{1/2}$) baseada em três medições individuais. $t_{1/2}$ > 2 h: +; $t_{1/2}$ > 4 h= ++; $t_{1/2}$ > 6 h= +++; $t_{1/2}$ > 10 h= ++++

SEQ Nº	Sequência	Meia-vida média ($t_{1/2}$)
176	AAMSRYEL	++
177	DLKYNALDL	+++
178	HAKEKLTAL	+++
180	LLKAEPLAF	++
181	YKKLRTSSF	++
182	LPFLRENDL	++
183	FQKLKLLSL	+
184	EPVKKSRL	+++
185	NPNLKTLL	++
187	YVKERSKAM	+++
189	HIFLRTTL	++
192	LPMLKVLNL	+
193	LSYNKYLQL	++
194	EAKRHLLQV	++

Lista de referências

Allison, J. P. *et al.*, Science **270** (1995): 932-933

Ampie, L. *et al.*, Front Oncol. **5** (2015): 12

Andersen, R. S. *et al.*, Nat.Protoc. **7** (2012): 891-902

Appay, V. *et al.*, Eur.J Immunol. **36** (2006): 1805-1814

Avigan, D. *et al.*, Clin Cancer Res. **10** (2004): 4699-4708

Banchereau, J. *et al.*, Cell **106** (2001): 271-274

Beatty, G. *et al.*, J Immunol **166** (2001): 2276-2282

Beggs, J. D., Nature **275** (1978): 104-109

Berman, R. S. *et al.*, National Cancer Institute: PDQ(R) Colon Cancer Treatment (2015a)

Berman, R. S. *et al.*, National Cancer Institute: PDQ(R) Rectal Cancer Treatment (2015b)

Boulter, J. M. *et al.*, Protein Eng **16** (2003): 707-711

Braumuller, H. *et al.*, Nature (2013)

Bray, F. *et al.*, Int J Cancer **132** (2013): 1133-1145

Brossart, P. *et al.*, Blood **90** (1997): 1594-1599

Bruckdorfer, T. *et al.*, Curr.Pharm.Biotechnol. **5** (2004): 29-43

Butterfield, L. H. *et al.*, Clin Cancer Res **12** (2006): 2817-2825

Butterfield, L. H. *et al.*, Clin Cancer Res **9** (2003): 5902-5908

Card, K. F. *et al.*, Cancer Immunol Immunother. **53** (2004): 345-357

Chang, Y. S. *et al.*, Cancer Chemother.Pharmacol. **59** (2007): 561-574

Chapiro, J. *et al.*, Radiol.Med. **119** (2014): 476-482

Cohen, C. J. *et al.*, J Mol Recognit. **16** (2003a): 324-332

Cohen, C. J. *et al.*, J Immunol **170** (2003b): 4349-4361

Cohen, S. N. *et al.*, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **69** (1972): 2110-2114

Coligan, J. E. *et al.*, Current Protocols in Protein Science (1995)

Colombetti, S. *et al.*, J Immunol. **176** (2006): 2730-2738

Dengjel, J. *et al.*, Clin Cancer Res **12** (2006): 4163-4170

Denkberg, G. *et al.*, J Immunol **171** (2003): 2197-2207

Enguita-German, M. *et al.*, World J Hepatol. **6** (2014): 716-737

Falk, K. *et al.*, Nature **351** (1991): 290-296

Ferlay *et al.*, GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11 [Internet], (2013), http://globocan.iarc.fr

Ferre, H. *et al.*, Protein Sci. **12** (2003): 551-559

Follenzi, A. *et al.*, Nat Genet. **25** (2000): 217-222

Fong, L. *et al.*, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **98** (2001): 8809-8814

Gabrilovich, D. I. *et al.*, Nat Med. **2** (1996): 1096-1103

Gattinoni, L. *et al.*, Nat Rev.Immunol **6** (2006): 383-393

Gnjatic, S. *et al.*, Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A **100** (2003): 8862-8867

Godkin, A. *et al.*, Int.Immunol **9** (1997): 905-911

Gragert, L. *et al.*, Hum.Immunol. **74** (2013): 1313-1320

Green, M. R. *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual **4th** (2012)

Greenfield, E. A., Antibodies: A Laboratory Manual **2nd** (2014)

Gustafsson, C. *et al.*, Trends Biotechnol. **22** (2004): 346-353

Harndahl, M. *et al.*, Eur.J Immunol. **42** (2012): 1405-1416

Holtl, L. *et al.*, Clin.Cancer Res. **8** (2002): 3369-3376

Horig, H. *et al.*, Cancer Immunol Immunother. **49** (2000): 504-514

Hwang, M. L. *et al.*, J Immunol. **179** (2007): 5829-5838

Jung, G. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A **84** (1987): 4611-4615

Kaufman, H. L. *et al.*, Clin Cancer Res **14** (2008): 4843-4849

Kibbe, A. H., Handbook of Pharmaceutical Excipients **rd** (2000)

Koido, S. *et al.*, World J Gastroenterol. **19** (2013): 8531-8542

Krieg, A. M., Nat Rev.Drug Discov. **5** (2006): 471-484

Kuball, J. *et al.*, Blood **109** (2007): 2331-2338

Lee, W. C. *et al.*, J Immunother. **28** (2005): 496-504

Leitlinie Magenkarzinom, **032-009OL**, (2012)

Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, **030/099**, (2014)

Liddy, N. *et al.*, Nat Med. **18** (2012): 980-987

Ljunggren, H. G. *et al.*, J Exp.Med. **162** (1985): 1745-1759

Llovet, J. M. *et al.*, N.Engl.J Med. **359** (2008): 378-390

Longenecker, B. M. *et al.*, Ann N.Y.Acad.Sci. **690** (1993): 276-291

Lukas, T. J. *et al.*, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **78** (1981): 2791-2795

Lundblad, R. L., Chemical Reagents for Protein Modification **3rd** (2004)

Marten, A. *et al.*, Cancer Immunol.Immunother. **51** (2002): 637-644

Massari, F. *et al.*, Cancer Treat.Rev. **41** (2015): 114-121

Matsueda, S. *et al.*, World J Gastroenterol. **20** (2014): 1657-1666

Meziere, C. *et al.*, J Immunol **159** (1997): 3230-3237

Miyagi, Y. *et al.*, Clin Cancer Res **7** (2001): 3950-3962

Morgan, R. A. *et al.*, Science **314** (2006): 126-129

Mortara, L. *et al.*, Clin Cancer Res. **12** (2006): 3435-3443

Moulton, H. M. *et al.*, Clin Cancer Res **8** (2002): 2044-2051

Mumberg, D. *et al.*, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **96** (1999): 8633-8638

Okuno, K. *et al.*, Exp.Ther Med. **2** (2011): 73-79

Ostergaard, Pedersen L. *et al.*, Eur.J Immunol. **31** (2001): 2986-2996

Palmer, D. H. *et al.*, Hepatology **49** (2009): 124-132

Plebanski, M. *et al.*, Eur.J Immunol **25** (1995): 1783-1787

Porta, C. *et al.*, Virology **202** (1994): 949-955

Rammensee, H. *et al.*, Immunogenetics **50** (1999): 213-219

Reinisch, W. *et al.*, J Immunother. **25** (2002): 489-499

Rini, B. I. *et al.*, Curr.Opin.Oncol. **20** (2008): 300-306

Rini, B. I. *et al.*, Cancer **107** (2006): 67-74

Rock, K. L. *et al.*, Science **249** (1990): 918-921

Rodenko, B. *et al.*, Nat Protoc. **1** (2006): 1120-1132

Saiki, R. K. *et al.*, Science **239** (1988): 487-491

Sangro, B. *et al.*, J Clin Oncol **22** (2004): 1389-1397

Schmitt, T. M. *et al.*, Hum.Gene Ther. **20** (2009): 1240-1248

Scholten, K. B. *et al.*, Clin Immunol. **119** (2006): 135-145

Seeger, F. H. *et al.*, Immunogenetics **49** (1999): 571-576

Sherman, F. *et al.*, Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics (1986)

Shi, M. *et al.*, World J Gastroenterol. **10** (2004): 1146-1151

Singh-Jasuja, H. *et al.*, Cancer Immunol.Immunother. **53** (2004): 187-195

Small, E. J. *et al.*, J Clin Oncol. **24** (2006): 3089-3094

Stintzing, S., F1000Prime.Rep. **6** (2014): 108

Su, Z. *et al.*, Cancer Res. **63** (2003): 2127-2133

Takayama, T. *et al.*, Cancer **68** (1991): 2391-2396

Takayama, T. *et al.*, Lancet **356** (2000): 802-807

Teufel, R. *et al.*, Cell Mol Life Sci. **62** (2005): 1755-1762

Thakkar, J. P. *et al.*, Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. **23** (2014): 1985-1996

Tran, E. *et al.*, Science **344** (2014): 641-645

Walter, S. *et al.*, J Immunol **171** (2003): 4974-4978

Walter, S. *et al.*, Nat Med. **18** (2012): 1254-1261

Wilhelm, S. M. *et al.*, Cancer Res **64** (2004): 7099-7109

Willcox, B. E. *et al.*, Protein Sci. **8** (1999): 2418-2423

Wilson, P. M. *et al.*, Nat Rev.Clin Oncol **11** (2014): 282-298

Wittig, B. *et al.*, Hum.Gene Ther. **12** (2001): 267-278

Zaremba, S. *et al.*, Cancer Res. **57** (1997): 4570-4577

Zufferey, R. *et al.*, J Virol. **73** (1999): 2886-2892

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo formado por SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 268 e sequências variantes da mesma com pelo menos 88% de homologia com SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 268, caracterizado pelo fato de que as referidas variantes se ligam a molécula(s) do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e/ou induzem reação cruzada de células T com o referido peptídeo variante, e um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, sendo que o referido peptídeo não é um polipeptídeo completo.

2. Peptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido peptídeo possui capacidade de se ligar a uma molécula de MHC classe I ou II, sendo que tal peptídeo pode, quando ligado ao referido MHC, ser capaz de ser reconhecido por células T CD4 e/ou CD8.

3. Peptídeo ou variante do mesmo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos do mesmo compreende um segmento contínuo de aminoácidos de acordo com qualquer elemento de SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 268.

4. Peptídeo ou variante do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o referido peptídeo ou variante do mesmo possui comprimento total de 8 a 100, preferivelmente de 8 a 30, mais preferivelmente de 8 a 16 aminoácidos e, mais preferido de todos, em que o peptídeo consiste ou consiste essencialmente em uma sequência de aminoácidos de acordo com qualquer uma das SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 268.

5. Peptídeo ou variante do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o peptídeo é modificado e/ou inclui ligações não peptídicas.

6. Peptídeo ou variante do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o referido peptídeo é parte de uma proteína de fusão, em especial uma proteína que contém aminoácidos N-terminais da cadeia invariante (Ii) associada ao antígeno HLA-DR.

7. Anticorpo, em particular um anticorpo solúvel ou ligado a membrana, preferivelmente um anticorpo monoclonal ou fragmento do mesmo, caracterizado pelo fato de que reconhece especificamente o peptídeo ou variante do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, preferivelmente o peptídeo ou variante do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 quando ligado a uma molécula de MHC.

8. Receptor de célula T, preferivelmente solúvel ou ligado à membrana, ou um fragmento do mesmo que reaja com um ligante de HLA, caracterizado pelo fato de que o referido ligante é o peptídeo ou variante do mesmo como definido qualquer uma das reivindicações 1 a 5, preferivelmente o peptídeo ou variante do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 quando ligado a uma molécula de MHC.

9. Receptor de célula T de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a referida sequência ligante de aminoácidos é pelo menos 88% idêntica a qualquer uma das sequências SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 268 ou em que a referida sequência ligante de aminoácidos consiste em qualquer uma das sequências SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 268.

10. Receptor de células T de acordo com a reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que o referido receptor de células T é fornecido como molécula solúvel e, opcionalmente, realiza outra função efetora como domínio de imunoestimulação ou toxina.

11. Aptâmero, caracterizado pelo fato de que reconhece

especificamente o peptídeo ou variante do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, preferivelmente o peptídeo ou variante do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ligado a uma molécula de MHC.

12. Ácido nucleico que codifica um peptídeo ou uma variante do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, um anticorpo ou fragmento do mesmo como definindo na reivindicação 7 ou um receptor de célula T ou fragmento do mesmo como definido na reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de ser ligado opcionalmente a uma sequência promotora heteróloga ou a um vetor de expressão que expressa o referido ácido nucleico.

13. Célula hospedeira recombinante que compreende o peptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, o anticorpo ou fragmento do mesmo como definido na reivindicação 7, o receptor de célula T ou fragmento do mesmo como definido na reivindicação 8 ou 9 ou o ácido nucleico ou o vetor de expressão como definido na reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a referida célula hospedeira é selecionada preferivelmente entre uma célula apresentadora de antígeno, tal como uma célula dendrítica, uma célula T ou uma célula NK.

14. Método *in vitro* de produção de linfócitos T ativados, caracterizado pelo fato de que o método compreende colocar células T em contato *in vitro* com moléculas de MHC classe I ou II humanas expressas na superfície de células apresentadoras de antígeno adequadas ou uma estrutura artificial que mimetiza uma célula apresentadora de antígeno por um período suficientemente longo para ativar as referidas células T de forma específica para o antígeno, sendo que tal antígeno é o peptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

15. Linfócito T ativado produzido pelo método como

definido na reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que reconhece seletivamente uma célula que apresenta um polipeptídeo que compreende uma das sequências de aminoácidos apresentadas como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

16. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos um ingrediente ativo selecionado do grupo que consiste em peptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, o anticorpo ou fragmento do mesmo como definido na reivindicação 7, o receptor de célula T ou fragmento do mesmo como definido na reivindicação 8 ou 9, o aptâmero como definido na reivindicação 11, o ácido nucleico ou vetor de expressão como definido na reivindicação 12, a célula hospedeira como definida na reivindicação 13 ou o linfócito T ativado como definido na reivindicação 15 ou um ingrediente ativo conjugado ou marcado e um veículo farmaceuticamente aceitável e, opcionalmente, excipientes e/ou estabilizantes farmaceuticamente aceitáveis.

17. Método de produção de um peptídeo ou variante do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, o anticorpo ou fragmento do mesmo como definido na reivindicação 7 ou o receptor de célula T ou fragmento do mesmo como definido na reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que o método compreende a cultura da célula como definida na reivindicação 13 e o isolamento do peptídeo ou variante do mesmo, do anticorpo ou fragmento do mesmo ou do receptor de célula T ou fragmento do mesmo da referida célula hospedeira e/ou de seu meio de cultura.

18. Peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, anticorpo ou fragmento do mesmo de acordo com a reivindicação 7, receptor de célula T ou fragmento do mesmo de acordo com a reivindicação 8 ou 9, aptâmero de acordo com a reivindicação 11, ácido nucleico ou vetor de expressão de acordo com

a reivindicação 12, célula hospedeira de acordo com a reivindicação 13 ou linfócito T ativado de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de ser para uso em medicina.

