

(11) Número de Publicação: **PT 1447414 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 14/705 (2006.01) **A61K 38/08** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1998.09.22	(73) Titular(es): THE GOVERNEMENT OF THE UNITED STATES OF AMÉRICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTEMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES 6011 EXECUTIVE BOULEVARD, SUITE 325 ROCKVILLE, MD 20852 US
(30) Prioridade(s): 1997.10.10 US 61589 P	(72) Inventor(es): JEFFREY SCHLOM US SALAZAR NÉE BARZAGA, MARIA ELENA US SAM ZAREMBA US
(43) Data de publicação do pedido: 2004.08.18	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2007.06.06 039/2007	

(54) Epígrafe: **PÉPTIDOS ANTAGONISTAS DO ANTIGÉNIO CARCINOEMBRIONÁRIO (CEA).**

(57) Resumo:

RESUMO

"Péptidos antagonistas do antigénio carcinoembrionário (CEA)"

O presente invento refere-se à preparação e utilização de péptidos que actuam como agonistas e antagonistas do antigénio carcinoembrionário humano (CEA). São divulgados agonistas do péptido de CEA, CAP1, e é demonstrada a sua utilidade no aumento de respostas imunitárias contra CEA.

DESCRIÇÃO

"Péptidos antagonistas do antigénio carcinoembrionário (CEA)"

CAMPO DO INVENTO

O presente invento refere-se à preparação e utilização de péptidos que podem actuar como agonistas do antigénio carcinoembrionário humano (CEA). Mais especificamente, o péptido agonista de acordo com o presente invento pode ser utilizado como imunogénio, sozinho ou em protocolos de imunização inicial e reforços (*prime/boost*) com outros imunogénios tais como rV-CEA, para uma variedade de condições neoplásicas. Estas podem incluir cancro colorrectal, cancro do pulmão, cancro pancreático e cancro da mama. Assim, o presente invento refere-se também à produção e utilização de vacinas contra cancro. Os agonistas peptídicos de acordo com o presente invento podem também ser utilizados para facilitar a propagação de células T, por exemplo, de pacientes vacinados, para estudos de transferência adoptiva.

ANTECEDENTES DO INVENTO

Um dos principais desafios da imunoterapia moderna do cancro é a identificação de epítomos de linfócitos T citotóxicos (CTL) a partir de antigénios associados a tumores (TAA) definidos que promovem a lise de células tumorais. A maioria dos antigénios nos cancros humanos não são específicos dos tumores e são sobre-expressos em células malignas em oposição a células dos tecidos normais. Por isso, a imunidade ao cancro em seres humanos pode residir principalmente no desenvolvimento de uma resposta imunitária eficaz dirigida principalmente contra moléculas próprias qualitativamente comuns a todos os tipos celulares.

O antigénio carcinoembrionário humano (CEA) é uma glicoproteína de 180 kDa expressa na maioria dos tumores do cólon, recto, estômago e pâncreas (1), em cerca de 50% dos carcinomas da mama (2) e em 70% dos carcinomas de pulmão (3). O CEA é também expresso em tecido fetal dos intestinos e numa menor extensão no epitélio normal do cólon. A imunogenicidade do CEA tem sido ambígua, com vários estudos a relatar a

presença de anticorpos anti-CEA em pacientes (4-7) enquanto que outros estudos não (8-10). O CEA foi primeiro descrito como uma antigénio fetal específico de cancro em adenocarcinoma do tracto digestivo humano em 1965 (Gold, P. e Freeman, S.O., *Exp. Med.* 121: 439-462, 1965). Desde então, o CEA tem sido caracterizado como um antigénio da superfície celular produzido em excesso em quase todos os tumores sólidos do tracto gastrintestinal humano. O gene para a proteína CEA humana foi clonado (Oikawa *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142: 511-518, 1987; Publicação Europeia EP 0346710).

Recentemente, foi relatada a primeira prova de uma resposta de CTL humanos ao CEA (11; WO 96/26271). Este péptido CAP1 apresentava o nível mais alto de ligação a células T2 entre os vários péptidos de CEA testados com estimulação das células T resultando na criação de linhas de células T citotóxicas. Identificámos um péptido 9-mero, designado CAP1 (com a sequência YLSGANLNL) (SEQ ID NO:1), com base na ligação a HLA-A2 e na capacidade para gerar CTL específicos a partir de células mononucleares do sangue periférico (PMBC) de pacientes de carcinoma imunizados com um vírus vacínia recombinante expressando CEA (rV-CEA). Por exemplo, os linfócitos do sangue periférico (PBL) de 5 pacientes apresentavam sinais de resposta de células T ao péptido CAP1 após imunização com rV-CEA. Dois outros laboratórios criaram desde então CTL específicos para CAP1 *in vitro* empregando células dendríticas pulsadas com o péptido como células de apresentação do antigénio (APC) (12). Foi recentemente relatado (13) que os CTL específicos de CAP1 podem ser gerados a partir de PMBC de pacientes de carcinoma imunizados com o ALVAC-CEA recombinante da varíola aviária. Vários grupos relataram também a criação de anticorpos anti-CEA e respostas de células T proliferativas específicas de CEA após imunização com um anti-Id para um anticorpo monoclonal anti-CEA (mAb) (14), proteína CEA recombinante (15) ou rV-CEA (16).

Vários investigadores introduziram CTL para antigénios associados a tumores e virais através de estimulação *in vitro* de PMBC com um péptido imunodominante. Trabalho recente com o antigénio de melanoma gp100 (17-19), um péptido da polimerase de HIV (20) e o antigénio tumoral do vírus do papiloma E6 (21) demonstraram maior imunogenicidade após modificações das

sequências peptídicas. Nestes estudos, as substituições foram em posições de âncora e pretendia-se que aumentassem a ligação a antigénios do MHC de murídeo ou humanos. Esta abordagem foi baseada numa correlação demonstrada entre a imunogenicidade e a afinidade de ligação do péptido a moléculas do MHC (complexo de histocompatibilidade principal) de classe I para epítomos de antigénios virais (22).

Investigadores anteriores trabalharam também com fragmentos de CEA. Assim, Shively (1989), numa publicação de patente Europeia (EP 0343946 A2) relata vários fragmentos de CEA que incluem um epítomo único (tal como definido pela sua reactividade com um anticorpo). O último fragmento de CEA tem 177 aminoácidos de comprimento e contém a sequência 9-mero de CAP1. Contudo, não foram descritos fragmentos de CEA mais curtos que incluíssem a sequência de CAP1.

Em resumo, a utilização de rV-CEA sozinho como agente para reforço da resposta imunitária específica de CEA de rV-CEA sofre da desvantagem de estimular uma resposta imunitária ao vírus vacínia. Contudo, a nova combinação de rV-CEA e CAP1 sugeriu-se-nos como um "protocolo de segunda geração" para o tratamento de pacientes de cancro.

É um princípio aceite que quando um péptido imunogénico é modificado de um modo conservado (p.ex., um aminoácido hidrófobo é substituído por um aminoácido hidrófobo) é provável que o péptido modificado tenha uma actividade imunogénica semelhante com base na manutenção da forma, da carga e do carácter hidrófobo da molécula.

Mais especificamente, um estudo de Madden (33) identificou preferências de aminoácidos específicos em péptidos para a complexação do MHC, um passo precursor para o reconhecimento de células T. Madden bem como outros investigadores (31) sugerem que as posições dos aminoácidos específicos em péptidos estão disponíveis para o reconhecimento de células T.

Skipper *et al.* (40) descrevem a identificação e caracterização de um epítomo peptídico de ocorrência natural da tirosinase, em que a sequência peptídica difere da que é

prevista a partir do ADN. Este péptido modificado é reconhecido por linfócitos T citotóxicos ("CTL") humanos específicos da tirosinase mais eficazmente que o produto de tradução directa e é o único dos dois péptidos a ser apresentado pelas moléculas HLA-A2.1 à superfície celular. A modificação é uma substituição de uma asparagina por um ácido aspártico. Os autores sugerem que a asparagina é N-glicosilada no retículo endoplasmático durante a síntese proteica e é desamidada após a tradução.

No caso de CAP1, as âncoras primária e secundária nas posições 2, 9 e 1 estão já ocupadas pelos aminoácidos preferidos e foi assim tomada uma abordagem diferente para melhorar a imunogenicidade do péptido através da tentativa de aumentar a sua capacidade para se ligar ao TCR. Pareceu-nos que através da alteração dos resíduos de aminoácidos que se espera que contactem com o TCR se podia gerar um análogo de CAP1 com substituições em posições que não fossem de âncora de MHC. Um tal análogo poderia então representar um agonista estimulante de células T capaz de estimular CTL de modo mais eficaz que o péptido nativo. Os resultados anteriores apoiaram o conceito de que alguns análogos peptídicos podiam actuar como antagonistas de células T através da inibição de respostas ao péptido antigénico (23-29). Tal inibição foi mostrada como sendo específica de TCR e não podia ser explicada através de competição pela ligação do péptido à proteína do MHC. De modo análogo, um agonista estimulante do péptido seria um análogo que aumentava a função efectora sem o acompanhamento de aumentos da ligação ao MHC. Procurámos então aumentar a imunogenicidade de CAP1 através da análise de painéis de análogos contendo substituições únicas de aminoácidos por resíduos que previmos interagissem com o receptor de células T (TCR) dos CTL específicos de CAP1. O presente invento refere-se à construção de um novo agonista estimulante de células T para o péptido CAP1, o primeiro exemplo de tal para um epítipo de CTL humanos.

SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento refere-se à identificação de péptidos que são têm alterações únicas ou duplas de aminoácidos relativamente à sequência peptídica de CAP1. O péptido CAP1

foi identificado como um epítopo altamente imunogénico do antigénio carcinoembrionário (aqui referido como "CEA"), que é capaz de estimular respostas de células T citolíticas ("CTL") específicas de CEA. O CEA é um antigénio da superfície celular que se encontra em abundância em vários tipos de células cancerosas. Assim, péptidos de CEA capazes de uma resposta de CTL citolítica, tais como CAP-1 são potenciais imunogénios para utilização em imunoterapia de cancro.

Os péptidos do presente invento são agonistas de CAP-1 e CEA; isto é, facilitam a interacção entre o complexo MHC da célula de apresentação do antigénio e o complexo receptor de células T ("TCR"). Assim, estes péptidos podem servir como imunogénios para tratar e/ou vacinar pacientes com cancros que expressem CEA. Também, estes péptidos podem ser utilizados para estimular células T em cultura para transferência adoptiva de células T para pacientes de cancro. Quatro desses péptidos possuem as sequências de aminoácidos:

- 1) YLSGADLNL (Agonista CAP1-6D) (SEQ ID NO:2);
- 2) YLSGADINL (Agonista CAP1-6D, 7I) (SEQ ID NO:3);
- 3) YLSGANINL (Agonista CAP1-7I) (SEQ ID NO:4); e
- 4) YLSGACLNL (Agonista CAP1-6C) (SEQ ID NO:5).

Os aminoácidos sublinhados identificam as alterações de aminoácidos relativamente à sequência peptídica de CAP-1. Os péptidos CAP1-6D e CAP1-6D, 7I são péptidos especialmente preferidos de acordo com o presente invento e têm uma actividade aumentada em comparação com a actividade de CAP-1. Os péptidos CAP1-7I e CAP1-6C têm uma actividade semelhante a CAP-1.

O presente invento engloba estojos compreendendo um péptido agonista e um vector compreendendo um gene codificando CEA ou uma proteína CEA produzida de modo recombinante. Para além disso, o estojo pode incluir uma molécula imunoestimulante.

Outro objecto do presente invento é uma composição farmacêutica compreendendo um ou mais péptidos agonistas sozinhos ou em combinação com uma molécula imunoestimulante e um transportador farmacêuticamente aceitável.

Outro aspecto do presente invento refere-se à utilização destes péptidos em imunoterapia do cancro. Os péptidos agonistas são úteis na estimulação de uma resposta imunitária citolítica a CEA, resultando na redução e/ou prevenção de tumores. Assim, o presente invento refere-se também a um método de tratamento de pacientes de cancro com os péptidos bem como uma vacina contra o cancro.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1A-1D: Efeito de substituições de aminoácidos únicas no péptido de CEA, CAP1, sobre a lise por CEA de CTL T-Vac8. Células C1R-A2 foram marcadas com ^{11}In e incubadas durante 1 hora em poços de fundo redondo (2000/poço) com cada péptido substituído a 1 (a cheio), 0,1 (a branco) e 0,01 (estriado) $\mu\text{g/ml}$. Os CTL T-Vac8 foram adicionados a E:A= 1,45:1 e a libertação de isótopo foi medida após 4 horas. A libertação espontânea foi determinada para cada péptido a 1 $\mu\text{g/ml}$. Todos os ensaios foram efectuados em triplicado. As Figuras 1A-1D representam substituições nas posições p5 a p8, respectivamente. Os aminoácidos são designados através do código de uma letra; o aminoácido codificando a sequência nativa de CAP1 está indicado em cada figura e ao longo da margem direita.

Figuras 2A e 2B: CAP1 e análogos apresentam uma sensibilidade diferente à citotoxicidade por CEA de CTL T-Vac8 As células alvo T2 da Figura 2A e C1R-A2 da Figura 2B foram marcadas com ^{51}Cr e incubadas em placas de 96 poços de fundo redondo (10 000/poço) com CAP1 (●) ou os péptidos substituídos CAP1-6D (□) ou CAP1-7I (◇) nas concentrações indicadas. Após 1 hora, CTL T-Vac8 foram adicionados a E:A= 2,5:1 e a libertação de isótopo foi determinada após 4 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. NCA571 (Δ) é um péptido 9-mero obtido após um alinhamento óptimo de CEA com o gene relacionado NCA (11).

