

(11) Número de Publicação: **PT 2685995 T**

(51) Classificação Internacional:

A61K 36/06 (2017.01) **A61K 39/00** (2017.01)

A61K 38/17 (2017.01) **A61P 35/00** (2017.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2012.03.19**

(30) Prioridade(s): **2011.03.17 US**
201161453656 P

(43) Data de publicação do pedido: **2014.01.22**

(45) Data e BPI da concessão: **2017.05.03**
154/2017

(73) Titular(es):

GLOBEIMMUNE, INC.

1450 INFINITE DRIVE LOUISVILLE, CO 80027 US

THE UNITED STATES OF AMERICA, AS

**REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES**

US

(72) Inventor(es):

CLAUDIA PALENA

US

ZHIMIN GUO

US

DAVID APELIAN

US

JEFFREY SCHLOM

US

(74) Mandatário:

FERNANDO ANTÓNIO FERREIRA MAGNO

AV. 5 DE OUTUBRO, Nº 146, 7º ANDAR 1050-061 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES IMUNOTERAPÊUTICAS DE LEVEDURA-BRACHYURY**

(57) Resumo:

DESCREVEM-SE COMPOSIÇÕES IMUNOTERAPÊUTICAS À BASE DE LEVEDURA COMPREENDENDO ANTIGÉNIOS DE BRACHYURY E MÉTODOS PARA A PREVENÇÃO E/OU TRATAMENTO DE CANCROS CARACTERIZADOS PELA EXPRESSÃO OU SOBREEXPRESSÃO DE BRACHYURY.

DESCRIÇÃO**"Composições imunoterapêuticas de levedura-Brachyury"**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício de prioridade ao abrigo do título 35 do United States Code (35 U.S.C.), Secção 119(e), do pedido provisório de patente U.S. com o número de série 61/453,656, apresentado em 17 de março de 2011.

DIREITOS DO GOVERNO

Este invento foi criado no exercício de um Acordo de Cooperação de Pesquisa e Desenvolvimento com o National Institutes of Health, uma agência do Department of Health and Human Services. O Governo dos Estados Unidos detém certos direitos neste invento.

DECLARAÇÃO RELATIVA A ACORDO DE PESQUISA CONJUNTA

Este invento foi realizado por, ou em nome de, partes num Acordo de Cooperação de Pesquisa e Desenvolvimento, executado em 8 de maio de 2008. As partes no Acordo de Cooperação de Pesquisa e Desenvolvimento são: GlobeImmune, Inc. e o Department of Health and Human Services dos Estados Unidos, representado pelo National Cancer Institute, um instituto, centro ou divisão do National Institutes of Health.

REFERÊNCIA A UMA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

Este pedido contém uma Listagem de Sequências submetida eletronicamente como um ficheiro de texto através de EFS-Web. O ficheiro de texto, denominado "3923-34-PCT_ST25", tem um tamanho em bytes de 76 KB e foi registado em 13 de março de 2012. A informação contida no ficheiro de texto é aqui incorporada na íntegra através de referência em conformidade com o título 37 do Code of Federal Regulations (37 CFR), Secção 1.52(e)(5).

CAMPO DO INVENTO

O presente invento refere-se de um modo geral a composições imunoterapêuticas à base de levedura e à sua utilização em métodos para a prevenção e/ou tratamento de cancros caracterizados pela expressão ou sobreexpressão de Brachyury.

ANTECEDENTES DO INVENTO

O Brachyury, também conhecido como "T", é um fator de transcrição mesodérmico e membro do complexo de genes T-box. O gene que codifica Brachyury (designado por gene T ou gene Brachyury nos humanos) foi inicialmente identificado, em 1927, por Nadine Dobrovolskaïa-Zavadskaïa através de uma mutação em ratinhos que afetava o comprimento da cauda e as vértebras sacrais nos animais heterozigóticos. O gene Brachyury foi clonado em ratinhos, em 1990, por Hermann e colegas (Herrmann et al., 1990, *Nature* 343:617-622) e em humanos, em 1996, por Edwards e colegas (Edwards et al., 1996, *Genome Res.* 6:226-223), que também descreveram a sequência de aminoácidos deduzida para o Brachyury humano.

Como um membro da família T-box de fatores de transcrição, o Brachyury contém o motivo altamente conservado de domínio de ligação ao ADN, denominado "T-box" ou domínio T, que se liga a uma sequência consenso palindrômica. O Brachyury, como outras proteínas T-box, desempenha um papel no desenvolvimento precoce e é vital para a formação e diferenciação da mesoderme posterior e o desenvolvimento axial nos vertebrados (ver, por exemplo, Wilkinson et al., 1990, *Nature* 343(6259):657-659; Beddington et al., 1992, *Development* (Suppl.):157-165; Schulte-Merker et al., 1994, *Development* 120: 1009-1015; Kispert and Herrmann, 1994, *Dev. Biol.* 161:179-193; Showell et al., 2004, *Dev Dyn* 229:201-218). Mais recentemente, Palena e colegas demonstraram que o Brachyury é expresso numa variedade de tecidos tumorais e linhas celulares de cancros humanos e mostraram que péptidos de Brachyury podem ser utilizados para gerar linhas de células T específicas para Brachyury em doadores normais e em doentes de cancro (Palena et al., 2007, *Clin. Cancer Res.* 13(8):2471-2478). Os estudos efetuados por Fernando et al.

mostraram que o Brachyury promove a transição epitelial-mesenquimal (EMT) em células de tumores humanos, conferindo às células tumorais um fenótipo mesenquimal, bem como capacidades migratórias e invasivas, ao mesmo tempo que atenua a progressão do ciclo celular do tumor (Fernando et al., 2010, *J. Clin. Invest.* 120(2):533-544). Por conseguinte, o Brachyury está envolvido na progressão metastática do cancro.

O cancro é uma causa principal de morte em todo o mundo, e o desenvolvimento de terapias eficazes para o cancro continua a ser uma das áreas de pesquisa e desenvolvimento clínico mais ativas. Embora tenham sido propostas várias abordagens inovadoras para tratar e prevenir os cancros, muitos cancros continuam a ter uma taxa de mortalidade elevada e podem ser difíceis de tratar ou relativamente insensíveis às terapias convencionais. Os cancros associados à expressão de Brachyury podem ser encontrados numa variedade de tecidos, incluindo a mama, intestino delgado, estômago, rim, bexiga, útero, ovário, testículo, pulmão, cólon e próstata, e incluem cancros metastáticos e em fase tardia. Além disso, o Brachyury é expresso em tumores com origem nas células B, como a leucemia linfocítica crónica (LLC), células B transformadas com o vírus de Epstein-Barr e linfomas de Burkitt e Hodgkin. Assim, o Brachyury parece desempenhar um papel num grande número de cancros humanos. Embora o Brachyury tenha sido proposto como um alvo para a imunoterapia do cancro (ver, por exemplo, Palena et al., *supra*; Fernando et al., *supra* e WO 2008/106551), como este é um alvo relativamente novo, continua a existir a necessidade na técnica de novos produtos imunoterapêuticos que tratem e/ou previnam eficazmente os cancros associados à expressão ou sobreexpressão do Brachyury.

SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento é definido pelas reivindicações. Uma concretização do invento refere-se ao composto reivindicado para utilização num método para reduzir, deter, inverter, atrasar ou prevenir a progressão metastática do cancro num indivíduo que tem um cancro. O método inclui o passo de administrar a um indivíduo que tem um cancro que está a

sofrer progressão metastática, está em risco de sofrer progressão metastática ou é previsto que comece a sofrer progressão metastática uma composição imunoterapêutica compreendendo: (a) um veículo de levedura e (b) um antigénio do cancro compreendendo pelo menos um antigénio de Brachyury. Outra concretização do invento refere-se à utilização de uma composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um antigénio do cancro compreendendo pelo menos um antigénio de Brachyury para reduzir, deter, inverter ou prevenir a progressão metastática do cancro num indivíduo que tem um cancro.

Num aspeto, o Brachyury não é detetado no cancro do indivíduo no momento em que a composição é administrada pela primeira vez. Num aspeto, a expressão de Brachyury é detetada no cancro do indivíduo no momento em que a composição é administrada pela primeira vez. O indivíduo poderá ter um cancro em estágio I, um cancro em estágio II, um cancro em estágio III ou um cancro em estágio IV.

Outra concretização da divulgação que compreende o invento refere-se a um método para prevenir ou atrasar o começo de um cancro que expressa Brachyury. O método inclui o passo de administrar a um indivíduo uma composição imunoterapêutica compreendendo: (a) um veículo de levedura e (b) um antigénio do cancro compreendendo pelo menos um antigénio de Brachyury. Outra concretização refere-se à utilização de uma composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um antigénio do cancro compreendendo pelo menos um antigénio de Brachyury, para prevenir ou atrasar o começo de um cancro que expressa Brachyury.

Num aspeto destas concretizações, não foi detetado um cancro no indivíduo. Num aspeto, o indivíduo apresenta um risco elevado de desenvolver um cancro (por exemplo, via uma predisposição genética). Num aspeto, o indivíduo tem uma lesão pré-cancerosa.

Num aspeto destas concretizações, o indivíduo tem um cancro, mas não foram detetadas células cancerosas expressando Brachyury no cancro. Num aspeto, o cancro ainda não é metastático. Num aspeto, o cancro apresenta um risco

elevado de metastizar. Num aspeto, o sujeito tem um cancro em estágio I. Num aspeto, o sujeito tem um cancro em estágio II.

Outra concretização da divulgação refere-se a um método para reduzir ou prevenir a resistência à quimioterapia ou a resistência à radiação das células tumorais num doente com um cancro. O método inclui os passos de administrar a um indivíduo que tem um cancro e está a receber quimioterapia e/ou radioterapia uma composição imunoterapêutica compreendendo: (a) um veículo de levedura e (b) um antigénio do cancro compreendendo pelo menos um antigénio de Brachyury. Outra concretização da divulgação refere-se à utilização de uma composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um antigénio do cancro compreendendo pelo menos um antigénio de Brachyury, para reduzir ou prevenir a resistência à quimioterapia ou a resistência à radiação das células tumorais num doente com um cancro. Num aspeto, o Brachyury não é detetado no cancro do indivíduo no momento em que a composição é administrada pela primeira vez. Num aspeto, a expressão de Brachyury é detetada no cancro do indivíduo no momento em que a composição é administrada pela primeira vez.

Outra concretização da divulgação refere-se a um método para tratar um cancro. O método inclui os passos de: (a) administrar a um indivíduo que tem um cancro no qual não foi detetada a expressão de Brachyury uma primeira composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um primeiro antigénio do cancro que não compreende um antigénio de Brachyury e (b) administrar ao indivíduo, antes, simultaneamente com, sequencialmente com ou após a administração da primeira composição imunoterapêutica, uma segunda composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um segundo antigénio do cancro compreendendo um antigénio de Brachyury. Num aspeto, o método compreende adicionalmente, no passo (a), administrar uma ou mais composições imunoterapêuticas adicionais, em que cada uma das uma ou mais composições imunoterapêuticas adicionais compreende um antigénio do cancro adicional. Num aspeto de qualquer uma das concretizações acima, o antigénio do cancro é selecionado entre Ras mutada, antigénio carcinoembrionário (CEA), MUC-1, EGFR, BCR-Abl, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE,

GP-100, MUC-2, PSMA, tirosinase, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erb/B2, hTERT, p73, B-RAF, APC (adenomatous polyposis coli), Myc, proteína von Hippel-Lindau (VHL), Rb-1, Rb-2, recetor de androgénios (AR), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ews-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, mesotelina e NGEP. Num aspeto, o antigénio do cancro é selecionado entre o grupo que consiste em Ras mutada, antigénio carcinoembrionário (CEA) e MUC-1. Outra concretização da divulgação refere-se à utilização de uma combinação de composições imunoterapêuticas para tratar um cancro, em que as composições imunoterapêuticas compreendem: (a) uma primeira composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um primeiro antigénio do cancro que não compreende um antigénio de Brachyury e (b) uma segunda composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um segundo antigénio do cancro compreendendo um antigénio de Brachyury.

Outra concretização ainda da divulgação refere-se a um método para tratar um cancro. O método inclui os passos de: (a) administrar a um indivíduo que tem um cancro uma primeira composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um antigénio Ras mutado; (b) administrar ao indivíduo de (a) uma segunda composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um antigénio selecionado entre o grupo que consiste em antigénio carcinoembrionário (CEA) e mucina-1 (MUC-1); e (c) administrar ao indivíduo de (a) e (b) uma terceira composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um antigénio de Brachyury. Num aspeto, os passos de administração em (a), (b) e (c) são simultâneos. Outra concretização da divulgação refere-se à utilização de uma combinação de composições imunoterapêuticas para tratar um cancro, em que as composições imunoterapêuticas compreendem: (a) uma primeira composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um antigénio Ras mutado; (b) uma segunda composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um antigénio selecionado entre o grupo que consiste em antigénio carcinoembrionário (CEA) e mucina-1 (MUC-1); e (c) uma terceira composição imunoterapêutica compreendendo um veículo levedura e um antigénio de Brachyury.

Em qualquer uma das concretizações ou aspetos do invento descritos acima ou em outro local desta divulgação, em que o indivíduo tem um cancro ou uma lesão pré-cancerosa, num aspeto do invento, o indivíduo está a ser tratado ou foi tratado com outra terapia para o cancro. Por exemplo, essa terapia pode incluir, mas não está limitada a, uma quimioterapia, uma terapia dirigida, uma radioterapia, uma transferência adotiva de células T e/ou a administração de uma ou mais composições imunoterapêuticas adicionais. Num aspeto, uma composição imunoterapêutica adicional compreende um veículo de levedura e um segundo antigénio do cancro que não inclui um antigénio de Brachyury. O segundo antigénio do cancro pode incluir, mas não está limitado a, Ras mutada, antigénio carcinoembrionário (CEA), MUC-1, EGFR, BCR-Abl, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, PSMA, tirosinase, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erb/B2, hTERT, p73, B-RAF, APC (adenomatous polyposis coli), Myc, proteína von Hippel-Lindau (VHL), Rb-1, Rb-2, recetor de androgénios (AR), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ews-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, mesotelina e NGEP. Num aspeto, o segundo antigénio do cancro é selecionado entre Ras mutada, antigénio carcinoembrionário (CEA) e MUC-1.

Num aspeto de qualquer uma das concretizações ou aspetos do invento descritos acima ou em outro local desta divulgação, o método ou utilização reduz a carga tumoral no indivíduo, aumenta a sobrevivência do indivíduo e/ou inibe o crescimento do tumor no indivíduo.

Num aspeto de qualquer um dos aspetos do invento descritos acima ou em outro local desta divulgação, o método compreende ainda a ressecção cirúrgica de um tumor do indivíduo.

Num aspeto de qualquer um dos aspetos do invento descritos acima ou em outro local desta divulgação, o cancro tem origem em células epiteliais. Num aspeto, o cancro pode incluir, mas não está limitado a, cancro da mama, cancro do intestino delgado, cancro do estômago, cancro do pâncreas, cancro do rim, cancro da bexiga, cancro do útero, cancro do ovário, cancro testicular, cancro do pulmão, cancro do cólon,

cancro da próstata, leucemia linfocítica crónica (LLC), células B transformadas com o vírus de Epstein-Barr, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin ou seus cancros metastáticos.

Num aspeto de qualquer um dos aspetos do invento descritos acima ou em outro local desta divulgação, o antigénio de Brachyury é o Brachyury humano completo. Num aspeto, o antigénio de Brachyury não é o Brachyury completo. Num aspeto, o antigénio de Brachyury possui uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18 ou SEQ ID NO:2, ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 95% com SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18 ou SEQ ID NO:2. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende da pelo menos posição 1 ou 2 a entre a posição 255 e a extremidade C-terminal de SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18 ou SEQ ID NO:2. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende da pelo menos posição 1 ou 2 a entre a posição 430 e a extremidade C-terminal de SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18 ou SEQ ID NO:2. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende as posições 246 a 254 de SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18 ou SEQ ID NO:2. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende SEQ ID NO:6, as posições 2-435 de SEQ ID NO:6 ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 95% com SEQ ID NO:6. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende SEQ ID NO:18, as posições 2-435 de SEQ ID NO:18 ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 95% com SEQ ID NO:18. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende SEQ ID NO:2, as posições 2-435 de SEQ ID NO:2 ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 95% com SEQ ID NO:2. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende SEQ ID NO:6, as posições 2-435 de SEQ ID NO:6 ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 99% com SEQ ID NO:6. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende SEQ ID NO:18, as posições 2-435 de SEQ ID NO:18 ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 99% com SEQ ID NO:18. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende SEQ ID NO:2, as posições 2-435 de SEQ ID NO:2 ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 99% com SEQ ID NO:2. Num aspeto, o antigénio do cancro tem pelo menos 25 aminoácidos de comprimento. Num aspeto, o antigénio de Brachyury tem pelo menos 25 aminoácidos de comprimento. Num aspeto, o antigénio de Brachyury tem mais de 30 aminoácidos

de comprimento. Num aspeto, o antigénio do cancro compreende dois ou mais domínios imunogénicos de Brachyury.

Num aspeto de qualquer um do invento descritos acima ou em outro local desta divulgação, o antigénio do cancro é uma proteína de fusão. Num aspeto, a proteína de fusão possui uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO:8, ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 95% com SEQ ID NO:8. Num aspeto, a proteína de fusão possui uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO:20, ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 95% com SEQ ID NO:20.

Outra concretização da divulgação que compreende o invento refere-se a uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury, em que a composição imunoterapêutica compreende: (a) um veículo de levedura e (b) um antigénio expresso pelo veículo de levedura e compreendendo pelo menos um antigénio de Brachyury, em que o antigénio de Brachyury compreende mais de 30 aminoácidos de uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18 ou SEQ ID NO:2. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 95% com SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18 ou SEQ ID NO:2. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende da pelo menos posição 1 ou 2 a entre a posição 255 e a extremidade C-terminal de SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18 ou SEQ ID NO:2. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende da pelo menos posição 1 ou 2 a entre a posição 430 e a extremidade C-terminal de SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18 ou SEQ ID NO:2. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende as posições 246 a 254 de SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18 ou SEQ ID NO:2. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende SEQ ID NO:6, as posições 2-435 de SEQ ID NO:6 ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 95% com SEQ ID NO:6. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende SEQ ID NO:18, as posições 2-435 de SEQ ID NO:18 ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 95% com SEQ ID NO:18. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende SEQ ID NO:2, as posições 2-435 de SEQ ID NO:2 ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 95% com SEQ ID NO:2. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende SEQ ID NO:6, as posições

2-435 de SEQ ID NO:6 ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 99% com SEQ ID NO:6. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende SEQ ID NO:18, as posições 2-435 de SEQ ID NO:18 ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 99% com SEQ ID NO:18. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende SEQ ID NO:2, as posições 2-435 de SEQ ID NO:2 ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 99% com SEQ ID NO:2. Num aspeto, o antigénio do cancro é uma proteína de fusão. Num aspeto, a proteína de fusão possui uma sequência de aminoácidos que é SEQ ID NO:8, ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 95% com SEQ ID NO:8. Num aspeto, a proteína de fusão possui uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:20, ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 95% com SEQ ID NO:20. Num aspeto, o veículo de levedura é uma levedura inteira. Num aspeto, a levedura inteira é inativada pelo calor.

Outra concretização ainda da divulgação que compreende o invento refere-se a uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury compreendendo: (a) uma levedura completa inativada e (b) uma proteína de fusão de Brachyury compreendendo a sequência de aminoácidos das posições 2-435 de SEQ ID NO:6. A expressão da proteína de fusão de Brachyury encontra-se sob o controlo do promotor *CUP1*, a proteína de fusão de Brachyury é expressa pela levedura e a composição desencadeia uma resposta de células T específica para Brachyury. Num aspeto, a proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:8.

Outra concretização ainda da divulgação que compreende o invento refere-se a uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury compreendendo: (a) uma levedura completa inativada e (b) uma proteína de fusão de Brachyury compreendendo a sequência de aminoácidos das posições 2-435 de SEQ ID NO:18. A expressão da proteína de fusão de Brachyury encontra-se sob o controlo do promotor *CUP1*, a proteína de fusão de Brachyury é expressa pela levedura e a composição desencadeia uma resposta de células T específica para Brachyury. Num aspeto, a proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:20.

Num aspeto de qualquer uma das concretizações ou aspetos do invento descritos acima ou em outro local desta divulgação, o veículo de levedura é uma levedura inteira. Num aspeto, a levedura inteira é morta. Num aspeto, a levedura inteira é inativada pelo calor. Num aspeto, a levedura expressa o antigénio. Num aspeto, a levedura é de um género selecionado entre o grupo que consiste em *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* e *Yarrowia*. Num aspeto, a levedura é proveniente de *Saccharomyces*. Num aspeto, a levedura é proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*.