19. Método para matar células-alvo em um paciente no qual as células-alvo apresentam um polipeptídeo que compreende uma das sequências de aminoácidos como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o método compreende administração ao paciente de um número eficaz de células T ativadas, como definidas na reivindicação 15.

20. Peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, anticorpo ou fragmento do mesmo de acordo com a reivindicação 7, receptor de célula T ou fragmento do mesmo de acordo com a reivindicação 8 ou 9, aptâmero de acordo com a reivindicação 11, ácido nucleico ou vetor de expressão de acordo com a reivindicação 12, célula hospedeira de acordo com a reivindicação 13 ou o linfócito T ativado de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de ser para uso no diagnóstico e/ou tratamento do câncer ou para uso na fabricação de um medicamento anticâncer.

21. Uso de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o referido câncer é selecionado do grupo formado por câncer colorretal, glioblastoma, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide crônica ou aguda; outras neoplasias linfoides como, por exemplo, linfoma não Hodgkin, distúrbios linfoproliferativos pós-transplante (DLPT); outras neoplasias mieloides como mielofibrose primária, trombocitopenia essencial, policitemia vera; e outras neoplasias como câncer de esôfago, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de pulmão de pequenas células, câncer de pâncreas, câncer de próstata, melanoma, câncer de mama, câncer da vesícula biliar, colangiocarcinoma, câncer de bexiga, câncer do útero, carcinoma

de células escamosas de cabeça e pescoço, mesotelioma e outros tumores que apresentam sobrexpressão de uma proteína da qual sejam derivados os peptídeos com SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 268.

22. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um recipiente que compreende uma composição farmacêutica que contém o(s) peptídeo(s) como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, o anticorpo ou fragmento do mesmo como definido na reivindicação 7, o receptor de célula T ou fragmento do mesmo como definido na reivindicação 8 ou 9, o aptâmero como definido na reivindicação 11, o ácido nucleico ou vetor de expressão como definido na reivindicação 12, a célula hospedeira como definida na reivindicação 13 ou o linfócito T ativado como definido na reivindicação 15 em solução ou em forma liofilizada.

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

(c) opcionalmente, pelo menos mais um peptídeo selecionado do grupo formado por SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 268; e

(d) opcionalmente, instruções de (i) uso da solução ou (ii) reconstituição e/ou uso da formulação liofilizada.

23. Kit de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que compreende também um ou mais dentre (iii) uma solução tampão, (iv) um diluente, (v) um filtro, (vi) uma agulha ou (v) uma seringa.

24. Método de produção de uma vacina anticâncer personalizada para tratamento à base de compostos ou células para pacientes individuais, caracterizado pelo fato de que o referido método compreende:

a) identificar os peptídeos associados a tumores (TUMAPs) apresentados por uma amostra tumoral obtida do referido paciente individual;

b) comparar os peptídeos identificados em a) com um depósito de peptídeos pré-selecionados de acordo com sua imunogenicidade e/ou apresentação aumentada em tumores em comparação com tecidos normais;

c) selecionar pelo menos um peptídeo do depósito que corresponda a um TUMAP identificado no paciente; e

d) fabricar e/ou formular a vacina personalizada ou produto para terapia a base de compostos ou de células de acordo com a etapa c).

25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que os TUMAPs são identificados por:

a1) comparações dos dados de expressão da amostra tumoral com os dados de expressão de uma amostra de tecido normal correspondente ao tipo de tecido da amostra tumoral para identificar proteínas sobrexpressas ou com expressão aberrante na amostra tumoral; e

a2) correlações dos dados de expressão com as sequências de ligantes de MHC ligados a moléculas de MHC classe I e/ou MHC classe II na amostra tumoral para identificar ligantes de MHC derivados de proteínas sobrexpressas ou expressas de maneira aberrante pelo tumor.

26. Método de acordo com a reivindicação 24 ou 25, caracterizado pelo fato de que as sequências dos ligantes de MHC são identificadas eluindo-se os peptídeos ligados das moléculas de MHC isoladas da amostra tumoral e sequenciando-se os ligantes eluídos.

27. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 26, caracterizado pelo fato de que o tecido normal correspondente ao tipo de tecido do tumor é obtido do mesmo paciente.

28. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 27, caracterizado pelo fato de que os peptídeos

incluídos no depósito são identificados conforme as seguintes etapas:

aa. Realização de análise de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) em todo o genoma através de métodos paralelos em alto grau, usando microarrays ou perfis de expressão baseados em sequenciamento, compreendendo a identificação de genes sobrexpressos em tecidos malignos em comparação com um ou mais tecidos normais;

ab. Seleção dos peptídeos codificados pelos genes sobrexpressos ou expressos seletivamente detectados na etapa aa; e

ac. Determinar as respostas de células T induzidas *in vivo* pelos peptídeos selecionados a partir de ensaios de imunogenicidade *in vitro* usando células T humanas de doadores saudáveis ou do referido paciente; ou

ba. Identificação de ligantes de HLA da amostra tumoral usando espectrometria de massa;

bb. Realização de análise de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) em todo o genoma, através de métodos paralelos em alto grau, usando microarrays ou perfis de expressão baseados em sequenciamento, compreendendo a identificação de genes sobrexpressos em tecidos malignos em comparação com um ou mais tecidos normais;

bc. Comparação dos ligantes de HLA identificados com os referidos dados de expressão gênica;

bd. Seleção de peptídeos codificados por genes sobrexpressos ou expressos seletivamente detectados na etapa bc;

be. Nova detecção dos TUMAPs selecionados na etapa bd em tecidos tumorais e pouca ou nenhuma detecção em tecidos saudáveis e confirmação da relevância da sobrexpressão ao nível de mRNA; e

bf. Determinação da indução de respostas de células T *in*

vivo pelos peptídeos selecionados a partir de ensaios de imunogenicidade *in vitro* em células T humanas de doadores saudáveis ou do referido paciente.

29. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 28, caracterizado pelo fato de que a imunogenicidade dos peptídeos incluídos no depósito é determinada por um método que compreende ensaios de imunogenicidade *in vitro*, monitoramento da imunidade do paciente para detecção de ligação a HLAs individuais, coloração para multímeros de MHC, ensaios ELISPOT e/ou coloração para citoquinas intracelulares.

30. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 29, caracterizado pelo fato de que o referido depósito compreende uma pluralidade de peptídeos selecionados do grupo formado por SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 268.

31. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 30, caracterizado pelo fato de compreender a identificação de pelo menos uma mutação exclusiva para a amostra tumoral em relação ao tecido normal correspondente de um paciente individual e seleção de um peptídeo que se correlaciona com a mutação para inclusão na vacina ou na criação de terapias celulares.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma mutação é identificada por sequenciamento de genoma inteiro.

Figura 1A

Gene: EGFR

Peptídeo: LPSPTDSNFY

SEQ Nº: 2

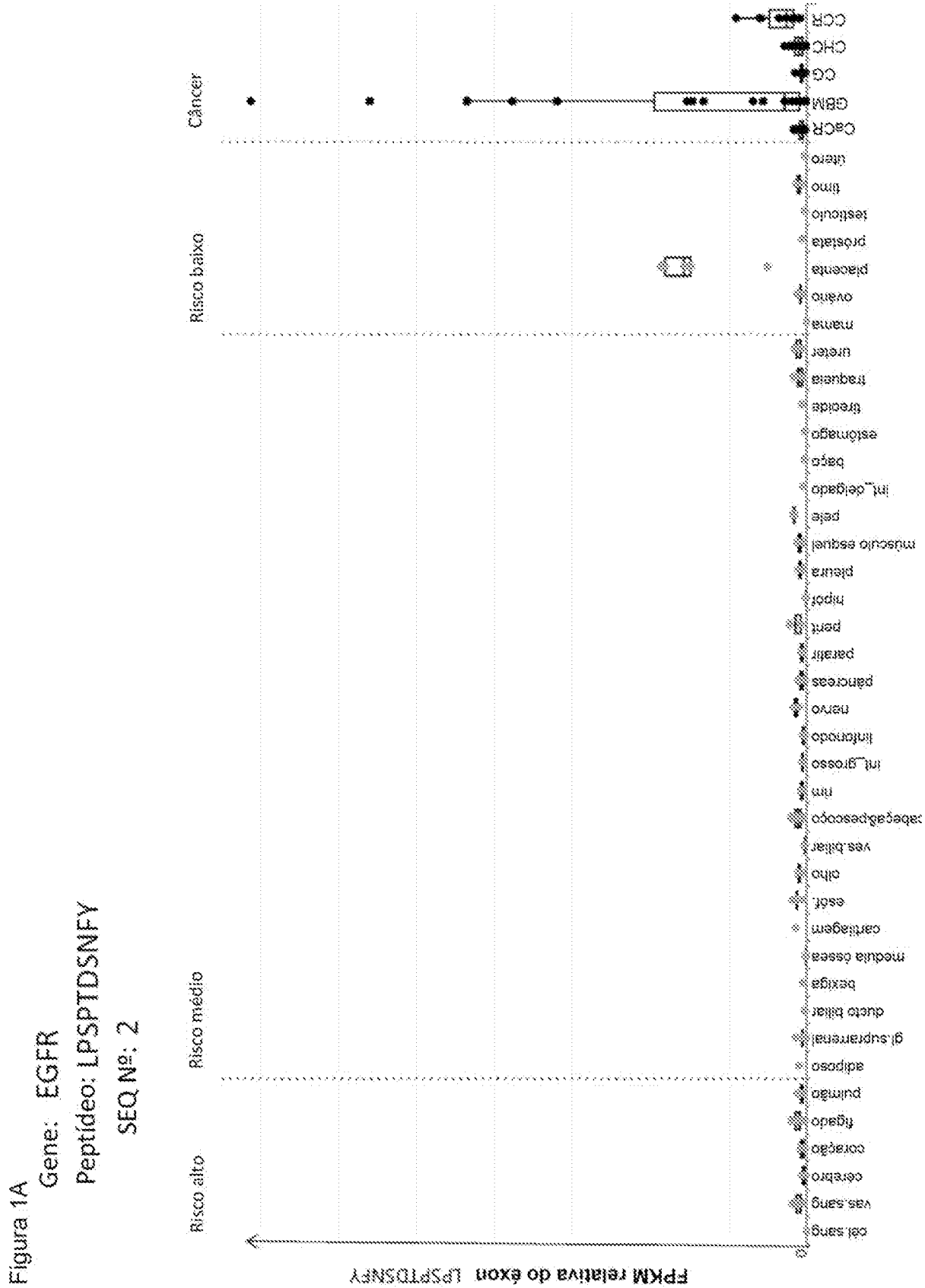
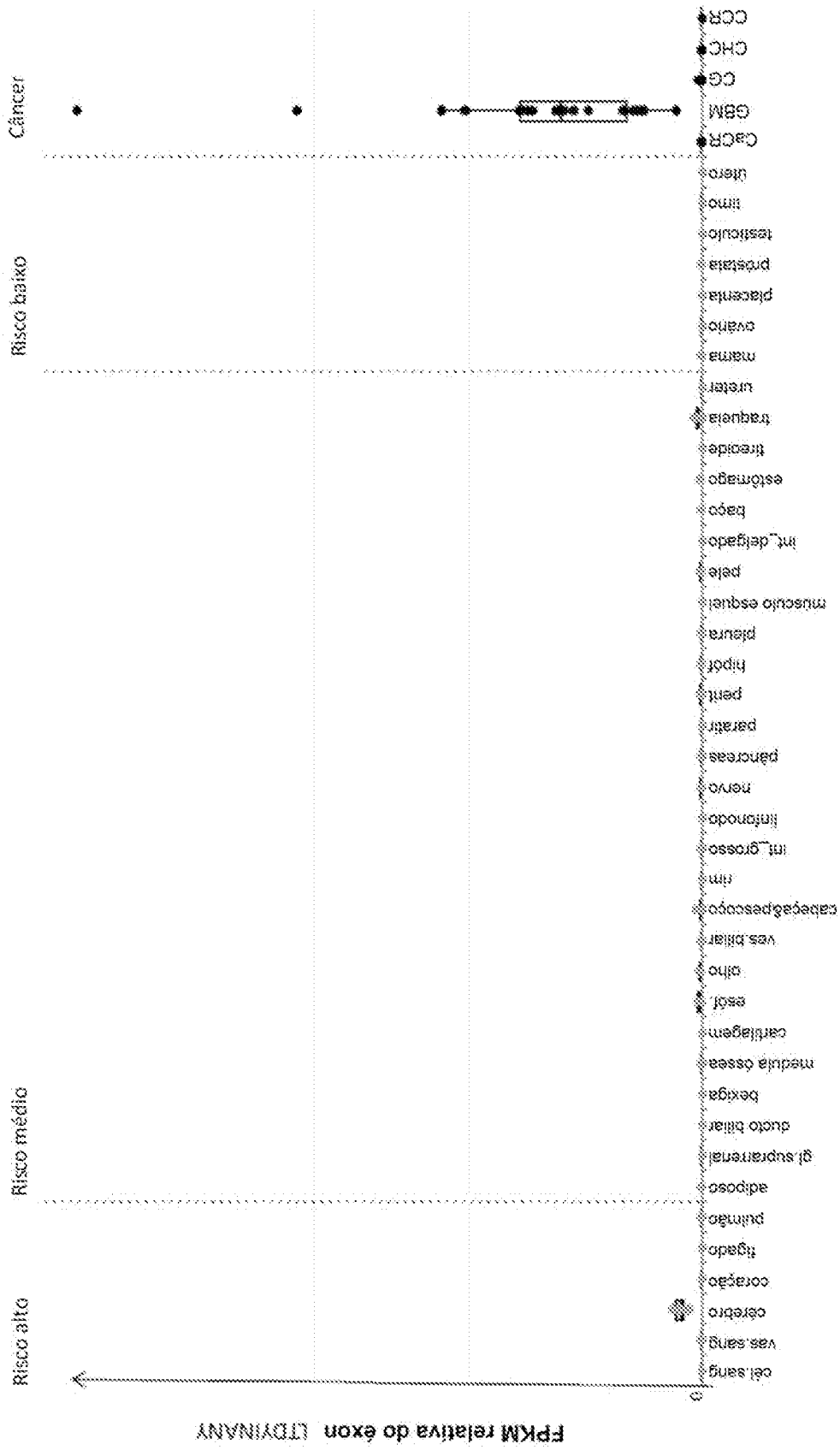