Figuras 3A e 3B: Efeito de substituições de aminoácidos únicas no péptido CAP1, sobre a ligação e a estabilidade de complexos de HLA-A2. Células T2 foram colhidas em meio isento de soro e depois incubadas de um dia para o outro (10^6 por poço) com os péptidos CAP1 (●), CAP1-6D (□) ou CAP1-7I (◇) nas

concentrações indicadas (Figura 3A). As células foram colhidas e ensaiadas quanto à expressão na superfície celular de moléculas HLA-A2 através de coloração com mAb BB7.2 sensível à conformação, anticorpo W6/32 específico de HLA (não mostrado) e anticorpo MOPC-195 de controlo do isotipo (não mostrado). A intensidade média da fluorescência foi determinada numa população celular viva, regulada.

Figura 3B: As células foram incubadas com o péptido a 100 µg/ml de um dia para o outro, depois lavadas para ficarem sem péptido não ligado e incubadas a 37°C. Nos tempos indicados, as células foram coradas para determinar a presença de complexos péptido-HLA-A2 à superfície celular. As barras de erro indicam o EPM para duas experiências.

Figuras 4A e 4B: CTL gerados a partir de indivíduos aparentemente saudáveis com o péptido CAP1-6D reconhecem CAP1 e CAP1-6D. As linhas de CTL (designadas T-N1 e T-N2) foram geradas com CAP1-6D e foram ensaiadas quanto à especificidade do péptido. T-N1 foi ensaiada após 5 ciclos de estimulação a uma razão de efector para alvo de 20:1 (Figura 4A). T-N2 foi ensaiada após 10 ciclos a uma razão de efector para alvo de 15:1 (Figura 4B). Os alvos C1R-A2 marcados com ⁵¹Cr (5000/poço) foram incubados com a quantidade indicada do péptido CAP1 (●) ou CAP1-6D (□). Após 4 horas a quantidade de isótopo libertada foi determinada num contador gama. Os valores foram determinados a partir de culturas em triplicado.

Figuras 5A e 5B: As linhas de células T geradas com CAP1-6D, mas não com CAP1, de dadores aparentemente saudáveis reconhecem células tumorais expressando CEA endógeno. CTL T-N2 gerados com CAP1-6D (Figura 5A) e células T geradas com CAP1 nativo (Figura 5B) foram ensaiados após 9 ciclos de estimulação *in vitro* contra os alvos tumorais SW480 e SW1463 (CEA⁺, HLA-A2⁺, ● e ▲, respectivamente), SKmel24 (CEA⁻, -A2⁺, □) e K562 (◇). As células tumorais foram cultivadas durante 72 horas na presença de γ-IFN para regular positivamente o HLA. As células foram tripsinizadas e marcadas com ⁵¹Cr e incubadas (5000 células/poço) com CTL T-N2 a razões crescentes de efector para alvo. As culturas foram incubadas durante 4 horas e a quantidade de isótopo libertada foi determinada

num contador gama. Os valores foram determinados a partir de culturas em triplicado.

Figura 6: Restrição a A2.1 de MHC de classe 1 da linha de CTL (T-N2) derivada do agonista CAP1-6D. A linha de CTL T-N2 foi utilizada como efectora para a célula alvo SW837 de carcinoma do cólon humano. SW837 é positiva para CEA e negativa para HLA-A2.1. SW837 foram infectadas a uma MOI de 10:1 com um vacínia recombinante contendo o transgene A2.1 (■) ou um vacínia de tipo selvagem (Δ).

Figura 7A e 7B: CTL gerados com CAP1-6D lisam tumores positivos para CEA, positivos para HLA-A2: Efeito da supra-regulação de IFN. Os CTL T-N1 gerados com CAP1-6D foram ensaiados contra várias linhas celulares tumorais: SW480 (CEA⁺ e HLA-A2⁺, ●), SW1116 (CEA⁺ mas -A2⁻, □) e CaOV3 (CEA⁻ mas -A2⁺, ◇). As células tumorais foram cultivadas 72 horas na ausência (Figura 7A) ou na presença (Figura 7B) de γ -IFN, tripsinizadas e marcadas com ⁵¹Cr, e depois incubadas (5000 células/poço) com CTL T-N1 a razões crescentes de efector para alvo. As culturas foram incubadas durante 4 horas e a quantidade de isótopo libertada foi determinada num contador de raios gama. Os valores foram determinados a partir de culturas em triplicado.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

O presente invento é um agonista peptídico do epítipo de CEA nativo, CAP-1 (SEQ ID NO:1). O agonista caracteriza-se pela sua capacidade para eliciar linfócitos T citotóxicos específicos do antigénio que inibem o crescimento ou matam células de carcinoma que expressem CEA ou epítipos de CEA.

Os péptidos agonistas do presente invento compreendem cerca de 8-13 aminoácidos, de preferência 9-10 aminoácidos. Numa concretização, o agonista compreende uma sequência com uma substituição na posição 6 em comparação com o CAP-1 nativo (SEQ ID NO:1). Noutra concretização o agonista compreende uma sequência com uma substituição de aminoácidos na posição 7 em comparação com o CAP-1 nativo (SEQ ID NO:1). Ainda noutra concretização, o agonista compreende uma sequência com uma substituição de aminoácidos na posição 6 e na posição 7 em

comparação com o CAP-1 nativo. O aminoácido substituído serve para aumentar a interacção do complexo de TCR nos linfócitos T citotóxicos com o complexo ligando péptido-antigénio de MHC. Tal interacção aumentada resulta numa maior função efectora dos linfócitos T citotóxicos.

Um exemplo de uma substituição inclui Asp e Cys na posição 6 ou um Ile na posição 7.

Numa concretização, o agonista peptídico compreende a seguinte sequência de aminoácidos:

<u>Posição de aminoácido</u>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Péptido CAP-1 Nativo	Y	L	S	G	A	N	L	N	L	(SEQ. ID NO:1)
Agonista	Y	L	S	G	A	<u>D</u>	L	N	L	(SEQ. ID NO:2)
Agonista	Y	L	S	G	A	<u>D</u>	<u>I</u>	N	L	(SEQ. ID NO:3)
Agonista	Y	L	S	G	A	N	<u>I</u>	N	L	(SEQ. ID NO:4)
Agonista	Y	L	S	G	A	<u>C</u>	L	N	L	(SEQ. ID NO:5)

O péptido agonista do presente invento pode ser obtido através de tecnologia de ADN recombinante ou através de síntese química de péptidos.

O péptido agonista pode ser formulado numa composição farmacêutica em combinação com um transportador farmacêuticamente aceitável para utilizar como imunogénio num mamífero, de preferência um ser humano. A composição pode compreender ainda um ou mais constituintes diferentes para aumentar a resposta imunitária que incluem, mas não se limitam a, moléculas imunoestimulantes tais como interleucina 2, interleucina 6, interleucina 12, interferão gama, factor de necrose tumoral alfa, GM-CSF, B7.1, B7.2, ICAM-1, LFA-3, CD72 e ciclofosfamida.

O péptido agonista é administrado a um mamífero numa quantidade eficaz para gerar uma resposta imunitária específica de CEA, de preferência uma resposta imunitária celular. A eficácia do péptido *ras* mutante como imunogénio pode ser determinada através de parâmetros *in vivo* ou *in vitro* tal como são conhecidos na arte. Estes parâmetros incluem, mas não se limitam a, ensaios de citotoxicidade específicos do

antigénio, regressão de tumores expressando CEA ou epítomos de CEA, inibição de células cancerígenas expressando CEA ou epítomos de CEA, produção de citocinas e semelhantes.

Podem ser administrados pelo menos um ou mais péptidos agonistas numa dose de cerca de 0,05 mg a cerca de 10 mg por vacinação do mamífero, de preferência cerca de 0,1 mg a cerca de 5 mg por vacinação. Podem ser proporcionadas várias doses durante um período de semanas tal como indicado. Numa concretização, é proporcionada uma dose por mês durante 3 meses. O péptido agonista pode ser administrado sozinho ou em combinação com adjuvantes, incorporado em lipossomas (Patentes U.S. 5643599, 5464630, 5059421, 4885172), com citocinas, modificadores da resposta biológica ou outros reagentes que na arte se sabe aumentarem a resposta imunitária. Os adjuvantes incluem, mas não se limitam a, RIBI DetoxTM, QS21, alúmen e adjuvante incompleto de Freund. Numa concretização, o péptido ras mutante é administrado em combinação com DetoxTM (RIBI Immunochem Research, Hamilton, MT). RIBI DetoxTM contém como ingredientes activos o esqueleto da parede celular de *Mycobacterium phlei* e o monofosforil-lípido A de *Salmonella minnesota* R595 preparado como uma emulsão de óleo-em-água com esqualeno e Tween 80.

Os péptidos agonistas podem também ser conjugados com péptidos auxiliares ou com grandes moléculas transportadoras para aumentar a imunogenicidade do péptido. Estas moléculas incluem, mas não se lhes limitam, o péptido de *influenza*, o toxóide do tétano e o epítomo CD4 do toxóide do tétano, a exotoxina de *Pseudomonas*, poli-L-lisina, uma cauda lipídica, a sequência de sinal do retículo endoplasmático (RE) e semelhantes.

Os péptidos do presente invento podem também ser conjugados com uma molécula de imunoglobulina utilizando métodos aceites na especialidade. A molécula de imunoglobulina pode ser específica para um receptor de superfície presente em células tumorais mas ausente ou em quantidades muito baixas em células normais. A imunoglobulina pode também ser específica para um tecido específico. Um tal conjugado péptido-imunoglobulina permite o direccionamento do péptido para um tecido e/ou célula específicos.

Outra forma eficaz do péptido agonista para criação de uma resposta imunitária específica do péptido num mamífero é uma célula de apresentação do antigénio pulsada com o péptido agonista. As células de apresentação do antigénio incluem, mas não se limitam a, células dendríticas, linfócitos B, monócitos, macrófagos e semelhantes. Numa concretização preferida, a célula de apresentação do antigénio pulsada com o péptido agonista é uma célula dendrítica.

Os linfócitos T citotóxicos específicos de CEA e do péptido agonista podem ser criados *in vivo* ou *in vitro* através de estimulação de linfócitos a partir de uma fonte com uma quantidade eficaz de um agonista sozinho ou em combinação com uma molécula imunoestimulante e/ou adjuvante ou numa formulação de lipossomas. As fontes de linfócitos incluem, mas não se limitam a, sangue periférico, tecidos tumorais, nódulos linfáticos e efusões tais como líquido pleural ou líquido ascítico e semelhantes.

Os linfócitos T citotóxicos específicos de CEA e do péptido agonista são imunorreactivos com o agonista ou o péptido de CEA. Os linfócitos T citotóxicos inibem a ocorrência de células tumorais e de cancro e inibem o crescimento ou matam células tumorais que expressem CEA ou seus epítomos ou células tumorais que expressem um agonista. Os linfócitos T citotóxicos, para além de serem específicos do antigénio, estão restringidos ao MHC de classe I. Numa concretização preferida os linfócitos T citotóxicos são restringidos a HLA-A2 de MHC classe I. Os linfócitos T citotóxicos possuem um fenótipo CD8⁺.

Pacientes seleccionados possuindo células de carcinoma expressando CEA ou epítomos de CEA são vacinados subcutaneamente até três vezes a intervalos mensais com adjuvante DETOXTM misturado com o agonista peptídico apropriado. Podem também ser vacinados pacientes de carcinoma com células mononucleares de sangue periférico autólogas pré-pulsadas *ex vivo* com um agonista peptídico sozinho ou em combinação com um agonista peptídico. As respostas de células T anti-CEA são avaliadas através de medição por ensaios de proliferação.

A vacinação com os péptidos agonistas de CEA do presente invento induz respostas imunitárias celulares anti-CEA altamente específicas e sistémicas. Para além disso, o desenvolvimento de tais péptidos agonistas restringidos a MHC de classe I possui implicações importantes para imunoterapia, tanto activa (*i.e.*, vacinação) como passiva (*i.e.*, expansão *ex vivo* para transferência celular adoptiva), que podem ser utilizadas para a indução e propagação de respostas de CTL CD8⁺ específicos em pacientes de cancro.

Os pacientes com tumores sólidos expressando CEA ou seus epítomos, incluindo, mas não se limitando a, cancro do cólon, cancro do pulmão, cancro do pâncreas, cancro do endométrio, cancro da mama, cancro da tiróide, melanoma, cancro oral, cancro da laringe, seminoma, cancro hepatocelular, cancro do ducto biliar, leucemia mieloblástica aguda, carcinoma das células basais, carcinoma de células escamosas, cancro da próstata e semelhantes, beneficiam de imunização com os péptidos agonistas. Os pacientes passíveis de tratamento utilizando os péptidos agonistas do presente invento são os pacientes possuindo tumores com CEA ou epítomos de CEA.

Os péptidos podem ser quimicamente sintetizados sob condições GMP e purificados através de HPLC até >95% de pureza e liofilizados. As composições farmacêuticas são formuladas através da reconstituição do péptido com um transportador farmacêuticamente aceitável tal como cloreto de sódio. Num exemplo, cada mililitro de solução contém 1500 µg de um péptido agonista mais 9,0 mg de cloreto de sódio.

Quando o péptido agonista é administrado com um adjuvante é desejável misturar o péptido com o adjuvante pouco antes da administração a um paciente.

O péptido agonista pode ser administrado a um paciente através de várias vias incluindo, mas não se lhes limitando, subcutânea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa e semelhantes. Numa concretização o péptido agonista é administrado subcutaneamente. O péptido pode ser administrado num ou mais locais a um paciente. Numa concretização, o péptido, sozinho ou em combinação com um

adjuvante, é administrado em três locais, subcutaneamente, sobre os deltóides, as coxas e o abdómen.

Noutro método de geração de uma resposta imunitária, as células de apresentação do antigénio pulsadas com o péptido agonista são administradas ao paciente numa quantidade eficaz para gerar uma resposta imunitária específica do antigénio. As células de apresentação do antigénio incluem, mas não se limitam a, células dendríticas, linfócitos B, monócitos, macrófagos e semelhantes. Numa concretização, as células dendríticas são isoladas de um paciente através dos métodos descritos em Romani, N. *et al.*, 1994. As células dendríticas isoladas são cultivadas *in vitro* com um péptido agonista durante um período de cerca de 0,5 a cerca de 3 horas e são lavadas para remover o péptido não ligado. As células dendríticas pulsadas com o péptido agonista são transferidas de novo para o paciente a uma concentração de cerca de 10^6 a cerca de 10^9 células dendríticas. Uma tal concentração é eficaz na criação de uma resposta imunitária no paciente incluindo a criação de linfócitos T citotóxicos específicos do péptido agonista que são capazes de inibir o crescimento ou matar células tumorais.