Num aspeto de qualquer uma das concretizações da divulgação que compreende o invento descritas acima ou em outro local desta divulgação, a composição é formulada num excipiente farmacêuticamente aceitável adequado para administração a um sujeito.

Outra concretização ainda da divulgação que compreende o invento refere-se à utilização de qualquer uma das composições imunoterapêuticas de levedura-Brachyury aqui descritas para tratar uma doença. Num aspeto, a doença é um cancro. Num aspeto, a doença está associada a um agente infeccioso. Num aspeto, a doença está associada a um vírus ou uma infeção viral. Esse vírus pode incluir, mas não está limitado, o vírus de Epstein-Barr (EBV).

Outra concretização da divulgação que compreende o invento refere-se a um método para tratar ou prevenir uma doença ou perturbação associada a uma infeção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV). O método inclui o passo de administrar a um indivíduo qualquer uma das composições imunoterapêuticas de levedura-Brachyury aqui descritas.

Outra concretização ainda da divulgação que compreende o invento refere-se a um método para produzir uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury. O método inclui os passos de: (a) crescer leveduras que foram transformadas com uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica um antigénio de Brachyury sob o controlo de um promotor *CUP1*, num meio adequado na ausência de CuSO_4 , até as leveduras chegarem a meio da fase exponencial de crescimento; (b)

induzir a expressão do antigénio de Brachyury nas leveduras através da adição de CuSO_4 ao meio; (c) crescer as leveduras após o passo (b) durante entre 6 e 8 horas; e (d) colher as leveduras. Num aspeto, as leveduras no passo (a) são crescidas até uma densidade celular de entre 1,0 e 2,0 Y.U. por mililitro de volume total de cultura. Num aspeto, as leveduras no passo (a) são crescidas até uma densidade celular de entre 1,0 e 1,5 Y.U. por mililitro de volume total de cultura. Num aspeto, as leveduras são crescidas nos passos (a)-(c) num meio em que o pH é mantido a pH 5,5 ou um valor superior. Num aspeto, o método inclui adicionalmente um passo de inativação da levedura pelo calor após o passo (d). Por exemplo, num aspeto, as leveduras são inativadas pelo calor a cerca de 56 °C durante aproximadamente 1 hora. Num aspeto adicional desta concretização, as leveduras podem ser formuladas para injeção com um excipiente farmacologicamente aceitável. Num aspeto, as leveduras são provenientes de *Saccharomyces*. Num aspeto, as leveduras são provenientes de *Saccharomyces cerevisiae*.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Fig. 1A é uma imagem digitalizada de uma transferência de Western mostrando a deteção por anticorpo anti-Brachyury da expressão de Brachyury numa composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury, com ambos os meios U2 e UL2.

A Fig. 1B é uma imagem digitalizada de uma transferência de Western mostrando a deteção por anticorpo anti-His da expressão de Brachyury numa composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury, com ambos os meios U2 e UL2.

A Fig. 2 é uma imagem digitalizada de uma transferência de Western mostrando a expressão de Brachyury numa composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury, em que a densidade celular no momento da indução do antigénio e o tempo de colheita após a indução do antigénio foram variados.

As Figs. 3A-3C são gráficos ilustrando que as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de dois de entre três doadores saudáveis, pulsadas com levedura-Brachyury durante dois ciclos de estimulação, seguidos de pulso com

péptido de Brachyury, foram capazes de gerar células Tc CD8⁺ que conseguiram matar células de carcinoma SW480 (HLA-A2⁺/nível elevado de Brachyury), com lise mínima das células de carcinoma MCF7 (HLA-A2⁺/nível reduzido de Brachyury) (Fig. 3A, dador 07706; Fig. 3B, dador 17663; Fig. 3C, dador 26532).

A Fig. 4A é um gráfico mostrando que as células T específicas para Brachyury, obtidas das PBMC de um dador saudável estimuladas com uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury, lisam especificamente as células tumorais que possuem o MHC apropriado (SW480, HLA-A2⁺/nível elevado de Brachyury) versus as células de carcinoma H226 (HLA-A2⁻/nível elevado de Brachyury).

A Fig. 4B é um gráfico ilustrando a expressão do ARNm de Brachyury em relação ao ARNm de um gene de controlo (GAPDH), nas células tumorais SW480 e H226 utilizadas na experiência apresentada na Fig. 4A.

A Fig. 5 é um gráfico ilustrando a proliferação de células T CD4⁺ isoladas dos baços de ratinhos que foram vacinados com levedura-Brachyury (GI-6301, círculos) ou levedura de controlo (YVEC, triângulos), em resposta às doses indicadas de proteína Brachyury purificada ou proteína β -gal de controlo.

A Fig. 6 é um gráfico mostrando que a administração de uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury (GI-6301, círculos) do invento revela uma tendência no sentido de reduzir os tumores que expressam Brachyury em ratinhos, comparativamente com ratinhos que recebem a levedura sozinha (sem antigénio de Brachyury).

As Figs. 7A e 7B são análises de citometria de fluxo ilustrando que a linha de células T específicas para Brachyury, T-2-BR-A, liga-se a um tetrâmero HLA-A2 específico para Brachyury (Fig. 7B) e não se liga a um tetrâmero de controlo (Fig. 7A).

A Fig. 8 é uma análise de citometria de fluxo ilustrando a expressão de perforina na linha de células T específicas

para Brachyury, T-2-BR-A, após estimulação com células B autólogas pulsadas com péptido agonista de Brachyury.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Este invento refere-se, de um modo geral, a composições imunoterapêuticas à base de levedura e a métodos para a prevenção e/ou tratamento de cancros que expressam ou sobreexpressam Brachyury. O invento inclui a utilização de uma composição imunoterapêutica à base de levedura (também designada por imunoterapia à base de levedura) compreendendo um veículo de levedura e antigénios de Brachyury ou seus domínios imunogénicos (também aqui designada por "imunoterapia à base de levedura-Brachyury" ou "composições imunoterapêuticas de levedura-Brachyury"). Os inventores descrevem nesta divulgação a construção e produção de novos produtos de imunoterapia à base de levedura-Brachyury e demonstram que a imunoterapia à base de levedura-Brachyury expande as células T específicas para Brachyury, incluindo as células T citotóxicas (Tc) CD8⁺, de indivíduos normais e de doentes com cancro. Além disso, ratinhos imunizados com composições imunoterapêuticas de levedura-Brachyury geraram *in vivo* respostas de células T específicas para Brachyury e o crescimento de tumores expressando Brachyury foi inibido nestes ratinhos. No seu conjunto, os resultados aqui apresentados mostram que a imunoterapia à base de levedura-Brachyury é útil para a produção de respostas imunes celulares específicas para Brachyury (CD4⁺ e CD8⁺) e para a prevenção e tratamento de tumores que expressam Brachyury, oferecendo uma terapia nova para a prevenção e/ou tratamento de cancros metastáticos e perturbações associadas.

As composições imunoterapêuticas de levedura-Brachyury úteis no presente invento estão unicamente adaptadas para visar de forma eficaz os cancros que expressam Brachyury por várias razões. Primeiro, o Brachyury está envolvido nos processos EMT e, assim, sem estarem vinculados pela teoria, os inventores acreditam que este desempenha um papel nos tumores em fase tardia e nos processos metastáticos. Por conseguinte, num aspeto do invento, a imunoterapia à base de levedura-Brachyury é eficaz para visar as células tumorais antes ou no momento em que começam a adquirir motilidade e a

invadir outros tecidos, dessa forma prevenindo, inibindo, detendo, invertendo ou atrasando o começo do cancro metastático e/ou a progressão do cancro, e especialmente do cancro metastático. Existe uma grande necessidade de dispor de terapias eficazes para os cancros em fase tardia, especialmente os cancros metastáticos, que poderão apresentar poucas opções de tratamento após o fracasso da terapia convencional do cancro. A levedura-Brachyury representa uma nova abordagem para tratar esses cancros, ou para atrasar, inibir, inverter ou preveni-los totalmente. Adicionalmente, a imunoterapia à base de levedura-Brachyury pode ser usada para prevenir ou atrasar um cancro metastático ou a progressão de um cancro em indivíduos que têm cancro em fase inicial. A terapia é útil, numa concretização, em cancros que apresentam uma velocidade de progressão metastática elevada e poderá ser útil para deter a progressão do cancro. Além disso, a imunoterapia à base de levedura-Brachyury é útil em indivíduos que têm uma lesão ou um tumor pré-canceroso (pré-maligno), em indivíduos que apresentam um risco elevado de desenvolver um cancro, particularmente um cancro com uma velocidade de metastização elevada, e mesmo em indivíduos normais como um agente profilático para a prevenção do cancro, podendo ser utilizada em conjunção com outra imunoterapia profilática para o cancro, como aqui descrito.

A imunoterapia à base de levedura-Brachyury também confere um benefício aos indivíduos que estão a ser submetidos a outra terapia para o cancro, incluindo a quimioterapia e a radioterapia. Mais particularmente, sabe-se que os cancros metastáticos, em alguns casos, são mais resistentes à quimioterapia e/ou à radioterapia do que os cancros primários. Deste modo, as composições de imunoterapia à base de levedura-Brachyury do invento podem ser utilizadas para inibir ou reduzir ou eliminar a resistência à quimioterapia ou a resistência à radiação que pode ocorrer no cancro metastático através da inibição da expressão de Brachyury no cancro (e inibindo assim as influências antiproliferativas), e as composições do invento poderão melhorar o desempenho da quimioterapia ou da radioterapia num indivíduo.

A imunoterapia à base de levedura-Brachyury também pode ser usada para tratar perturbações ou doenças associadas à expressão de Brachyury que poderão ser de natureza não oncológica, ou que poderão preceder uma transformação maligna. Por exemplo, o Brachyury pode ser regulado positivamente em células que estão infetadas com um agente infeccioso, por exemplo, um vírus como o vírus de Epstein-Barr (EBV). Por conseguinte, a imunoterapia à base de levedura-Brachyury pode ser usada para tratar ou prevenir qualquer doença ou perturbação associada à expressão de Brachyury, incluindo, mas não limitada a, doenças infecciosas, como seja uma infeção viral, incluindo, mas não limitadas a, perturbações associadas ao EBV (por exemplo, a mononucleose).

A imunoterapia à base de levedura-Brachyury também é facilmente adaptável à utilização de antigénios tumorais adicionais na mesma composição de levedura, ou à utilização em combinação com outros compostos imunoterapêuticos à base de levedura que visam outros antigénios tumorais (sequencial ou simultaneamente) ou com outros compostos imunoterapêuticos e tratamentos/terapias para o cancro. Por conseguinte, a imunoterapia à base de levedura-Brachyury pode ser adaptada ao tipo de cancro, ao estágio do cancro, ao grau do cancro, aos antigénios expressos pelo tumor e ao estado clínico global do indivíduo (isto é, a terapia é facilmente personalizada), e para o indivíduo que já tem um cancro, a sua utilização pode ser modificada à medida que o cancro progride num indivíduo, de modo a proporcionar uma eficácia máxima em vários estádios do tumor. A imunoterapia à base de levedura-Brachyury oferece a oportunidade de conceber abordagens individualizadas, sofisticadas e eficazes, para o tratamento profilático e/ou terapêutico alargado de uma ampla variedade de cancros.

As composições de levedura-Brachyury aqui descritas induzem respostas imunes inatas, assim como respostas imunes adaptativas contra o antigénio-alvo (Brachyury), incluindo respostas de células T Th1 e Th17 dependentes de CD4 e respostas de células T CD8⁺ específicas para antigénio, que incluem respostas de células T citotóxicas (Tc), todas elas sem a utilização de adjuvantes exógenos, citocinas ou outras moléculas imunoestimuladoras, muitos dos quais apresentam

problemas de toxicidade. Além disso, as composições imunoterapêuticas de levedura-Brachyury inibem os números e/ou a funcionalidade das células T reguladoras (Treg), reforçando deste modo as respostas de células T efetoras que normalmente podem ser suprimidas pela presença do tumor, por exemplo. Adicionalmente, em comparação com as composições imunoterapêuticas que imunizam através da geração de respostas de anticorpos, crê-se que as potentes e amplas respostas imunes celulares específicas para antígeno desencadeadas pela imunoterapia à base de levedura-Brachyury são particularmente eficazes no que diz respeito a visarem as células tumorais. Na verdade, numerosos estudos mostraram que as abordagens imunoterapêuticas são melhoradas quando as células tumorais são visadas por meio de células Tc CD8⁺ que reconhecem os péptidos tumorais no contexto de moléculas do MHC de classe I.

A imunoterapia à base de levedura-Brachyury é especialista na ativação de células apresentadoras de antígeno e possui uma capacidade única para sensibilização cruzada da resposta imune, gerando respostas de células Tc CD8⁺ que são tipicamente eficazes contra os tumores, mesmo perante aquilo que pode, de outro modo, ser um ambiente supressor. Como este tipo de imunoterapia utiliza a capacidade natural da célula apresentadora de antígeno para apresentar os imunógenos relevantes, não é necessário conhecer a identidade precisa dos epitopos das células Tc ou dos epitopos do MHC de classe II de Brachyury para produzir uma imunoterapêutica eficaz de acordo com o presente invento. Na realidade, múltiplos epitopos das células T CD4⁺ e CD8⁺ podem ser visados numa única composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury, pelo que os compostos imunoterapêuticos de levedura-Brachyury do invento não estão limitados à utilização de péptidos curtos e, de facto, a utilização nestas composições de polipéptidos mais compridos e de proteínas de fusão é eficaz. Por conseguinte, através do recurso à imunoterapia à base de levedura-Brachyury, elimina-se o uso de algoritmos e fórmulas complexas para identificar epitopos putativos de células T.

Além disso, como o Brachyury não é expresso pela maioria dos tecidos normais (não tumorais) e é tipicamente

sobreexpresso nas células tumorais, quaisquer efeitos "off target" (longe do alvo) relacionados com os tecidos normais não são problemáticos. Como referido acima, a levedura-Brachyury pode ser utilizada eficazmente num protocolo de imunização (profilático ou terapêutico) sem o uso de adjuvantes exógenos, agentes ou moléculas imunoestimuladores, moléculas coestimuladoras ou citocinas, embora tais agentes possam, se desejado, ser incluídos. Adicionalmente, a imunoterapia à base de levedura-Brachyury pode ser administrada repetidamente sem perda da eficácia, algo que poderá ser problemático com outros tipos de imunoterapia.

Composições do invento

Uma concretização do presente invento refere-se a uma composição de imunoterapia à base de levedura que pode ser usada para prevenir e/ou tratar cancros caracterizados por uma expressão ou sobreexpressão de Brachyury (incluindo os cancros que inicialmente podem não conter células expressando Brachyury detetável, mas que poderão ou irão conter células que expressam Brachyury em estádios posteriores do desenvolvimento do cancro). A composição é uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury compreendendo: (a) um veículo de levedura e (b) um antigénio do cancro compreendendo um ou mais antigénio(s) de Brachyury e/ou seu(s) domínio(s) imunogénico(s). O antigénio de Brachyury ou seu domínio imunogénico é mais tipicamente expresso como uma proteína recombinante pelo veículo de levedura (por exemplo, por uma levedura intacta ou um esferoplasto de levedura, que podem ser opcional e adicionalmente processados para um citoplasto de levedura, uma célula fantasma de levedura, um extrato de membrana de levedura ou uma sua fração), embora seja uma concretização do invento o facto de um ou mais antigénios de Brachyury serem carregados num veículo de levedura, ou de outro modo complexados com, ligados a, misturados com ou administrados com um veículo de levedura conforme aqui descrito, para formar uma composição do presente invento.

Uma "composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury" é um tipo específico de "composição imunoterapêutica à base de levedura" que contém pelo menos um antigénio de Brachyury

ou um seu domínio imunogénico. A frase "composição imunoterapêutica à base de levedura" poderá ser usada indistintamente com "produto de imunoterapia à base de levedura", "composição de imunoterapia à base de levedura", "composição à base de levedura", "composto imunoterapêutico à base de levedura", "vacina à base de levedura" ou derivados destas frases. Uma "composição imunoterapêutica" é uma composição que provoca uma resposta imune suficiente para obter pelo menos um benefício terapêutico num sujeito. Tal como aqui utilizado, o termo composição imunoterapêutica à base de levedura refere-se a uma composição que inclui um componente veículo de levedura e que provoca uma resposta imune suficiente para obter pelo menos um benefício terapêutico num sujeito. Mais particularmente, uma composição imunoterapêutica à base de levedura é uma composição que inclui um componente veículo de levedura e, tipicamente, um componente antigénio e que pode provocar ou induzir uma resposta imune, por exemplo uma resposta imune celular, incluindo, sem limitação, uma resposta imune celular mediada por células T. Num aspeto, uma composição imunoterapêutica à base de levedura útil no invento é capaz de induzir uma resposta imune mediada por células T CD8⁺ e/ou uma resposta imune mediada por células T CD4⁺ e, num aspeto, uma resposta imune mediada por células T CD8⁺ e uma resposta imune mediada por células T CD4⁺, particularmente contra um antigénio-alvo (por exemplo, um antigénio do cancro). Uma resposta imune CD4⁺ pode incluir respostas imunes Th1, respostas imunes Th2, respostas imunes Th17 ou qualquer combinação das respostas acima. Os compostos imunoterapêuticos à base de levedura são particularmente capazes de gerar respostas Th1 e Th17. Uma resposta imune CD8⁺ pode incluir uma resposta de células T citotóxicas (Tc), e os compostos imunoterapêuticos à base de levedura são capazes de gerar tais respostas. Num aspeto, uma composição imunoterapêutica à base de levedura modula o número e/ou a funcionalidade das células T reguladoras (Treg) num sujeito. A imunoterapia à base de levedura também pode ser modificada para promover um tipo de resposta face a outra, por exemplo, através da adição de citocinas, anticorpos e/ou modulando o processo de produção da levedura. Opcionalmente, uma composição imunoterapêutica à base de levedura é capaz de provocar uma resposta imune humoral.

As composições imunoterapêuticas de levedura-Brachyury do invento poderão ser "profiláticas" ou "terapêuticas". Quando administradas profilaticamente, as composições do presente invento são administradas antes do desenvolvimento, ou da detecção do desenvolvimento, de um cancro que expressa Brachyury, com o objetivo de prevenir, inibir ou atrasar o desenvolvimento de tumores que expressam Brachyury; e/ou prevenir, inibir ou atrasar a migração do tumor e/ou a invasão por parte do tumor de outros tecidos (metástases) e/ou, em geral, prevenir ou inibir a progressão do cancro num indivíduo. Como aqui discutido, o Brachyury é expresso em vários cancros, incluindo em cancros em fase tardia, e está envolvido no processo EMT, que é um processo associado à invasividade e migração dos tumores, como acontece no cancro metastático. Por conseguinte, as composições profiláticas podem ser administradas a indivíduos que aparentam não ter um cancro (indivíduos saudáveis ou normais), a indivíduos com lesões pré-cancerosas (pré-malignas) e também a indivíduos que têm um cancro, mas no qual o Brachyury ainda não foi detetado (isto é, antes da expressão de Brachyury pelas células tumorais no cancro). Os indivíduos que apresentam um risco elevado de desenvolver um cancro, em particular um cancro ao qual a expressão de Brachyury e/ou as metástases estão normalmente associadas, poderá ser tratado profilaticamente com uma composição do invento. Quando administradas terapêuticamente, as composições de imunoterapia são administradas a um indivíduo com um cancro que expressa Brachyury, com o objetivo de melhorar o cancro, por exemplo reduzindo a carga tumoral no indivíduo; inibir o crescimento tumoral no indivíduo; aumentar a sobrevivência do indivíduo; prevenir, inibir, inverter ou atrasar o desenvolvimento da migração do tumor e/ou da invasão por parte do tumor de outros tecidos (cancro metastático) e/ou prevenir, inibir, inverter ou atrasar a progressão do cancro no indivíduo. Num aspeto, a imunoterapia à base de levedura-Brachyury é usada terapêuticamente para inibir, reduzir ou eliminar a resistência à quimioterapia ou a resistência à radiação que pode surgir no cancro metastático através da inibição da expressão de Brachyury no cancro, e as composições do invento poderão melhorar o desempenho da quimioterapia ou da radioterapia num indivíduo.

Tipicamente, uma composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury inclui um veículo de levedura e pelo menos um antígeno do cancro compreendendo um antígeno de Brachyury ou um seu domínio imunogénico, em que o antígeno do cancro é expresso por, ligado a, introduzido em, ou misturado com o veículo de levedura. Em algumas concretizações, o antígeno do cancro, o antígeno de Brachyury ou seu domínio imunogénico, é disponibilizado como uma proteína de fusão. Abaixo estão descritas várias proteínas e proteínas de fusão de Brachyury adequadas para utilização nas composições e métodos do invento. Em algumas concretizações, o antígeno do cancro e o antígeno de Brachyury são o mesmo elemento. Em algumas concretizações, o antígeno do cancro inclui outros antígenos, incluindo outros antígenos do cancro, além do antígeno de Brachyury. Num aspeto do invento, uma proteína de fusão útil como um antígeno do cancro pode incluir dois ou mais antígenos, por exemplo, um antígeno de Brachyury e outro antígeno do cancro que não é um antígeno de Brachyury, ou dois antígenos de Brachyury diferentes. Num aspeto, a proteína de fusão pode incluir dois ou mais domínios imunogénicos de um ou mais antígenos, por exemplo dois ou mais domínios imunogénicos de um antígeno de Brachyury, ou dois ou mais epitopos de um ou mais antígenos, por exemplo dois ou mais epitopos de um antígeno de Brachyury.