Figura 1B

Gene: PTPRZ1

Peptídeo: LTDYINANY

SEQ Nº: 28



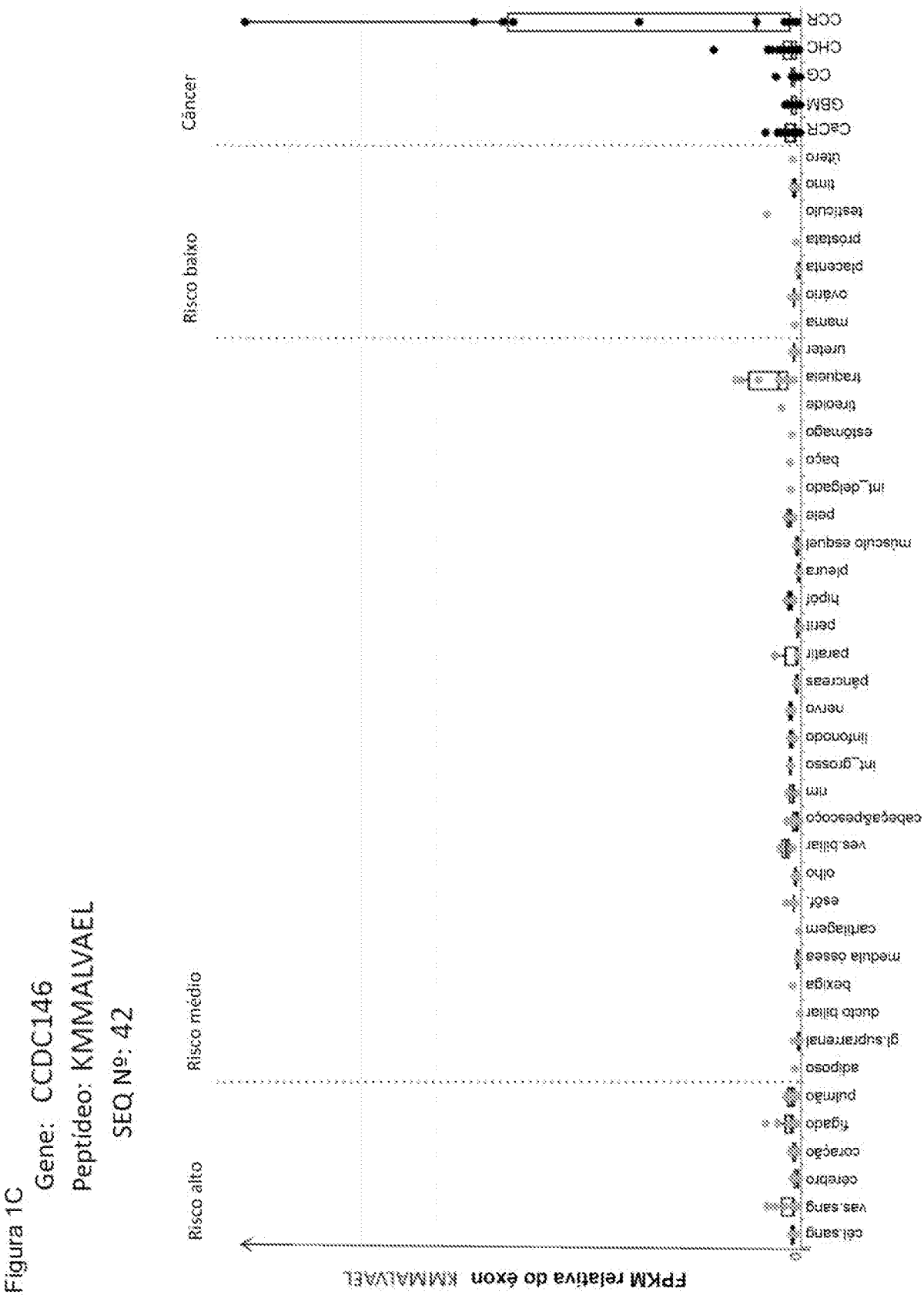

Figura 1C
Gene: CCDC146
Peptídeo: KMMALVAEL
SEQ Nº: 42
FPKM relativa do éxon KMMALVAEL
Risco alto
Risco médio
Risco baixo
Câncer
cel.sang
vas.sang
cerebro
coração
figado
pulmão
adiposo
gl.suprarrenal
ducto biliar
bexiga
medula óssea
cartilagem
estômago
olho
ves.biliar
cabeça&pescoço
rim
int_grosso
linfonodo
nervo
pâncreas
paratir
perit
hipof
pleura
músculo esquel
pele
int_delgado
baço
estômago
traqueia
ureter
mama
ovário
placenta
próstata
testículo
útero
CaCR
GBM
CG
CHC
CCR