Os critérios para determinação de uma resposta antitumoral no paciente imunizado são como se segue:

1. Remissão Completa (RC): Completo desaparecimento de todas as evidências de tumor e regresso dos testes anómalos a níveis normais durante um mínimo de 4 semanas.

2. Resposta Parcial (RP): Diminuição em pelo menos 50% no total dos produtos dos diâmetros perpendiculares de todas as lesões medidas na ausência de progressão de qualquer lesão ou do aparecimento de quaisquer novas lesões durante pelo menos 4 semanas.

3. Doença Estável (DE): Alteração mensurável na doença demasiado pequena para verificar os requisitos para resposta parcial ou progressão e o aparecimento de novas lesões durante pelo menos 12 semanas. Pode não haver agravamento dos sintomas.

4. Doença Progressiva (DP) ou Relapso: Tem de se verificar qualquer um dos critérios abaixo para ser considerada doença progressiva:

- Desenvolvimento de qualquer nova área de doença maligna (mensurável ou palpável),
- Aumento (>25%) em qualquer área de pré-tratamento de doença maligna mensurável.

A resposta imunológica à imunização com os péptidos agonistas é avaliada através de ensaio de proliferação *in vitro* de células T e/ou ensaio citotóxico *in vitro* de células T antes e após a vacinação.

O presente invento permite a imunização *in vitro* para proliferação e criação de células T de linhas de células T citotóxicas para o péptido agonista específico do tumor. A cultura *in vitro* de células T específicas do péptido a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), tecido de nódulo linfático (LNT) ou linfócitos infiltrantes do tumor (TIL) com péptido agonista e IL-2 gera células T específicas de CEA e do péptido agonista. Estas células T são testadas quanto a citotoxicidade contra APC sensibilizados com péptido agonista (células B transformadas com EBV autólogas ou células tumorais autólogas) tal como aqui descrito. Os clones de células T gerados são caracterizados fenotipicamente através de citometria de fluxo quanto à expressão de CD3, CD4 e CD8. Os linfócitos citotóxicos específicos do péptido agonista podem ser adoptivamente transferidos para um paciente para inibir ou matar células tumorais que expressem CEA ou epítomos de CEA. Os pacientes podem então ser novamente imunizados com péptido agonista de preferência em adjuvante.

Geralmente, são administradas entre cerca de 1×10^5 e 2×10^{11} células T citotóxicas por infusão em, por exemplo, uma a três infusões de cerca de 200 a cerca de 250 ml cada durante um período de 30 a 60 minutos. Após o termo das infusões, o paciente pode ser tratado com um modificador da resposta biológica tal como interleucina 2 (IL-2). No caso de IL-2, é administrada IL-2 recombinante intravenosamente numa dose de 720 000 UI por quilograma de peso corporal de oito em oito horas. Após transferência adoptiva das células T citotóxicas específicas do antigénio para o paciente, este pode adicionalmente ser tratado com o péptido agonista utilizado para preparar células T citotóxicas, para expandir mais o número de células T *in vivo*.

Um péptido agonista pode ser codificado por uma sequência de ADN e suas variantes.

Numa concretização a sequência de ADN codificando o péptido agonista é uma variante da sequência de ADN compreendendo:

TAC	CTT	TCG	GGA	GCG	AAC
Tyr	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn
CTC	AAC	CTC	(SEQ. ID No: 6)		
Leu	Asn	Leu	(SEQ. ID No: 1).		

Uma variante de SEQ ID NO:6 inclui, mas não se limita a, um codão ATC (Ile) em vez do codão CTC (Leu na posição 7). Outra variante de SEQ ID NO:6 inclui, mas não se limita a, um codão TGT (Cys) em vez do codão AAC (Asn na posição 6).

Noutra concretização, a sequência de ADN codificando o péptido agonista compreende:

TAC	CTT	TCG	GGA	GCG	GAC
Tyr	Leu	Ser	Gly	Ala	Asp
CTC	AAC	CTC	(SEQ. ID No: 7)		
Leu	Asn	Leu	(SEQ. ID No: 2)		

e suas variantes.

Ainda noutra concretização, a sequência de ADN codificando o péptido agonista compreende:

TAC	CTT	TCG	GGA	GCG	GAC
Tyr	Leu	Ser	Gly	Ala	Asp
ATC	AAC	CTC	(SEQ. ID No: 8)		
Ile	Asn	Leu	(SEQ. ID No: 3)		

ou suas variantes.

Estão incluídas substituições conservativas baseadas na degenerescência dos codões desde que a modificação resulte num péptido agonista funcionalmente equivalente ou num péptido com maior imunogenicidade.

Os vectores e plasmídeos compreendendo uma sequência de ADN codificando um péptido agonista incluem, mas não se limitam a, um plasmídeo de *E. coli*, um vector de *Listeria* e um vector viral recombinante. Os vectores virais recombinantes incluem, mas não se limitam a, *Orthopoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Vaccinia*, baculovírus, adenovírus humanos, SV40, papilomavírus bovinos e semelhantes, compreendendo a sequência de ADN codificando um péptido agonista.

O péptido agonista recombinante pode ser obtido utilizando um sistema de expressão de baculovírus de acordo com o método de Bei et al., *J. Clin. Lab. Anal.* 9: 261-268, 1995. Os vectores virais recombinantes podem ser construídos através de métodos conhecidos na arte tais como em Patente U.S. 5093258; WO 96/10419; Cepko et al., *Cell* 37: 1053-1062, 1984; Morin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4626-4630, 1987; Lowe et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3896-3900, 1987; Panicali e Paoletti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4927-4931, 1982; Mackett et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7415-7419, 1982; WO 91/19803; Perkus et al., *Science* 229: 981-984, 1985; Kaufman et al., *Int. J. Cancer.* 48: 900-907, 1991; Moss, *Science* 252: 1662, 1991; Smith e Moss, *Biotechniques*, Nov/Dez, pág. 306-312, 1984; Patente U.S. 4738846; Sutter e Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10847-10851, 1992; Sutter et al., *Virology*, 1994; e Baxby e Paoletti, *Vaccine* 10: 8-9, 1992.

As células hospedeiras que podem expressar o ADN codificando o péptido agonista transportado pelos vectores ou plasmídeos são células hospedeiras procarióticas e eucarióticas e incluem, mas não se limitam a, *E. coli*, *Listeria*, espécies de *Bacillus*, células COS, células Vero, fibroblastos de embriões de galinha, células tumorais, células de apresentação do antigénio e semelhantes. Quando a célula hospedeira é uma célula de apresentação do antigénio, a célula hospedeira deve expressar adicionalmente uma molécula de MHC de classe I.

Relatámos recentemente (11) evidências de respostas de CTL a CEA em pacientes imunizados com rV-CEA. O péptido 9-mero CAP1 foi empregue para expandir CTL *in vitro* devido: (a) à sua

forte ligação a HLA-A2 e (b) à sua não identidade com outros membros da família de genes de CEA expressos em tecidos normais. Os CTL foram gerados a partir de PBMC após imunização de pacientes enquanto que o sangue pré-imunização dos mesmos pacientes não conseguiu proliferar. Adicionalmente, células dendríticas pulsadas com CAP1 estimularam *in vitro* o crescimento de CTL restringidos a -A2 de sangue periférico de pacientes de cancro não imunizados (12). Finalmente quando os CTL foram gerados *in vitro* através de estimulação com células dendríticas codificando ARNm de CEA inteiro, a citotoxicidade contra CAP1 foi superior à actividade contra seis outros péptidos de CEA de ligação a -A2 (S. Nair e E. Gilboa, comunicação pessoal ou observação não publicada). Tais resultados encorajam a noção de que CAP1 é um epítipo imunodominante da molécula CEA.

O presente invento pretende melhorar a imunogenicidade do péptido CAP1 através da introdução de substituições de aminoácidos em posições que não sejam de âncora para formar os péptidos agonistas do presente invento. Quando se utilizou CTL T-Vac8 como efector, o análogo CAP1-6D sensibilizou as células alvo para a lise muito melhor que o próprio CAP1. Outros estudos mostraram que a actividade citolítica de um segundo CTL específico de CAP1 restringido a -A2, T-Vac24, foi tão boa ou melhor com CAP1-6D do que com CAP1. Estas demonstrações de maior reactividade não se podiam explicar através de uma melhor apresentação pelo MHC de classe I. Finalmente, CAP1-6D podia ser utilizado para estimular CTL *in vitro* a partir de PBMC tanto de pacientes de carcinoma como de dadores normais. Antes do presente invento, as tentativas para estimular CTL anti-CAP1 de dadores normais utilizando esta mesma metodologia não tinham tido sucesso. O presente invento refere-se à estimulação de dadores normais com CAP1-6D em oposição a CAP1 nativo onde a estimulação com a sequência nativa não conseguiu produzir actividade citotóxica específica. Em contraste, a estimulação com CAP1-6D produziu vários CTL com reactividade específica anti-péptido CAP1 bem como reactividade antitumoral. Assim, o péptido análogo CAP1-6D é capaz de seleccionar uma população de CTL humanos específicos de CAP1 mais eficientemente que o CAP1 nativo. Um tal agonista pode encontrar aplicações no desenho de vacinas dirigidas por células T contra carcinomas que expressem CEA.

O presente invento refere-se também a uma criação e expansão mais eficientes de células T específicas de tumores para imunoterapia adoptiva. Nos últimos anos foi alcançado um grande progresso na caracterização de péptidos antigénios associados a tumores que podem ser apresentados a CTL pelos antigénios HLA de classe I. Em casos onde as mutações geram neo-antigénios tais como *ras* (35, 36), *p53* (37, 38) ou β -catenina (39) pontualmente mutado as estratégias de vacinação direccionam-se para a nova sequência sob o pressuposto de que o sistema imunitário não é "tolerante" a um antigénio que nunca viu. Mais recentemente foi proposto que os neo-antigénios podem também surgir através de desamidações pós-tradução (29, 40). Contudo, em muitos casos os alvos pretendidos para terapia tumoral não são neo-antigénios mas em vez disso antigénios oncofetais ou de diferenciação normais que são sobre-expressos ou expressos ectopicamente por células malignas. É este o caso do CEA (41). Em tais situações, os modelos que invocam "tolerância" prevêem que o sistema imunitário tenha encontrado estes antigénios e seja menos capaz de lhes responder. Este quadro clássico foi confrontado em anos recentes com numerosos relatos de imunidade provocada a antigénios de diferenciação sobre-expressos, oncogenes e genes supressores tumorais (37, 38, 42-44). Contudo, é frequentemente difícil em termos experimentais gerar e expandir células T com a actividade antitumoral desejada e é portanto desejável considerar novas estratégias para a criação de CTL.

Foram descritos alguns péptidos de ligação de classe II nos quais substituições aumentam as respostas de clones de Th humanos e de murídeo sem aumentar a ligação a antigénios de classe II (29, 45-47). Contudo, entre os péptidos de classe I humanos, as únicas substituições descritas para a criação de CTL foram as que aumentam a ligação a HLA (17-20). As substituições nesses estudos foram dirigidas a resíduos nas posições de âncora primárias e secundárias que definem os motivos de ligação aos antigénios do MHC de classe I. Até as substituições dirigidas a uma posição não âncora (19) alcançaram o seu efeito de estimulação através do aumento da ligação a HLA-A2. O análogo CAP1-6D no presente relatório representa o que parece ser uma classe diferente de péptidos de CTL substituídos, agonistas que aumentam o reconhecimento

do ligando péptido-MHC pelo receptor de células T e produzem uma maior função efectora sem aumentos na ligação. Tanto quanto sabemos este é o primeiro destes péptidos agonistas estimulantes descrito para um CTL humano.

É improvável que a susceptibilidade lítica aumentada dos alvos na presença de CAP1-6D seja devida a uma melhor apresentação do antigénio. Experiências de ligação mostram que HLA-A2 apresenta o CAP1 nativo e os análogos CAP1-6D e CAP1-7I de modo aproximadamente igual. Outra possibilidade é que CAP1-6D apresente uma actividade aumentada porque é apresentado por mais de um alelo e T-Vac8 é promíscuo para com os complexos péptido-MHC. Contudo, T-Vac8, T-Vac24 e CTL derivados de pacientes não imunizados apresentaram uma lise melhorada com CAP1-6D. Uma vez que HLA-A2 é o único MHC de classe I nos alvos empregues, a melhor lise não pode ser devida ao recrutamento de outro MHC de classe I.

Uma vez que os CTL anti-CAP1 de múltiplos dadores demonstram uma reactividade cruzada agonista é possível que CAP1-6D possa ser utilizado para estimular o crescimento de CTL de numerosos indivíduos -A2. Fomos encorajados pelas diferenças bastantes distintas entre T-Vac8 e T-Vac24 na grandeza da resposta ao agonista; isto implica que cada effector utiliza diferentes segmentos do gene de TCR e que estes podem mesmo assim reconhecer tanto a sequência nativa como a substituição CAP1-6D. A capacidade de CAP1-6D para actuar como agonista com células T que expressem diferentes receptores de células T amplia claramente o seu potencial terapêutico. Assim, o presente invento refere-se também à estimulação com o agonista e à subsequente criação de células T que reconhecem a sequência normal em indivíduos não imunizados. Tais indivíduos presumivelmente nunca encontraram a sequência modificada e uma vez que o agonista é mais eficiente a desencadear uma resposta de células T, tais agonistas poderiam ser capazes de seleccionar CTL mais facilmente que os imunogénios baseados na sequência nativa.

Para que os CTL derivados dos péptidos sejam reagentes terapêuticos úteis é essencial demonstrar que podem lisar células tumorais que expressem antigénio endógeno (48, 49). Anteriormente (11), mostrámos que as células tumorais

processam CEA e apresentam antigénios reconhecidos pelos CTL gerados através de estimulação com CAP1. De acordo com o presente invento, os CTL criados a partir de dadores normais através de estimulação com CAP1-6D são também capazes de reconhecer células tumorais alogeneicas positivas para CEA e positivas para HLA-A2. Estas células T não conseguem reconhecer células tumorais negativas para -A2 nem células positivas para -A2 que não tenham expressão de CEA.