De acordo com o presente invento, um veículo de levedura utilizado numa composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury é qualquer célula de levedura (por exemplo, uma célula completa ou intacta) ou um seu derivado (ver abaixo) que pode ser usado em conjunção com um ou mais antígenos, seus domínios imunogénicos ou seus epitopos, numa composição do invento (por exemplo, uma composição terapêutica ou profilática). O veículo de levedura pode, assim, incluir, mas não está limitado a, um microrganismo levedura intacto (inteiro) vivo (isto é, uma célula de levedura que possui todos os seus componentes, incluindo uma parede celular), um microrganismo levedura intacto morto ou inativado, ou derivados da levedura intacta incluindo: um esferoplasto de levedura (isto é, uma célula de levedura desprovida de uma parede celular), um citoplasto de levedura (isto é, uma célula de levedura desprovida de parede celular e de núcleo),

uma célula fantasma de levedura (isto é, uma célula de levedura desprovida de parede celular, núcleo e citoplasma), um extrato de membrana subcelular de levedura ou fração deste (também designado por uma partícula de membrana de levedura e, previamente, por uma partícula subcelular de levedura), qualquer outra partícula de levedura ou uma preparação da parede celular de levedura.

Os esferoplastos de levedura são tipicamente produzidos por digestão enzimática da parede celular da levedura. Tal método está descrito, por exemplo, em Franzusoff et al., 1991, *Meth. Enzymol.* 194, 662-674, aqui incorporado na íntegra através de referência.

Os citoplastos de levedura são tipicamente produzidos por enucleação das células de levedura. Tal método está descrito, por exemplo, em Coon, 1978, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 48, 45-55, aqui incorporado na íntegra através de referência.

As células fantasmas de levedura são tipicamente produzidas por meio da resselagem de uma célula permeabilizada ou lisada e podem, mas não necessitam de, conter pelo menos alguns dos organelos dessa célula. Tal método encontra-se descrito, por exemplo, em Franzusoff et al., 1983, *J. Biol. Chem.* 258, 3608-3614 e Bussey et al., 1979, *Biochim. Biophys. Acta* 553, 185-196, ambos aqui incorporados na íntegra através de referência.

Uma partícula de membrana de levedura (extrato de membrana subcelular de levedura ou fração deste) refere-se a uma membrana de levedura desprovida de núcleo ou citoplasma natural. A partícula pode ter qualquer tamanho, incluindo tamanhos que vão desde o tamanho de uma membrana natural de levedura até às micropartículas produzidas por sonicação ou outros métodos de rutura da membrana conhecidos pelos peritos na especialidade, seguidos de resselagem. Um método para produzir extratos de membrana subcelular de levedura está descrito, por exemplo, em Franzusoff et al., 1991, *Meth. Enzymol.* 194, 662-674. Também é possível utilizar frações de partículas de membrana de levedura que contêm partes de membrana de levedura e, quando o antigénio ou outra proteína

foi expresso de forma recombinante pela levedura antes da preparação das partículas de membrana de levedura, o antigénio ou outra proteína de interesse. Os antigénios ou outras proteínas de interesse podem ser transportados no interior da membrana, em qualquer uma das superfícies da membrana ou combinações deles (isto é, a proteína pode estar tanto dentro como fora da membrana e/ou atravessar a membrana da partícula de membrana de levedura). Numa concretização, uma partícula de membrana de levedura é uma partícula de membrana de levedura recombinante, que pode ser uma membrana de levedura intacta, rompida ou rompida e novamente selada, que inclui pelo menos um antigénio pretendido ou outra proteína de interesse na superfície da membrana ou, pelo menos parcialmente, embutido na membrana.

Um exemplo de uma preparação da parede celular de levedura é uma preparação de paredes celulares isoladas de levedura que transportam um antigénio na sua superfície ou, pelo menos parcialmente, embutido na parede celular, de modo que quando a preparação da parede celular de levedura é administrada a um animal, ela estimula uma resposta imune desejada contra um alvo de doença.

É possível utilizar qualquer estirpe de levedura para produzir um veículo de levedura do presente invento. As leveduras são microrganismos unicelulares que pertencem a uma de três classes: Ascomicetes, Basidiomicetes e Fungos Imperfeitos. Uma consideração para a seleção de um tipo de levedura para utilização como um modulador imune é a patogenicidade da levedura. Numa concretização, a levedura é uma estirpe não patogénica como *Saccharomyces cerevisiae*. A seleção de uma estirpe de levedura não patogénica minimiza quaisquer efeitos adversos para o indivíduo a quem o veículo de levedura é administrado. Contudo, é possível utilizar leveduras patogénicas se a patogenicidade da levedura puder ser anulada por qualquer meio conhecido por um perito na especialidade (por exemplo, estirpes mutantes). De acordo com um aspeto do presente invento, utilizam-se estirpes de levedura não patogénicas.

Os géneros das estirpes de levedura que poderão ser utilizados no invento incluem, mas não estão limitados a,

Saccharomyces, *Candida* (que pode ser patogénica), *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* e *Yarrowia*. Num aspeto, os géneros de levedura são selecionados entre *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* ou *Schizosaccharomyces* e, num aspeto, utiliza-se *Saccharomyces*. As espécies das estirpes de levedura que poderão ser utilizadas no invento incluem, mas não estão limitadas a, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Candida albicans*, *Candida kefyr*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus neoformans*, *Hansenula anomala*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Pichia pastoris*, *Rhodotorula rubra*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Yarrowia lipolytica*. É de salientar que algumas destas espécies incluem uma variedade de subespécies, tipos, subtipos, etc. que se destinam a estar incluídos nas espécies supracitadas. Num aspeto, as espécies de levedura utilizadas no invento incluem *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *H. polymorpha*, *P. pastoris* e *S. pombe*. *S. cerevisiae* é útil, na medida em que é relativamente fácil de manipular e é "geralmente reconhecida como segura" ou "GRAS" (do inglês *Generally Recognized As Safe*) para utilização como aditivo alimentar (GRAS, regra proposta da FDA 62FR18938, 17 de abril de 1997). Uma concretização do presente invento consiste numa estirpe de levedura que é capaz de efetuar a replicação de plasmídeos para um número de cópias particularmente elevado, como acontece com uma estirpe *S. cerevisiae* cir°. A estirpe *S. cerevisiae* é uma dessas estirpes que é capaz de suportar vetores de expressão que permitem que um ou mais antigénios-alvo e/ou proteínas de fusão dos antigénios e/ou outras proteínas sejam expressos em níveis elevados. Outra estirpe de levedura útil no invento é *Saccharomyces cerevisiae* W303α. Além disso, é possível utilizar no presente invento quaisquer estirpes mutantes de levedura, incluindo aquelas que exibem modificações pós-traducionais reduzidas dos antigénios-alvo ou das outras proteínas expressos, tais como mutações nas enzimas que estendem a glicosilação ligada a N.

A composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury do invento inclui pelo menos um antigénio do cancro compreendendo um antigénio de Brachyury. De acordo com o

presente invento, a utilização em geral nesta divulgação do termo "antigénio" refere-se a: qualquer porção de uma proteína (por exemplo, péptido, proteína parcial, proteína completa), em que a proteína existe naturalmente em, ou é desenhada ou derivada sinteticamente de, uma composição celular (célula completa, lisado celular ou células rompidas), um organismo (organismo completo, lisado ou células rompidas), um carboidrato, outra molécula ou uma sua porção. Um antigénio poderá desencadear uma resposta imune específica para antigénio (por exemplo, uma resposta imune humoral e/ou mediada por células) contra os mesmos antigénios ou antigénios similares aos que são encontrados por um elemento do sistema imunitário (por exemplo, células T, anticorpos).

Um antigénio pode ser tão pequeno como um único epitopo, um único domínio imunogénico ou maior e pode incluir múltiplos epitopos ou domínios imunogénicos. Como tal, o tamanho de um antigénio pode ser tão pequeno como cerca de 8-11 aminoácidos (isto é, um péptido) e tão grande como: uma proteína completa, um multímero, uma proteína de fusão, uma proteína quimérica, uma célula completa, um microrganismo completo ou quaisquer porções destes (por exemplo, fragmentos de proteínas (polipéptidos), lisados de células completas ou extratos de microrganismos). Os antigénios úteis no composto imunoterapêutico de levedura-Brachyury do presente invento são péptidos, polipéptidos, proteínas completas, multímeros, proteínas de fusão e proteínas quiméricas. Além disso, os antigénios podem incluir carboidratos, que podem ser introduzidos num veículo de levedura ou numa composição do invento. Entender-se-á que, em algumas concretizações (por exemplo, quando o antigénio é expresso por um veículo de levedura a partir de uma molécula de ácido nucleico recombinante), o antigénio é uma proteína, proteína de fusão, proteína quimérica ou seu fragmento, em vez de uma célula ou microrganismo inteiro. Para a expressão em levedura, um antigénio possui um tamanho mínimo que pode ser expresso de forma recombinante em levedura se o antigénio consistir na proteína inteira que será expressa pela levedura, e possui tipicamente pelo menos ou mais de 25 aminoácidos de comprimento, ou pelo menos ou mais de 26, pelo menos ou mais de 27, pelo menos ou mais de 28, pelo menos ou mais de 29,

pelo menos ou mais de 30, pelo menos ou mais de 31, pelo menos ou mais de 32, pelo menos ou mais de 33, pelo menos ou mais de 34, pelo menos ou mais de 35, pelo menos ou mais de 36, pelo menos ou mais de 37, pelo menos ou mais de 38, pelo menos ou mais de 39, pelo menos ou mais de 40, pelo menos ou mais de 41, pelo menos ou mais de 42, pelo menos ou mais de 43, pelo menos ou mais de 44, pelo menos ou mais de 45, pelo menos ou mais de 46, pelo menos ou mais de 47, pelo menos ou mais de 48, pelo menos ou mais de 49, ou pelo menos ou mais de 50 aminoácidos de comprimento, ou pelo menos ou mais de 25-50 aminoácidos de comprimento, ou pelo menos ou mais de 30-50 aminoácidos de comprimento, ou pelo menos ou mais de 35-50 aminoácidos de comprimento, ou pelo menos ou mais de 40-50 aminoácidos de comprimento, ou pelo menos ou mais de 45-50 aminoácidos de comprimento, embora possam ser expressas proteínas mais pequenas e possam ser expressas proteínas consideravelmente maiores (por exemplo, centenas de aminoácidos de comprimento ou mesmo alguns milhares de aminoácidos de comprimento). Num aspeto, poderá ser expressa uma proteína completa ou uma proteína que é desprovida de entre 1 e 20 aminoácidos das extremidades N-terminal e/ou C-terminal. As proteínas de fusão e as proteínas quiméricas também são antigénios que poderão ser expressos no invento. Um "antigénio-alvo" é um antigénio que é especificamente visado por uma composição imunoterapêutica do invento (isto é, um antigénio contra o qual se pretende provocar uma resposta imune). Um "antigénio do cancro" é um antigénio que compreende pelo menos um antigénio que está associado a um cancro, como seja um antigénio expresso por uma célula tumoral, de modo que visar o antigénio também visa o cancro. Um antigénio do cancro pode incluir um ou mais antigénios de uma ou mais proteínas, incluindo uma ou mais proteínas associadas a tumores. Um "antigénio de Brachyury" é um antigénio derivado, desenhado ou produzido a partir de uma proteína Brachyury.

Quando se refere a estimulação de uma resposta imune, o termo "imunogénio" é um subconjunto do termo "antigénio" e, deste modo, em alguns casos, pode ser usado indistintamente do termo "antigénio". Um imunogénio, tal como aqui utilizado, descreve um antigénio que provoca uma resposta imune humoral e/ou mediada por células (isto é, é imunogénico), de forma

que a administração do imunogénio a um indivíduo desencadeia uma resposta imune específica para antigénio contra os mesmos antigénios ou antigénios similares aos que são encontrados pelo sistema imunitário do indivíduo. Numa concretização, o imunogénio provoca uma resposta imune mediada por células, incluindo uma resposta de células T CD4⁺ (por exemplo, Th1, Th2 e/ou Th17) e/ou uma resposta de células T CD8⁺ (por exemplo, uma resposta de células Tc).

Um "domínio imunogénico" de um dado antigénio pode ser qualquer parte, fragmento ou epitopo de um antigénio (por exemplo, uma subunidade ou fragmento peptídico ou um epitopo de um anticorpo ou outro epitopo conformacional) que contenha pelo menos um epitopo que pode atuar como um imunogénio quando administrado a um animal. Por conseguinte, um domínio imunogénico é maior do que um único aminoácido e tem pelo menos um tamanho suficiente para conter pelo menos um epitopo que pode atuar como um imunogénio. Por exemplo, uma única proteína pode conter múltiplos domínios imunogénicos diferentes. Os domínios imunogénicos não precisam de ser sequências lineares dentro de uma proteína, como no caso de uma resposta imune humoral, onde estão contemplados domínios conformacionais.

Um epitopo é aqui definido como um sítio imunogénico único num dado antigénio que é suficiente para desencadear uma resposta imune quando administrado ao sistema imunitário, no contexto de sinais coestimuladores apropriados e/ou células ativadas do sistema imunitário. Por outras palavras, um epitopo é a parte de um antigénio que é reconhecida pelos componentes do sistema imunitário e também pode ser designado por determinante antigénico. Os peritos na especialidade reconhecerão que os epitopos de células T são diferentes em termos de tamanho e composição dos epitopos de células B ou de anticorpos, e que os epitopos apresentados pela via do MHC de classe I diferem em termos de tamanho e atributos estruturais dos epitopos apresentados pela via do MHC de classe II. Por exemplo, os epitopos de células T apresentados por moléculas do MHC de classe I têm tipicamente entre 8 e 11 aminoácidos de comprimento, ao passo que os epitopos apresentados por moléculas do MHC de classe II estão menos limitados ao nível do comprimento e poderão ter até 25

aminoácidos ou mais. Além disso, os epitopos de células T têm características estruturais previstas que dependem das moléculas específicas do MHC ligadas pelo epitopo. Os epitopos podem ser epitopos de sequência linear ou epitopos conformacionais (regiões de ligação conservadas). A maioria dos anticorpos reconhece epitopos conformacionais.

O Brachyury (que também pode ser designado por "T") é uma proteína grandemente conservada entre muitas espécies animais diferentes e é um fator de transcrição que contém um domínio "T-box" ou "domínio T", um motivo de domínio de ligação ao ADN partilhado por várias proteínas diferentes, designadas coletivamente por família de proteínas T-box. O Brachyury humano foi clonado pela primeira vez em 1996 (Edwards et al., *supra*). Uma sequência nucleotídica que codifica o Brachyury humano é aqui representada por SEQ ID NO:1, que é uma sequência de ARNm que foi obtida a partir do n.º de acesso do GENBANK® NM_003181 (GI:19743811). A SEQ ID NO:1 codifica uma proteína Brachyury humana com 435 aminoácidos, cuja sequência de aminoácidos é aqui representada como SEQ ID NO:2 (também encontrada no n.º de acesso do GENBANK® NP_003172; GI:4507339).

Outra proteína Brachyury humana aqui divulgada é uma variante da proteína Brachyury humana representada por SEQ ID NO:2 e possui a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:6. A SEQ ID NO:6, uma proteína também com 435 aminoácidos, é codificada por uma sequência nucleotídica aqui representada por SEQ ID NO:5. A SEQ ID NO:6 possui uma identidade de aproximadamente 99% com a SEQ ID NO:2 ao longo do comprimento total da proteína. A SEQ ID NO:6 difere da SEQ ID NO:2 na posição 177 (Asp versus Gly, respetivamente), posição 368 (Thr versus Ser, respetivamente) e posição 409 (Asn versus Asp, respetivamente).

Outra proteína Brachyury humana aqui divulgada é um agonista da proteína Brachyury humana representada por SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:6. Tal como aqui utilizado de um modo geral, um "agonista" é qualquer composto ou agente, incluindo, sem limitação, pequenas moléculas, proteínas, péptidos, anticorpos, agentes de ligação a ácidos nucleicos, etc., que se liga a um recetor ou ligando e produz ou

desencadeia uma resposta, podendo incluir agentes que mimetizam ou reforçam a ação de uma substância que existe naturalmente e que se liga ao recetor ou ligando. Quando utilizado no contexto de um antigénio de Brachyury do invento, um antigénio ou proteína "agonista" refere-se a um antigénio ou proteína que compreende pelo menos um epitopo agonista de células T, que também poderá ser designado por um "mimotopo". Um péptido mimotopo é um péptido que mimetiza a estrutura de um epitopo de tipo selvagem e, como um agonista, o mimotopo mimetiza ou reforça a ação (função biológica) do epitopo natural. Por exemplo, a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:12 (WLLPGTSTL) é um epitopo de células T de uma proteína Brachyury de tipo selvagem. A sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (WLLPGTSTV) é um mimotopo ou agonista do epitopo de células T de SEQ ID NO:12.

Um antigénio agonista de Brachyury humano é aqui representado por SEQ ID NO:18. A SEQ ID NO:18 é uma proteína com 435 aminoácidos e é codificada por uma sequência nucleotídica aqui representada por SEQ ID NO:17. A SEQ ID NO:18 é idêntica a SEQ ID NO:6, salvo por uma substituição de uma leucina na posição 254 de SEQ ID NO:6 por uma valina em SEQ ID NO:18. Esta substituição cria um epitopo agonista de células T em SEQ ID NO:18 nas posições 246 a 254 que, sem se estar vinculado pela teoria, se crê que induz respostas de células T melhoradas contra Brachyury comparativamente ao epitopo de tipo selvagem (posições 246 a 254 de SEQ ID NO:6).

As posições 41 a 223 de qualquer uma de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:18 representam o domínio de ligação ao ADN T-box de Brachyury humano, e o domínio T-box noutras sequências de Brachyury, incluindo sequências de Brachyury de outras espécies, pode ser facilmente identificado por comparação com estas sequências. Tal como aqui usada, a referência a um domínio T-box de qualquer proteína Brachyury aqui descrita ou conhecida na técnica e utilizada no invento poderá incluir mais 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40 aminoácidos consecutivos da sequência de Brachyury, na extremidade N-terminal e/ou C-terminal do domínio T-box definido (por exemplo, de qualquer um dos lados das posições

41-223 de SEQ ID NO:2, 6 ou 18). O Brachyury humano, incluindo as duas proteínas Brachyury humanas aqui descritas, também contém vários epitopos de células T CD4⁺ e CD8⁸⁺. Esses epitopos foram descritos, por exemplo, em WO 2008/106551 e incluem um epitopo de células Tc CD8⁺, WLLPGTSTL (também aqui designado por Tp2, SEQ ID NO:12), nas posições 246 a 254 de SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:6. Como discutido acima, a SEQ ID NO:18 compreende um epitopo agonista da SEQ ID NO:12, aqui representado por SEQ ID NO:13.

O Brachyury humano possui uma homologia muito elevada com o Brachyury de outras espécies animais e, por conseguinte, é possível utilizar as sequências de Brachyury de outros organismos na preparação de uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury do invento, em particular quando estas sequências são idênticas, substancialmente homólogas e provocam uma resposta imune eficaz contra o antigénio-alvo (por exemplo, Brachyury nativo expresso por uma célula tumoral). Por exemplo, o Brachyury murino, que foi clonado pela primeira vez por Hermann e colegas em 1990 (Hermann et al., *supra*), apresenta uma identidade de aproximadamente 85% com o Brachyury humano ao nível nucleotídico e uma identidade de aproximadamente 91% ao nível de aminoácidos. Relativamente ao Brachyury de outros animais, ao nível de aminoácidos, o Brachyury humano apresenta uma identidade de 99,5% com o Brachyury de *Pan troglodytes*, uma identidade de 90,1% com o Brachyury de *Canis lupus familiaris*, uma identidade de 88,5% com o Brachyury de *Bos Taurus*, uma identidade de 92,2% com o Brachyury de *Rattus norvegicus* e uma identidade de 80,9% com o Brachyury de *Gallus gallus*. Nos aminoácidos 1-223 de Brachyury, que contêm o domínio T-box, o Brachyury humano e de ratinho diferem apenas em dois aminoácidos (nas posições 26 e 96). Uma sequência nucleotídica que codifica o Brachyury murino é aqui representada por SEQ ID NO:3, que é uma sequência de ARNm que foi obtida a partir do n.º de acesso do GENBANK® NM_009309 (GI:1118130357). A SEQ ID NO:3 codifica uma proteína Brachyury murina com 436 aminoácidos, cuja sequência de aminoácidos é aqui representada por SEQ ID NO:4. As posições 41 a 223 de SEQ ID NO:4 representam o domínio de ligação ao ADN T-box de Brachyury murino.