Figura 1D

Gene: MMP16

Peptídeo: YLPPTDPRMSV

SEQ Nº: 54

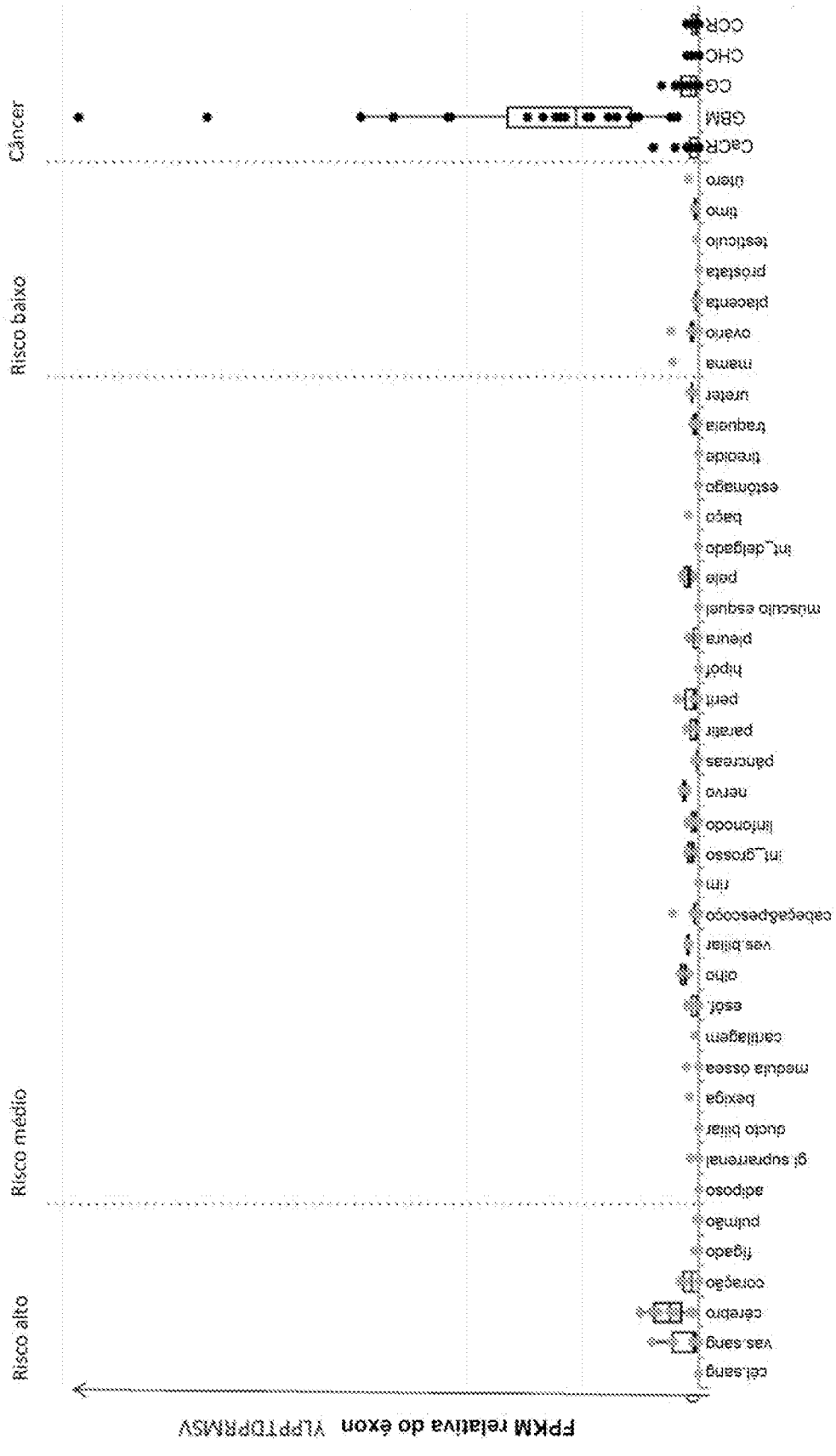


Figura 1E

Gene: RP11-1220K2.2

Peptídeo: GLPDFVKEL

SEQ Nº: 60

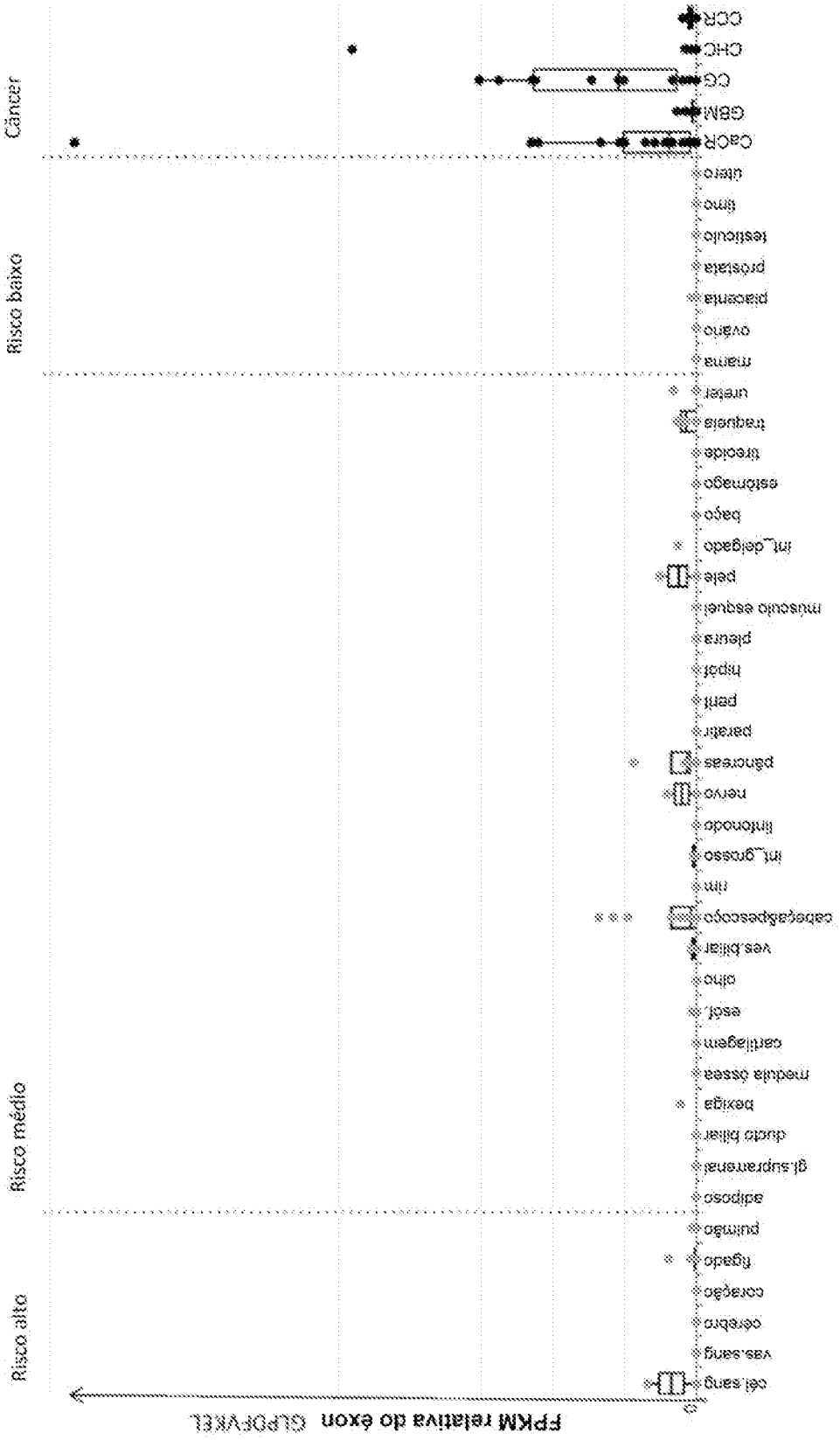


Figura 1F

Gene: GRM8

Peptídeo: ATMQSKLIQK

SEQ Nº: 99

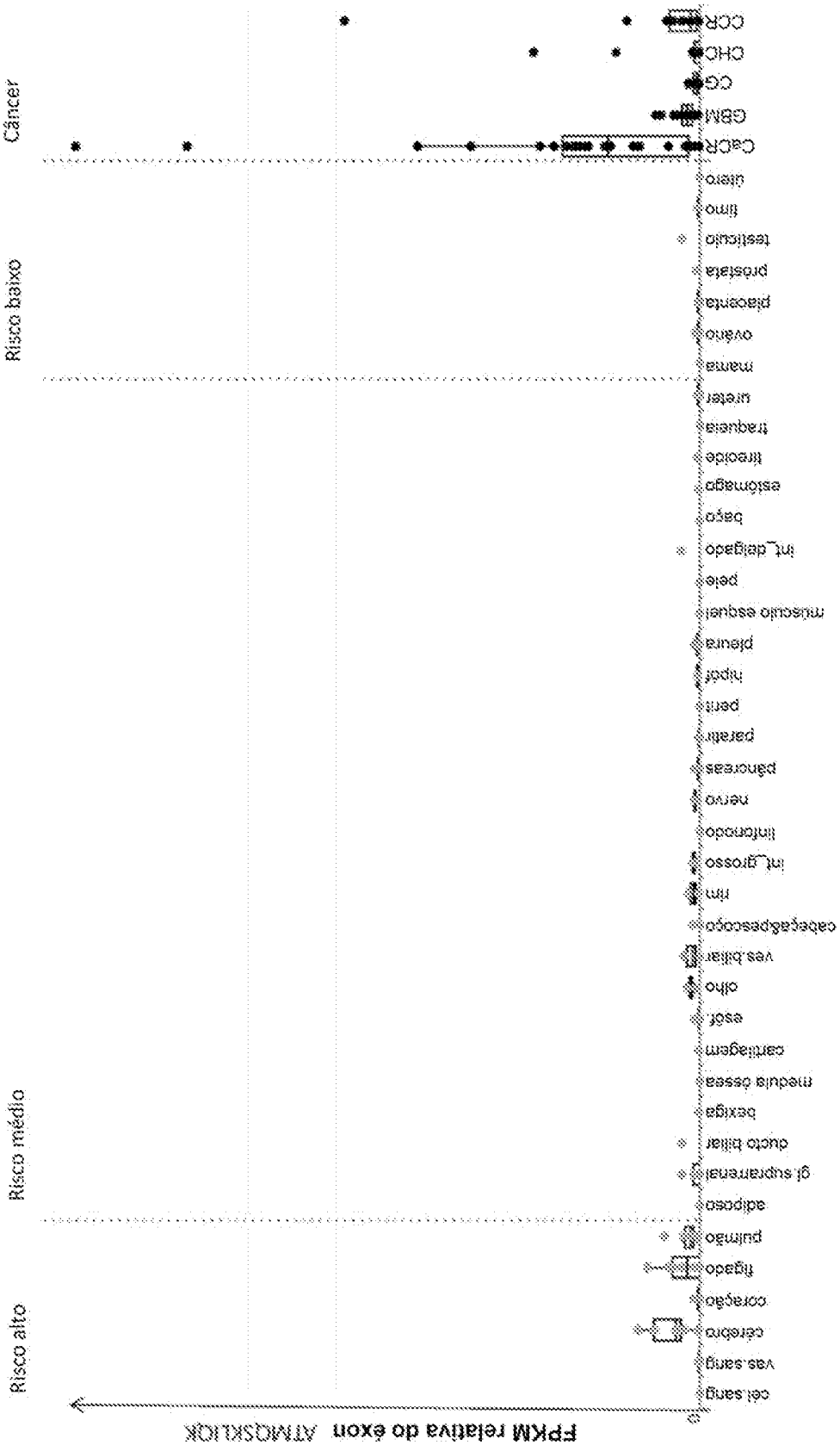


Figura 1G

Gene: HAVCR1

Peptídeo: GVIIAKKYFFK

SEQ Nº: 101

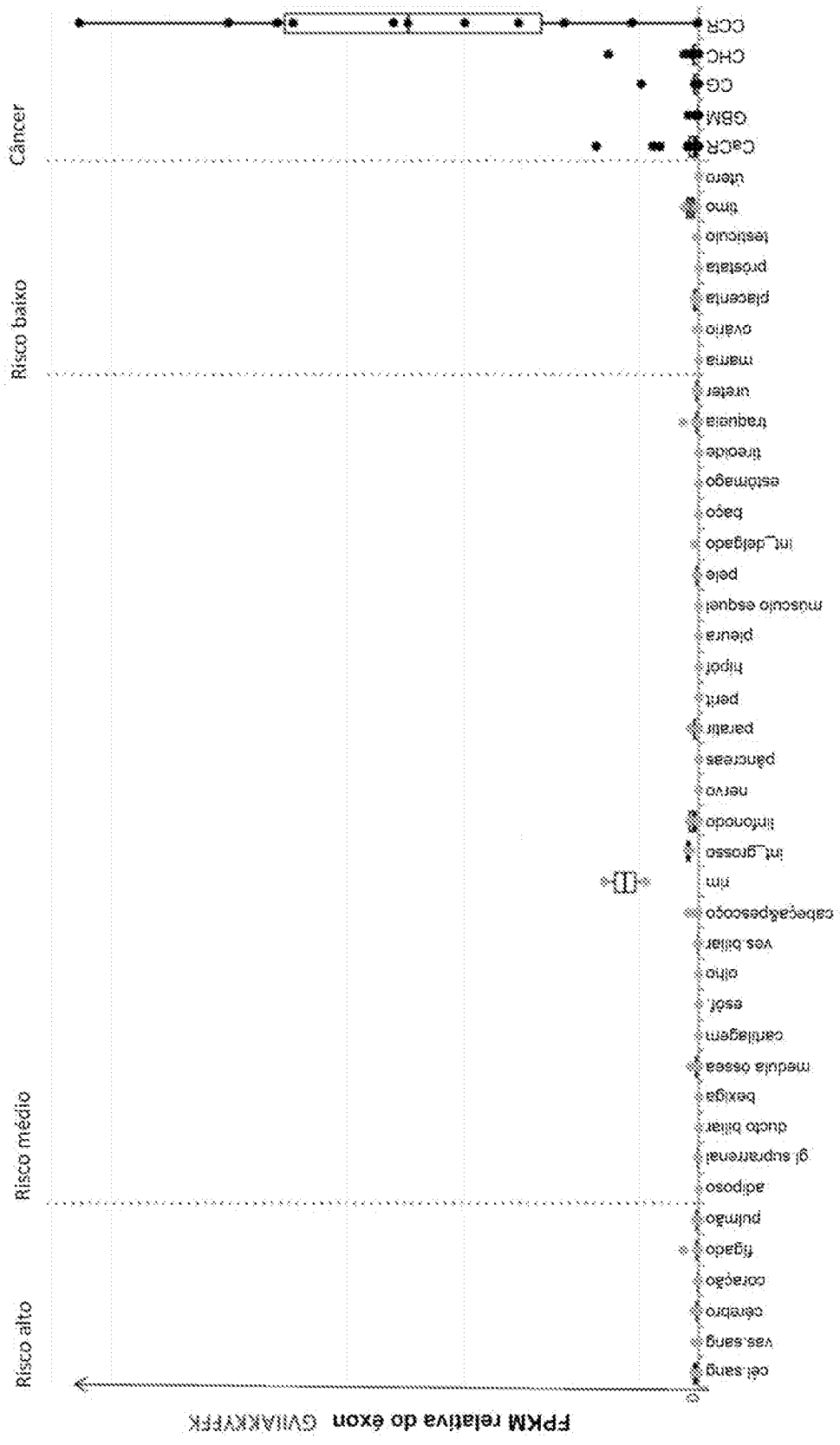


Figura 1H

Gene: SEMA5B

Peptídeo: GTESGTILK

SEQ Nº: 110

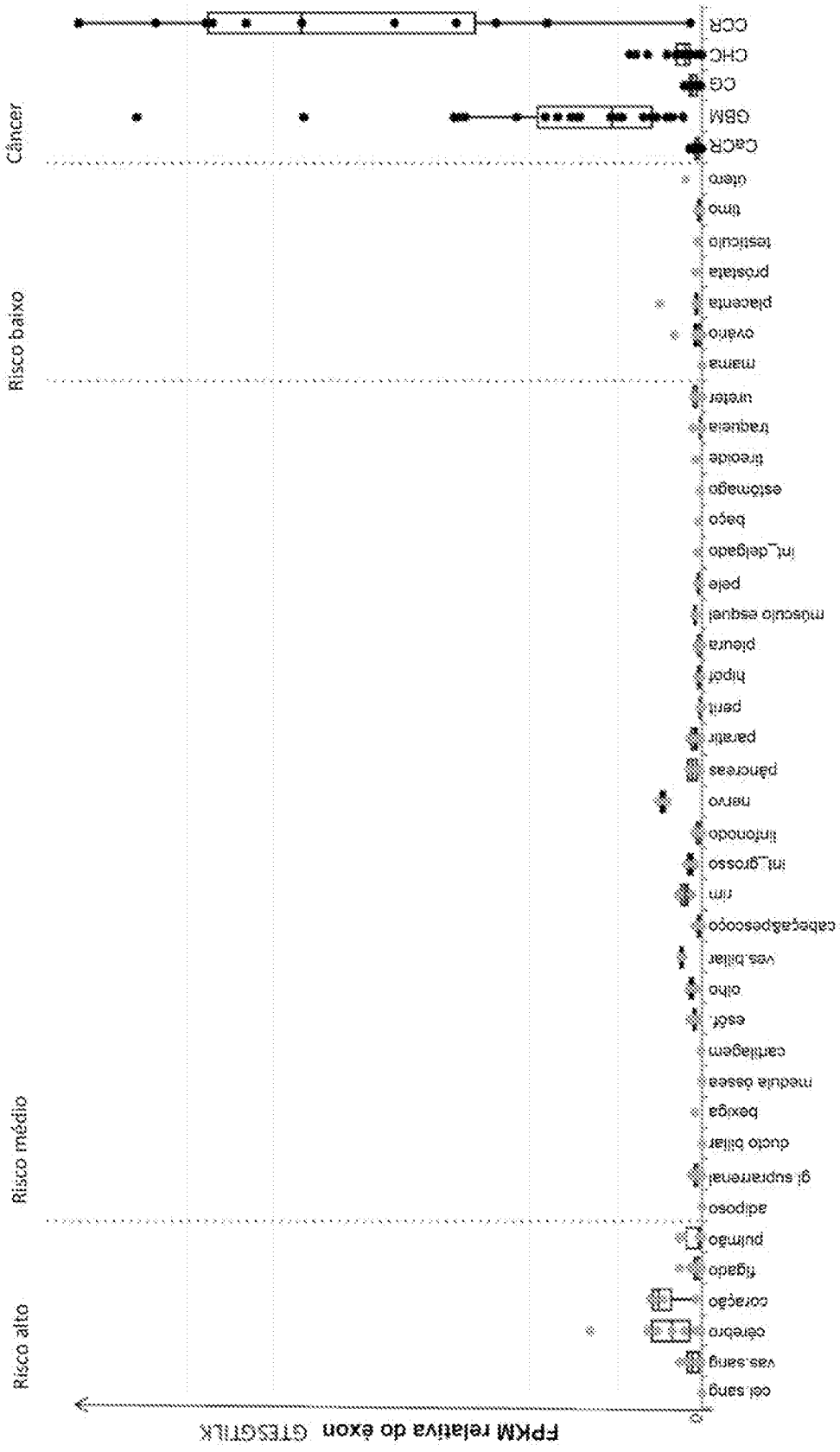
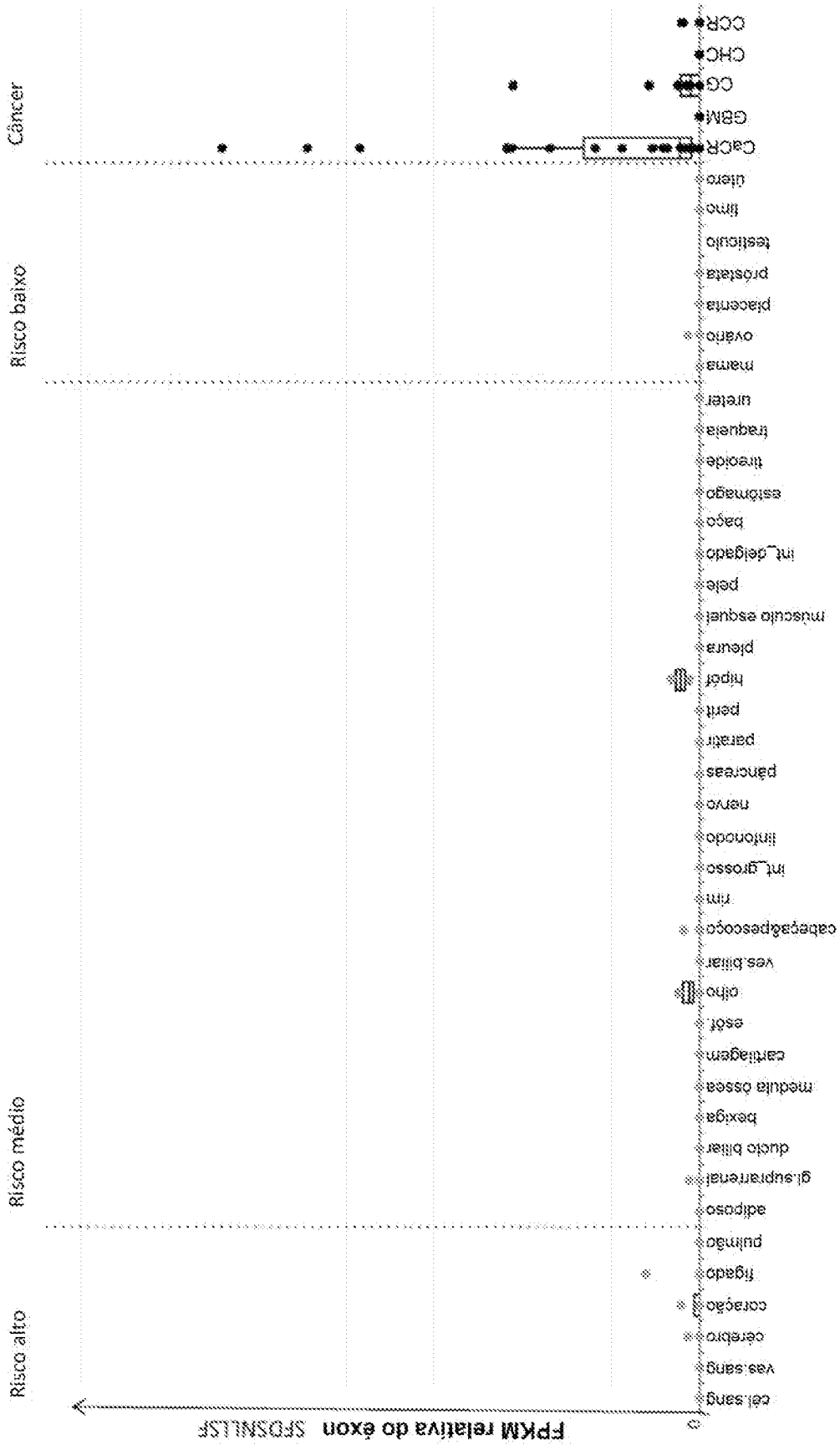