Mostrámos também que os CTL seleccionados com o agonista CAP1-6D podem ser mantidos subsequentemente através de estimulação com a sequência CAP1 nativa. Esta é uma importante verificação uma vez que os CTL em pacientes, estabelecidos *in vivo* através de imunização activa ou transferidos de modo adoptivo após expansão *ex vivo*, apenas provavelmente encontrarão a sequência nativa. Isto permite que os CTL sejam mantidos durante um período alargado *in vivo*.

Uma das razões originais para seleccionar e testar CAP1 foi a sua não identidade com outras sequências relatadas no genoma humano. Previa-se portanto que seria improvável que quaisquer respostas imunitárias obtidas danificassem tecidos normais possuindo outros antigénios. Por esta razão foi efectuada uma pesquisa semelhante das bases de dados de proteínas para os péptidos CAP1-6D e CAP1-7I que revelou que estes não estão relatados como sequências humanas noutro local no Genbank (Genetics Computer Group, Madison, WI). Contudo, duas sequências semelhantes, YLNVQDLNL (SEQ ID NO:9) e YLHDPEFNL (SEQ ID NO:10), estão relatadas para antigénios do vírus da peste suína africana e do vírus do sarampo, respectivamente. Estas sequências encaixam no motivo de consenso para HLA-A2 e permitem portanto que indivíduos infectados expressem antigénios que reagem de forma cruzada com CAP1. Uma possibilidade interessante é que a presença de CTL anti-CAP1 nalguns pacientes represente um exemplo de mimetismo de epítomos (50).

Dois relatórios recentes sugerem que resíduos de asparagina modificados poderiam aumentar a imunogenicidade dos péptidos de MHC de classe I. Skipper *et al.* (40) utilizaram CTL criados em culturas mistas de linfócitos e células tumorais para identificar antigénios em extractos de células

de melanoma. Um péptido antigénico era idêntico em 8 de 9 posições a uma sequência de tirosinase, com uma substituição de asparagina para ácido aspártico na posição 3. Quando testados utilizando péptidos sintéticos, os CTL eram mais activos contra o péptido com ácido aspártico do que contra o péptido contendo a asparagina geneticamente prevista. Estes autores especulam que desamidações pós-tradução possam gerar péptidos antigénicos a partir de antigénios de diferenciação normais. Recentemente, Chen *et al.* (51) relataram a criação de CTL de murídeo para um derivado de succinimida estabilizado de um péptido antigénico contendo asparagina. Embora estes CTL pudessem matar alvos pulsados com o péptido de asparagina natural, fizeram-no com menos sensibilidade. Eles levantam a possibilidade da desamidação de proteínas *in vivo* e *in vitro* poder produzir intermediários transientes de succinimida que representem autoligandos alterados capazes de provocar uma resposta imunitária. Noutro extremo, Kersh e Allen (52) substituíram uma asparagina de contacto com TCR por ácido aspártico num péptido de hemoglobina e aboliram a capacidade de resposta a um clone Th de murídeo. Presentemente não podemos excluir a possibilidade da maior reactividade de CAP1-6D ser devida a desamidação da sequência nativa que por sua vez inicia a resposta que detectámos com CAP1. Contudo, a nossa repetida incapacidade para criar CTL anti-CAP1 a partir de PBMC pré-imunizados dos mesmos pacientes de quem gerámos CTL após a imunização, argumenta contra isto. Também, as desamidações putativas não podiam contribuir para o reconhecimento de outros análogos tais como CAP1-6C ou CAP1-7I pelos CTL T-Vac8. Em vez disso parece mais razoável que os receptores de células T de ambos, T-Vac8 e T-Vac24, bem como das novas linhas aqui descritas, possam reconhecer algum desvio da sequência CAP1 nativa.

Em resumo, a síntese de análogos de um péptido de CEA imunodominante com substituições de aminoácidos nas posições previstas como potencialmente interagindo com o receptor de células T permitiu-nos identificar um agonista estimulante. Este agonista foi reconhecido por dois CTL de CEA diferentes e aumenta a actividade de um deles em 2-3 ordens de grandeza. O agonista foi também capaz de estimular o crescimento de CTL a partir do sangue periférico de dadores normais não imunizados com mais facilidade que a sequência peptídica nativa. Mais

importante, os CTL gerados utilizando o agonista estimulante foram capazes de reconhecer e lisar alvos apresentando a sequência nativa, incluindo linhas celulares tumorais expressando CEA endógeno. De acordo com o presente invento, a caracterização deste péptido agonista estimulante facilita imunoterapias antitumorais mais agressivas quando empregue como imunogénio *in vivo* ou para a expansão *ex vivo* de CTL antitumorais autólogos. A abordagem sintética empregue de acordo com o presente invento é também útil no melhoramento da imunogenicidade de outros epítomos peptídicos de CTL.

MATERIAIS E MÉTODOS

PÉPTIDOS

Um painel de substituições únicas de aminoácidos para as posições p5 a p8 do péptido de CEA CAP1 foi feito através da química do f-moc utilizando tecnologia de pinos (Chiron Mimotopes, Victoria, Austrália). CAP1 (YLSGANLNL) e CAP1-6D (YLSGADLNL), de pureza superior a 96%, foram também produzidos por Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). Os péptidos adicionais CAP1-7I e NCA571 foram sintetizados num sintetizador Applied Biosystems 432A e apresentavam pureza superior a 90% em HPLC de fase inversa em C18.

LINHAS CELULARES

T-Vac8 (53) e T-Vac24 (11) são CTL humanos específicos para o péptido de CEA CAP1. Estas linhas celulares foram geradas através de estimulação *in vitro* de PBMC utilizando CAP1 e IL-2, de acordo com métodos anteriormente publicados (11). Resumidamente, os PBMC após imunização eram de indivíduos HLA-A2+ com carcinoma avançado aos quais tinha sido administrado rV-CEA num ensaio de Fase I. Os PBMC foram isolados em gradientes de meio de separação de linfócitos (Organon Teknika, Durham, NC) e foram colocadas 2×10^5 células em poços de placas de cultura de 96 poços estéreis (Coming Costar, Cambridge, MA) juntamente com 50 µg/ml de péptido. Após 5 dias de incubação a 37°C numa atmosfera humidificada contendo CO₂ a 5%, os sobrenadantes foram removidos e substituídos por meio contendo 10 U/ml de IL-2 humana (uma oferta de Surgery Branch, NCI). As culturas foram alimentadas com IL-2 de 3 em 3 dias durante 11 dias e foram depois novamente estimuladas com PBMC (5×10^5) autólogos irradiados

(4000 rad) e péptido. IL-2 fresca foi proporcionada a cada terceiro dia e foram feitas novas estimulações subsequentes de 2 em 2 semanas. Os CTL são mantidos em meio RPMI completo (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) com glutamina (GIBCO/BRL), penicilina, estreptomicina e soro de um banco humano AB a 10% (Gemini Bioproducts, Inc., Calabasas, CA).

A linha celular C1R-A2 (proporcionada pelo Dr. W. Biddison, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, MD) é mantida em RPMI completo com soro fetal bovino a 10% (FBS, Biofluids Inc., Rockville, MD), glutamina, aminoácidos não essenciais e piruvato (Biofluids) e 1 mg/ml de G418. A linha celular 174.CEM-T2 (proporcionada pelo Dr. P. Creswell, Yale University School of Medicine, New Haven, CT) é deficiente no processamento do péptido endógeno e é mantida em meio de Iscove (GIBCO/BRL) com FBS a 10%. Tanto a linha C1R-A2 como T2 apresentam péptidos exógenos com HLA-A2.

As linhas celulares tumorais positivas para CEA SW480, SW1463, SW1116 e SW837 foram obtidas a partir da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) e passadas semanalmente no respectivo meio de cultura descrito no catálogo de ATCC. A linha de melanoma negativa para CEA SKmel24 (proporcionada pelo Dr. S. Rosenberg, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD) foi passada semanalmente em RPMI 1640, FBS a 10% e 10 µg/ml de gentamicina (Life Technologies). O tumor do ovário CaOV3 negativo para CEA foi proporcionado pelo Dr. R. Freedman (MD Anderson Cancer Center, Houston TX) e foi cultivado em RPMI com FBS a 15%, glutamina, 12 µg/ml de insulina (Sigma, St. Louis, MO), 10 µg/ml de hidrocortisona (Biofluids) e 10 µg/ml de gentamicina. Todas as linhas tumorais foram tripsinizadas com Tripsina/Versene (Biofluids) durante 5-10 minutos antes da marcação com o isótopo para ensaios de CTL. O alvo assassino natural (NK) altamente sensível K562 foi obtido a partir de ATCC e passado semanalmente com RPMI 1640, FBS a 10%.

CRIAÇÃO DE CTL

As linhas de células T T-N1 e T-N2 foram geradas a partir de dois dadores normais positivos para HLA-A2 através de estimulação *in vitro* com o péptido como se segue. Para o

primeiro ciclo de estimulação, as células T foram positivamente seleccionadas através de crivo em balões MicroCollector CD3+ (Applied Immune Sciences, Santa Clara, CA). Células CD3+ (3×10^6) foram cultivadas com 10^6 células 174.CEM-T2 que foram previamente infectadas com vírus vacínia expressando B7 humana a uma multiplicidade de infecção de 10, pulsadas com 50 µg/ml de péptido CAP1 ou CAP1-6D e 2 µg/ml de microglobulina β2 humana (Intergen, Purchase, NY) e irradiadas (10000 rad). As culturas foram incubadas a 37°C numa atmosfera húmida contendo CO₂ a 5%, em balões T25 em RPMI com soro humano a 10%, glutamina 2 mM e 10 µg/ml de gentamicina num volume total de 10 ml com 2×10^7 PBMC autólogos irradiados (2500 rads) como células de alimentação. Após 24 horas em cultura foram adicionadas 10 U/ml de huIL-2 e 0,1 ng/ml de rIL-12 (R & D Systems, Minneapolis, MN). Após 9 dias em cultura, as células foram novamente estimuladas utilizando células EBV-B autólogas irradiadas (10000 rads) pré-incubadas com 25 µg/ml de péptido a uma razão de 2,5:1 de células estimulantes para células T, e foram novamente adicionadas IL-2 e IL-12, 24 horas depois. A concentração de péptido foi reduzida a metade com cada ciclo subsequente de estimulação até ser alcançada uma concentração final de 3,12 µg/ml.

Adicionalmente, foram gerados CTL a partir de PBMC após imunização de pacientes de cancro Vac8 através de estimulação com CAP1-6D de acordo com procedimentos já publicados (11).

ENSAIO DE CTL

As células alvo foram marcadas com ⁵¹Cr ou ¹¹¹In, depois incubadas a 2000-10000 por poço com ou sem péptidos em placas de microtítulo de fundo redondo (Corning Costar). Uma hora depois, foram adicionadas as células T. Os sobrenadantes foram colhidos (Skatron, Inc., Sterling VA) após 4 horas e a libertação de isótopo foi medida. Todos os ensaios foram efectuados em triplicado e a percentagem de libertação específica foi calculada de acordo com:

$$\frac{(\text{libertação observada} - \text{libertação espontânea})}{(\text{libertação máxima} - \text{libertação espontânea})} \times 100$$

onde a libertação espontânea é obtida através da omissão das células T e a libertação máxima é obtida através da adição de Triton $\times 100$ a 1%.

ENSAIO DE LIGAÇÃO

A ligação dos péptidos a HLA-A2 foi avaliada através de incubação com células 174.CEM-T2 com processamento deficiente e medição da estabilidade dos complexos péptido-A2 da superfície celular (30). Resumidamente, as células foram colhidas e lavadas com RPMI isento de soro, depois incubadas de um dia para o outro a $1-2 \times 10^6$ células/poço com várias concentrações de péptidos. No dia seguinte, as células foram recolhidas, lavadas em PBS com Ca^{2+} , Mg^{2+} e FBS a 5%, depois divididas em alíquotas para uma análise de citometria de fluxo de cor única. As células foram incubadas 1 hora em gelo sem anticorpo, com anticorpo anti-A2 A2,69 (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA) ou com anticorpo de controlo com o mesmo isotipo UPC-10 (Organon Teknika), depois lavadas e coradas 1 hora com Ig de cabra anti-ratinho marcado com fluoresceína-isotiocianato (FITC) (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL). A coloração da superfície celular foi mediada num citómetro de fluxo Becton Dickinson (Mountain View, CA) e a intensidade média da fluorescência (MFI) para 10000 células vivas foi representada num gráfico contra a concentração de péptido.

UTILIZAÇÃO DA CADEIA DE TCR

Os CTL T-N1 foram cultivados tal como descrito durante 5 ciclos de estimulação antigénica utilizando o análogo CAP1-6D. A linha foi então dividida e foram mantidas culturas em duplicado com CAP1 ou CAP1-6D durante 5 ciclos adicionais de estimulação. As células T purificadas em Ficoll (5×10^5) foram coradas com um painel de 19 anticorpos monoclonais de murídeo anti-V β e 2 anti-V α para regiões variáveis do receptor de células T $\alpha\beta$ humanas. As células foram incubadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticorpos purificados durante 30 minutos a 4°C. Os monoclonais não marcados utilizados foram: V β 3.1 clone 8F10, V β 5(a) clone 1C1, V β 5(b) clone W112, V β 5(c) clone LC4, V β 6.7 clone OT145, V β 8(a) clone 16G8, V β 12 clone S511, V β 13 clone BAM13, V α 2 clone F1 e V α 12.1 clone 6D6 (T Cell Diagnostics, Woburn, MA) e V β 18 (Immunotech, Westbrook, ME). As células foram coradas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticorpo IgG de

cabra anti-ratinho marcado com FITC (Southern Biotechnology Associates) durante 30 minutos no escuro. Os monoclonais marcados directamente foram: V β 11, V β 21.3, V β 13.6, V β 14, V β 16, V β 17, V β 20 e V β 22 marcados com FITC e V β 9 e V β 23 marcados com PE (Immunotech). As células foram fixadas com paraformaldeído a 1%, lavadas com tampão FACSFlow (Becton Dickinson) e analisadas utilizando um citómetro de fluxo Becton Dickinson.