Numa concretização do invento, um antigénio de Brachyury compreende ou consiste na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:18 ou pelo menos num seu domínio imunogénico. Numa concretização, um antigénio de Brachyury compreende ou consiste em dois, três, quatro, cinco ou mais domínios imunogénicos de Brachyury. Numa concretização do invento, um antigénio de Brachyury compreende ou consiste na sequência de aminoácidos representada pelas posições de aminoácidos 1 ou 2 até um dos últimos 25 aminoácidos na extremidade C-terminal de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:18 (isto é, até qualquer uma das posições 441 a 435 de SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:18, ou até qualquer uma das posições 442 a 436 de SEQ ID NO:4). Outro antigénio de Brachyury útil no invento também inclui pelo menos as posições de aminoácidos 1-223 de Brachyury (por exemplo, as posições 1-223 de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:18) ou as posições 41-223 de Brachyury (por exemplo, as posições 41-223 de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:18). Outro antigénio de Brachyury útil no invento inclui de pelo menos as posições de aminoácidos 1 a 85 a entre a posição 255 e a extremidade C-terminal de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:18. Outro antigénio de Brachyury útil no invento inclui de pelo menos as posições de aminoácidos 1 a 85 a entre a posição 430 e a extremidade C-terminal de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:18. Outro antigénio de Brachyury útil no invento inclui de pelo menos as posições de aminoácidos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 a entre a posição 255 e a extremidade C-terminal de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:18.

De acordo com quaisquer concretizações do presente invento, a referência a uma proteína "completa" (ou um domínio funcional completo ou um domínio imunológico completo) inclui a sequência de aminoácidos completa da proteína ou domínio funcional ou domínio imunológico, como aqui descrita ou como conhecida ou descrita de outro modo numa sequência disponível ao público. Uma proteína ou domínio que é "quase completo", que é também um tipo de homólogo de uma proteína, difere de uma proteína ou domínio completo pela adição ou eliminação ou omissão de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

ou 10 aminoácidos da extremidade N-terminal e/ou C-terminal dessa proteína completa ou domínio completo. A título de exemplo, várias das proteínas de fusão aqui descritas compreendem um antígeno de Brachyury "quase completo", uma vez que o antígeno omite a metionina na posição 1 e substitui um péptido N-terminal. A referência em geral a uma proteína ou domínio ou antígeno pode incluir ambas as proteínas completa e quase completa, assim como outros seus homólogos.

Num aspeto de quaisquer concretizações relacionadas com um antígeno de Brachyury, um antígeno do cancro ou um antígeno de Brachyury possui um tamanho mínimo suficiente para permitir que o antígeno seja expresso por levedura. Para a expressão em levedura, uma proteína possui tipicamente pelo menos cerca de 25 aminoácidos de comprimento, embora possam ser expressas proteínas mais pequenas e possam ser expressas proteínas consideravelmente maiores por levedura. Por exemplo, um antígeno de Brachyury útil no invento é um fragmento de uma proteína Brachyury que pode ser expresso de forma recombinante por levedura e que contém pelo menos um domínio imunogénico de Brachyury, o qual poderia incluir pelo menos um domínio imunogénico de qualquer uma de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:18. Num aspeto, tal antígeno tem pelo menos 25 aminoácidos de comprimento e contém pelo menos um domínio imunogénico de Brachyury. Num aspeto, tal antígeno possui mais de 30 aminoácidos de comprimento e contém pelo menos um domínio imunogénico de Brachyury. Num aspeto, tal antígeno possui pelo menos 25-50 aminoácidos de comprimento e contém pelo menos um domínio imunogénico de Brachyury. Num aspeto, tal antígeno possui pelo menos 30-50 aminoácidos de comprimento e contém pelo menos um domínio imunogénico de Brachyury. Num aspeto, tal antígeno possui pelo menos 35-50 aminoácidos de comprimento e contém pelo menos um domínio imunogénico de Brachyury. Num aspeto, tal antígeno possui pelo menos 40-50 aminoácidos de comprimento e contém pelo menos um domínio imunogénico de Brachyury. Num aspeto, tal antígeno possui pelo menos 45-50 aminoácidos de comprimento e contém pelo menos um domínio imunogénico de Brachyury. Numa concretização, o antígeno de Brachyury útil no presente invento possui pelo menos 25 aminoácidos de comprimento, ou pelo menos 30, 35, 40, 45, 50,

55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425 ou 430 aminoácidos de comprimento, podendo incluir qualquer fragmento com pelo menos qualquer um destes comprimentos de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:18.

Num aspeto, um antigénio de Brachyury compreende um ou mais epitopos de células Tc, que poderão incluir duas ou mais cópias de quaisquer um, dois, três ou mais dos epitopos de células Tc aqui descritos. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende um ou mais epitopos de células T CD4⁺. Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende um ou mais epitopos de células Tc e um ou mais epitopos de células T CD4⁺. Num aspeto, o epitopo de células T é um epitopo agonista.

Num aspeto, um antigénio de Brachyury compreende uma sequência de aminoácidos de WLLPGTSTL (SEQ ID NO:12, também representada pelas posições 245 a 254 de SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:6). Num aspeto, um antigénio de Brachyury compreende uma sequência de aminoácidos de WLLPGTSTV (SEQ ID NO:13, também representada pelas posições 245 a 254 de SEQ ID NO:18). Num aspeto, o aminoácido na posição 4 quer de SEQ ID NO:12 quer de SEQ ID NO:13 (uma prolina ou P nestas sequências) é substituído por uma serina (S), uma treonina (T), uma isoleucina (I) ou uma valina (V).

Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende uma sequência de aminoácidos de SQYPSLWSV (SEQ ID NO:14). Num aspeto, o aminoácido na posição 2 de SEQ ID NO:14 (uma glutamina ou Q nesta sequência) é substituído por uma leucina (L). Num aspeto, o aminoácido na posição 4 de SEQ ID NO:14 (uma prolina ou P nesta sequência) é substituído por uma serina (S), treonina (T), leucina (L) ou valina (V). Num aspeto, o aminoácido na posição 7 de SEQ ID NO:14 (um triptofano ou W nesta sequência) é substituído por uma valina (V), leucina (L), isoleucina (I), serina (S) ou treonina (T).

Num aspeto, o aminoácido na posição 9 de SEQ ID NO:14 (uma valina ou V nesta sequência) é substituído por uma leucina (L). Um antigénio compreendendo uma sequência que contém qualquer combinação de uma ou mais destas substituições em SEQ ID NO:14 está contemplado pelo invento.

Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende uma sequência de aminoácidos de RLIASWTPV (SEQ ID NO:15). Num aspeto, o aminoácido na posição 1 de SEQ ID NO:15 (uma arginina ou R nesta sequência) é substituído por uma tirosina (Y) ou um triptofano (W). Num aspeto, o aminoácido na posição 6 de SEQ ID NO:15 (um triptofano ou W nesta sequência) é substituído por uma valina (V), uma lisina (L), uma isoleucina (I), uma serina (S) ou uma treonina (T). Um antigénio compreendendo uma sequência que contém qualquer combinação de uma ou ambas destas substituições em SEQ ID NO:15 está contemplado pelo invento.

Num aspeto, o antigénio de Brachyury compreende uma sequência de aminoácidos de AMYSFLLDFV (SEQ ID NO:16). Num aspeto, o aminoácido na posição 2 de SEQ ID NO:16 (uma metionina ou M nesta sequência) é substituído por uma leucina (L).

Numa concretização do invento, um antigénio de Brachyury compreende, consiste essencialmente em, ou consiste numa proteína de fusão possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:8. A proteína de fusão de SEQ ID NO:8 é um polipéptido único com os seguintes elementos de sequência fundidos *in-frame* da extremidade N-terminal para a extremidade C-terminal: (1) um péptido N-terminal para conferir resistência à degradação proteossómica e estabilizar a expressão em levedura (posições 1-6 de SEQ ID NO:8); (2) um antigénio de Brachyury humano consistindo nas posições 2-435 de SEQ ID NO:6 (posições 7-440 de SEQ ID NO:8); e (3) uma marca de hexa-histidina (posições 441-446 de SEQ ID NO:8). A sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:8 é codificada pela sequência polinucleotídica de SEQ ID NO:7.

Noutra concretização do invento, um antigénio de Brachyury compreende, consiste essencialmente em, ou consiste numa proteína de fusão possuindo a sequência de aminoácidos

de SEQ ID NO:10. A proteína de fusão de SEQ ID NO:10 é um polipéptido único com os seguintes elementos de sequência fundidos *in-frame* da extremidade N-terminal para a extremidade C-terminal: (1) um péptido N-terminal para conferir resistência à degradação proteossômica e estabilizar a expressão em levedura (posições 1-6 de SEQ ID NO:10); (2) um antígeno de Brachyury murino consistindo nas posições 2-436 de SEQ ID NO:4 (posições 7-441 de SEQ ID NO:10); e (3) uma marca de hexa-histidina (posições 442-447 de SEQ ID NO:10). A sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:10 é codificada pela sequência polinucleotídica de SEQ ID NO:9.

Noutra concretização do invento, um antígeno de Brachyury compreende, consiste essencialmente em, ou consiste numa proteína de fusão possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:20. A proteína de fusão de SEQ ID NO:20 é um polipéptido único com os seguintes elementos de sequência fundidos *in-frame* da extremidade N-terminal para a extremidade C-terminal: (1) um péptido N-terminal para conferir resistência à degradação proteossômica e estabilizar a expressão (posições 1-6 de SEQ ID NO:20, a sequência peptídica também aqui representada por SEQ ID NO:11); (2) os aminoácidos 2-435 de SEQ ID NO:18 (posições 7-440 de SEQ ID NO:20), em que SEQ ID NO:18 representa uma proteína agonista Brachyury humana completa; e (3) uma marca de hexa-histidina (posições 441-446 de SEQ ID NO:20). O epitopo agonista (SEQ ID NO:13) está localizado nas posições 251 a 259 de SEQ ID NO:20 (posições 246 a 254 de SEQ ID NO:18). A sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:20 é codificada pela sequência polinucleotídica de SEQ ID NO:19.

Um antígeno de Brachyury útil no presente invento também inclui proteínas possuindo uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% com a sequência de aminoácidos de qualquer uma das proteínas ou antígenos de Brachyury aqui descritos ao longo do comprimento total da proteína, ou em relação a um seu fragmento ou domínio definido [por exemplo, um domínio imunológico ou um domínio funcional (domínio com pelo menos uma atividade biológica)] que faz parte da proteína. Por exemplo, um domínio da proteína Brachyury aqui descrito

inclui o domínio T-box. Um domínio imunológico foi descrito em pormenor acima.

Em alguns aspetos do invento, é possível efetuar inserções, eliminações e/ou substituições de aminoácidos para um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais aminoácidos de uma proteína Brachyury de tipo selvagem ou de referência, desde que a proteína Brachyury resultante, quando utilizada como um antigénio numa composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury do invento, provoque uma resposta imune contra uma proteína Brachyury nativa como a proteína Brachyury de tipo selvagem ou de referência, que poderá incluir uma resposta imune melhorada, uma resposta imune diminuída ou uma resposta imune substancialmente idêntica. Por exemplo, o invento inclui a utilização de antigénios agonistas de Brachyury, que poderão incluir um ou mais epitopos de células T que foram mutados para melhorar a resposta de células T contra o agonista de Brachyury, por exemplo melhorando a avidéz ou afinidade do epitopo para uma molécula do MHC ou para o recetor de células T que reconhece o epitopo no contexto da apresentação pelo MHC. Os agonistas de Brachyury poderão, assim, melhorar a potência ou eficiência de uma resposta de células T contra o Brachyury nativo expresso por uma célula tumoral. O antigénio de Brachyury possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:18 é um exemplo não limitativo de um agonista de Brachyury (ou de um antigénio de Brachyury compreendendo um epitopo agonista).

Adicionalmente, as sequências de expressão N-terminais e as marcas C-terminais, como aquelas descritas acima em relação às proteínas de fusão de SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:20, são opcionais, mas poderão ser selecionadas entre várias sequências diferentes descritas noutros locais desta divulgação para melhorar ou ajudar a expressão e a estabilidade e/ou permitir a identificação e/ou purificação da proteína. Muitos promotores diferentes adequados para utilização em levedura são também conhecidos na técnica. Além disso, poderão introduzir-se sequências de ligação intercaladas curtas (por exemplo, péptidos com 1, 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos) entre as partes de uma proteína de fusão compreendendo um antigénio de Brachyury por várias razões,

incluindo a introdução de sítios de enzimas de restrição para facilitar a clonagem, como sítios de clivagem para proteases fagossomais do hospedeiro, para acelerar o processamento da proteína ou antigénio e para a manipulação futura das construções.

Opcionalmente, as proteínas, incluindo as proteínas de fusão, que são utilizadas como um componente da composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury do invento são produzidas usando construções de antigénios que são particularmente úteis para melhorar ou estabilizar a expressão de antigénios heterólogos em levedura. Numa concretização, a(s) proteína(s) ou péptido(s) antigénico(s) desejado(s) são fundidos ao nível da sua extremidade amino-terminal com: (a) um péptido sintético específico que estabiliza a expressão da proteína de fusão no veículo de levedura ou impede a modificação pós-traducional da proteína de fusão expressa (tais péptidos estão descritos em pormenor, por exemplo, na Publicação de Patente U.S. n.º 2004-0156858 A1, publicada em 12 de agosto de 2004); (b) pelo menos uma parte de uma proteína endógena de levedura, incluindo, embora não limitada à, sequência *leader* do fator alfa de levedura, em que qualquer um dos parceiros de fusão proporciona uma estabilidade melhorada da expressão da proteína na levedura e/ou impede a modificação pós-traducional das proteínas pelas células de levedura (tais proteínas também estão descritas em pormenor, por exemplo, na Publicação de Patente U.S. n.º 2004-0156858 A1, supra); e/ou (c) pelo menos uma parte de uma proteína de levedura que faz com que a proteína de fusão seja expressa à superfície da levedura (por exemplo, uma proteína Aga, descrita em maior detalhe nesta divulgação). Além disso, o presente invento inclui opcionalmente a utilização de péptidos que são fundidos com a extremidade C-terminal da construção que codifica o antigénio, particularmente para utilização na seleção e identificação da proteína. Esses péptidos incluem, mas não estão limitados a, qualquer péptido sintético ou natural, tal como uma marca peptídica (por exemplo, 6X His ou hexapéptido) ou qualquer outra marca epitópica curta. Os péptidos ligados à extremidade C-terminal de um antigénio de acordo com o invento podem ser usados com ou sem a adição dos péptidos N-terminais discutidos acima, e vice-versa.

Numa concretização, um péptido sintético útil numa proteína de fusão que será expressa numa levedura é ligado à extremidade N-terminal do antigénio, onde o péptido consiste em pelo menos duas posições de aminoácidos que são heterólogas ao antigénio, em que o péptido estabiliza a expressão da proteína de fusão no veículo de levedura ou impede a modificação pós-traducional da proteína de fusão expressa. O péptido sintético e a porção N-terminal do antigénio, juntos, formam uma proteína de fusão que possui os seguintes requisitos: (1) o resíduo de aminoácido na posição um da proteína de fusão é uma metionina (isto é, o primeiro aminoácido no péptido sintético é uma metionina); (2) o resíduo de aminoácido na posição dois da proteína de fusão não é uma glicina nem uma prolina (isto é, o segundo aminoácido no péptido sintético não é uma glicina nem uma prolina); (3) nenhuma das posições de aminoácidos nas posições 2-6 da proteína de fusão é uma metionina (isto é, os aminoácidos nas posições 2-6, façam eles parte do péptido sintético ou da proteína, se o péptido sintético for mais curto do que 6 aminoácidos, não incluem uma metionina); e (4) nenhum dos aminoácidos nas posições 2-6 da proteína de fusão é uma lisina ou uma arginina (isto é, os aminoácidos nas posições 2-6, façam eles parte do péptido sintético ou da proteína, se o péptido sintético for mais curto do que 5 aminoácidos, não incluem uma lisina nem uma arginina). O péptido sintético pode ser tão curto como dois aminoácidos, mas num aspeto contém 2-6 aminoácidos (incluindo 3, 4, 5 aminoácidos) e pode ser mais comprido do que 6 aminoácidos, em números inteiros, até cerca de 200 aminoácidos, 300 aminoácidos, 400 aminoácidos, 500 aminoácidos ou mais.

Numa concretização, uma proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos de M-X2-X3-X4-X5-X6, em que M é metionina; em que X2 é qualquer aminoácido exceto glicina, prolina, lisina ou arginina; em que X3 é qualquer aminoácido exceto metionina, lisina ou arginina; em que X4 é qualquer aminoácido exceto metionina, lisina ou arginina; em que X5 é qualquer aminoácido exceto metionina, lisina ou arginina; e em que X6 é qualquer aminoácido exceto metionina, lisina ou arginina. Numa concretização, o resíduo X6 é uma prolina. Uma sequência sintética exemplificativa que melhora a estabilidade da expressão de um antigénio numa célula de

levedura e/ou impede a modificação pós-traducional da proteína na levedura inclui a sequência M-A-D-E-A-P (aqui representada por SEQ ID NO:11). Além da estabilidade melhorada do produto de expressão, este parceiro de fusão não parece afetar negativamente a resposta imune contra o antígeno imunizante na construção. Adicionalmente, os péptidos de fusão sintéticos podem ser desenhados para fornecerem um epitopo que pode ser reconhecido por um agente de seleção, como seja um anticorpo.

Num aspeto do invento, o veículo de levedura é manipulado de forma que o antígeno seja expresso ou disponibilizado mediante entrega ou translocação de um produto proteico expresso, total ou parcialmente, à superfície do veículo de levedura (expressão extracelular). Um método para obter este aspeto do invento consiste em utilizar um braço espaçador para posicionar uma ou mais proteínas à superfície do veículo de levedura. Por exemplo, é possível utilizar um braço espaçador para criar uma proteína de fusão do(s) antígeno(s) ou outra proteína de interesse com uma proteína que direcione o(s) antígeno(s) ou outra proteína de interesse para a parede celular da levedura. Por exemplo, uma destas proteínas que pode ser usada para direccionar outras proteínas é uma proteína de levedura (por exemplo, a proteína da parede celular 2 (cwp2), a proteína Aga2, Pir4 ou Flo1) que permite que o(s) antígeno(s) ou outra proteína sejam direccionados para a parede celular da levedura, de modo que o antígeno ou outra proteína esteja localizado à superfície da levedura. Poderão usar-se proteínas diferentes de proteínas de levedura para o braço espaçador. Contudo, para qualquer proteína do braço espaçador, é especialmente desejável que a resposta imunogénica seja dirigida contra o antígeno-alvo e não contra a proteína do braço espaçador. Assim, caso sejam usadas outras proteínas para o braço espaçador, a proteína do braço espaçador que é usada não deverá gerar uma resposta imune tão grande à própria proteína do braço espaçador que a resposta imune ao(s) antígeno(s)-alvo seja suplantada. Um perito na especialidade deverá ter como objetivo uma resposta imune pequena à proteína do braço espaçador em relação à resposta imune para o(s) antígeno(s)-alvo. Os braços espaçadores podem ser construídos de modo a terem sítios de

clivagem (por exemplo, sítios de clivagem de proteases) que permitam que o antigénio seja facilmente removido ou processado longe da levedura, se desejado. Qualquer método conhecido de determinação da magnitude das respostas imunes pode ser usado (por exemplo, produção de anticorpos, ensaios líticos, etc.) e estes são facilmente conhecidos por um perito na especialidade.

Outro método para posicionar o(s) antigénio(s)-alvo ou outras proteínas de modo a estarem expostos à superfície da levedura consiste em utilizar sequências sinal, como glicosilfosfatidilinositol (GPI), para ancorar o alvo à parede celular da levedura. Em alternativa, o posicionamento pode ser obtido mediante a junção de sequências sinal que direcionam o(s) antigénio(s) ou outras proteínas de interesse para a via secretora através de translocação para o retículo endoplasmático (RE), de modo que o antigénio liga-se a uma proteína que está presa à parede celular (por exemplo, cwp).