Figura 1I

Gene: PIWIL1

Peptídeo: SFDSNLLSF

SEQ Nº: 133



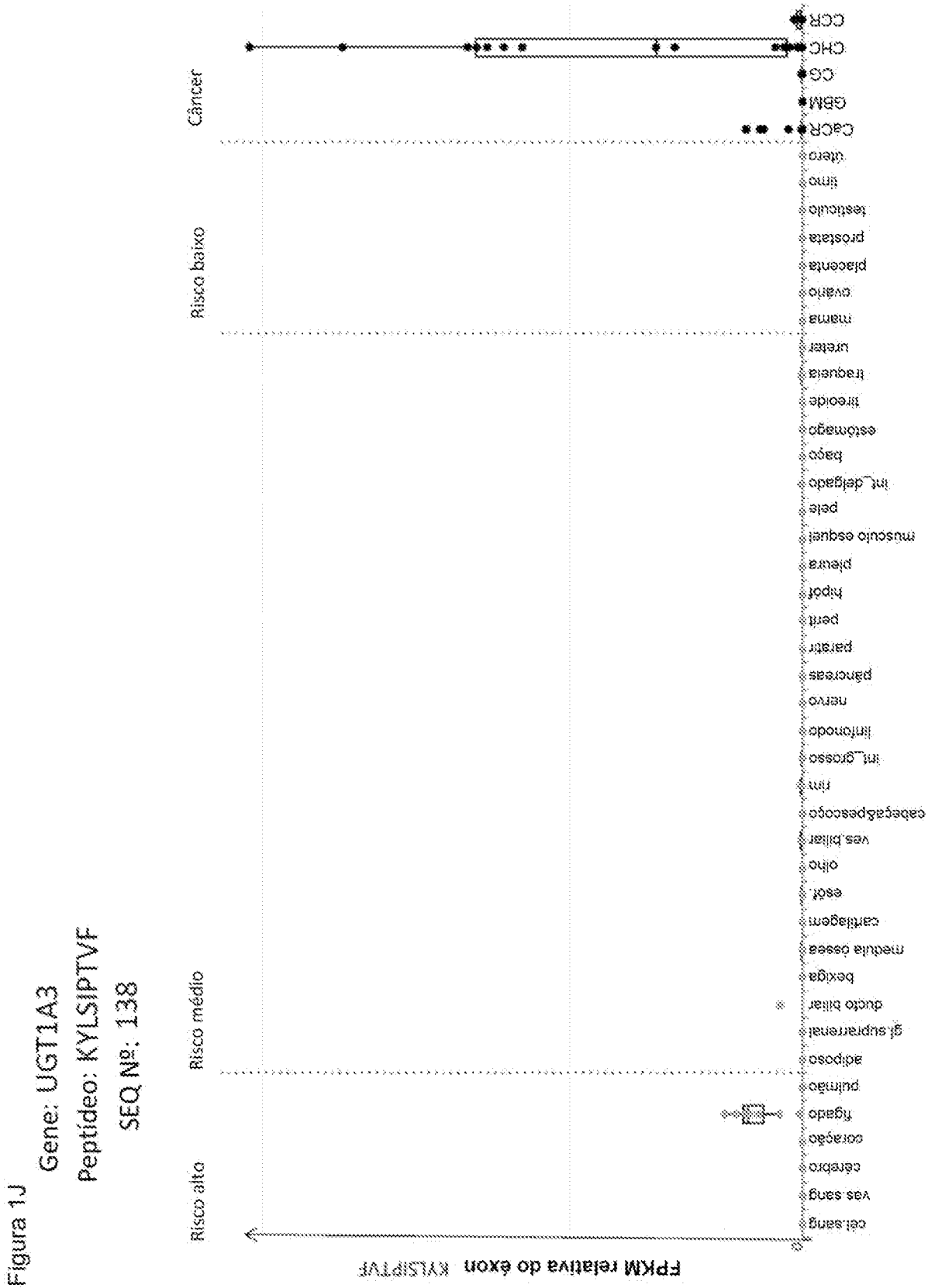


Figura 1J

Gene: UGT1A3

Peptídeo: KYLSIPTVF

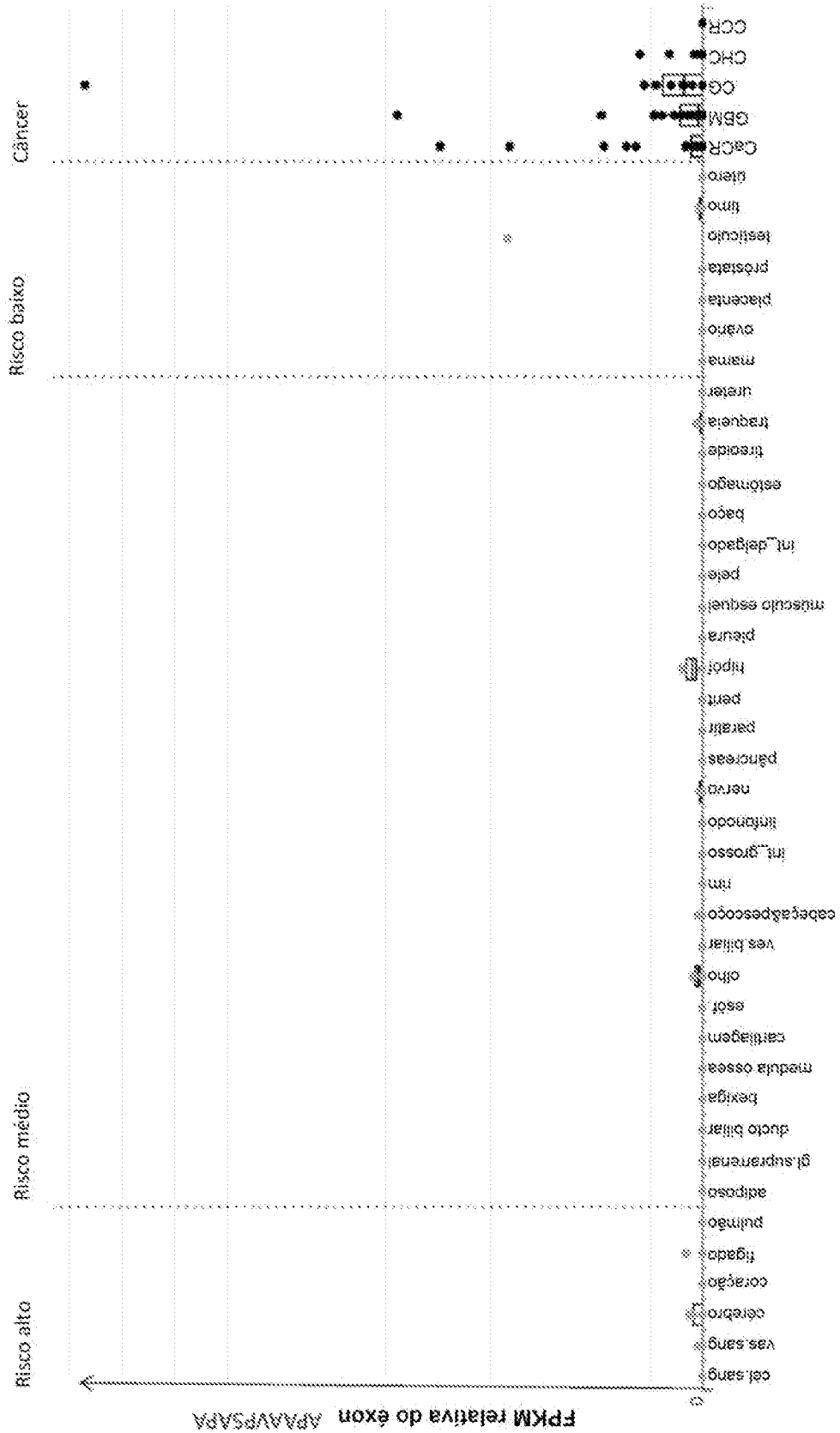
SEQ Nº: 138

Figura 1K

Gene: FEZF1

Peptídeo: APAAVPSAPA

SEQ Nº: 153



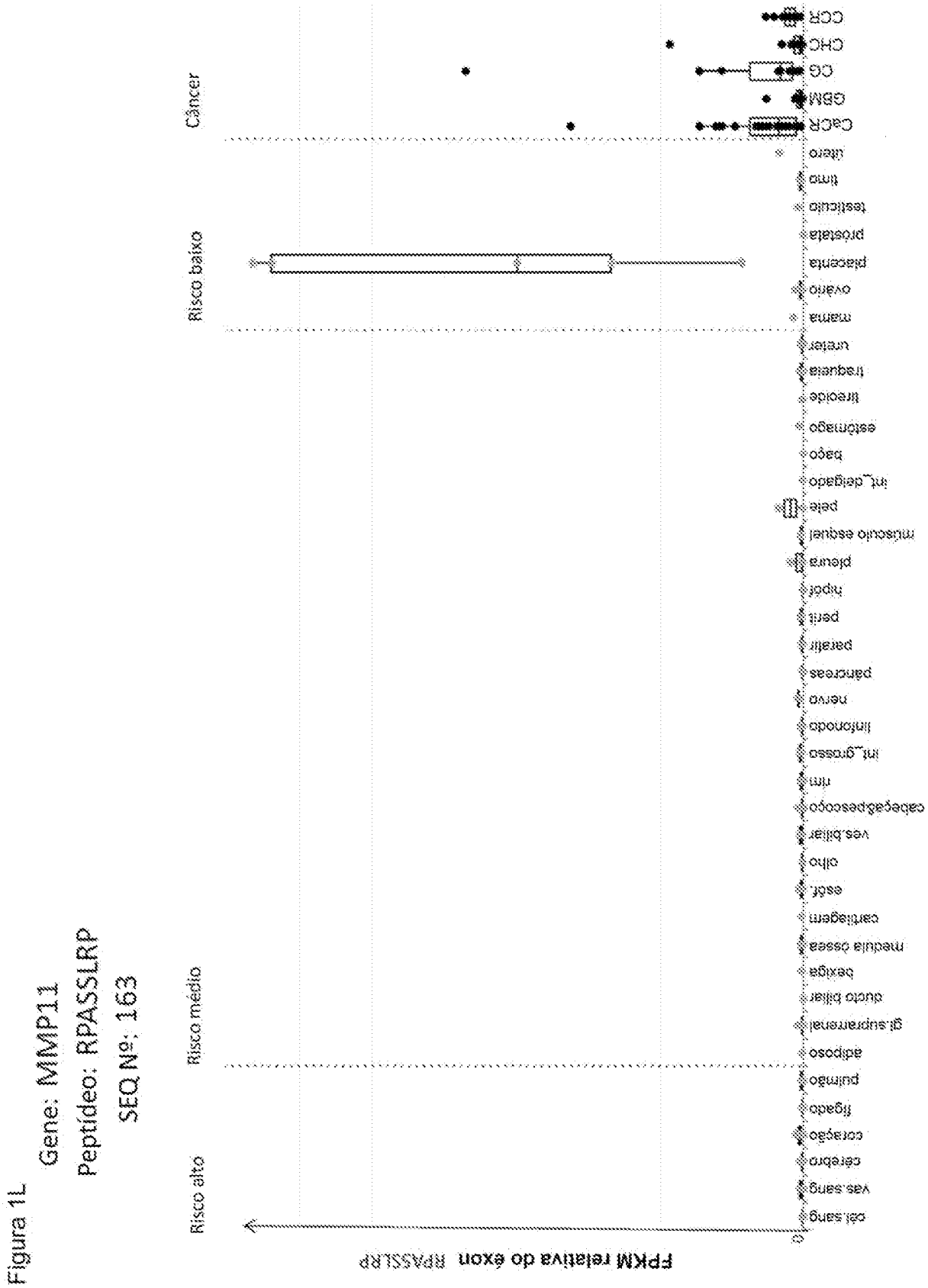


Figura 1L

Gene: MMP11

Peptídeo: RPASSLRP

SEQ Nº: 163

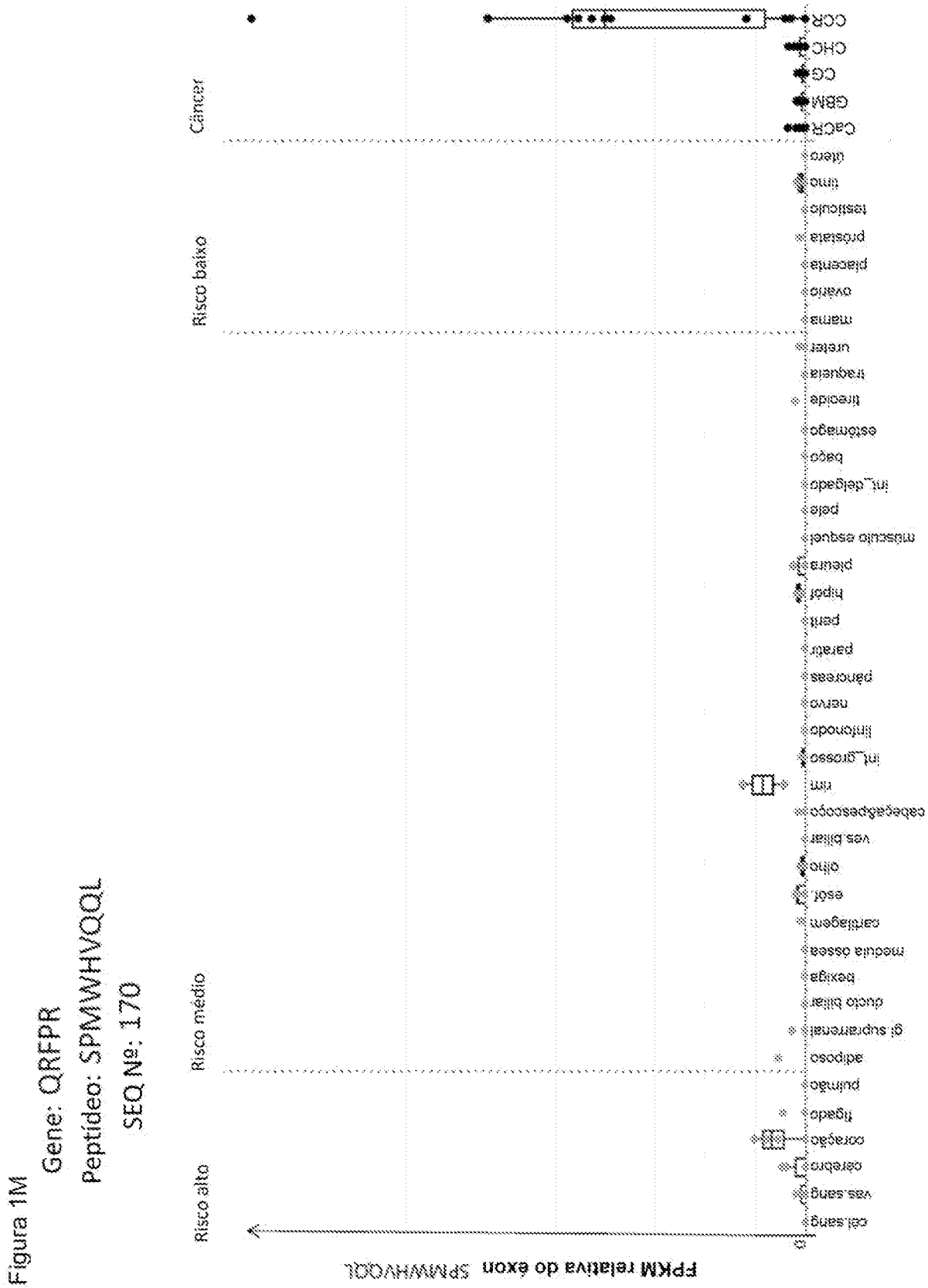

Gene: QRFPR
Peptídeo: SPMWHVQQL
SEQ Nº: 170
Risco alto
Risco médio
Risco baixo
Câncer
FPKM relativa do éxon SPMWHVQQL
CACR
GBM
CG
CHC
CCR
cól.sang
vas.sang
cerebro
coração
fígado
pulmão
adiposo
gl. suprarrenal
ducto biliar
bexiga
medula óssea
cartilagem
esôf.
olho
ves.biliar
cabeçaépescoço
rim
int_grosso
linfonodo
nervo
pâncreas
paratir.
perit.
hipof.
pleura
músculo esquel.
pele
int_delgado
baço
estômago
tireoide
traqueia
ureter
mama
ovário
placenta
próstata
testículo
útero