EXEMPLOS

Péptidos CAP1 Substituídos

Vários factores foram considerados ao decidir que posições examinar quanto aos efeitos sobre a actividade das células T. Experiências de sequenciação e mapeamento definiram um motivo de ligação no qual a posição 2 e o terminal C (posição 9 ou 10) são críticos para a apresentação do péptido por HLA-A2 (para revisão, ver 31). Adicionalmente, Tyr na posição 1 foi identificado como uma âncora secundária eficaz (20, 32). Uma vez que o péptido de CEA CAP1 possui já os aminoácidos preferidos nestas três posições estes resíduos não foram alterados. Em vez disso, centrámo-nos nos resíduos que se previa que interagiam com o TCR na esperança de descobrir análogos que estimulassem células T citotóxicas humanas específicas de CAP1. Estudos de cristalografia de raios X de vários péptidos ligados a HLA-A2 solúvel sugerem que todos os péptidos de ligação assumem uma conformação comum no sulco de ligação ao péptido (33). Quando foram examinados cinco péptidos modelo, os resíduos 5 a 8 sobressaem para fora do sulco de ligação e ficam potencialmente disponíveis para ligação a um TCR. Por essa razão foi produzido um painel de 80 péptidos análogos de CAP1 nos quais os resíduos nas posições 5 a 8 (p5-p8) foram sintetizados com cada um dos 20 aminoácidos naturais. Os péptidos são designados CAP1-pAA, onde p se refere à posição no péptido e AA se refere ao aminoácido de substituição, utilizando o código de aminoácidos de uma letra; *i.e.*, para CAP1-6D a posição 6 é ocupada por ácido aspártico.

Maior Sensibilidade de CTL dos Alvos ao Análogo CAP1-6D

Os efeitos destas substituições de aminoácidos sobre o potencial de reconhecimento do TCR foram estudados utilizando uma linha de CTL humanos específicos de CAP1 e restringida a HLA-A2, designada T-Vac8. Resumidamente, T-Vac8 foi gerada tal como descrito nos Materiais e Métodos através de estimulação com péptido *in vitro* de PBMC de um paciente ao qual tinha sido administrado rV-CEA. Para a pesquisa inicial, T-Vac8 foi utilizada num ensaio de citotoxicidade para medir a libertação de ¹¹¹In a partir de células C1R-A2 marcadas incubadas com cada membro do painel de péptidos (a três concentrações de péptido). A libertação espontânea a partir dos alvos (na ausência de T-Vac8) foi determinada para cada péptido individual.

Os resultados estão presentes nas Figuras 1A a 1D. Das 80 substituições únicas de aminoácidos, a maioria não conseguiu activar citotoxicidade de T-Vac8. Contudo, seis substituições independentes conservaram a reactividade. Na posição 5, três análogos CAP1-5F, CAP1-5I e CAP1-5S proporcionaram estimulação, embora a níveis reduzidos em comparação com o próprio CAP1. Na posição 6 as substituições CAP1-6C e CAP1-6D activaram citotoxicidade de T-Vac8 e pareceu serem iguais ou melhores que CAP1 uma vez que foram mais activos na concentração peptídica intermédia (0,1 µg/ml). Na posição 7 o análogo CAP1-7I também pareceu ser activo. Finalmente, na posição 8 nenhum análogo foi capaz de sensibilizar alvos para lise por T-Vac8. Os dois análogos mais activos (CAP1-6D e CAP1-7I) foram então analisados em detalhe, omitindo CAP1-6C devido à preocupação com a formação de dissulfuretos sob condições oxidantes.

Preparações mais puras (90-96%) de CAP1 nativo e dos análogos CAP1-6D e CAP1-7I foram sintetizadas e comparadas num ensaio de CTL ao longo de uma variedade mais ampla de concentrações peptídicas, utilizando duas linhas celulares diferentes como alvos (Figura 2A e 2B). Empregando células T2 o análogo CAP1-6D foi pelo menos 10² vezes mais eficaz que O CAP1 nativo. A actividade lítica de CAP1-6D esteve a 1/2 do máximo a 10⁻⁴ µg/ml (Figura 2A). Em contraste, o análogo CAP1-7I e a sequência CAP1 nativa eram comparáveis um com o outro ao longo de toda a variação de titulação do péptido e

apresentaram metade da lise máxima a 10^{-2} µg/ml. Empregando as células C1R-A2 como alvos, CAP1-6D foi de forma semelhante entre 10^2 e 10^3 mais eficaz a mediar a lise que CAP1 (Figura 2B).

O péptido CAP1-6D foi também testado utilizando uma segunda linha de células T específicas de CEA, T-Vac24 (11). Esta linha foi gerada a partir de PBMC após vacinação com rV-CEA de um paciente de carcinoma diferente através de estimulação *in vitro* com o péptido CAP1 nativo; em contraste com T-Vac8 predominantemente CD8+, T-vac24 possui uma elevada percentagem de células duplamente positivas CD4+CD8+ (11). Num ensaio de libertação de ^{111}In de 4 h empregando T-Vac24, CAP1-6D foi ligeiramente mais eficaz (lise de 30%) que a sequência de CAP1 nativa (lise de 20%); embora as diferenças não fossem tão pronunciadas como com T-Vac8, a maior sensibilidade ao análogo foi observada em três experiências separadas. O péptido análogo envolveu claramente o aparelho lítico de um segundo CTL específico de CAP1.

Análogos e Péptido Nativo Mostram uma Apresentação Idêntica através de HLA-A2

A maior eficácia de CAP1-6D em ensaios de CTL podia ser devida a uma melhor apresentação pelo alvo. Os análogos de CAP1 mais activos foram testados quanto à ligação a HLA-A2 através da medição da HLA-A2 da superfície celular na linha celular humana com transporte deficiente T2. Quando comparados ao longo de uma variação de concentrações de 4 log, o CAP1 nativo e os dois análogos CAP1-6D e CAP1-7I apresentaram-se todos igualmente em células T2 (Figura 3). Adicionalmente, experiências de dissociação indicam que os complexos de HLA-A2 que se formam com os 3 péptidos não mostram diferenças apreciáveis na estabilidade (Figura 3 - inserção). Quando células T2 pulsadas com péptido foram lavadas para remoção do péptido não ligado, as semividas dos complexos péptido-A2 à superfície celular foram de 12,5 h (CAP1), 9,7 h (CAP1-6D) e 10,8 h (CAP1-7I). Se alguma coisa, o complexo formado com o péptido agonista parece ligeiramente menos estável. Uma vez que não existem diferenças na ligação a HLA-A2, a eficácia melhorada de CAP1-6D nos ensaios de CTL parece ser devida a um melhor envolvimento pelo receptor de células T, uma

característica comportamental de um péptido agonista estimulante.

Os CTL Humanos Gerados com CAP1-6D Também Reconhecem CAP1 Nativo

O agonista CAP1-6D poderia ser útil em aplicações experimentais e clínicas se pudesse estimular o crescimento de CTL específicos de CEA a partir de pacientes com carcinomas estabelecidos. Numa experiência, PBMC após imunização com rV-CEA de um paciente de cancro Vac8 (o mesmo paciente rV-CEA a partir do qual foram estabelecidos os CTL T-Vac8) foram estimulados *in vitro* com CAP1-6D e após 5 ciclos de estimulação foram ensaiados quanto à actividade de CTL contra alvos revestidos com CAP1 ou CAP1-6D. Esta nova linha demonstrou actividade citotóxica dependente do péptido contra células alvo revestidas com CAP1-6D ou CAP1 nativo (Tabela 1).

Mostrou-se já que os PBMC pós-imunização de pacientes Vac8 e Vac24 produzem actividade de CTL quando estimulados com CAP1 enquanto que os PBMC pré-imunização eram negativos (11, 34). Para além disso, as tentativas anteriores para estimular a actividade de CTL a partir de dadores saudáveis não imunizados com o péptido CAP1 não tiveram sucesso. Para testar se o péptido agonista é de facto mais imunogénico que o CAP1 nativo tentámos gerar CTL de dadores saudáveis não imunizados utilizando CAP1-6D. PBMC HLA-A2+ de indivíduos aparentemente saudáveis foram estimulados *in vitro* com CAP1 ou com o agonista CAP1-6D. Após 4 ciclos de estimulação *in vitro*, as linhas celulares foram ensaiadas quanto à especificidade contra células C1R-A2 pulsadas com CAP1 ou CAP1-6D.

Embora as estimulações com CAP1 ou com o péptido CAP1-6D tenham produzido linhas de células T, lise específica do péptido foi apenas obtida nas linhas geradas com CAP1-6D. Duas linhas de células T independentes de diferentes dadores foram derivadas utilizando CAP1-6D e foram designadas T-N1 e T-N2 (Figura 4A e Figura 4B, respectivamente). Ambas as linhas de CTL lisam alvos C1R-A2 pulsados com o péptido CAP1 nativo. Contudo, é obtida uma lise mais eficiente utilizando o agonista CAP1-6D. Os CTL T-N1 reconhecem CAP1-6D a uma concentração peptídica 3-10 vezes inferior a CAP1 e T-N2 reconhece o agonista 100 vezes melhor que CAP1. Em contraste,

as tentativas para gerar uma linha de células CTL a partir de dadores normais através de estimulação com CAP1 resultaram em linhas sem lise dependente do péptido e perda das linhas em ciclos iniciais de estimulação. Assim as tentativas para gerar linhas de células T utilizando os dois péptidos demonstraram a capacidade de CAP1-6D para actuar como agonista não só no estágio efector, na lise dos alvos, como também na selecção de células T que estão presumivelmente a baixas frequências de precursores.

Para determinar se os CTL estabelecidos com o agonista podiam ser mantidos com a sequência de CAP1 nativa, a T-N1 foi cultivada durante 5 ciclos tal como descrito utilizando CAP1-6D, depois dividida em culturas em duplicado mantidas no agonista ou em CAP1. T-N1 continuou a crescer quando estimulada com ambos os péptidos e respondeu a ambos os péptidos em ensaios de CTL. A análise fenotípica da utilização de TCR em T-N1 indica que a maioria das células (71%) utiliza V β 12, com uma população menor que utiliza V β 5.3 (Tabela 2). O mesmo padrão de utilização de TCR V β foi observado após a mudança das células para CAP1 durante 5 ou mais ciclos de estimulação. Este padrão de utilização de V β foi distinto do de T-Vac8. Estes dados indicam que o agonista pode seleccionar células T que estão provavelmente a baixa frequência de precursores mas que uma vez seleccionadas, tais CTL podem ser mantidos com o CAP1 nativo.

CTL Gerados com CAP1-6D Lisaram Especificamente Células Tumorais CEA⁺, HLA-A2⁺

Foram conduzidos estudos para determinar a capacidade dos CTL gerados com o agonista estimulante para lisar células tumorais humanas expressando endogenamente CEA. T-N1 e T-N2 foram testadas contra um painel de células tumorais que são CEA⁺/A2⁺ (SW480 e SW1463), CEA⁺/A2⁻ (SW1116) ou CEA⁻/A2⁺ (CaOV3 e SKmel24). Uma linha de células T (T-N2) do dador normal foi testada quanto à capacidade para lisar alvos tumorais expressando endogenamente CEA. Os CTL T-N2 gerados com o agonista lisaram células tumorais expressando CEA e HLA-A2 ao mesmo tempo que não exibiam lise titulável de células de melanoma SKmel24 CEA⁻/A2⁺ (Figura 5A). Não foi observada lise significativa de K562. Em contraste, as linhas celulares geradas através de estimulação com CAP1 nativo não mostraram

actividade antitumoral detectável (Figura 5B). A restrição a HLA-A2.1 das respostas de T-N2 a alvos tumorais positivos para CEA foi ainda demonstrada através da lise específica de uma célula tumoral positiva para CEA, negativa para HLA-A2.1, SW837, após infecção com uma construção *vaccinia*-A2.1 (rV-A2.1). Não foi observada lise quando os alvos SW837 foram infectados com o vacínia de tipo selvagem de controlo sem o transgene de A2.1 (Figura 6).

A capacidade de uma linha de CTL (T-N1) derivada de um segundo dador para matar alvos de carcinoma expressando CEA endógeno é mostrada na Figura 7A e 7B. T-N1 lisou especificamente células de tumor SW480. Isto é drasticamente aumentado até 79% de lise através de pré-tratamento das células tumorais com IFN- γ , um tratamento que aumenta a densidade à superfície celular de HLA-A2 e CEA. A especificidade da morte de T-N1 é demonstrada através da sua incapacidade para lisar tumores CEA⁻/A2⁺ tais como o tumor derivado do ovário CaOV3, o tumor melanoma SKmel24 ou o alvo NK K562. Finalmente, a restrição por HLA-A2 é demonstrada através da incapacidade de T-N1 para lisar células tumorais CEA⁺/A2⁻ SW1116 (Figura 7A), mesmo após tratamento com IFN- γ (Figura 7B).

Tabela 1: CTL gerados através de estimulação com o análogo CAP1-6D a partir de PBMC de um paciente HLA-A2 imunizado com rVCEA

razão efector/alvo	lise		
	sem péptido	CAP1	CAP1-6D
25:1	10%	41%	40%
6,25:1	0,5%	38%	46%

As células T foram ensaiadas após 5 estimulações *in vitro*. A actividade citotóxica foi determinada num ensaio de libertação de 4 horas com o péptido a 25 μ g/ml.

Tabela 2: Utilização do TCR da linha de CTL estabelecida com o agonista CAP1-6D

Utilização do TCR ^a	T-N1 ^b		T-N1 ^c	
	% de positivos	MFI	% de positivos	MFI
Vβ12	71	83	70	83
Vβ5.3	18	47	20	57
Vβ3.1	6	48	8	46
Vβ8	3	30	6	26
Vβ13.6	2	19	3	39
Vβ12.1	3	43	3	40

^a Determinada através de análise de FACS utilizando um painel de 19 anticorpos Vβ e 2 Vα (ver Materiais e Métodos). São mostrados apenas os anticorpos corados positivamente.