Num aspeto, a proteína do braço espaçador é uma proteína de levedura. A proteína de levedura pode consistir em entre cerca de dois e cerca de 800 aminoácidos de uma proteína de levedura. Numa concretização, a proteína de levedura tem cerca de 10 a 700 aminoácidos. Noutra concretização, a proteína de levedura tem cerca de 40 a 600 aminoácidos. Outras concretizações do invento incluem a proteína de levedura possuindo pelo menos 250 aminoácidos, pelo menos 300 aminoácidos, pelo menos 350 aminoácidos, pelo menos 400 aminoácidos, pelo menos 450 aminoácidos, pelo menos 500 aminoácidos, pelo menos 550 aminoácidos, pelo menos 600 aminoácidos ou pelo menos 650 aminoácidos. Numa concretização, a proteína de levedura tem pelo menos 450 aminoácidos de comprimento. Outra consideração para otimizar a expressão à superfície do antigénio, caso tal seja pretendido, é se a combinação do antigénio e do braço espaçador deverá ser expressa como um monómero ou como um dímero ou como um trímero ou ainda mais unidades ligadas entre si. Esta utilização de monómeros, dímeros, trímeros, etc. permite o espaçamento ou enrolamento apropriado do antigénio, de modo que uma parte, se não mesmo todo, o antigénio seja apresentado à superfície do veículo de levedura de uma maneira que o torna mais imunogénico.

A utilização de proteínas de levedura pode estabilizar a expressão das proteínas de fusão no veículo de levedura, impedir a modificação pós-traducional da proteína de fusão expressa e/ou direcionar a proteína de fusão para um compartimento particular na levedura (por exemplo, para ser expressa à superfície da célula de levedura). Para entrega na via secretora da levedura, as proteínas de levedura exemplificativas a utilizar incluem, mas não estão limitadas a: Aga (incluindo, mas não limitadas a, Aga1 e/ou Aga2), SUC2 (invertase de levedura), a sequência *leader* do fator alfa, CPY, Cwp2p devido à sua localização e retenção na parede celular, os genes BUD para localização na gémula da célula de levedura durante a fase inicial de formação da célula-filha, Flo1p, Pir2p e Pir4p.

É possível utilizar outras sequências para direcionar, reter e/ou estabilizar a proteína noutras partes do veículo de levedura, por exemplo, no citosol ou na mitocôndria ou no retículo endoplasmático ou no núcleo. Os exemplos de proteínas de levedura apropriadas que podem ser usadas para quaisquer das concretizações indicadas acima incluem, mas não estão limitadas a, TK, AF, SEC7; os produtos génicos fosfoenolpiruvato-carboxicinas PCK1, fosfoglicerocinas PGK e triose-fosfato-isomerase TPI pela sua expressão repressível em glucose e localização citosólica; as proteínas de choque térmico SSA1, SSA3, SSA4, SSC1, cuja expressão é induzida e cujas proteínas são mais termoestáveis aquando da exposição das células a tratamento térmico; a proteína mitocondrial CYC1 para importação para a mitocôndria; ACT1.

Os métodos de produção de veículos de levedura e de expressão, combinação e/ou associação de veículos de levedura com antígenos e/ou outras proteínas e/ou agentes de interesse para produzir composições de imunoterapia à base de levedura estão contemplados pelo invento.

De acordo com o presente invento, o termo "complexo veículo de levedura-antígeno" ou "complexo levedura-antígeno" é utilizado genericamente para descrever qualquer associação de um veículo de levedura com um antígeno e pode ser usado indistintamente com "composição de imunoterapia à base de levedura", quando semelhante composição for utilizada

para provocar uma resposta imune como descrito acima. Tal associação inclui a expressão do antigénio pela levedura (uma levedura recombinante), a introdução de um antigénio numa levedura, a ligação física do antigénio à levedura e a mistura da levedura com o antigénio, por exemplo num tampão ou noutra solução ou formulação. Estes tipos de complexos estão descritos em pormenor abaixo.

Numa concretização, uma célula de levedura utilizada para preparar o veículo de levedura é transfetada com uma molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica uma proteína (por exemplo, o antigénio), de forma que a proteína seja expressa pela célula de levedura. Esta levedura é aqui também designada por levedura recombinante ou veículo de levedura recombinante. A célula de levedura pode depois ser formulada com um excipiente farmacologicamente aceitável e administrada diretamente a um doente, armazenada para administração posterior ou introduzida numa célula dendrítica como uma célula intacta. A célula de levedura também pode ser morta ou pode ser derivatizada, por exemplo por formação de esferoplastos, citoplastos, células fantasma ou partículas subcelulares de levedura, em que qualquer uma das formas poderá ser seguida de armazenamento, administração ou introdução do derivado na célula dendrítica. Os esferoplastos de levedura também podem ser transfetados diretamente com uma molécula de ácido nucleico recombinante (por exemplo, o esferoplasto é produzido a partir de uma levedura completa e depois transfetado), de modo a produzir um esferoplasto recombinante que expressa o antigénio. As células de levedura ou os esferoplastos de levedura que expressam de forma recombinante o(s) antigénio(s) poderão ser usados para produzir um veículo de levedura compreendendo um citoplasto de levedura, uma célula fantasma de levedura, uma partícula de membrana de levedura, uma partícula de parede celular de levedura ou sua fração.

Em geral, o veículo de levedura e o(s) antigénio(s) e/ou outros agentes podem ser associados por meio de qualquer técnica aqui descrita. Num aspeto, o(s) antigénio(s) e/ou agente(s) foram introduzidos intracelularmente no veículo de levedura. Noutro aspeto, o(s) antigénio(s) e/ou agente(s) foram ligados, covalente ou não covalentemente, ao veículo de

levedura. Noutro aspeto ainda, o veículo de levedura e o(s) antigénio(s) e/ou agente(s) foram associados por mistura. Noutro aspeto, e numa concretização, o(s) antigénio(s) e/ou agente(s) são expressos de forma recombinante pelo veículo de levedura ou pela célula de levedura ou esferoblasto de levedura do qual o veículo de levedura foi derivado.

Um número de antigénios e/ou outras proteínas que será produzido por um veículo de levedura do presente invento é qualquer número de antigénios e/ou outras proteínas que possa ser razoavelmente produzido por um veículo de levedura, e tipicamente varia de pelo menos um a pelo menos cerca de 6 ou mais, incluindo de cerca de 2 a cerca de 6 antigénios e/ou outras proteínas.

A expressão de um antigénio ou outra proteína num veículo de levedura do presente invento é obtida utilizando técnicas conhecidas pelos peritos na especialidade. Resumidamente, uma molécula de ácido nucleico que codifica pelo menos um antigénio desejado ou outra proteína é inserida num vetor de expressão, de tal forma que a molécula de ácido nucleico é ligada funcionalmente a uma sequência de controlo da transcrição a fim de ser possível efetuar a expressão constitutiva ou regulada da molécula de ácido nucleico quando ela é transformada numa célula de levedura hospedeira. As moléculas de ácido nucleico que codificam um ou mais antigénios e/ou outras proteínas podem estar num ou mais vetores de expressão, ligadas funcionalmente a uma ou mais sequências de controlo da expressão. As sequências de controlo da expressão particularmente importantes são aquelas que controlam o início da transcrição, como as sequências promotoras e as sequências de ativação a montante. É possível utilizar qualquer promotor de levedura adequado no presente invento e os peritos na especialidade conhecem vários destes promotores. Os promotores para expressão em *Saccharomyces cerevisiae* incluem, mas não estão limitados a, promotores dos genes que codificam as seguintes proteínas de levedura: álcool-desidrogenase I (ADH1) ou II (ADH2), CUP1, fosfoglicerato-cinase (PGK), triose-fosfato-isomerase (TPI), fator de alongamento da tradução EF-1 alfa (TEF2), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH; também designada por TDH3, de triose-fosfato-desidrogenase),

galactocinase (GAL1), galactose-1-fosfato-uridiltransferase (GAL7), UDP-galactose-epimerase (GAL10), citocromo c1 (CYC1), proteína Sec7 (SEC7) e fosfatase ácida (PHO5), incluindo promotores híbridos como os promotores *ADH2/GAPDH* e *CYC1/GAL10*, e incluindo o promotor *ADH2/GAPDH*, que é induzido quando as concentrações de glucose na célula são baixas (por exemplo, cerca de 0,1 a cerca de 0,2%), assim como o promotor *CUP1* e o promotor *TEF2*. Do mesmo modo, são conhecidas várias sequências de ativação a montante (UAS de *upstream activation sequence*), também denominadas amplificadores. As sequências de ativação a montante para expressão em *Saccharomyces cerevisiae* incluem, mas não estão limitadas às, UAS dos genes que codificam as seguintes proteínas: PCK1, TPI, TDH3, CYC1, ADH1, ADH2, SUC2, GAL1, GAL7 e GAL10, bem como outras UAS ativadas pelo produto génico GAL4, sendo a UAS ADH2 utilizada num aspeto. Como a UAS ADH2 é ativada pelo produto génico ADR1, poderá ser preferível sobreexpressar o gene de ADR1 quando um gene heterólogo está ligado funcionalmente à UAS ADH2. As sequências de terminação da transcrição para expressão em *Saccharomyces cerevisiae* incluem as sequências de terminação dos genes do fator α , GAPDH e CYC1.

As sequências de controlo da transcrição para expressar genes em leveduras metilotróficas incluem as regiões de controlo da transcrição dos genes que codificam a álcool-oxidase e a formato-desidrogenase.

A transfeção de uma molécula de ácido nucleico numa célula de levedura de acordo com o presente invento pode ser obtida por qualquer método mediante o qual uma molécula de ácido nucleico pode ser introduzida na célula e inclui, mas não está limitado a, difusão, transporte ativo, banho de ultrassons, eletroporação, microinjeção, lipofecção, adsorção e fusão de protoplastos. As moléculas de ácido nucleico transfetadas podem ser integradas num cromossoma da levedura ou mantidas em vetores extracromossómicos, utilizando técnicas conhecidas pelos peritos na especialidade. Os exemplos de veículos de levedura que transportam estas moléculas de ácido nucleico são aqui descritos em pormenor. Como discutido acima, um citoplasto de levedura, uma célula fantasma de levedura e partículas de membrana ou preparações da parede celular de levedura também podem ser produzidos de

modo recombinante por transfeção dos microrganismos intactos ou de esferoplastos de levedura com as moléculas de ácido nucleico desejadas, produzindo aí o antigénio, seguida de manipulação adicional dos microrganismos ou dos esferoplastos, usando técnicas conhecidas pelos peritos na especialidade, para produzir o citoplasto, a célula fantasma, o extrato de membrana subcelular de levedura ou suas frações contendo os antigénios desejados ou outras proteínas.

As condições eficazes para a produção de veículos de levedura recombinante e a expressão do antigénio e/ou outra proteína pelo veículo de levedura incluem um meio eficaz no qual uma estirpe de levedura pode ser crescida. Um meio eficaz é tipicamente um meio aquoso compreendendo fontes de hidratos de carbono, azoto e fosfato assimiláveis, bem como sais, minerais, metais e outros nutrientes apropriados, como vitaminas e fatores de crescimento. O meio poderá compreender nutrientes complexos ou poderá ser um meio mínimo definido. As estirpes de levedura do presente invento podem ser crescidas numa variedade de recipientes, incluindo, mas não limitados a, biorreatores, frascos Erlenmeyer, tubos de ensaio, placas de microtitulação e placas de Petri. A cultura é efetuada a uma temperatura, pH e teor de oxigénio apropriados para a estirpe de levedura. Tais condições de cultura encontram-se no âmbito da perícia de um perito na especialidade (ver, por exemplo, Guthrie et al. (eds.), 1991, *Methods in Enzymology*, vol. 194, Academic Press, San Diego). Por exemplo, num protocolo, as culturas líquidas contendo um meio adequado podem ser inoculadas usando culturas obtidas de placas iniciais e/ou culturas iniciais de composições de imunoterapia à base de levedura-Brachyury, e são crescidas durante aproximadamente 20 h a 30 °C, com agitação a 250 rpm. As culturas primárias podem depois ser expandidas para culturas maiores conforme desejado. A expressão da proteína a partir dos vetores com que as leveduras foram transformadas (por exemplo, expressão de Brachyury) poderá ser constitutiva se o promotor utilizado for um promotor constitutivo, ou poderá ser induzida por adição das condições de indução apropriadas para o promotor se o promotor utilizado for um promotor indutível (por exemplo, sulfato de cobre no caso do promotor *CUP1*). No caso de um promotor indutível, a indução da expressão da proteína poderá ser iniciada após a cultura

ter crescido até uma densidade celular adequada, que poderá ser de cerca de 0,2 Y.U./ml ou densidades superiores.

Um exemplo não limitativo de um meio adequado para a cultura de uma composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury do invento é o meio U2. O meio U2 compreende os seguintes componentes: 20 g/l de glucose; 6,7 g/l de Yeast Nitrogen Base (YNB) contendo sulfato de amónio e 0,04 mg/ml de cada um dos compostos histidina, leucina, triptofano e adenina. Outro exemplo não limitativo de um meio adequado para a cultura da composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury do invento é o meio UL2. O meio UL2 compreende os seguintes componentes: 20 g/l de glucose; 6,7 g/l de Yeast Nitrogen Base (YNB) contendo sulfato de amónio e 0,04 mg/ml de cada um dos compostos histidina, triptofano e adenina.

Numa concretização do invento, quando é utilizado um promotor indutível (por exemplo, o promotor *CUP1*) para expressar uma proteína Brachyury num veículo de levedura de acordo com o invento, a indução da expressão da proteína é iniciada a uma densidade celular superior à densidade celular que seria adequada para a maioria das proteínas expressas por levedura utilizando tal promotor. Mais especificamente, os presentes inventores constataram que a expressão ótima do antígeno de Brachyury controlada pelo promotor *CUP1* verifica-se quando se permite que as leveduras que expressam o antígeno de Brachyury cresçam até uma densidade celular de entre pelo menos 0,5 Y.U./ml e aproximadamente 2,0 Y.U./ml e, num aspeto, até entre 0,5 Y.U./ml e aproximadamente 1,5 Y.U./ml e, num aspeto, até entre pelo menos 1,0 Y.U./ml e cerca de 2,0 Y.U./ml e, noutro aspeto, até pelo menos cerca de 1,0 Y.U./ml, antes da indução da expressão do antígeno de Brachyury nas leveduras. Os presentes inventores constataram que, após a indução da expressão de Brachyury, as leveduras duplicarão apenas cerca de 1x a 1,5x. Além disso, após a indução da expressão de Brachyury, os inventores verificaram que o crescimento da levedura para densidades celulares superiores a cerca de 2,0 Y.U./ml, ou durante mais de cerca de 6-8 horas, resulta numa viabilidade reduzida das culturas, ao mesmo tempo que não melhora substancialmente a acumulação do antígeno na levedura. Por conseguinte, numa concretização

do invento, uma composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury em que a expressão do antigénio está sob o controlo de um promotor indutível, como o promotor *CUP1*, é crescida até meio da fase exponencial antes da indução da expressão do antigénio. Num aspeto, as células são crescidas até entre cerca de 1 e 2 Y.U./ml antes da indução da expressão do antigénio. Num aspeto, a expressão do antigénio é induzida (por exemplo, pela adição de sulfato de cobre) e continua durante até 6, 6,5; 7, 7,5 ou 8 horas. Num aspeto, a indução ocorre a uma temperatura de cerca de 30 °C e uma velocidade de agitação de 250 rpm.

Em algumas concretizações do invento, as leveduras são crescidas em condições de pH neutro. Tal como aqui empregue, a utilização geral do termo "pH neutro" refere-se a um intervalo de pH entre cerca de pH 5,5 e cerca de pH 8 e, num aspeto, entre cerca de pH 6 e cerca de 8. Um perito na especialidade compreenderá que podem ocorrer flutuações pequenas (por exemplo, décimas ou centésimas) ao efetuar medições com um medidor de pH. Como tal, a utilização de pH neutro para crescer as células de levedura significa que as células de levedura são crescidas a pH neutro durante a maior parte do tempo que estão em cultura. Numa concretização, as leveduras são crescidas num meio mantido a um valor de pH de pelo menos 5,5 (isto é, não é permitida a descida do pH do meio de cultura para um valor abaixo de pH 5,5). Noutro aspeto, as leveduras são crescidas a um pH mantido num valor de cerca de 6, 6,5; 7, 7,5 ou 8. A utilização de um pH neutro no crescimento das leveduras promove vários efeitos biológicos que constituem características desejáveis para a utilização das leveduras como veículos para imunomodulação. Por exemplo, a cultura da levedura a pH neutro permite um bom crescimento da levedura sem um efeito negativo no tempo de geração celular (por exemplo, abrandamento do tempo de duplicação). A levedura pode continuar a crescer para densidades elevadas sem perder a pliability da sua parede celular. A utilização de um pH neutro permite a produção de leveduras com paredes celulares pliables e/ou leveduras que são mais sensíveis às enzimas de digestão da parede celular (por exemplo, glucanase) a todas as densidades de colheita. Esta característica é desejável, pois as leveduras com paredes celulares flexíveis podem induzir respostas imunes

diferentes ou melhoradas em comparação com as leveduras crescidas em condições mais ácidas, por exemplo, promovendo a secreção de citocinas por células apresentadoras de antígeno que fagocitaram a levedura (por exemplo, citocinas do tipo TH1 incluindo, mas não limitadas a, IFN- γ , interleucina-12 (IL-12) e IL-2, assim como citocinas pró-inflamatórias como IL-6). Adicionalmente, estes métodos de cultura permitem uma maior acessibilidade aos antígenos localizados na parede celular. Noutro aspeto, a utilização de pH neutro para alguns antígenos permite a libertação do antígeno ligado via ligações dissulfureto por tratamento com ditioneitol (DTT), que não é possível quando essa levedura que expressa o antígeno é crescida em meios a pH mais baixo (por exemplo, pH 5).

Numa concretização, o controlo da quantidade de glicosilação da levedura é usado para controlar a expressão de antígenos pela levedura, particularmente à superfície. A quantidade de glicosilação da levedura pode afetar a imunogenicidade e a antigenicidade do antígeno, particularmente de um antígeno expresso à superfície, uma vez que os grupos açúcar tendem a ser volumosos. Assim, a existência de grupos açúcar à superfície da levedura e o seu impacto no espaço tridimensional à volta do(s) antígeno(s)-alvo devem ser aspetos considerados na modulação da levedura de acordo com o invento. É possível utilizar qualquer método para reduzir a quantidade de glicosilação da levedura (ou aumentá-la, se desejado). Por exemplo, poderia usar-se uma estirpe mutante de levedura que foi selecionada para ter pouca glicosilação (por exemplo, os mutantes *mnn1*, *och1* e *mnn9*) ou poderiam eliminar-se as sequências aceitadoras de glicosilação no antígeno-alvo por mutação. Em alternativa, poderia utilizar-se uma levedura com padrões de glicosilação abreviados, por exemplo *Pichia*. Também é possível tratar a levedura utilizando métodos que reduzem ou alteram a glicosilação.

Numa concretização do presente invento, como uma alternativa à expressão de um antígeno ou outra proteína de forma recombinante no veículo de levedura, um veículo de levedura é carregado intracelularmente com a proteína ou péptido, ou com hidratos de carbono ou outras moléculas que

atuam como um antigénio e/ou são úteis como agentes imunomoduladores ou modificadores da resposta biológica de acordo com o invento. Subsequentemente, o veículo de levedura, que agora contém o antigénio e/ou outras proteínas intracelularmente, pode ser administrado a um indivíduo ou introduzido num transportador como seja uma célula dendrítica. Os péptidos e as proteínas podem ser inseridos diretamente em veículos de levedura do presente invento por técnicas conhecidas pelos peritos na especialidade, por exemplo por difusão, transporte ativo, fusão de lipossomas, eletroporação, fagocitose, ciclos de congelação-descongelação e banho de ultrassons. Os veículos de levedura que podem ser carregados diretamente com péptidos, proteínas, hidratos de carbono ou outras moléculas incluem as leveduras intactas, assim como os esferoplastos, as células fantasma ou os citoplastos, que podem ser carregados com os antigénios e outros agentes após a produção. Em alternativa, a levedura intacta pode ser carregada com o antigénio e/ou agente e, em seguida, os esferoplastos, células fantasma, citoplastos ou partículas subcelulares podem ser preparados a partir dela. É possível introduzir qualquer número de antigénios e/ou outros agentes num veículo de levedura nesta concretização, de pelo menos 1, 2, 3, 4 ou qualquer número inteiro até centenas ou milhares de antigénios e/ou outros agentes, como aconteceria com o carregamento de um microrganismo ou partes dele, por exemplo.

Numa outra concretização do presente invento, um antigénio e/ou outro agente é ligado fisicamente ao veículo de levedura. A ligação física do antigénio e/ou outro agente ao veículo de levedura pode ser obtida por meio de qualquer método adequado na técnica, incluindo métodos de associação covalente e não covalente que incluem, embora não exclusivamente, a reticulação química do antigénio e/ou outro agente na superfície exterior do veículo de levedura ou a ligação biológica do antigénio e/ou outro agente na superfície exterior do veículo de levedura, por exemplo utilizando um anticorpo ou outro parceiro de ligação. A reticulação química pode ser obtida, por exemplo, por métodos que incluem a união com glutaraldeído, a marcação por fotoafinidade, o tratamento com carbodiimidas, o tratamento com reagentes capazes de estabelecer ligações dissulfureto e

o tratamento com outros reagentes de reticulação comuns na técnica. Em alternativa, é possível efetuar o contacto do veículo de levedura com um reagente que altera a carga da bicamada lipídica da membrana da levedura ou a composição da parede celular, de forma a aumentar a propensão da superfície exterior da levedura para se fundir com, ou ligar a, antigénios e/ou outros agentes com características de carga particulares. Agentes de direcionamento como anticorpos, péptidos de ligação, recetores solúveis e outros ligandos também poderão ser incorporados num antigénio como uma proteína de fusão, ou associados de outra forma a um antigénio, para a ligação do antigénio ao veículo de levedura.