Figura 1M

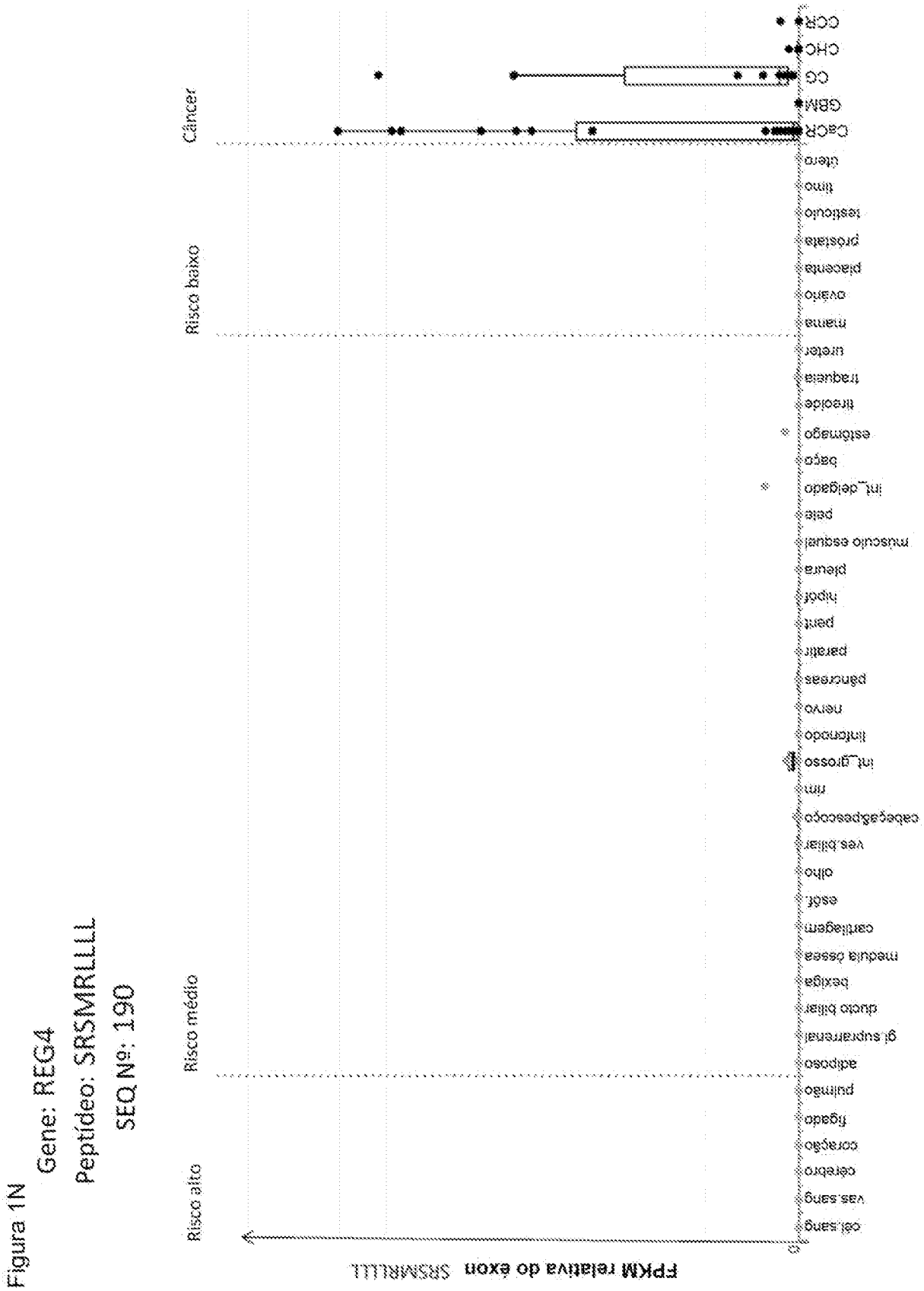

Gene: REG4
Peptídeo: SRSMRLLLL
SEQ Nº: 190
Risco alto
Risco médio
Risco baixo
Câncer
FPKM relativa do éxon SRSMRLLLL
0
cél.sang
vas.sang
cerebro
coração
fígado
pulmão
adiposo
gl.suprarrenal
duodo biliar
bexiga
medula óssea
cartilagem
esôf.
olho
ves.biliar
cabeçaSpescoço
rim
int_grosso
linfonodo
nervo
pâncreas
paratir
pent
hipot
pleura
músculo esquel
pele
int_delgado
baço
estômago
tireoide
traquéia
ureter
mama
ovário
placenta
próstata
testículo
útero
CaCR
GBM
CG
CHC
CCR

Figura 1N

Figura 1O

Gene: PTHLH

Peptídeo: AEIHTAEI

SEQ Nº: 231

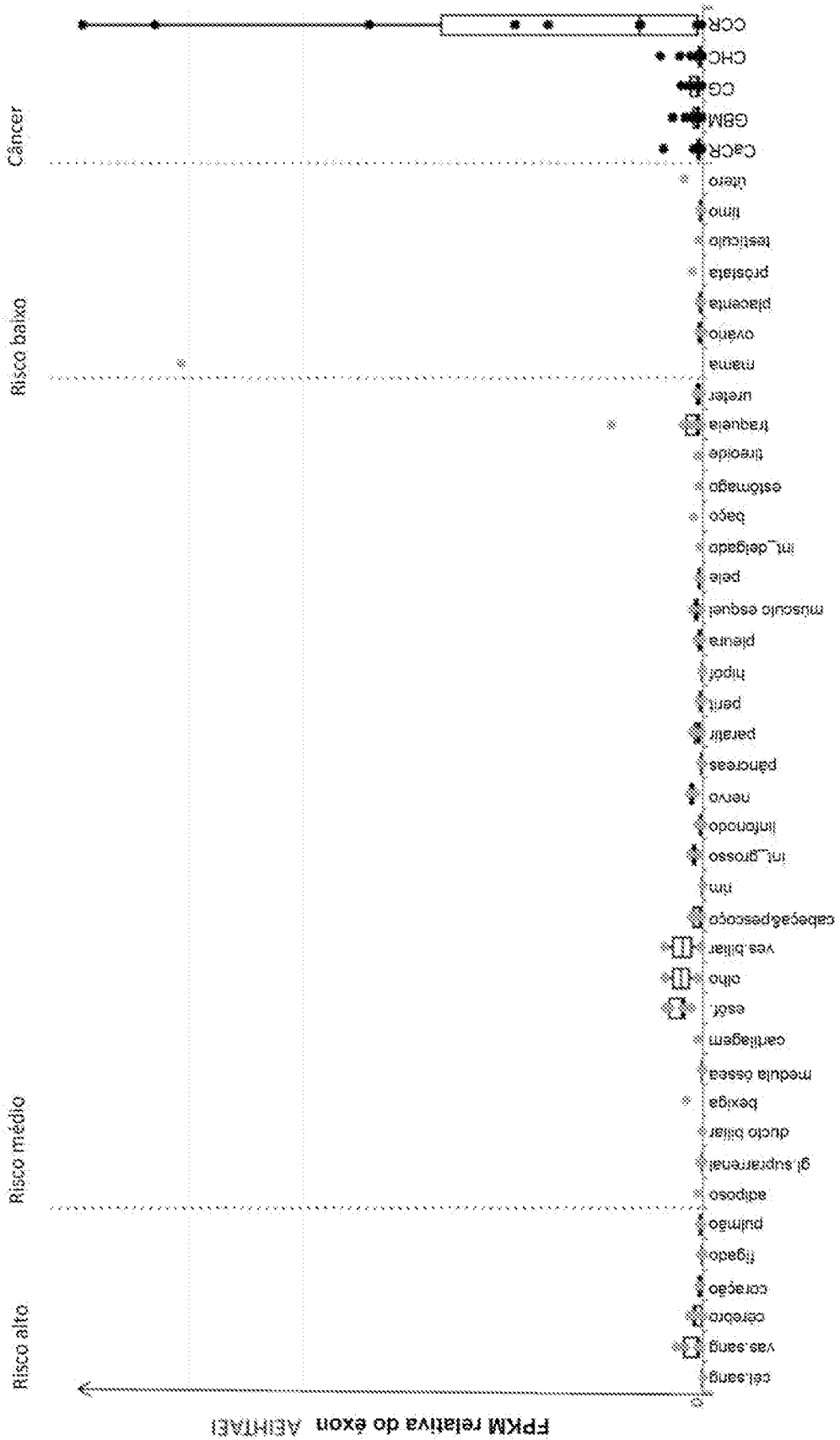
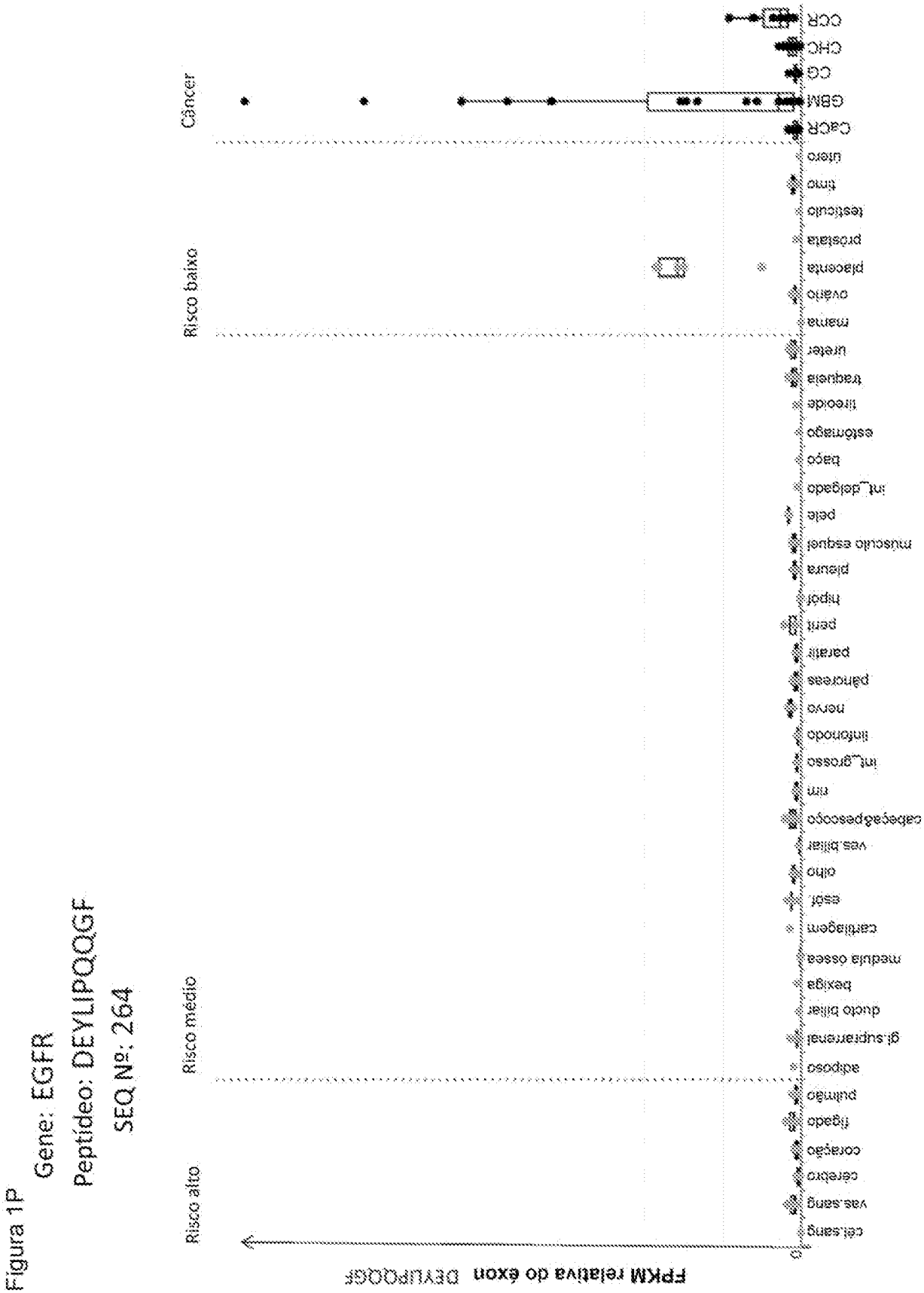


Figura 1P

Gene: EGFR

Peptídeo: DEYLIPQQGF

SEQ Nº: 264



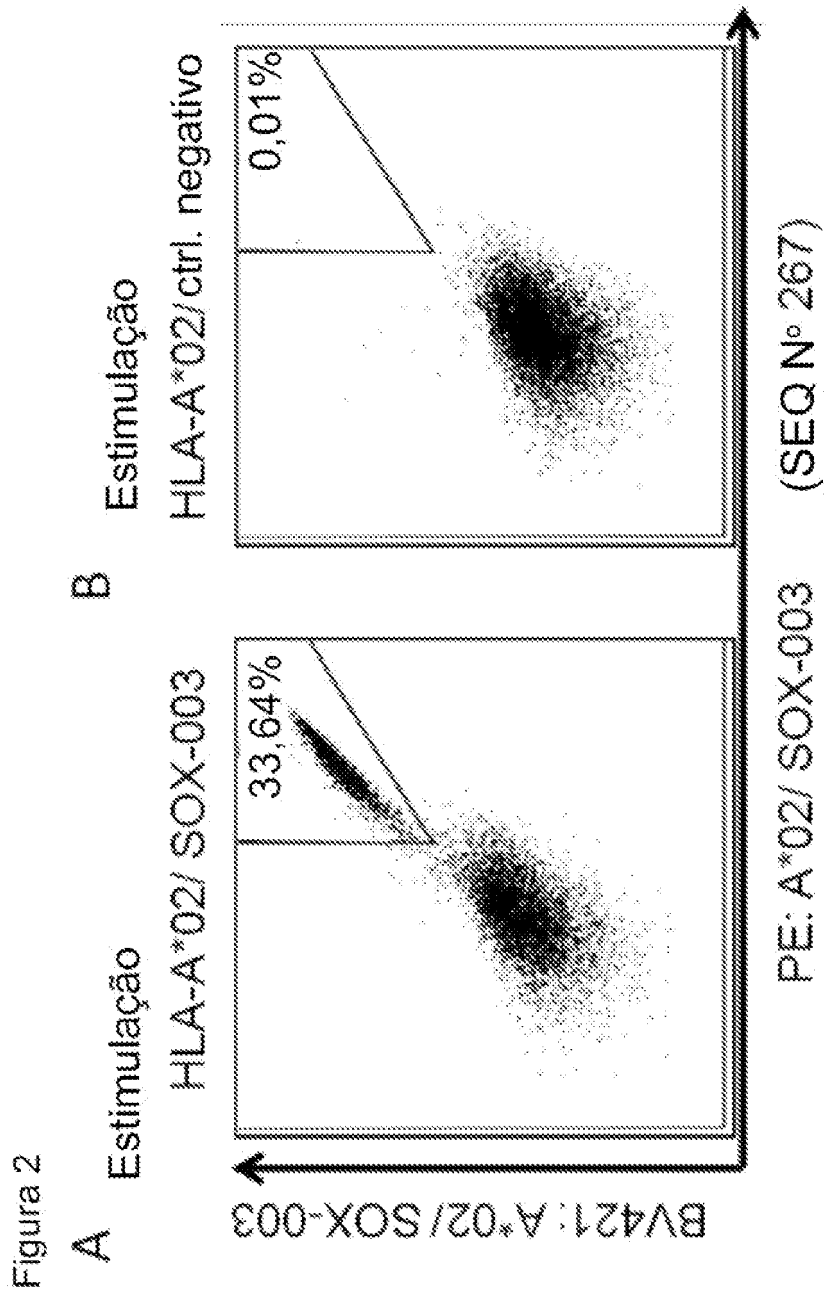

A
Estimulação
HLA-A*02/ SOX-003
33,64%
B
Estimulação
HLA-A*02/ctrl. negativo
0,01%
BV421: A*02/ SOX-003
PE: A*02/ SOX-003 (SEQ Nº 267)