^b Linha de CTL seleccionada e mantida com o agonista CAP1-6D tal como descrito na secção Materiais e Métodos.

^c Linha de CTL seleccionada com o agonista CAP1-6D durante 5 ciclos de estimulação e mantida com CAP1 durante mais 10 ciclos.

REFERÊNCIAS

1. Muraro, R., Wunderlich, D., Thor, A., Lundy, J., Noguchi, P., Cunningham, R., e Schlom, J. Definition by monoclonal antibodies of a repertoire of epitopes of carcinoembryonic antigen differentially expressed in human colon carcinoma versus normal adult tissues. *Cancer Res.*, 45: 5769-5780 1985.

2. Steward, A.M., Nixon, D., Zamcheck, N., e Aisenberg, A. Carcinoembryonic antigen in breast cancer patients: serum levels and disease progress. *Cancer*, 33: 1246-1252, 1974.

3. Vincent, R.G. e Chu, T.M. Carcinoembryonic antigen in patients with carcinoma of the lung. *J. Thor. Cardiovas. Surg.*, 66: 320-328, 1978.

4. Gold, J.M., Freedman, S.O., e Gold, P. Human anti CEA antibodies detected by radioimmuno-electrophoresis. *Nature New Biology*, 239: 60-62. 1973.

5. Pompecki, R. Presence of immunoglobulin G in human sera binding to carcinoembryonic antigen (CEA) and nonspecific crossreacting antigen (NCA). *Eur. J Cancer*, 16: 973-974, 1980.

6. Ura, Y., Ochi, Y., Hamazu, M., Ishida, M., Nakajima, K., e Watanabe, T. Studies on circulating antibodies against CEA and CEA like antigen in cancer patients. *Cancer Lett.*, 25: 283-295, 1985.

7. Fuchs, C., Krapf, F., Kern, P., Hoferichter, S., Jager, W., e Kalden, J.R. CEA-containing immune complexes in sera of patients with colorectal and breast cancer-analysis of complexed immunoglobulin classes. *Cancer Immunol. Immunother.*, 26:180-184, 1988.

8. LoGerfo, P., Herter, F.P., e Bennett, S.J. Absence of circulating antibodies to carcinoembryonic antigen in patients with gastrointestinal malignancies. *Int. J. Cancer*, 9: 344-348. 1972.

9. MacSween, J.M. The antigenicity of carcinoembryonic antigen in man. *Int. J. Cancer*, 15: 246-252. 1975.

10. Chester, K.A. e Begent, H.J. Circulating immune complexes (CIC), carcinoembryonic antigen (CEA) and CIC containing CEA as markers for colorectal cancer. *Clin. Exp. Immunol.*, 58: 685-693, 1984.

11. Tsang, K Y., Zaremba, S., Nieroda, C.A., Zhu, M.Z, Hamilton, J.M., e Schlom, J. Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J. Natl. Cancer Inst.*, 87: 982-990. 1995.

12. Gadea, J., Brunette, E., Philip, M., Lyeriy, H.K., Philip, R., e Alters, S. Generation of antigen specific CTL using peptide and gene modified dendritic cells. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* [abstr], 3154. 1996.

13. Marshall, J.L., Hawkins, M.J., Richmond, E., Tsang, K., e Schlom, J. A study of recombinant ALVAC-CEA in patients with advanced CEA-bearing cancers. *J. Immunol.* [abstr]. 19: 461. 1996.

14. Foon, K.A., Chakraborty, M., John, W.J., Sherraff, A., Kohler, H., e Bhattacharya-Chatterjee, M. Immune response to the carcinoembryonic antigen in patients treated with an anti-idiotypic antibody vaccine. *J. Clin. Invest.*, 96: 334-342, 1995.

15. Fagerberg, J., Samanci, A., Yi, Q., Strigard, K., Ryden, U., Wahren, B., e Mellstedt, H. Recombinant carcinoembryonic antigen and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for active immunization of colorectal carcinoma patients. *J. Immunol.* [abstr]. 19: 461. 1996.

16. Conry, R.M., Saleh, M.N., Schlom, J., e LoBuglio, A.F. Human immune response to carcinoembryonic antigen tumor vaccines. *J. Immunother.* [abstr], 18: 137, 1995.

17. Parkhurst, M.R., Salgaller, M.L, Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Rosenberg, S A., e Kawakami, Y. Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *J. Immunol.*, 157: 2539-2548, 1996.

18. Salgaller, M.L, Marincola, F.M., Cormier, J.N., e Rosenberg, S.A. Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res.*, 56: 4749-4757, 1996.

19. Bakker, A.B.H., van der Burg, S.H., Huubens, R:J.F., Drijfhout, J.W., Melief, C.J., Adema, G.J., e Figdor, C.G. Analogues of CTL epitopes with improved MHC class-I binding capacity elicit anti-melanoma CTL recognizing the wild type epitope. *Int. J. Cancer*, 70: 302-309, 1997.

20. Pogue, R.R., Eron, J., Frelinger, J.A., e Matsui, M. Amino-terminal alteration of the HLA-A*0201-restricted human immunodeficiency virus pol peptide increases complex stability and in vitro immunogenicity. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 92: 8166-8170, 1995.

21. Lipford, G., Bauer, S., Wagner, H., e Heeg, K. Peptide engineering allows cytotoxic T cell vaccination against human papilloma virus tumor antigen E6. *Immunol.*, 84: 298-303. 1995.

22. Grey, H.M., Ruppert, J., Vitiello, A., Sidney, J., Kast, W.M., Kubo, R.T., e Sette, A. Class I MHC-peptide interactions: structural requirements and functional implications. *Cancer Surv.*, 22: 37-49, 1995.

23. De Magistris, M.T.. Alexander, J., Coggeshall, M., Altman, A., Gaeta, F.C A., Grey, H.M., e Sette, A. Antigen

analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor. *Cell*, 68: 625-634. 1992.

24. Bertoletti, A., Sette, A., Chissari, F.V., Penna, A., Levrero, M., Carli, M.D., Fiaccadori, F., e Ferrari, F. Natural variants of cytotoxic epitopes are T cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature*, 369: 407-410, 1994.

25. Klenerman, P., Rowland-Jones, S., McAdam, S., Edwards, J., Daenke, S., Lalloo, D., Koppe, B., Rosenberg, W., Boyd, D., Edwards, A., Giangrande, P., Phillips, R.E., e McMichael, A.J. Cytotoxic T cell activity antagonized by naturally occurring HIV-1 gag variants. *Nature*. 369: 403-407. 1994.

26. Kuchroo, V.K., Greer, J.M., Kaul, D., Ishioka, G., Franco, A., Sette, A., Sobel, R A., e Lees, M.B. A single TCR antagonist peptide inhibits experimental allergic encephalomyelitis mediated by a diverse T cell repertoire. *J. Immunol.*, 153: 3326-3336. 1994.

27. Jameson, S.C. e Bevan, M.J. T cell receptor antagonists and partial agonists. *Immunity*, 2: 1-11, 1995.

28. Meier, U-C., Klenerman, P., Griffin, P., James, W., Koppe, B., Larder, B., McMichael, A., e Phillips, R. Cytotoxic T lymphocyte lysis inhibited by viable HIV mutants. *Science*. 270: 1360-1362. 1995.

29. Chen, Y., Matsushita, S., and Nishimura, Y. Response of a human T cell clone to a large panel of altered peptide ligands carrying single residue substitutions in an antigenic peptide: characterization and frequencies of TCR agonist and TCR antagonism with or without partial activation. *J. Immunol.*, 157: 3783-3790. 1996.

30. Nijman, H.W., Houbiers, J.G., Vierboom, M.P., van der Hurg, S.H., Drijfhout, J.W., D'Amaro, J., Kenemans, P., Melief, C.J., e Kast, W.M. Identification of peptide sequences that potentially trigger HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 23: 1215-1219, 1993.

31. Rammensee, H-G., Friede, T., e Stevanovic, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, 41: 178-228, 1995.

32. Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R.T., Grey, H.M., e Sette, A. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell*, 74: 929-937. 1993.

33. Madden, D.R., Garboczi, D.N., e Wiley, D.C. The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell*; 75: 693-708, 1993.

34. Hamilton, J.M., Chen, A.P., Nguyen, B., Grem, J., Abrams, S., Chung, Y., Kantor, J., Phares, J.C., Bastian, A., Brooks, C., Morrison, G., Allegra, C.J., e Schlom, J. Phase I study of recombinant vaccinia virus (rV) that expresses human carcinoembryonic antigen (CEA) in adult patients with adenocarcinomas. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* [abstr], 961. 1994.

35. Abrams, S.I., Horan Hand, P., Tsang, K.Y., e Schlom, J. Mutant ras epitopes as targets for cancer vaccines. *Semin. Oncol.*, 23: 118-134, 1996.

36. Elas, A.V., Nijman, H.W., Van Minne, C.E., Mourer, J.S., Kast, W.M., Melief, C.J.M., e Schrier, P.I. Induction and characterization of cytotoxic T lymphocytes recognizing a mutated p21 RAS peptide presented by HLA-A2010. *Int. J. Cancer*, 61: 389-396, 1995.

37. Houbiers, J.G.A., Nijman, H.W., van der Burg, S.H., Drijfhout, J.W., Kenemans, P., van de Velde, C.J.H., Brande, A., Momburg, F., Kast, W.M., e Melief, C.J.M. In vitro induction of human cytotoxic T lymphocyte responses against peptides of mutant and wild type p53. *Eur. J. Immunol.*, 23:2072-2077, 1993.

38. Ropke, M., Regner, M., e Claesson, M.H. T cell mediated cytotoxicity against p53-protein derived peptides in bulk and limiting dilution cultures of healthy donors. *Scand. J. Immunol.*, 42: 98-103, 1995.

39. Robbins, P.F., El-Gamil, M., Li, Y.F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., e Rosenberg, S. A mutated β -catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183: 1185-1192, 1996.

40. Skipper, J.C.A., Hendrickson, R.C., Guiden, P.H., Brichard, V., van Pel, A., Chen, Y., Shabanowitz, J., Wolfel, T., Slingluff, C.L., Jr., Boon, T., Hunt, D.F., e Engelhard, V.H. An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from post-translational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J. Exp. Med.*, 183: 527-534, 1996.

41. Thompson, J.A., Grunert, F., e Zimmerman, W. Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J. Clin. Lab. Anal.*, 5: 344-366, 1991.

42. Van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., e Boon, T. A gene encoding an antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254: 1643-1647, 1991.

43. Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C.H., Robbins, P.F., Rivoltini, L., Topalian, S.L, Miki, T., e Rosenberg, S.A. Cloning of the gene coding for a shared human melanocyte antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 3515-3519. 1994.

44. Peoples, G.E., Goedegebuure, P.S., Smith, R., Linehan, D.C., Yoshino, I., e Eberlein, T.J. Breast and ovarian cancer-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER2/neu-derived peptide. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92: 432-436, 1995.

45. Matsuoka, T., Kohrogi, H., Ando, M., Nishimura, Y., e Matsushita, S. Altered TCR ligands affect antigen-presenting cell responses: up regulation of IL-12 by analogue peptide. *J. Immunol.*, 157:4837-4843. 1996.

46. Ikagawa, S., Matsushita, S., Chen, Y-Z, Ishikawa, T., e Nishimura, Y. Single amino acid substitutions on a Japanese cedar pollen allergen (Cry j 1)-derived peptide induced alterations in human T cell responses and T cell receptor antagonism. *J. Aller. Clin. Immunol.*, 97: 53-64, 1996.

47. England, R.D., Kullberg, M.C., Cornette, J.L., e Berzofsky, J.A. Molecular analysis of a heteroclitic T cell response to the immunodominant epitope of sperm whale

myoglobin: Implications for peptide partial agonists. *J. Immunol.*, 155: 4295-4306, 1995.

48. Ropke, M., Hald, J., Guldborg, P., Zeuthen, J., Norgaard, L, Fugger, L., Svejgaard, A., Van Der Burg, S., Nijman, H.W., Melief, C.J.M., e Claesson, M.H. Spontaneous human squamous cell carcinomas are killed by a human cytotoxic T lymphocyte clone recognizing a wild-type p53-derived peptide. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 93: 14704-14707, 1996.

49. Correale, P., Walmsley, K., Nieroda, C., Zaremba, S., Zhu, M., Schlom, J., e Tsang, K.Y. In vitro generation of human cytotoxic T lymphocytes specific for peptides derived from prostate-specific antigen. *J. Natl. Cancer Inst.*, 89: 293-300, 1997.

50. Wucherpfennig, K.W. e Strominger, J.L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell*, 80: 695-705, 1995.

51. Chen, W., Ede, NJ., Jackson, D.C., McCluskey, J., e Purcell, A.W. CTL recognition of an altered peptide associated with asparagine bond rearrangement: Implications for immunity and vaccine design. *J. Immunol.*, 157: 1000-1005, 1996.

52. Kersh, G.J. e Alien, P.M. Structural basis for T cell recognition of altered peptide ligands: A single T cell receptor can productively recognize a large continuum of related ligands. *J. Exp. Med* 184: 1259-1268, 1996.