Quando o antigénio ou outra proteína é expresso ou ligado fisicamente à superfície da levedura, num aspeto, poderão selecionar-se cuidadosamente braços espaçadores para otimizar a expressão ou o teor do antigénio ou outra proteína à superfície. O tamanho do(s) braço(s) espaçador(es) pode afetar que quantidade do antigénio ou outra proteína está exposta para ligação à superfície da levedura. Assim, dependendo dos antigénio(s) ou outra(s) proteína(s) que estão a ser usados, um perito na especialidade selecionará um braço espaçador que proporcione um espaçamento apropriado para o antigénio ou outra proteína à superfície da levedura. Numa concretização, o braço espaçador é uma proteína de levedura possuindo pelo menos 450 aminoácidos. Os braços espaçadores foram discutidos em pormenor acima.

Noutra concretização ainda, o veículo de levedura e o antigénio ou outra proteína são associados um ao outro por um mecanismo de ligação mais passivo, não específico ou não covalente, como seja a mistura suave do veículo de levedura com o antigénio ou outra proteína num tampão ou outra formulação adequada (por exemplo, mistura).

Numa concretização, a levedura intacta (com ou sem expressão de antigénios ou outras proteínas heterólogos) pode ser pulverizada ou processada de maneira a produzir preparações da parede celular de levedura, partículas de membrana de levedura ou fragmentos de levedura (isto é, levedura não intacta), e os fragmentos de levedura podem, em

algumas concretizações, ser fornecidos ou administrados juntamente com outras composições que incluem antigénios (por exemplo, vacinas de ADN, vacinas subunitárias de proteínas, organismos patogénicos mortos ou inativados, vacinas de vetores virais) para melhorar as respostas imunes. Por exemplo, é possível utilizar um tratamento enzimático, um tratamento químico ou uma força física (por exemplo, rutura mecânica ou ultrassons) para fragmentar a levedura em partes que são usadas como um adjuvante.

Numa concretização do invento, os veículos de levedura úteis no invento incluem veículos de levedura que foram mortos ou inativados. A morte ou inativação da levedura pode ser obtida por qualquer um de vários métodos adequados conhecidos na técnica. Por exemplo, a inativação da levedura pelo calor é uma forma convencional de inativar as leveduras, e um perito na especialidade pode monitorizar as alterações estruturais do antigénio-alvo, se desejado, mediante métodos padrão conhecidos na técnica. Em alternativa, podem usar-se outros métodos de inativação das leveduras, tais como métodos químicos, elétricos, radioativos ou via UV. Ver, por exemplo, a metodologia divulgada em manuais de referência de cultura de leveduras, como Methods of Enzymology, Vol. 194, Cold Spring Harbor Publishing (1990). Qualquer das estratégias de inativação usada deve ter em atenção a estrutura secundária, terciária ou quaternária do antigénio-alvo e preservar essa estrutura de modo a otimizar a sua imunogenicidade.

Os veículos de levedura podem ser formulados em composições ou produtos de imunoterapia à base de levedura do presente invento usando várias técnicas conhecidas pelos peritos na especialidade. Por exemplo, os veículos de levedura podem ser secos por liofilização. As formulações compreendendo veículos de levedura também podem ser preparadas por compressão da levedura num bolo ou bloco, como é feito para as leveduras usadas em operações de panificação e produção de cerveja. Além disso, os veículos de levedura podem ser misturados com um excipiente farmacologicamente aceitável, como um tampão isotónico que é tolerado por um hospedeiro ou célula hospedeira. Os exemplos de semelhantes excipientes incluem água, soro fisiológico, solução de Ringer, solução de dextrose, solução de Hank e outras

soluções aquosas de sais equilibradas fisiologicamente. Também se poderão utilizar veículos não aquosos, tais como óleos fixos, óleo de sésamo, oleato de etilo ou triglicéridos. Outras formulações úteis incluem suspensões contendo agentes de melhoramento da viscosidade, como carboximetilcelulose de sódio, sorbitol, glicerol ou dextrano. Os excipientes também podem conter pequenas quantidades de aditivos, tais como substâncias que melhoram a isotonicidade e a estabilidade química. Os exemplos de tampões incluem tampão fosfato, tampão bicarbonato e tampão Tris, enquanto os exemplos de conservantes incluem timerosal, m- ou c-cresol, formalina e álcool benzílico. As formulações padrão podem ser líquidos injetáveis ou sólidos que podem ser adicionados a um líquido apropriado como uma suspensão ou solução para injeção. Assim, numa formulação não líquida, o excipiente pode compreender, por exemplo, dextrose, albumina sérica humana e/ou conservantes, aos quais se pode adicionar água ou soro fisiológico estéreis antes da administração.

Numa concretização do presente invento, uma composição pode incluir agentes adicionais, que também poderão ser designados por compostos modificadores da resposta biológica, ou a capacidade de produzir esses agentes/modificadores. Por exemplo, um veículo de levedura pode ser transfetado ou carregado com pelo menos um antigénio e pelo menos um agente/composto modificador da resposta biológica, ou uma composição do invento pode ser administrada em conjunção com pelo menos um agente/modificador da resposta biológica. Os modificadores da resposta biológica incluem adjuvantes e outros compostos que podem modular as respostas imunes, e que poderão ser designados por compostos imunomoduladores, assim como compostos que modificam a atividade biológica de outro composto ou agente, como um composto imunoterapêutico à base de levedura, em que essa atividade biológica não está limitada a efeitos no sistema imunitário. Determinados compostos imunomoduladores podem estimular uma resposta imune protetora, ao passo que outros podem suprimir uma resposta imune prejudicial, e o facto de um imunomodulador ser ou não útil em combinação com um dado composto imunoterapêutico à base de levedura poderá depender, pelo menos em parte, da doença ou perturbação a tratar ou prevenir e/ou do indivíduo que será tratado. Determinados modificadores da resposta

biológica reforçam preferencialmente uma resposta imune mediada por células, enquanto outros reforçam preferencialmente uma resposta imune humoral (isto é, podem estimular uma resposta imune na qual existe um maior nível de imunidade mediada por células em comparação com imunidade humoral, ou vice-versa). Determinados modificadores da resposta biológica têm uma ou mais propriedades em comum com as propriedades biológicas dos compostos imunoterapêuticos à base de levedura ou reforçam ou complementam as propriedades biológicas dos compostos imunoterapêuticos à base de levedura. Há várias técnicas conhecidas pelos peritos na especialidade para medir a estimulação ou supressão das respostas imunes, bem como para diferenciar respostas imunes mediadas por células de respostas imunes humorais e para diferenciar um tipo de resposta mediada por células de outro tipo (por exemplo, uma resposta de Th17 versus uma resposta de Th1).

Os agentes/modificadores da resposta biológica úteis no invento poderão incluir, mas não estão limitados a, citocinas, quimiocinas, hormonas, derivados lipídicos, péptidos, proteínas, polissacarídeos, fármacos do tipo pequenas moléculas, anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antigénio (incluindo, mas não limitados a, anticorpos anti-citocinas, anticorpos anti-recetores de citocinas, anticorpos anti-quimiocinas), vitaminas, polinucleótidos, grupos de ligação a ácidos nucleicos, aptâmeros e moduladores do crescimento. Alguns agentes adequados incluem, mas não estão limitados a, IL-1 ou agonistas de IL-1 ou de IL-1R, anti-IL-1 ou outros antagonistas de IL-1; IL-6 ou agonistas de IL-6 ou de IL-6R, anti-IL-6 ou outros antagonistas de IL-6; IL-12 ou agonistas de IL-12 ou de IL-12R, anti-IL-12 ou outros antagonistas de IL-12; IL-17 ou agonistas de IL-17 ou de IL-17R, anti-IL-17 ou outros antagonistas de IL-17; IL-21 ou agonistas de IL-21 ou de IL-21R, anti-IL-21 ou outros antagonistas de IL-21; IL-22 ou agonistas de IL-22 ou de IL-22R, anti-IL-22 ou outros antagonistas de IL-22; IL-23 ou agonistas de IL-23 ou de IL-23R, anti-IL-23 ou outros antagonistas de IL-23; IL-25 ou agonistas de IL-25 ou de IL-25R, anti-IL-25 ou outros antagonistas de IL-25; IL-27 ou agonistas de IL-27 ou de IL-27R, anti-IL-27 ou outros antagonistas de IL-27; interferão tipo I (incluindo IFN- α) ou

agonistas ou antagonistas do interferão tipo I ou de um seu recetor; interferão tipo II (incluindo IFN- γ) ou agonistas ou antagonistas do interferão tipo II ou de um seu recetor; anti-CD40, CD40L, proteína do gene de ativação de linfócitos 3 (LAG3) e/ou IMP321 (fator imunoestimulador de células T derivado da forma solúvel de LAG3), anticorpo anti-CTLA-4 (por exemplo, para libertar células T anérgicas); coestimuladores de células T (por exemplo, anti-CD137, anti-CD28, anti-CD40); alemtuzumab (por exemplo, CamPath®), diftitox denileucina (por exemplo, ONTAK®); anti-CD4; anti-CD25; anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-PD-L2; agentes que bloqueiam FOXP3 (por exemplo, para repelir a atividade/matar as células T reguladoras CD4+/CD25+); ligando de Flt3, imiquimod (Aldara™), fator de estimulação das colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF); fator de estimulação das colónias de granulócitos (G-CSF), sargramostim (Leukine®); hormonas incluindo, sem limitação, prolactina e hormona de crescimento; agonistas dos recetores do tipo Toll (TLR), incluindo, mas não limitados a, agonistas de TLR-2, agonistas de TLR-4, agonistas de TLR-7 e agonistas de TLR-9; antagonistas de TLR, incluindo, mas não limitados a, antagonistas de TLR-2, antagonistas de TLR-4, antagonistas de TLR-7 e antagonistas de TLR-9; agentes anti-inflamatórios e imunomoduladores, incluindo, mas não limitados a, inibidores da COX-2 (por exemplo, Celecoxib, AINE), glucocorticoides, estatinas, talidomida e seus análogos, incluindo IMiD™ (que são análogos estruturais e funcionais da talidomida (por exemplo, REVLIMID® (lenalidomida), ACTIMID® (pomalidomida)); agentes pró-inflamatórios, tais como componentes fúngicos ou bacterianos ou qualquer citocina ou quimiocina pró-inflamatória; vacinas imunoterapêuticas, incluindo, mas não limitadas a, vacinas à base de vírus, vacinas à base de bactérias ou vacinas à base de anticorpos; e quaisquer outros imunomoduladores, imunopotenciadores, agentes anti-inflamatórios, agentes pró-inflamatórios e quaisquer agentes que modulem o número de, modulem o estado de ativação de, e/ou modulem a sobrevivência das células apresentadoras de antígeno ou das células Th17, Th1 e/ou Treg. Qualquer combinação desses agentes está contemplada pelo invento, e quaisquer desses agentes combinados ou administrados num protocolo (por exemplo, simultaneamente, sequencialmente ou noutros formatos) com um composto imunoterapêutico à base de

levedura é uma composição abrangida pelo invento. Tais agentes são bem conhecidos na técnica. Estes agentes poderão ser usados sozinhos ou em combinação com outros agentes aqui descritos.

Os agentes podem incluir agonistas e antagonistas de uma dada proteína, péptido ou seu domínio. Tal como aqui utilizado, um "agonista" é qualquer composto ou agente, incluindo, sem limitação, pequenas moléculas, proteínas, péptidos, anticorpos, agentes de ligação a ácidos nucleicos, etc., que se liga a um recetor ou ligando e produz ou desencadeia uma resposta, e que poderá incluir agentes que mimetizam ou reforçam a ação de uma substância que existe naturalmente e que se liga ao recetor ou ligando. Um "antagonista" é qualquer composto ou agente, incluindo, sem limitação, pequenas moléculas, proteínas, péptidos, anticorpos, agentes de ligação a ácidos nucleicos, etc., que bloqueia ou inibe ou reduz a ação de um agonista.

As composições do invento podem ainda incluir ou ser administradas (em simultâneo, sequencialmente ou de forma intermitente) com quaisquer outros agentes ou composições ou protocolos que são úteis para prevenir ou tratar um cancro ou quaisquer compostos que tratam ou melhoram qualquer sintoma de um cancro, e particularmente de cancros associados à expressão ou sobreexpressão de Brachyury. Além disso, as composições do invento podem ser usadas juntamente com outras composições imunoterapêuticas, incluindo imunoterapia profilática e/ou terapêutica. De facto, as composições do invento podem ser usadas para inibir ou reduzir a resistência à quimioterapia ou a resistência à radiação que poderá surgir no cancro metastático através da inibição da expressão de Brachyury no cancro (e inibindo assim as influências antiproliferativas) ou as composições do invento poderão melhorar o desempenho da quimioterapia ou da radioterapia num indivíduo. Os agentes, composições ou protocolos (por exemplo, protocolos terapêuticos) adicionais que são úteis para o tratamento do cancro incluem, mas não estão limitados a, quimioterapia, ressecção cirúrgica de um tumor, radioterapia, transplante de células-tronco alogénicas ou autólogas e/ou terapias dirigidas contra o cancro (por exemplo, fármacos do tipo pequenas moléculas, compostos

biológicos ou terapias com anticorpos monoclonais que visam especificamente moléculas envolvidas no crescimento e progressão tumoral, incluindo, mas não limitados a, moduladores seletivos dos recetores de estrogénio (SERM de *selective estrogen receptor modulator*), inibidores da aromatase, inibidores das tirosina-cinases, inibidores das serina/treonina-cinases, inibidores das desacetilases de histonas (HDAC), ativadores dos recetores de retinoides, estimuladores da apoptose, inibidores da angiogénese, inibidores da poli(ADP-ribose)-polimerase (PARP) ou imunoestimuladores). Quaisquer destes agentes terapêuticos e/ou protocolos terapêuticos adicionais poderão ser administrados antes, em simultâneo com, alternando com, ou após as composições de imunoterapia do invento, ou em diferentes momentos temporais. Por exemplo, quando administradas a um indivíduo em conjunção com quimioterapia ou uma terapia dirigida, poderá ser desejável administrar as composições de imunoterapia à base de levedura-Brachyury durante o "hiato" entre as doses de quimioterapia ou terapia dirigida, de forma a maximizar a eficácia das composições de imunoterapia. Com frequência, a ressecção cirúrgica de um tumor poderá preceder a administração de uma composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury, embora possa haver uma cirurgia adicional ou primária durante ou após a administração de uma composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury.

O invento também inclui um conjunto compreendendo qualquer uma das composições aqui descritas ou quaisquer dos componentes individuais das composições aqui descritas. Os conjuntos poderão incluir reagentes adicionais e instruções ou indicações escritas para utilizar qualquer uma das composições do invento para prevenir ou tratar um cancro associado à expressão ou sobreexpressão de Brachyury.

Métodos para administração ou utilização das composições do invento

As composições imunoterapêuticas de levedura-Brachyury do invento são concebidas para utilização na prevenção ou tratamento de cancros que estão associados à expressão ou sobreexpressão de Brachyury ou são caracterizados por

expressão ou sobreexpressão de Brachyury, incluindo através da prevenção da emergência de tais cancros, detendo a progressão de tais cancros ou eliminando tais cancros. Mais particularmente, as composições imunoterapêuticas de levedura-Brachyury podem ser usadas para prevenir, inibir ou atrasar o desenvolvimento de tumores que expressam Brachyury e/ou prevenir, inibir ou atrasar a migração do tumor e/ou a invasão por parte do tumor de outros tecidos (metástases) e/ou, de um modo geral, prevenir ou inibir a progressão do cancro num indivíduo. As composições imunoterapêuticas de levedura-Brachyury também podem ser usadas para melhorar pelo menos um sintoma do cancro, por exemplo reduzindo a carga tumoral no indivíduo; inibindo o crescimento tumoral no indivíduo; aumentando a sobrevivência do indivíduo; prevenindo, inibindo, invertendo ou atrasando o desenvolvimento da migração do tumor e/ou da invasão por parte do tumor de outros tecidos (cancro metastático) e/ou prevenindo, inibindo, invertendo ou atrasando a progressão do cancro no indivíduo. A imunoterapia à base de levedura-Brachyury também pode ser usada terapeuticamente para inibir, reduzir ou eliminar a resistência à quimioterapia ou a resistência à radiação que poderá surgir no cancro metastático através da inibição da expressão de Brachyury no cancro, e as composições do invento poderão melhorar o desempenho da quimioterapia ou da radioterapia num indivíduo.

Os cancros que são relevantes para as composições e métodos do invento consistem em qualquer cancro que expressa, ou pode expressar, Brachyury, ou cancros na proximidade de cancros que expressam ou podem expressar Brachyury, e incluem, mas não estão limitados a, cancro da mama, intestino delgado, estômago, rim, bexiga, útero, ovário, testículo, pulmão, cólon, pâncreas ou próstata, e incluem cancros metastáticos e em fase tardia. Além disso, o Brachyury é expresso em tumores com origem nas células B, como a leucemia linfocítica crónica (LLC), células B transformadas com o vírus de Epstein-Barr e linfomas de Burkitt e Hodgkin, assim como respetivos cancros metastáticos.

Uma concretização do invento refere-se a um método para inibir a migração do tumor e/ou reduzir, deter, inverter ou prevenir a progressão metastática do cancro num indivíduo que

tem um cancro, ou inverter o desenvolvimento de eventos metastáticos num cancro. Como discutido acima, o Brachyury promove a transição epitelial-mesenquimal (EMT) em células de tumores humanos, conferindo às células tumorais um fenótipo mesenquimal, bem como capacidades migratórias e invasivas, ao mesmo tempo que atenua a progressão do ciclo celular do tumor. Por conseguinte, o envolvimento de Brachyury em processos metastáticos faz dele um alvo ideal para a prevenção ou inibição dos processos metastáticos, incluindo a paragem do cancro num estágio pré-metastático. A utilização de uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury do invento pode ser eficaz para prevenir ou tratar um cancro metastático, incluindo deter a progressão do cancro, perante a fuga (ou fuga tentada) do cancro à terapia tradicional, como a quimioterapia e a radiação. O método inclui os passos de administrar ao indivíduo que tem um cancro uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury do invento como aqui descrita, que inclui, mas não está limitada a: (a) um veículo de levedura e (b) um antigénio do cancro compreendendo pelo menos um antigénio de Brachyury.

Num aspeto, o Brachyury não é detetado no cancro do indivíduo no momento em que a composição é administrada pela primeira vez. Em geral, quando o Brachyury não é detetado no cancro do indivíduo, o indivíduo poderá ter um cancro em fase inicial em que a expressão de Brachyury ainda não se manifestou (por exemplo, estágio I ou estágio II) ou em que a expressão de Brachyury em todo o caso ainda não é detetável (isto é, o Brachyury poderá ou não ser expresso num nível baixo ou num pequeno número de células tumorais, mas ainda não é facilmente detetável utilizando métodos de deteção convencionais). Neste aspeto do invento, o desenvolvimento de células tumorais expressando Brachyury é prevenido, atrasado ou inibido mediante utilização da composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury. Como resultado, a migração do tumor e/ou outros processos metastáticos conducentes à progressão metastática do tumor são prevenidos, atrasados ou inibidos e/ou verifica-se uma paragem geral da progressão do tumor no indivíduo.

Noutro aspeto, a expressão de Brachyury é ou pode ser detetada no cancro do indivíduo no momento em que a

composição é administrada pela primeira vez. O indivíduo poderá ter um cancro de estágio I, estágio II, estágio III ou estágio IV neste aspeto do invento. Neste aspeto, a utilização da composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury reduz, elimina, abranda ou detém o crescimento de tumores que expressam Brachyury, o que pode resultar em redução da carga tumoral no indivíduo, inibição do crescimento do tumor que expressa Brachyury e/ou maior sobrevivência do indivíduo. O indivíduo poderá experimentar uma paragem, abrandamento ou inversão dos processos metastáticos, melhorando a sobrevivência e a saúde do doente e, além disso, permitindo a utilização de outros protocolos terapêuticos para tratar o cancro.