Figura 2

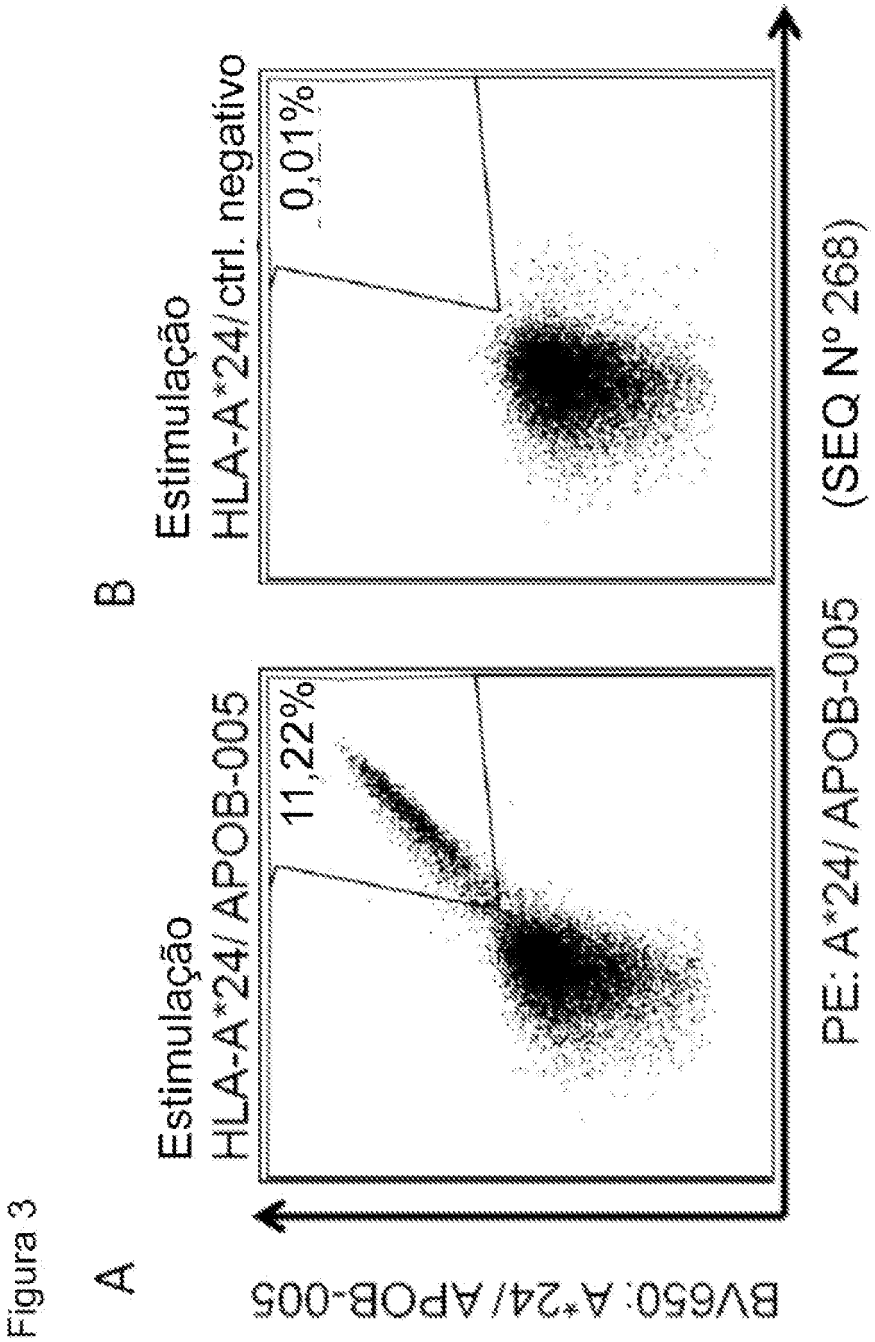

A
Estimulação
HLA-A*24/ APOB-005
11,22%
B
Estimulação
HLA-A*24/ ctrl. negativo
0,01%
BV650: A*24/ APOB-005
PE: A*24/ APOB-005 (SEQ Nº 268)

Figura 3

Figura 4

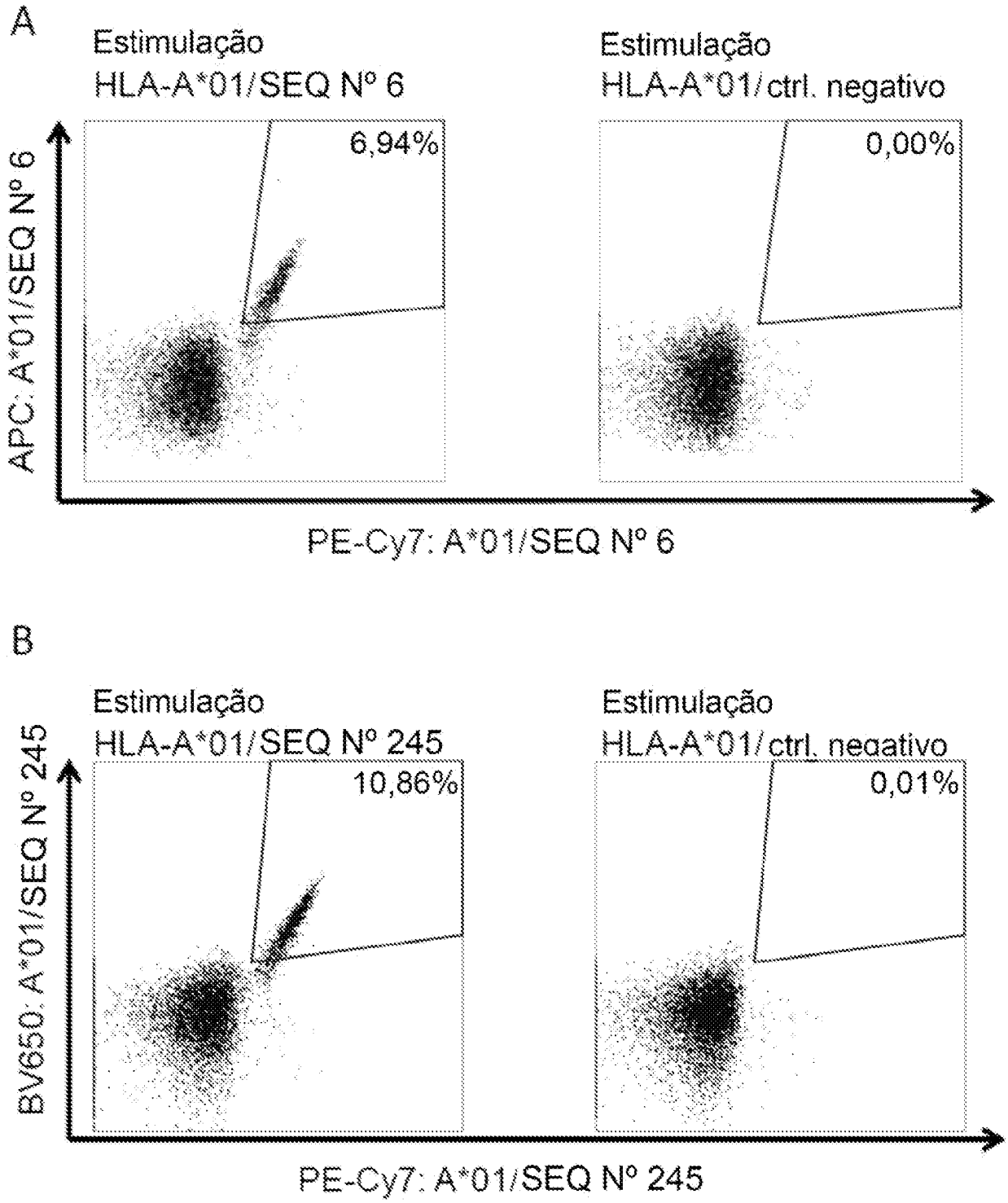

A
Estimulação
HLA-A*01/SEQ Nº 6
6,94%
Estimulação
HLA-A*01/ctrl. negativo
0,00%
APC: A*01/SEQ Nº 6
PE-Cy7: A*01/SEQ Nº 6
B
Estimulação
HLA-A*01/SEQ Nº 245
10,86%
Estimulação
HLA-A*01/ctrl. negativo
0,01%
BV650: A*01/SEQ Nº 245
PE-Cy7: A*01/SEQ Nº 245

Figura 5

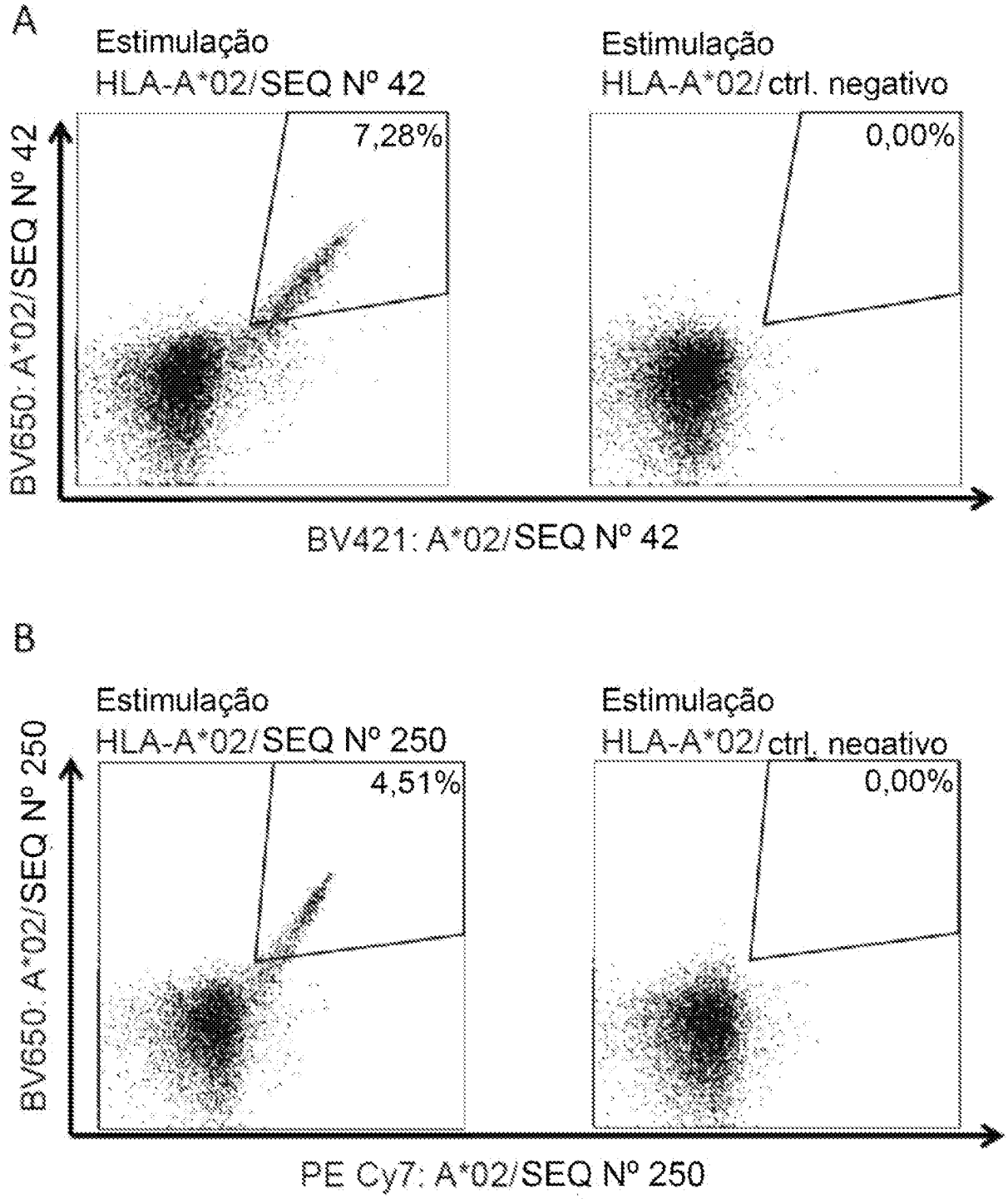

A
Estimulação
HLA-A*02/SEQ Nº 42
7,28%
Estimulação
HLA-A*02/ctrl. negativo
0,00%
BV650: A*02/SEQ Nº 42
BV421: A*02/SEQ Nº 42
B
Estimulação
HLA-A*02/SEQ Nº 250
4,51%
Estimulação
HLA-A*02/ctrl. negativo
0,00%
BV650: A*02/SEQ Nº 250
PE Cy7: A*02/SEQ Nº 250

Figura 6

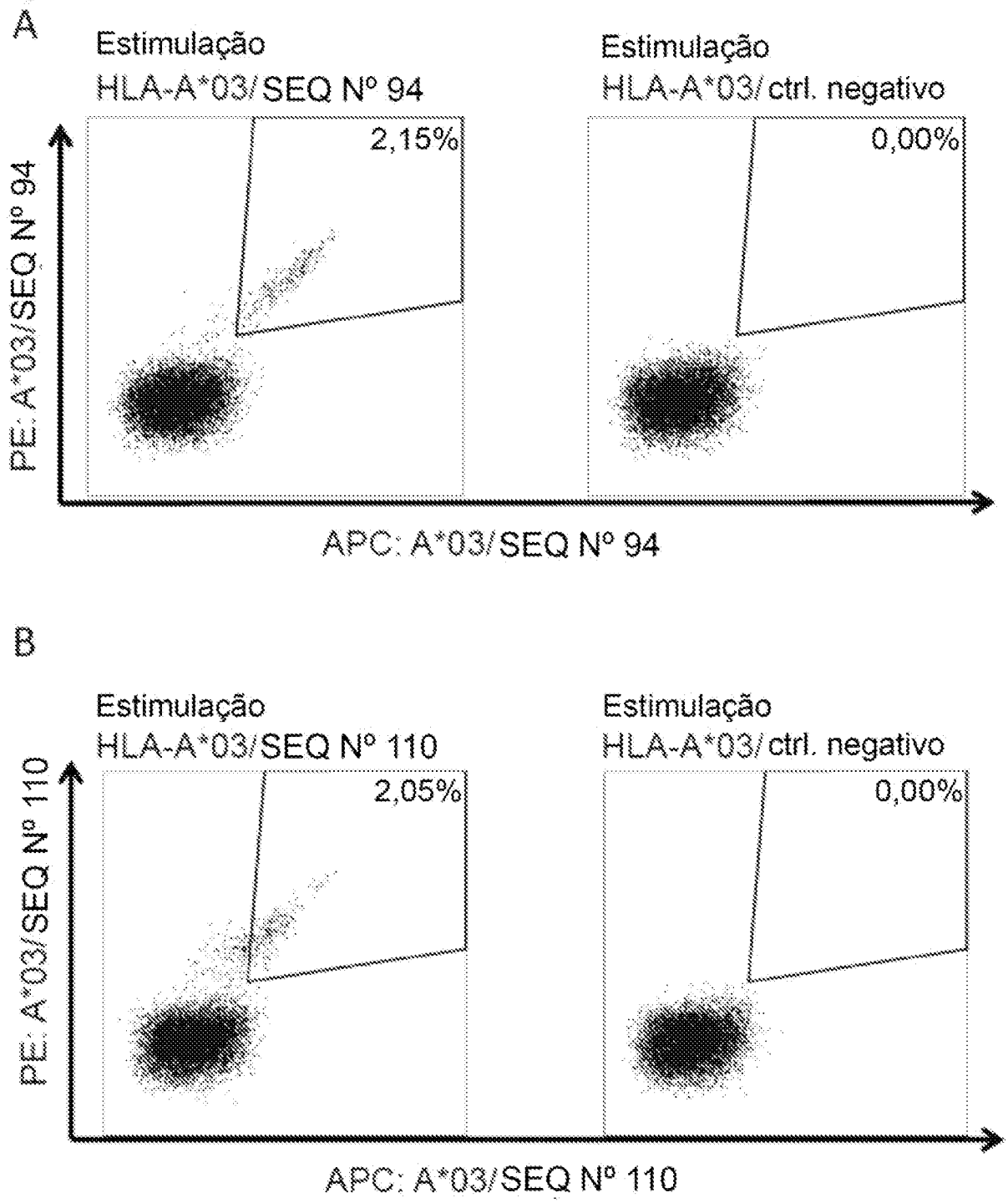

A
Estimulação
HLA-A*03/SEQ Nº 94
2,15%
Estimulação
HLA-A*03/ctrl. negativo
0,00%
PE: A*03/SEQ Nº 94
APC: A*03/SEQ Nº 94
B
Estimulação
HLA-A*03/SEQ Nº 110
2,05%
Estimulação
HLA-A*03/ctrl. negativo
0,00%
PE: A*03/SEQ Nº 110
APC: A*03/SEQ Nº 110