53. Tsang, K.Y. Zhu, M.Z. Nieroda, C.A, Correale, P., Zaremba, S., Hamilton, J.M., Cole, D., Lam, C., e Schlom, J. Phenotypic Stability of a Cytotoxic T Cell Line Directed Against an Immunodominant Epitope of Human Carcinoembryonic Antigen (accepted by *Clinical Cancer Res.*).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA ET

<120> PÉPTIDOS AGONISTAS E ANTAGONISTAS DE CEA

<130> 21-66EPT1

<140> EP 04 011 673.3

<141> 1998-09-22

<150> US60/061,589

<151> 1997-10-10

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Tyr	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Leu	Asn	Leu
1					5			

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Tyr	Leu	Ser	Gly	Ala	Asp	Leu	Asn	Leu
1					5			

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Tyr	Leu	Ser	Gly	Ala	Asp	Ile	Asn	Leu
1					5			

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Tyr	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	Ile	Asn	Leu
1					5			

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Tyr	Leu	Ser	Gly	Ala	Cys	Leu	Asn	Leu
1					5			

<210> 6

<211> 27

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

tacctttcgg gagcgaacct caacctc

27

<210> 7
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7
tacctttcgg gagcggacct caacctc 27

<210> 8
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 8
tacctttcgg gagcggacat caacctc 27

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 9

Tyr	Leu	Asn	Val	Gln	Asp	Leu	Asn	Leu
1				5				

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10

Tyr	Leu	His	Asp	Pro	Glu	Phe	Asn	Leu
1				5				

<210> 11
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11
tacctttcgg gagcgaacat caacctc 27

<210> 12
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12
tacctttcgg gagcgtgtct caacctc 27

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Péptido compreendendo um agonista de uma sequência nativa de ligação a MHC de Classe I:

YLSGANLNL (SEQ ID NO:1),
| |
123456789

em que o agonista varia numa substituição de aminoácidos na posição 6 e/ou na posição 7 de SEQ ID NO:1 e o referido agonista possui maior imunogenicidade em comparação com a sequência nativa.

2. Composição farmacêutica compreendendo pelo menos um péptido de acordo com a reivindicação 1 e um transportador farmacêuticamente aceitável.

3. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 2 compreendendo ainda uma molécula imunoestimulante.

4. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 3 em que a molécula imunoestimulante é seleccionada de entre o grupo que consiste em IL-2, B7.1, B7.2, ICAM-1, LFA-3, CD72 GM-CSF, TNF α , INF γ , IL-12, IL-6 e suas combinações.

5. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 2 compreendendo ainda uma molécula de HLA de classe I ou uma célula expressando uma molécula de HLA de classe I.

6. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 2 compreendendo ainda um fármaco quimioterapêutico, um antibiótico, um fármaco antiviral, um fármaco antifúngico ou ciclofosfamida.

7. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 2 compreendendo ainda um adjuvante.

8. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7 em que o adjuvante é seleccionado de entre o grupo que consiste em alúmen, adjuvante incompleto de Freund, QS21 e Ribi DetoxTM.

9. Conjugado péptido-imunoglobulina compreendendo o péptido de acordo com a reivindicação 1 e uma molécula de imunoglobulina.

10. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 2 em que o péptido é incorporado num lipossoma.

11. Conjugado péptido-molécula transportadora compreendendo o péptido de acordo com a reivindicação 1 conjugado com uma molécula transportadora.

12. Conjugado péptido-molécula transportadora de acordo com a reivindicação 11 em que a molécula transportadora é seleccionada de entre o grupo que consiste num péptido de *influenza*, toxóide do tétano, epítipo CD4 do toxóide do tétano, exotoxina A de *Pseudomonas*, poli-L-lisina, uma cauda lipídica e uma sequência de sinal do retículo endoplasmático.

13. Estojo compreendendo o péptido agonista de acordo com a reivindicação 1 e um vector compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando CEA.

14. Estojo de acordo com a reivindicação 13 compreendendo ainda uma molécula imunoestimulante.

15. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 5, em que a molécula de HLA de Classe I é HLA-A2.

16. Estojo de acordo com a reivindicação 13, em que o CEA codificado compreende um epítipo YLSGANLNL (SEQ ID NO:1).

17. Estojo de acordo com a reivindicação 14, em que a molécula imunoestimulante é GM-CSF.

18. Péptido de acordo com a reivindicação 1 para utilização em medicina.

19. Utilização do péptido de acordo com a reivindicação 1 para a preparação de uma composição farmacêutica para imunoterapia de cancro.

20. Utilização de acordo com a reivindicação 19, em que a imunoterapia de cancro inclui tratamento e/ou vacinação de um paciente com um cancro que expressa CEA.

21. Utilização de acordo com a reivindicação 19 ou 20, em que o cancro é seleccionado de entre o grupo que consiste em cancro colorrectal, cancro do cólon, cancro do pulmão, cancro do pâncreas, cancro do endométrio, cancro da mama, cancro da tiróide, melanoma, cancro oral, cancro laríngeo, seminoma, cancro hepatocelular, cancro do ducto biliar, leucemia mieloblástica aguda, carcinoma das células basais, carcinoma das células escamosas e cancro da próstata.