De facto, o cancro metastático pode estar associado a uma resistência, ou maior resistência, a terapias do cancro como a quimioterapia, a radiação ou a terapia dirigida, em que o cancro "escapa" à terapia ou é simplesmente menos afetado pela terapia e progride. Por conseguinte, existe a necessidade de reduzir ou eliminar a resistência a estas terapias, de modo a melhorar ou reforçar a eficácia da terapia e melhorar a saúde e a sobrevivência do doente. Assim, uma concretização do invento refere-se a um método para reduzir ou prevenir a resistência à quimioterapia, a resistência à terapia dirigida ou a resistência à radiação num doente com cancro. O método compreende administrar a um indivíduo que tem um cancro e está a receber quimioterapia e/ou radioterapia para o cancro uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury como aqui descrita, que poderá incluir uma composição compreendendo: (a) um veículo de levedura e (b) um antigénio do cancro compreendendo pelo menos um antigénio de Brachyury. Este método do invento também poderá ser usado para tratar a resistência associada a outros tratamentos terapêuticos para o cancro, incluindo, mas não exclusivamente, a terapia dirigida.

Num aspeto desta concretização, o Brachyury não é detetado no cancro do indivíduo no momento em que a composição é administrada pela primeira vez. Neste aspeto, a administração de uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury previne ou inibe o começo da resistência à

quimioterapia ou à radioterapia mediante a inibição do desenvolvimento de células tumorais expressando Brachyury no cancro. Noutro aspeto, a expressão de Brachyury é detetada no cancro do indivíduo no momento em que a composição é administrada pela primeira vez. Neste aspeto, o indivíduo poderá ou não já estar a experimentar resistência à quimioterapia ou à radiação. Em qualquer dos casos, a administração da composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury do invento previne ou inibe a resistência à quimioterapia ou à radioterapia ou melhora a capacidade da quimioterapia ou da radioterapia para tratar o indivíduo, reduzindo ou eliminando as células tumorais que expressam Brachyury no doente.

Outra concretização do invento refere-se a um método para tratar um cancro e, em particular, um cancro que expressa Brachyury. O método inclui administrar a um indivíduo que tem um cancro que expressa Brachyury uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury aqui descrita, que pode incluir uma composição compreendendo: (a) um veículo de levedura e (b) um antigénio do cancro compreendendo pelo menos um antigénio de Brachyury. Num aspeto, o método reduz a carga tumoral no doente. Num aspeto, o método aumenta a sobrevivência do doente. Num aspeto, o método inibe o crescimento do tumor no indivíduo. Num aspeto, o método previne, detém ou inverte a progressão metastática do tumor.

Como se crê que a expressão de Brachyury é mais prevalente à medida que um cancro avança ou progride para estádios mais elevados (por exemplo, do estágio I para o estágio II para o estágio III para o estágio IV, dependendo do cancro particular) e está associado a processos metastáticos, uma concretização do invento consiste em fornecer um método para prevenir ou atrasar o começo de um cancro que expressa Brachyury, ou deter o cancro num estágio pré-metastático ou pré-maligno. Tal método inclui administrar a um indivíduo no qual não são detetadas células cancerosas expressando Brachyury uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury aqui descrita, que pode incluir uma composição compreendendo: (a) um veículo de levedura e (b) um antigénio do cancro compreendendo pelo menos um antigénio de

Brachyury. Num aspeto desta concretização, sabe-se que o cancro expressa ou crê-se que seja suscetível de expressar Brachyury nalgum estágio do cancro, em pelo menos um subconjunto de indivíduos com o cancro. Num aspeto desta concretização, o indivíduo já tem um cancro, mas não é detetado Brachyury no cancro no momento em que a composição é administrada pela primeira vez, o que significa que o indivíduo poderá ter um cancro em fase inicial no qual a expressão de Brachyury ainda não se manifestou ou no qual a expressão de Brachyury em todo o caso ainda não é detetável (isto é, o Brachyury poderá ou não ser expresso num nível baixo ou num pequeno número de células tumorais, mas ainda não é facilmente detetável utilizando métodos de deteção convencionais). Em alguns casos, o tipo de cancro poderá ser conhecido por ter uma velocidade de progressão metastática elevada. Neste aspeto, a administração da composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury previne, atrasa ou inibe o desenvolvimento de células tumorais que expressam Brachyury no cancro do doente e, por conseguinte, previne, detém, atrasa ou inibe os processos metastáticos que acompanham a expressão de Brachyury. Noutro aspeto, o indivíduo não tem um cancro quando a composição é administrada. Este indivíduo poderá ter uma "predisposição" ou ser suscetível de desenvolver um cancro, talvez devido ao historial familiar ou a um marcador genético, ou porque o indivíduo apresentou sinais de células ou lesões pré-cancerosas ou possui células ou lesões pré-cancerosas (pré-malignas).

Num aspeto, o indivíduo é adicionalmente tratado com pelo menos um outro composto terapêutico ou protocolo terapêutico útil para o tratamento do cancro. Tais agentes e protocolos terapêuticos foram discutidos em pormenor noutros locais desta divulgação. Por exemplo, em qualquer uma das concretizações referentes a métodos do invento aqui descritas, num aspeto, quando o indivíduo tem um cancro (independentemente do estado da expressão detetável de Brachyury nas células do tumor), o indivíduo está a ser tratado ou foi tratado com outra terapia para o cancro. Essa terapia pode incluir qualquer um dos protocolos terapêuticos aqui descritos ou a utilização de qualquer composto ou agente terapêutico previamente aqui descrito, incluindo, mas não

exclusivamente, a quimioterapia, a radioterapia, a terapia dirigida, a ressecção cirúrgica de um tumor, a transferência de células-tronco, a terapia com citocinas, a transferência adotiva de células T e/ou a administração de uma segunda composição imunoterapêutica. No caso da administração de uma segunda composição imunoterapêutica, tais composições poderão incluir, mas não estão limitadas a, composições de imunoterapia à base de levedura adicionais, composições de imunoterapia à base de vírus recombinantes (vetores virais), terapia com citocinas, terapia imunoestimuladora (incluindo a quimioterapia com propriedades imunoestimuladoras), vacinas de ADN e outras composições de imunoterapia.

Num aspeto, a segunda composição imunoterapêutica inclui um segundo antígeno do cancro que não compreende um antígeno de Brachyury. Por exemplo, uma segunda composição imunoterapêutica útil em combinação com uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury é uma composição imunoterapêutica à base de levedura compreendendo outro antígeno do cancro. Esses antígenos do cancro poderão incluir, mas não estão limitados a, antígeno carcinoembrionário (CEA), oncoproteína Ras com mutações pontuais, MUC-1, EGFR, BCR-Abl, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, oncoproteínas p53 normais e com mutações pontuais, PSMA, tirosinase, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erb/B2, hTERT, p73, B-Raf, APC (adenomatous polyposis coli), Myc, proteína von Hippel-Lindau (VHL), Rb-1, Rb-2, recetor de androgénios (AR), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ews-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, mesotelina, NGEP, modificações destes antígenos, variantes de *splice* destes antígenos e epitopos agonistas destes antígenos, assim como combinações destes antígenos e/ou seus domínios imunogénicos, suas modificações, suas variantes e/ou seus epitopos agonistas.

Tal como aqui utilizado, "tratar" um cancro, ou qualquer sua permutação (por exemplo, "tratado em termos de cancro", etc.), refere-se geralmente a administrar uma composição do invento uma vez o cancro presente (por exemplo, uma vez o cancro diagnosticado ou detetado num indivíduo), com pelo menos um objetivo terapêutico do tratamento (em comparação com a ausência deste tratamento) incluindo: redução da carga

tumoral, inibição do crescimento do tumor, aumento da sobrevivência do indivíduo, atraso, inibição, paragem ou prevenção do começo ou do desenvolvimento do cancro metastático (por exemplo, atrasando, inibindo, detendo ou prevenindo o começo do desenvolvimento da migração do tumor e/ou da invasão por parte do tumor de tecidos fora do cancro primário e/ou outros processos associados à progressão metastática do cancro), atraso ou paragem da progressão do cancro, melhoria das respostas imunes contra o tumor, melhoria das respostas imunes de memória a longo prazo contra os antigénios do tumor e/ou melhor saúde geral do indivíduo. "Prevenir" ou "proteger" contra um cancro, ou qualquer sua permutação (por exemplo, "prevenção do cancro", etc.), refere-se geralmente a administrar uma composição do invento antes do surgimento de um cancro, ou antes de ocorrer um estágio específico do cancro ou a expressão de um antigénio tumoral no cancro (por exemplo, antes de a expressão de Brachyury ser detetada no cancro), com pelo menos um objetivo do tratamento (em comparação com a ausência deste tratamento) incluindo: prevenir ou atrasar o começo ou o desenvolvimento de um cancro ou, caso o cancro surja após o tratamento, pelo menos reduzir a gravidade do cancro (por exemplo, reduzir o nível de crescimento do tumor, deter a progressão do cancro, melhorar a resposta imune contra o cancro, inibir os processos metastáticas) ou melhorar os resultados no indivíduo (por exemplo, melhorar a sobrevivência).

O presente invento inclui a entrega (administração, imunização) de uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury do invento a um sujeito ou indivíduo. O processo de administração pode ser realizado *ex vivo* ou *in vivo*, mas é tipicamente realizado *in vivo*. A administração *ex vivo* refere-se a efetuar parte do passo regulador fora do doente, por exemplo administrar uma composição do presente invento a uma população de células (células dendríticas) removidas de um doente, em condições que permitem que um veículo de levedura, antigénio(s) e quaisquer outros agentes ou composições sejam carregados na célula, e devolver as células ao doente. A composição terapêutica do presente invento pode ser devolvida a um doente, ou administrada a um doente, por meio de qualquer modo de administração adequado.

A administração de uma composição pode ser sistémica, mucosal e/ou proximal à localização do local-alvo (por exemplo, próximo de um local de um tumor). As vias de administração adequadas serão evidentes para os peritos na especialidade, dependendo do tipo de cancro que se pretende prevenir ou tratar e/ou da população de células-alvo ou tecido-alvo. Os vários métodos de administração aceitáveis incluem, mas não estão limitados a, administração intravenosa, administração intraperitoneal, administração intramuscular, administração intranodular, administração intracoronária, administração intra-arterial (por exemplo, numa artéria carótida), administração subcutânea, entrega transdérmica, administração intratraqueal, administração intra-articular, administração intraventricular, inalação (por exemplo, aerossol), administração intracraniana, intraespinal, intraocular, auricular, intranasal, oral, pulmonar, impregnação de um cateter e injeção direta num tecido. Num aspeto, as vias de administração incluem: intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intradérmica, intranodular, intramuscular, transdérmica, inalação, intranasal, oral, intraocular, intra-articular, intracraniana e intraespinal. A entrega parentérica pode incluir as vias intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapleural, intrapulmonar, intravenosa, subcutânea, cateter auricular e cateter venoso. A entrega auricular pode incluir gotas para o ouvido, a entrega intranasal pode incluir gotas para o nariz ou injeção intranasal e a entrega intraocular pode incluir gotas oftálmicas. A entrega via aerossol (inalação) também pode ser efetuada usando métodos convencionais na técnica (ver, por exemplo, Stribling et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 189:11277-11281, 1992). Num aspeto, uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury do invento é administrada por via subcutânea. Num aspeto, a composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury é administrada diretamente num ambiente tumoral.

Em geral, uma dose única adequada de uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury é uma dose que é capaz de fornecer eficazmente um veículo de levedura e o antigénio de Brachyury a um dado tipo de células, tecido ou região do corpo do doente, numa quantidade eficaz para provocar uma resposta imune específica para antigénio contra um ou mais

antigénios ou epitopos de Brachyury, quando administrada uma ou mais vezes ao longo de um período de tempo adequado. Por exemplo, numa concretização, uma dose única de uma composição de levedura-Brachyury do presente invento é de cerca de 1×10^5 a cerca de 5×10^7 equivalentes de células de levedura por quilograma de peso corporal do organismo ao qual a composição está a ser administrada. Num aspeto, uma dose única de um veículo de levedura do presente invento é de cerca de 0,1 Y.U. (Yeast Unit - unidade de levedura; que são 1×10^6 células de levedura ou equivalentes de células de levedura) a cerca de 100 Y.U. (1×10^9 células) por dose (isto é, por organismo), incluindo qualquer dose intermédia, em incrementos de $0,1 \times 10^6$ células (isto é, $1,1 \times 10^6$; $1,2 \times 10^6$; $1,3 \times 10^6$...). Numa concretização, uma dose adequada inclui doses entre 1 Y.U. e 40 Y.U. e, num aspeto, entre 10 Y.U. e 40 Y.U. Numa concretização, as doses são administradas em diferentes locais no indivíduo, mas durante o mesmo período posológico. Por exemplo, uma dose de 40 Y.U. poderá ser administrada mediante a injeção de doses de 10 Y.U. em quatro locais diferentes no indivíduo durante um período posológico. O invento inclui a administração de uma quantidade da composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 Y.U. ou mais) em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais locais diferentes num indivíduo para formar uma dose única. Uma Y.U. (unidade de levedura) são 1×10^7 células de levedura ou equivalentes de células de levedura.

Os "reforços" de uma composição terapêutica são administrados, por exemplo, quando a resposta imune contra o antigénio enfraqueceu ou conforme necessário para proporcionar uma resposta imune ou induzir uma resposta de memória contra um antigénio ou antigénios particulares. Os reforços podem ser administrados com cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 semanas de intervalo, ou mensalmente, bimensalmente, trimestralmente, anualmente e/ou em incrementos de alguns ou de vários anos após a administração original, dependendo do estado do indivíduo em tratamento e do objetivo da terapia no momento da administração (por exemplo, profilático, tratamento ativo, manutenção). Numa concretização, um regime de administração é um regime no qual

doses da composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury são administradas pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais vezes ao longo de um período de tempo de semanas, a meses, a anos. Numa concretização, as doses são administradas semanalmente ou a cada duas semanas para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais doses, seguido de doses a cada duas semanas ou mensalmente consoante necessário para obter o tratamento preventivo ou terapêutico desejado para o cancro. Podem depois administrar-se reforços adicionais a intervalos similares ou mais prolongados (meses ou anos) como uma terapia de manutenção ou de remissão, se desejado.

Num aspeto do invento, um ou mais agentes terapêuticos ou protocolos terapêuticos adicionais são administrados ou realizados sequencialmente e/ou em simultâneo com a administração da composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury (por exemplo, ressecção cirúrgica do tumor, administração de quimioterapia, administração de radioterapia, administração de outra composição ou protocolo de imunoterapia, terapia com citocinas, transferência adotiva de células T ou transplante de células-tronco). Por exemplo, uma ou mais terapias podem ser administradas ou realizadas antes da administração da primeira dose da composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury ou após a administração da primeira dose. Numa concretização, uma ou mais terapias podem ser administradas ou realizadas de modo alternado com a administração da composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury, por exemplo num protocolo em que a composição de levedura-Brachyury é administrada a intervalos prescritos entre uma ou mais doses consecutivas de quimioterapia ou outra terapia. Numa concretização, a composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury é administrada numa ou mais doses ao longo de um período de tempo antes do início das terapias adicionais. Por outras palavras, a composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury é administrada como uma monoterapia durante um período de tempo e depois junta-se uma terapia adicional (por exemplo, quimioterapia), quer em simultâneo com novas doses da imunoterapia à base de levedura-Brachyury, quer de uma forma alternada com a imunoterapia à base de levedura-Brachyury. Em alternativa ou adicionalmente, poderá administrar-se outra terapia durante um período de tempo antes do início da

administração da composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury, e os conceitos poderão ser combinados (por exemplo, ressecção cirúrgica de um tumor, seguida de monoterapia com imunoterapia à base de levedura-Brachyury durante varias semanas, seguida de doses alternadas de quimioterapia e de imunoterapia à base de levedura-Brachyury durante semanas ou meses, opcionalmente seguida de monoterapia usando imunoterapia à base de levedura-Brachyury ou outra terapia, ou de um novo protocolo de combinações de terapia fornecidas sequencialmente, em simultâneo ou de forma alternada). O invento contempla vários protocolos para o tratamento de um cancro utilizando imunoterapia à base de levedura-Brachyury, e estes exemplos devem ser considerados exemplos não limitativos de vários protocolos possíveis.

Num aspeto do invento, além de visar Brachyury, a imunoterapia à base de levedura visa também antigénios adicionais distintos de Brachyury. Esses antigénios-alvo adicionais podem ser incluídos no mesmo veículo de levedura que os antigénios de Brachyury, ou podem produzir-se composições de imunoterapia à base de levedura adicionais visando diferentes antigénios, que são depois combinadas conforme desejado dependendo do indivíduo a tratar, dos antigénios expressos pelo tipo de cancro ou pelo tumor particular do indivíduo e/ou dependendo do estágio do cancro no indivíduo, ou do estágio de tratamento do indivíduo. Por exemplo, é possível selecionar uma combinação de antigénios que abrangem: (1) antigénios envolvidos em eventos seminais no desenvolvimento do cancro, como Ras mutada, antigénios envolvidos ou associados à desregulação de processos celulares, como CEA e (3) Brachyury, que está envolvido em processos metastáticos. Por exemplo, uma ou mais composições de imunoterapia à base de levedura adicionais poderão expressar um ou mais antigénios que incluem, mas não estão limitados a, antigénio carcinoembrionário (CEA), oncoproteína Ras com mutações pontuais, MUC-1, EGFR, BCR-Abl, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, oncoproteínas p53 normais e com mutações pontuais, PSMA, tirosinase, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erb/B2, hTERT, p73, B-RAF, APC (adenomatous polyposis coli), Myc, proteína von Hippel-Lindau (VHL), Rb-1, Rb-2, recetor de androgénios (AR), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1,

BRCA-2, pax3-fkhr, ews-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, mesotelina, NGEP, modificações destes antígenos, variantes de *splice* destes antígenos e epitopos agonistas destes antígenos, assim como combinações destes antígenos e/ou seus domínios imunogénicos, suas modificações, suas variantes e/ou seus epitopos agonistas. Poderá administrar-se uma, duas, três ou mais destas composições de imunoterapia à base de levedura a um indivíduo antes de, em simultâneo ou alternando com, e/ou após a administração de uma composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury, de modo a otimizar a abordagem dos antígenos no tumor do indivíduo. Tal como acima, podem também usar-se terapias adicionais nesses protocolos (por exemplo, ressecção cirúrgica do tumor, quimioterapia, terapia dirigida, radioterapia, etc.).

Numa concretização do invento, é disponibilizado um método para tratar um cancro. O método inclui os passos de: (a) administrar a um indivíduo que tem um cancro no qual não foi detetada a expressão de Brachyury uma primeira composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um primeiro antígeno do cancro que não compreende um antígeno de Brachyury e (b) administrar ao indivíduo, antes, em simultâneo com, ou após a administração da primeira composição imunoterapêutica, uma segunda composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um segundo antígeno do cancro compreendendo um antígeno de Brachyury. Em concretizações adicionais, o método pode incluir a administração de uma ou mais composições imunoterapêuticas adicionais, em que cada uma das uma ou mais composições imunoterapêuticas adicionais compreende um antígeno do cancro adicional. O antígeno adicional pode ser qualquer um daqueles conhecidos na técnica ou aqui descritos, incluindo, mas não limitado a, Ras mutada, antígeno carcinoembrionário (CEA) e MUC-1.

Noutra concretização do invento, um método para tratar um cancro inclui os seguintes passos: (a) administrar a um indivíduo que tem um cancro uma primeira composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um antígeno Ras mutado; (b) administrar ao indivíduo de (a) uma segunda composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um antígeno selecionado entre o grupo que

consiste em antigénio carcinoembrionário (CEA) e mucina-1 (MUC-1); e (c) administrar ao indivíduo de (a) e (b) uma terceira composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um antigénio de Brachyury. Um ou mais dos passos de administração em (a), (b) e (c) podem ser realizados em simultâneo ou sequencialmente. Os passos poderão ser repetidos conforme necessário para tratar o cancro de um indivíduo particular, e os antigénios do cancro podem ser modificados antes ou durante o tratamento para abordar especificamente o cancro do indivíduo particular.

No método do presente invento, as composições e as composições terapêuticas podem ser administradas a um animal, incluindo qualquer vertebrado, e particularmente qualquer membro da classe de vertebrados *Mammalia*, incluindo, sem limitação, primatas, roedores, gado e animais domésticos. O gado inclui mamíferos que são consumidos ou que produzem produtos úteis (por exemplo, ovelhas para a produção de lã). Os mamíferos a tratar ou proteger utilizando o invento incluem humanos, primatas não humanos, cães, gatos, ratinhos, ratos, cabras, ovelhas, gado bovino, cavalos e porcos.

Um "indivíduo" é um vertebrado, como um mamífero, incluindo, sem limitação, um humano. Os mamíferos incluem, mas não estão limitados a, animais de exploração, animais utilizados em competições desportivas, animais de estimação, primatas, ratinhos e ratos. O termo "indivíduo" é intercambiável com o termo "animal", "sujeito" ou "doente".