Figura 7

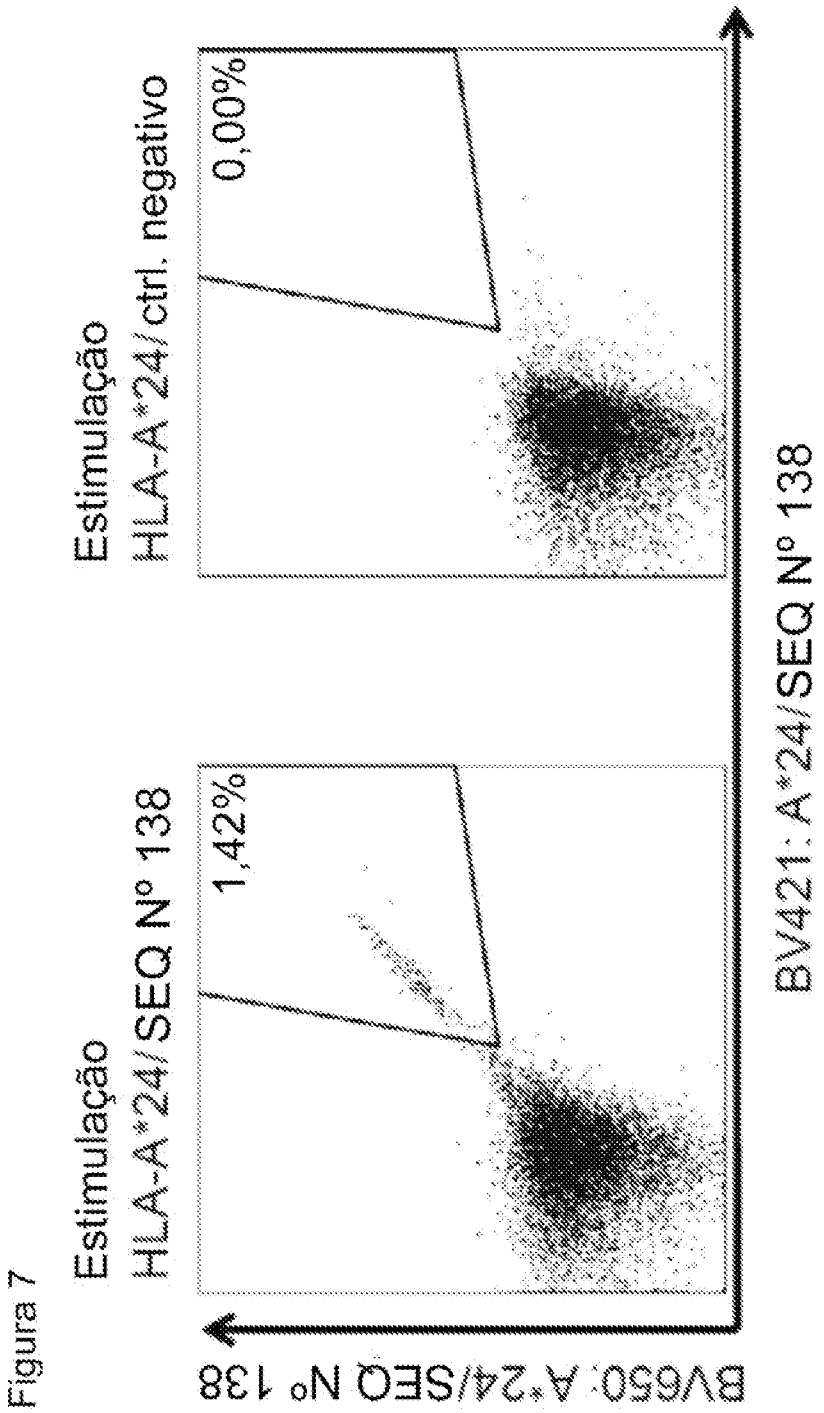

Estimulação
HLA-A*24/ SEQ Nº 138
1,42%
Estimulação
HLA-A*24/ ctrl. negativo
0,00%
BV650: A*24/SEQ Nº 138
BV421: A*24/SEQ Nº 138

Figura 8

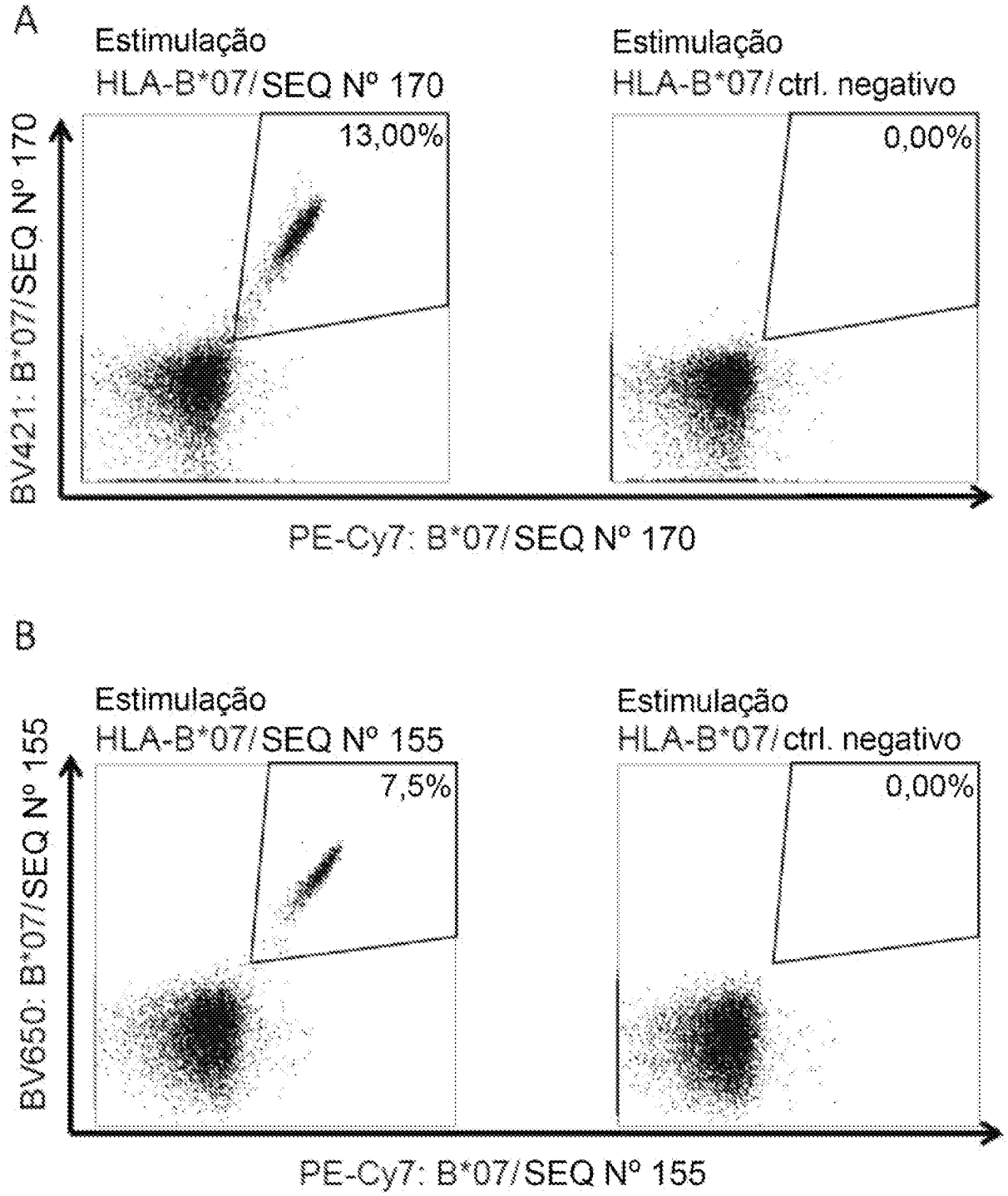
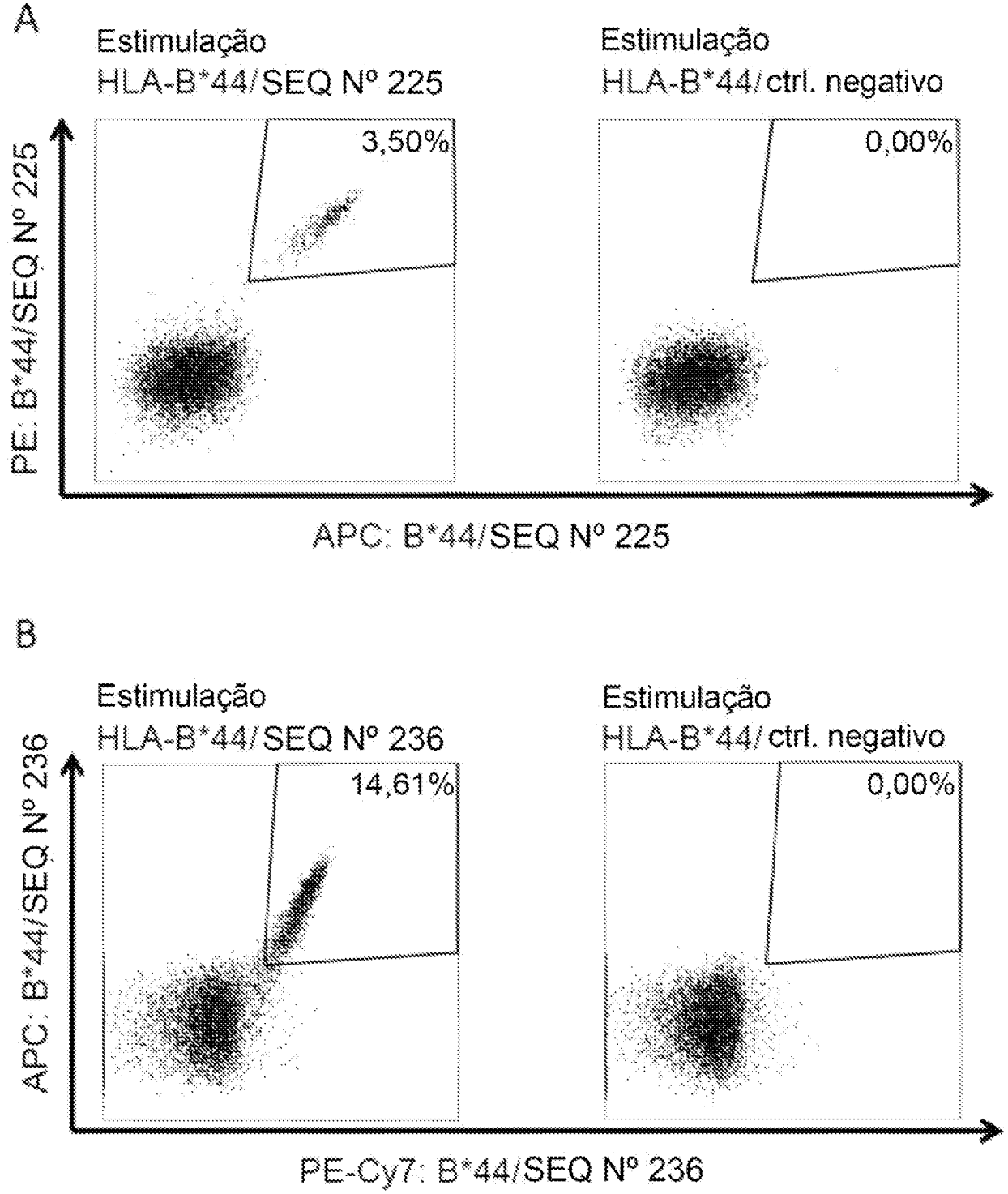

A
Estimulação
HLA-B*07/SEQ Nº 170
13,00%
Estimulação
HLA-B*07/ctrl. negativo
0,00%
BV421: B*07/SEQ Nº 170
PE-Cy7: B*07/SEQ Nº 170
B
Estimulação
HLA-B*07/SEQ Nº 155
7,5%
Estimulação
HLA-B*07/ctrl. negativo
0,00%
BV650: B*07/SEQ Nº 155
PE-Cy7: B*07/SEQ Nº 155

Figura 9


A
Estimulação
HLA-B*44/SEQ Nº 225
3,50%
Estimulação
HLA-B*44/ctrl. negativo
0,00%
PE: B*44/SEQ Nº 225
APC: B*44/SEQ Nº 225
B
Estimulação
HLA-B*44/SEQ Nº 236
14,61%
Estimulação
HLA-B*44/ctrl. negativo
0,00%
APC: B*44/SEQ Nº 236
PE-Cy7: B*44/SEQ Nº 236

RESUMO

Patente de Invenção: **"PEPTÍDEOS E COMBINAÇÕES DOS MESMOS PARA USO NA IMUNOTERAPIA CONTRA CÂNCER".**

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

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA P242827.TXT
- Data de Geração do Código: 04/10/2019
- Hora de Geração do Código: 16:15:51
- Código de Controle:
  - Campo 1: 7A1172AD2A61228C
  - Campo 2: 38DBC700503797A6