Lisboa,

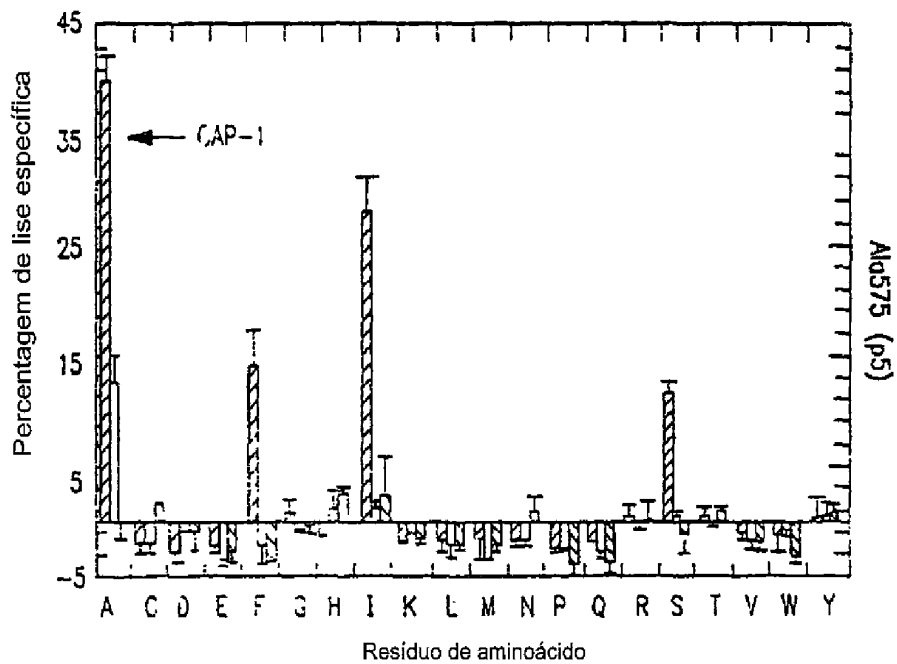


FIG. IA

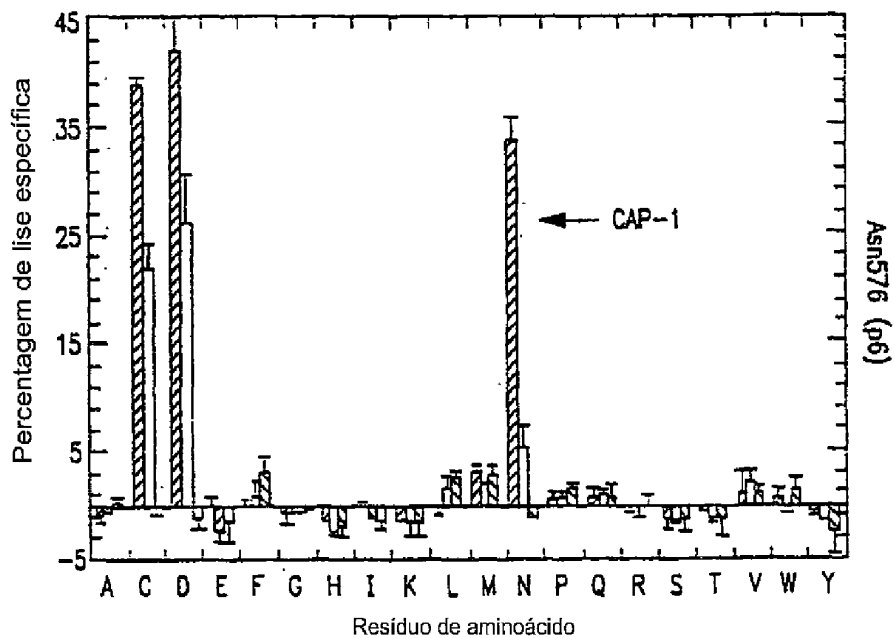


FIG. IB

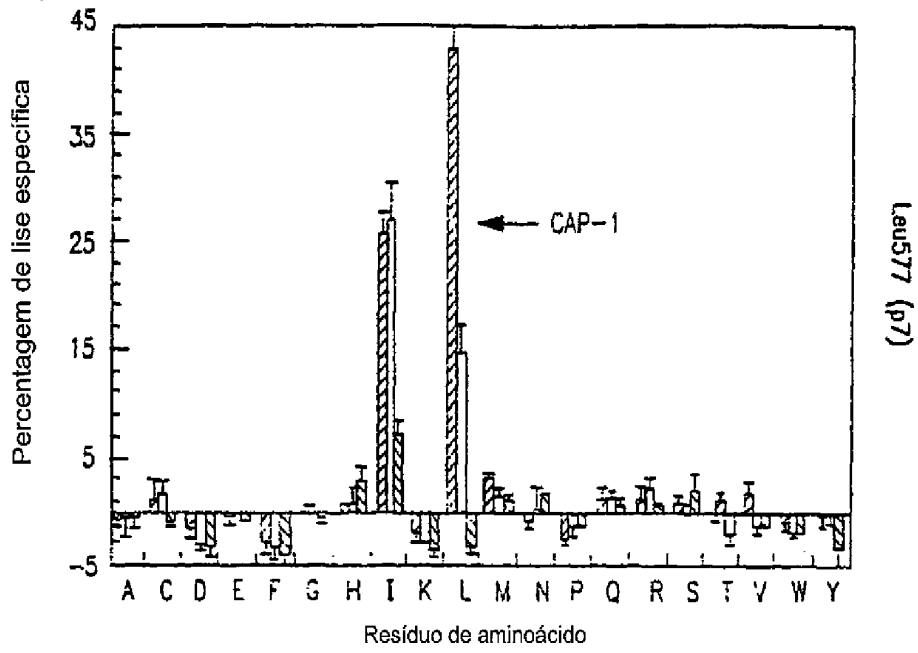


FIG. IC

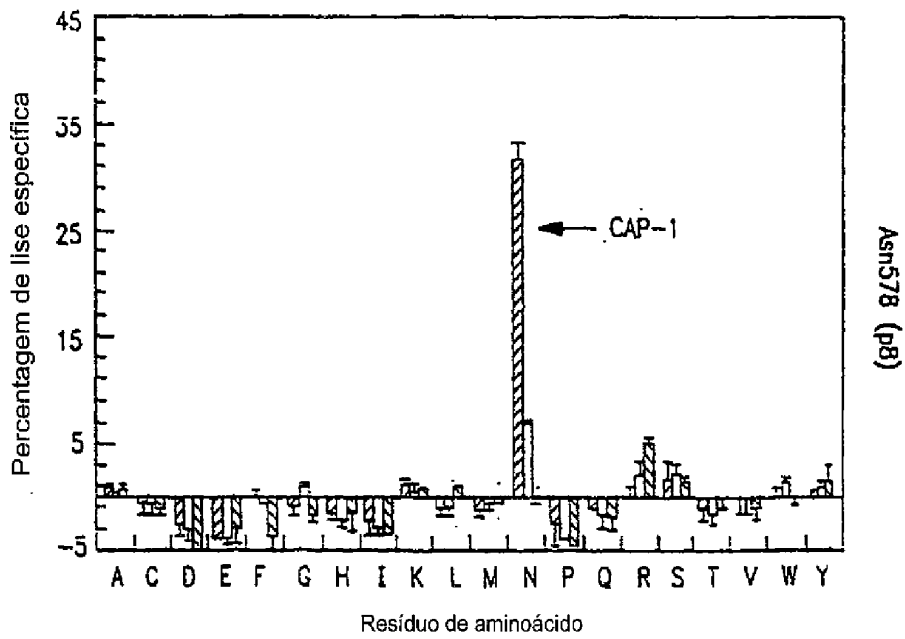


FIG. ID

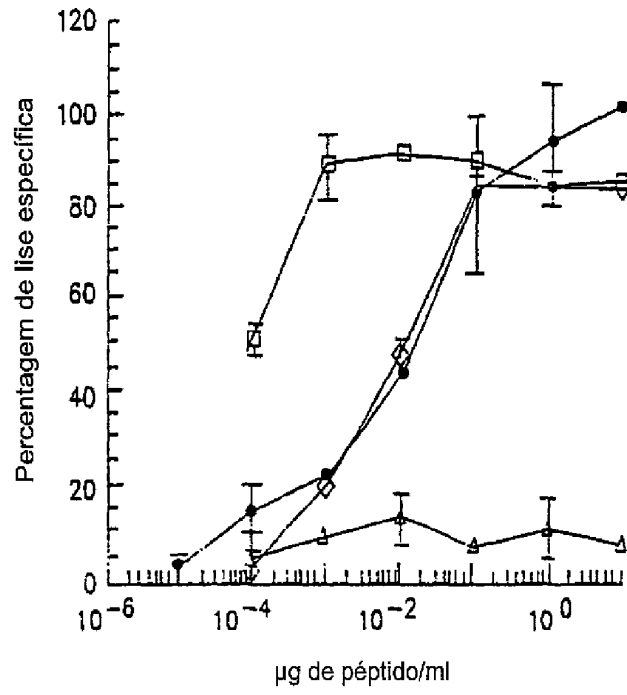


FIG. 2A

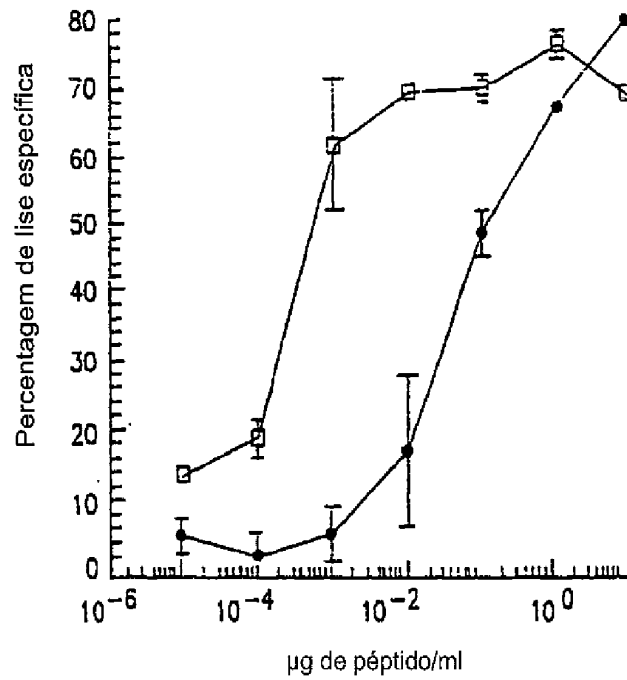


FIG. 2B

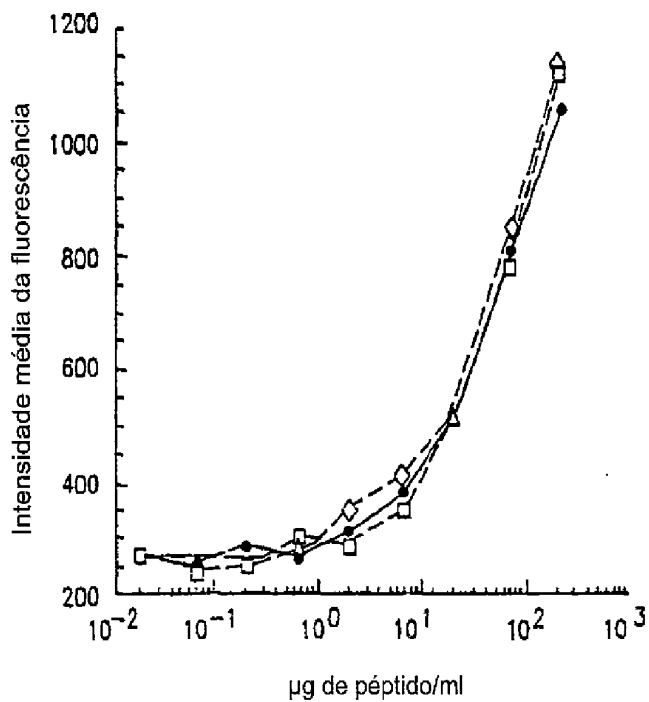


FIG. 3A

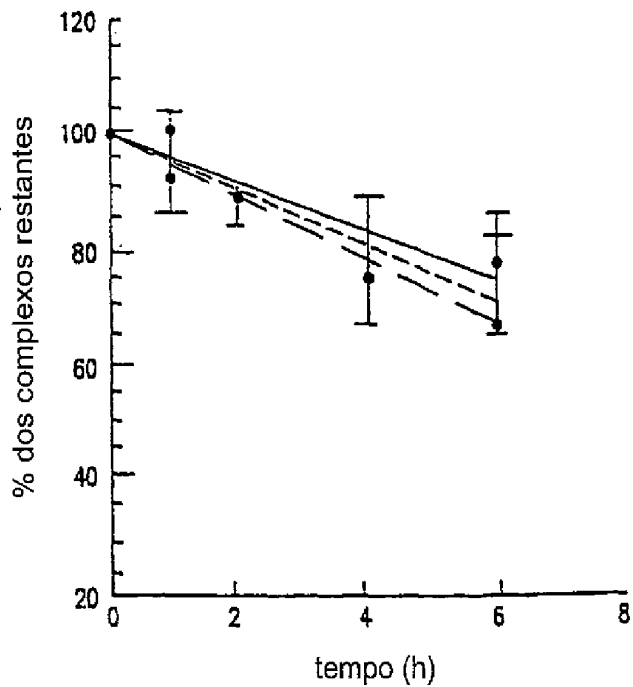


FIG. 3B

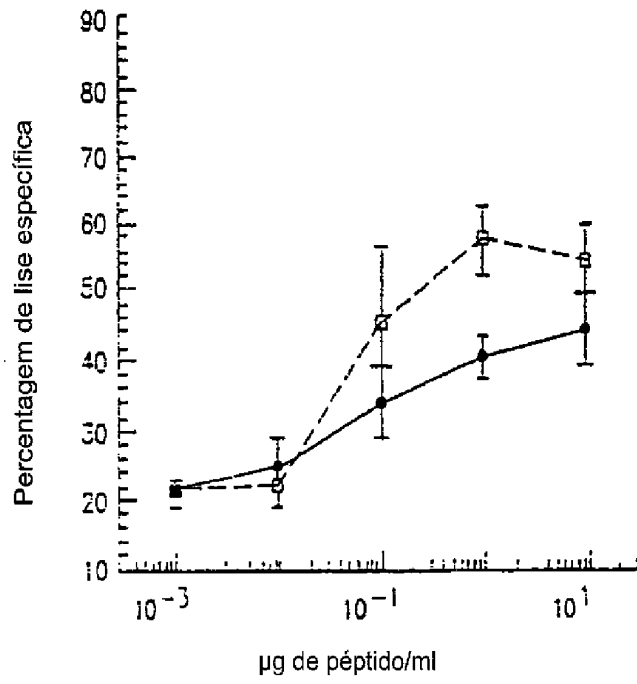


FIG. 4A

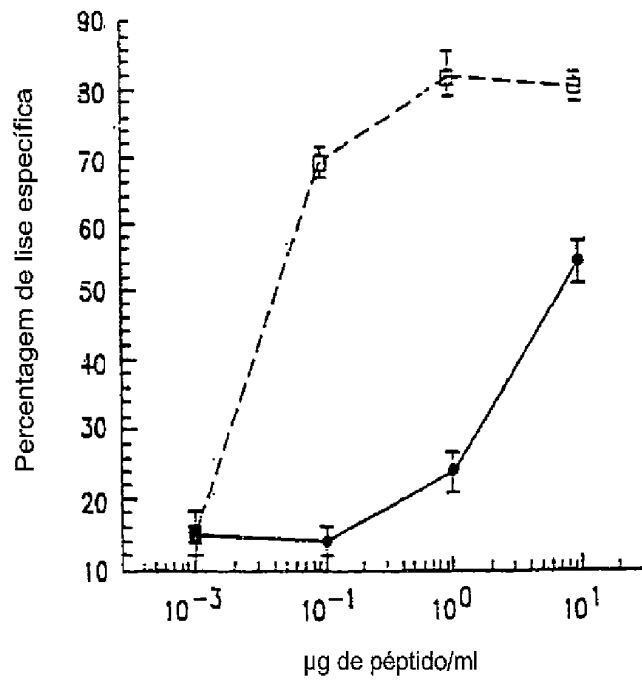


FIG. 4B

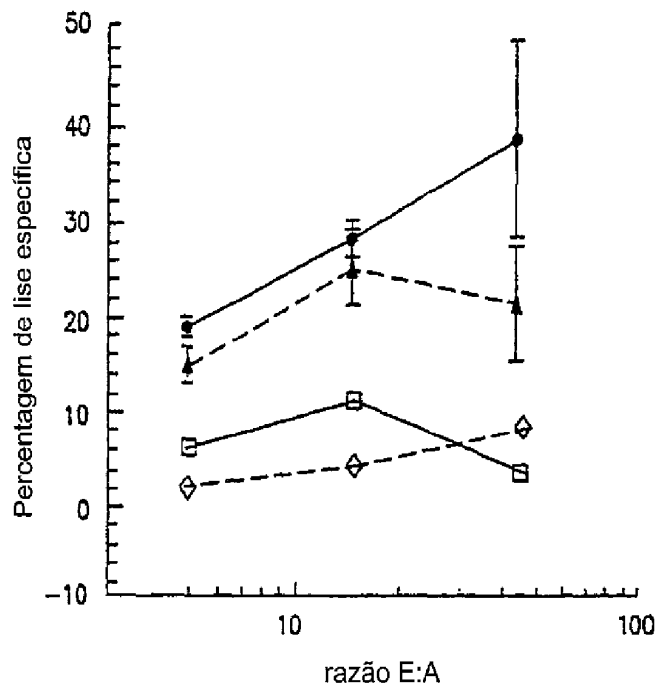


FIG. 5A

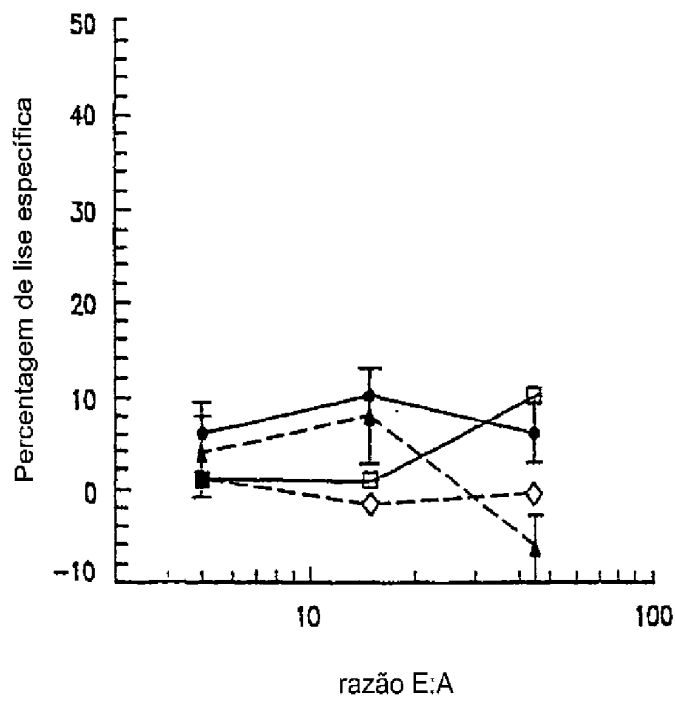


FIG. 5B

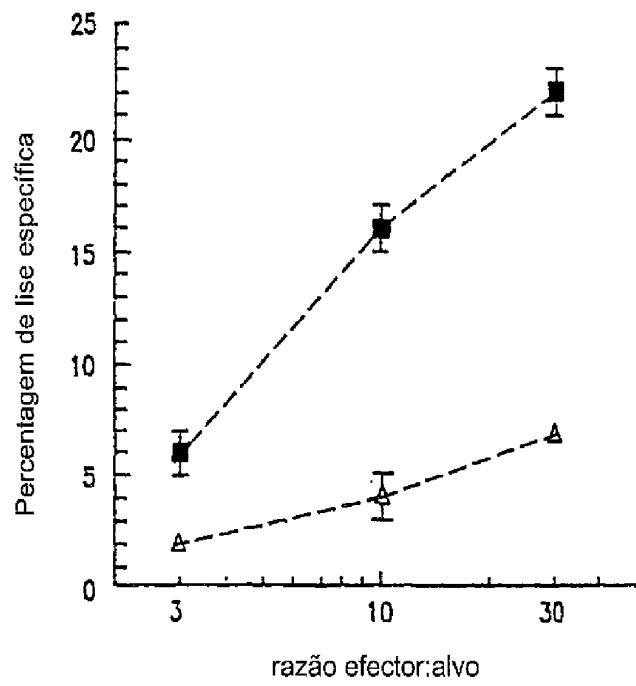


FIG. 6

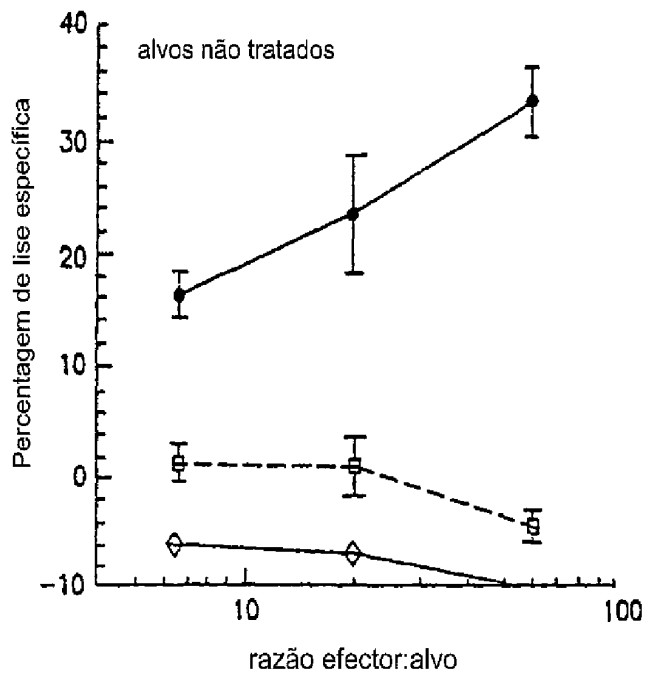


FIG. 7A

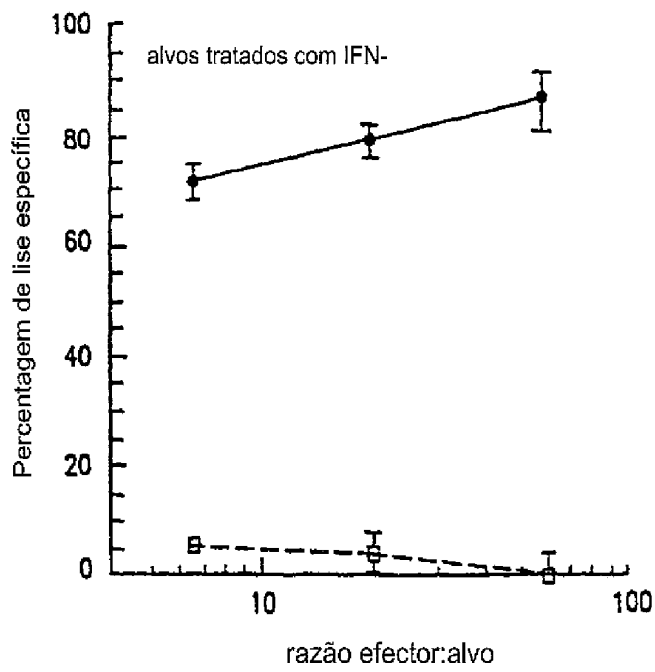


FIG. 7B