Técnicas gerais úteis no invento

A prática do presente invento empregará, salvo indicação em contrário, técnicas convencionais de biologia molecular (incluindo técnicas recombinantes), microbiologia, biologia celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos e imunologia, que são bem conhecidas pelos peritos na especialidade. Essas técnicas estão explicadas em detalhe na literatura, por exemplo, em Methods of Enzymology, Vol. 194, Guthrie et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); Biology and activities of yeasts, Skinner, et al., eds., Academic Press (1980); Methods in yeast genetics : a laboratory course manual, Rose et al., Cold Spring Harbor

Laboratory Press (1990); The Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology, Pringle et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997); The Yeast Saccharomyces: Gene Expression, Jones et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993); The Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics, Broach et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) e Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third edition (Sambrook and Russel, 2001) (aqui referidos conjuntamente como "Sambrook"); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987, incluindo suplementos até 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Harlow and Lane (1988), Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York; Harlow and Lane (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (aqui referidos conjuntamente como "Harlow and Lane"), Beaucage et al. eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000); Casarett and Doull, Toxicology The Basic Science of Poisons, C. Klaassen, ed., 6th edition (2001) e Vaccines, S. Plotkin, W. Orenstein & P. Offit, eds., Fifth Edition (2008).

Definições gerais

Um "TARMOGEN®" (GlobeImmune, Inc., Louisville, Colorado) refere-se de um modo geral a um veículo de levedura que expressa um ou mais antigénios heterólogos extracelularmente (à sua superfície), intracelularmente (interna ou citosolicamente) ou tanto extracelular como intracelularmente. Os TARMOGEN® foram descritos em geral (ver, por exemplo, Patente U.S. n.º 5,830,463). Determinadas composições de imunoterapia à base de levedura, e métodos de preparação e utilização em geral das mesmas, também estão descritos em detalhe, por exemplo, em Patente U.S. n.º 5,830,463; Patente U.S. n.º 7,083,787; Patente U.S. n.º 7,736,642; Stubbs et al., *Nat. Med.* 7:625-629 (2001), Lu et al., *Cancer Research* 64:5084-5088 (2004) e em Bernstein et al., *Vaccine* 2008 Jan 24;26(4):509-21, todos eles aqui incorporados na íntegra através de referência.

Tal como aqui utilizado, o termo "análogo" refere-se a um composto químico que é estruturalmente similar a outro composto, mas difere ligeiramente em termos de composição (como na substituição de um átomo por um átomo de um elemento diferente ou na presença de um grupo funcional particular ou na substituição de um grupo funcional por outro grupo funcional). Assim, um análogo é um composto que é semelhante ou comparável em termos de função e aspeto, mas tem uma estrutura ou origem diferente em relação ao composto de referência.

Os termos "substituído", "derivado substituído" e "derivado", quando utilizados para descrever um composto, significam que pelo menos um hidrogénio ligado ao composto não substituído está substituído por um átomo diferente ou um grupo químico.

Embora um derivado possua uma estrutura física semelhante ao composto parental, o derivado poderá ter propriedades químicas e/ou biológicas diferentes do composto parental. Tais propriedades podem incluir, mas não estão limitadas a, maior ou menor atividade do composto parental, nova atividade em comparação com o composto parental, maior ou menor biodisponibilidade, maior ou menor eficácia, maior ou menor estabilidade *in vitro* e/ou *in vivo* e/ou propriedades de absorção acrescidas ou reduzidas.

Em geral, o termo "biologicamente ativo" indica que um composto (incluindo uma proteína ou péptido) possui pelo menos uma atividade detetável que tem um efeito sobre os processos metabólicos, fisiológicos, químicos ou outros de uma célula, um tecido ou um organismo, conforme medido ou observado *in vivo* (isto é, num ambiente fisiológico natural) ou *in vitro* (isto é, em condições laboratoriais).

De acordo com o presente invento, o termo "modular" pode ser intercambiado com "regular" e refere-se em geral à regulação positiva ou regulação negativa de uma atividade particular. Tal como aqui utilizado, o termo "regular positivamente" pode ser usado em geral para descrever qualquer das ações de: provocação, iniciação, acréscimo, aumento, reforço, melhoramento, realce, amplificação,

promoção ou fornecimento, em relação a uma atividade particular. De modo idêntico, o termo "regular negativamente" pode ser usado em geral para descrever qualquer das ações de: diminuição, redução, inibição, melhoramento, abaixamento, atenuação, bloqueio ou impedimento, em relação a uma atividade particular.

Numa concretização do presente invento, qualquer uma das sequências de aminoácidos aqui descritas pode ser produzida com desde pelo menos um, e até cerca de 20, aminoácidos heterólogos adicionais flanqueando cada uma das extremidades C-terminal e/ou N-terminal da sequência de aminoácidos especificada. A proteína ou polipéptido resultante pode ser referido como "consistindo essencialmente" na sequência de aminoácidos especificada. De acordo com o presente invento, os aminoácidos heterólogos são uma sequência de aminoácidos que não é encontrada naturalmente (isto é, não é encontrada na natureza, *in vivo*) a flanquear a sequência de aminoácidos especificada, ou que não está relacionada com a função da sequência de aminoácidos especificada, ou que não seria codificada pelos nucleótidos que flanqueiam a sequência de ácido nucleico natural que codifica a sequência de aminoácidos especificada tal como ela surge no gene, se esses nucleótidos na sequência natural fossem traduzidos de acordo com a utilização de códons padrão para o organismo do qual a sequência de aminoácidos em questão deriva. De forma idêntica, a frase "consistindo essencialmente em", quando usada em referência a uma sequência de ácido nucleico aqui indicada, refere-se a uma sequência de ácido nucleico codificando uma sequência de aminoácidos especificada que pode ser flanqueada por desde pelo menos um, e até tantos como cerca de 60, nucleótidos heterólogos adicionais em cada uma das extremidades 5' e/ou 3' da sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos especificada. Os nucleótidos heterólogos não são encontrados naturalmente (isto é, não são encontrados na natureza, *in vivo*) a flanquear a sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos especificada tal como ela surge no gene natural, ou não codificam uma proteína que confira qualquer função adicional ou que modifique a função da proteína possuindo a sequência de aminoácidos especificada.

De acordo com o presente invento, a frase "liga-se seletivamente a" refere-se à capacidade de um anticorpo, fragmento de ligação ao antigénio ou parceiro de ligação do presente invento para se ligar preferencialmente a proteínas especificadas. Mais especificamente, a frase "liga-se seletivamente" refere-se à ligação específica de uma proteína a outra (por exemplo, um anticorpo, seu fragmento ou parceiro de ligação a um antigénio), em que a quantidade de ligação, medida por qualquer ensaio padrão (por exemplo, um imunoensaio), é estatística e significativamente mais elevada do que o fundo para o ensaio. Por exemplo, ao efetuar um imunoensaio, os controlos normalmente incluem um poço/tubo de reação que contém anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio sozinho (isto é, na ausência de antigénio), em que a quantidade de reatividade (por exemplo, ligação não específica ao poço) apresentada pelo anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antigénio na ausência do antigénio é considerada o fundo. A ligação pode ser medida utilizando uma variedade de métodos convencionais na técnica, incluindo imunoensaios enzimáticos (por exemplo, ELISA, ensaios de *immunoblot*, etc.).

A referência geral a uma proteína ou polipéptido utilizado no presente invento inclui proteínas completas, proteínas quase completas (definidas acima), ou qualquer fragmento, domínio (estrutural, funcional ou imunogénico), epitopo conformacional, ou homólogo ou variante de uma dada proteína. Uma proteína de fusão também poderá ser referida, em geral, como uma proteína ou polipéptido. Uma proteína isolada, de acordo com o presente invento, é uma proteína (incluindo um polipéptido ou péptido) que foi removida do seu ambiente natural (isto é, que foi sujeita a manipulação humana) e pode incluir proteínas purificadas, proteínas parcialmente purificadas, proteínas produzidas de forma recombinante e proteínas produzidas sinteticamente, por exemplo. Assim, "isolada" não reflete a extensão em que a proteína foi purificada. De preferência, uma proteína isolada do presente invento é produzida de forma recombinante. De acordo com o presente invento, os termos "modificação" e "mutação" podem ser intercambiados, particularmente em relação às modificações/mutações na sequência de aminoácidos

de proteínas ou suas porções (ou sequências de ácido nucleico) aqui descritas.

Tal como aqui utilizado, o termo "homólogo" ou "variante" é usado para designar uma proteína ou péptido que difere de uma proteína ou péptido de referência (isto é, o "protótipo" ou proteína de "tipo selvagem") por pequenas modificações na proteína ou péptido de referência, mas que mantém a estrutura básica da proteína e das cadeias laterais da forma que existe naturalmente. Essas modificações incluem, mas não estão limitadas a: alterações numa ou em algumas cadeias laterais de aminoácidos; alterações num ou em alguns aminoácidos, incluindo eliminações (por exemplo, uma versão truncada da proteína ou péptido), inserções e/ou substituições; alterações na estereoquímica de um ou de alguns átomos; e/ou derivatizações menores, incluindo, mas não limitadas a: metilação, glicosilação, fosforilação, acetilação, miristoílação, prenilação, palmitoílação, amidação e/ou adição de glicosilfosfatidilinositol. Um homólogo ou variante pode ter propriedades melhoradas, reduzidas ou substancialmente similares em comparação com a proteína ou péptido de referência. Um homólogo ou variante pode incluir um agonista de uma proteína ou um antagonista de uma proteína. Os homólogos ou variantes podem ser produzidos usando técnicas conhecidas na técnica para a produção de proteínas, incluindo, embora não limitadas a, modificações diretas na proteína de referência isolada, síntese direta da proteína ou modificações na sequência de ácido nucleico que codifica a proteína, usando, por exemplo, técnicas de ADN recombinante ou clássicas para efetuar a mutagénese aleatória ou dirigida, resultando na codificação de uma variante da proteína. Além disso, poderão existir variantes naturais de uma proteína de referência (por exemplo, isoformas, variantes alélicas ou outras variantes naturais que podem existir de indivíduo para indivíduo) que poderão ser isoladas, produzidas e/ou utilizadas no invento.

Um homólogo ou variante de uma dada proteína poderá compreender, consistir essencialmente em, ou consistir, numa sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos cerca de 45%, ou pelo menos cerca de 50%, ou pelo menos cerca de 55%, ou pelo menos cerca de 60%, ou pelo menos cerca de

65%, ou pelo menos cerca de 70%, ou pelo menos cerca de 75%, ou pelo menos cerca de 80%, ou pelo menos cerca de 85%, ou pelo menos cerca de 86%, ou pelo menos cerca de 87%, ou pelo menos cerca de 88%, ou pelo menos cerca de 89%, ou pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos cerca de 91%, ou pelo menos cerca de 92%, ou pelo menos cerca de 93%, ou pelo menos cerca de 94%, ou pelo menos cerca de 95%, ou pelo menos cerca de 96%, ou pelo menos cerca de 97%, ou pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99% (ou qualquer percentagem de identidade entre 45% e 99%, em incrementos de números inteiros), com a sequência de aminoácidos da proteína de referência (por exemplo, uma sequência de aminoácidos aqui especificada ou a sequência de aminoácidos de uma proteína especificada). Numa concretização, o homólogo ou variante compreende, consiste essencialmente em, ou consiste, numa sequência de aminoácidos que tem uma identidade inferior a 100%, inferior a cerca de 99%, inferior a cerca de 98%, inferior a cerca de 97%, inferior a cerca de 96%, inferior a cerca de 95%, etc., em incrementos de 1%, até uma identidade inferior a cerca de 70% com a sequência de aminoácidos da proteína de referência.

Tal como aqui utilizada, salvo especificação em contrário, a referência a uma percentagem (%) de identidade refere-se a uma avaliação de homologia que é efetuada usando: (1) uma pesquisa de homologia básica com a ferramenta de alinhamento local BLAST (de *Basic Local Alignment Search Tool*), utilizando blastp para pesquisas de aminoácidos e blastn para pesquisas de ácidos nucleicos com parâmetros predefinidos padrão, em que a sequência de busca (*query sequence*) é filtrada relativamente a regiões de baixa complexidade por predefinição (como descrito em Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, aqui incorporado na íntegra através de referência); (2) um alinhamento BLAST de duas sequências (por exemplo, utilizando os parâmetros descritos abaixo); (3) e/ou PSI-BLAST (de *Position-Specific Iterated BLAST*; BLAST iterativo) com os parâmetros predefinidos padrão. Salienta-se que devido a algumas diferenças nos parâmetros padrão entre BLAST básico e BLAST para duas

sequências, duas sequências específicas poderiam ser reconhecidas como tendo uma homologia significativa usando o programa BLAST, ao passo que uma pesquisa efetuada em BLAST básico utilizando uma das sequências como a sequência de busca poderia não identificar a segunda sequência nas correspondências principais. Além disso, a ferramenta PSI-BLAST fornece uma versão automatizada e fácil de usar de uma pesquisa de "perfis", que é uma forma sensível de procurar homólogos de sequência. O programa efetua primeiro uma pesquisa BLAST com lacunas na base de dados. O programa PSI-BLAST utiliza a informação de quaisquer alinhamentos significativos devolvidos para construir uma matriz de pontuação específica da posição, que substitui a sequência de busca para o ciclo seguinte de pesquisa na base de dados. Por conseguinte, deve entender-se que a percentagem de identidade pode ser determinada utilizando qualquer um destes programas.

Duas sequências específicas podem ser alinhadas uma com a outra utilizando o programa BLAST como descrito em Tatusova and Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250. Esse alinhamento de sequências é efetuado em *blastp* ou *blastn*, utilizando o algoritmo BLAST 2.0 para efetuar uma pesquisa BLAST com lacunas (*Gapped BLAST*; BLAST 2.0) entre as duas sequências, que permite a introdução de lacunas (eliminações e inserções) no alinhamento resultante. Para efeitos de clareza na divulgação, um alinhamento de sequências BLAST para duas sequências é efetuado usando os parâmetros predefinidos padrão da seguinte forma:

Para *blastn*, utilizando a matriz 0 BLOSUM62:

Bonificação por correspondência = 1

Penalização por discrepância = -2

Penalizações por lacuna aberta (5) e lacuna de extensão (2)

lacuna x queda (50) esperado (10) tamanho de palavra (11)
filtro (on)

Para *blastp*, utilizando a matriz 0 BLOSUM62:

Penalizações por lacuna aberta (11) e lacuna de extensão (1)

lacuna x queda (50) esperado (10) tamanho de palavra (3)
filtro (on)

Uma molécula de ácido nucleico isolada é uma molécula de ácido nucleico que foi removida do seu ambiente natural (isto é, que foi sujeita a manipulação humana), em que o seu ambiente natural é o genoma ou cromossoma onde a molécula de ácido nucleico é encontrada na natureza. Assim, "isolada" não reflete necessariamente a extensão em que a molécula de ácido nucleico foi purificada, mas indica que a molécula não inclui um genoma inteiro ou um cromossoma inteiro ou um segmento do genoma contendo mais de um gene, no qual a molécula de ácido nucleico é encontrada na natureza. Uma molécula de ácido nucleico isolada pode incluir um gene completo. Uma molécula de ácido nucleico isolada que inclui um gene não é um fragmento de um cromossoma que inclui esse gene; mais exatamente, ela inclui a região codificante e as regiões reguladoras associadas ao gene, mas não inclui quaisquer genes adicionais que são encontrados naturalmente no mesmo cromossoma. Uma molécula de ácido nucleico isolada também poderá incluir partes de um gene. Uma molécula de ácido nucleico isolada também pode incluir uma sequência de ácido nucleico especificada flanqueada por (isto é, na extremidade 5' e/ou 3' da sequência) ácidos nucleicos adicionais que normalmente não flanqueiam a sequência de ácido nucleico especificada na natureza (isto é, sequências heterólogas). A molécula de ácido nucleico isolada pode incluir ADN, ARN (por exemplo, ARNm) ou derivados de ADN ou ARN (por exemplo, ADNc). Embora a frase "molécula de ácido nucleico" se refira principalmente à molécula de ácido nucleico física e a frase "sequência de ácido nucleico" se refira principalmente à sequência de nucleótidos na molécula de ácido nucleico, as duas frases podem ser usadas de forma indistinta, especialmente em relação a uma molécula de ácido nucleico, ou uma sequência de ácido nucleico, ser capaz de codificar uma proteína ou domínio de uma proteína.

Uma molécula de ácido nucleico recombinante é uma molécula que pode incluir pelo menos uma de qualquer sequência de ácido nucleico que codifica qualquer uma ou mais proteínas aqui descritas, ligada funcionalmente a pelo menos uma de qualquer sequência de controlo da transcrição capaz de regular eficazmente a expressão da(s) molécula(s) de ácido nucleico na célula que será transfetada. Embora a frase "molécula de ácido nucleico" se refira principalmente à

molécula de ácido nucleico física e a frase "sequência de ácido nucleico" se refira principalmente à sequência de nucleótidos na molécula de ácido nucleico, as duas frases podem ser usadas de forma indistinta, especialmente em relação a uma molécula de ácido nucleico, ou uma sequência de ácido nucleico, ser capaz de codificar uma proteína. Além disso, a frase "molécula recombinante" refere-se principalmente a uma molécula de ácido nucleico ligada funcionalmente a uma sequência de controlo da transcrição, mas pode ser usada de forma indistinta com a frase "molécula de ácido nucleico" que é administrada a um animal.

Uma molécula de ácido nucleico recombinante inclui um vetor recombinante, que é qualquer sequência de ácido nucleico, tipicamente uma sequência heteróloga, que está ligado funcionalmente à molécula de ácido nucleico isolada que codifica uma proteína de fusão do presente invento, que é capaz de permitir a produção recombinante da proteína de fusão e que é capaz de entregar a molécula de ácido nucleico numa célula hospedeira de acordo com o presente invento. Esse vetor pode conter sequências de ácido nucleico que não são encontradas naturalmente em posição adjacente às moléculas de ácido nucleico isoladas que serão inseridas no vetor. O vetor pode ser ARN ou ADN, procariótico ou eucariótico, e preferencialmente no presente invento, é um plasmídeo útil para transfetar levedura. Podem usar-se vetores recombinantes na clonagem, sequenciação e/ou restante manipulação das moléculas de ácido nucleico e na entrega dessas moléculas (por exemplo, numa composição de ADN ou numa composição à base de vetor viral. Os vetores recombinantes são usados preferencialmente na expressão de moléculas de ácido nucleico e também podem ser designados por vetores de expressão. Os vetores recombinantes preferidos são capazes de ser expressos numa célula hospedeira transfectada, como seja uma levedura.

Numa molécula recombinante do presente invento, as moléculas de ácido nucleico estão ligadas funcionalmente a vetores de expressão contendo sequências reguladoras, como sequências de controlo da transcrição, sequências de controlo da tradução, origens de replicação e outras sequências reguladoras que são compatíveis com a célula hospedeira e que controlam a expressão de moléculas de ácido nucleico do

presente invento. Em particular, as moléculas recombinantes do presente invento incluem moléculas de ácido nucleico que estão ligadas funcionalmente a uma ou mais sequências de controlo da expressão. A frase "ligada funcionalmente" refere-se a ligar uma molécula de ácido nucleico a uma sequência de controlo da expressão de uma maneira que permite que a molécula seja expressa quando é transfetada (isto é, transformada, transduzida ou transfetada) numa célula hospedeira.

De acordo com o presente invento, o termo "transfeção" é utilizado para designar qualquer método por meio do qual uma molécula de ácido nucleico exógena (isto é, uma molécula de ácido nucleico recombinante) pode ser inserida numa célula. O termo "transformação" pode ser usado de maneira indistinta com o termo "transfeção" quando esse termo é utilizado para designar a introdução de moléculas de ácido nucleico em células microbianas, como algas, bactérias e leveduras. Nos sistemas microbianos, o termo "transformação" é usado para descrever uma modificação herdada devido à aquisição de ácidos nucleicos exógenos pelo microrganismo e é, essencialmente, sinónimo do termo "transfeção". Assim, as técnicas de transfeção incluem, mas não estão limitadas a, transformação, tratamento químico das células, bombardeamento de partículas, eletroporação, microinjeção, lipofecção, adsorção, infeção e fusão de protoplastos.

Os resultados experimentais seguintes são fornecidos a título ilustrativo.

EXEMPLOS

Exemplo 1

O exemplo seguinte descreve a produção de uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury.

Nesta experiência, as leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) foram manipuladas para expressar Brachyury humano sob o controlo do promotor indutível por cobre *CUP1* ou do promotor constitutivo *TEF2*, produzindo composições de imunoterapia à base de levedura-Brachyury. Em cada caso,

produziu-se uma proteína de fusão compreendendo um antígeno de Brachyury como um polipéptido único com os seguintes elementos de sequência fundidos *in-frame* da extremidade N-terminal para a extremidade C-terminal, representada por SEQ ID NO:8 (1) um péptido N-terminal para conferir resistência à degradação proteossômica e estabilizar a expressão (posições 1-6 de SEQ ID NO:8, em que a sequência do péptido é aqui também representada por SEQ ID NO:11); (2) os aminoácidos 2-435 de SEQ ID NO:6, em que SEQ ID NO:6 representa uma proteína Brachyury humana quase completa (posições 7-440 de SEQ ID NO:8); e (3) uma marca de hexa-histidina (posições 441-446 de SEQ ID NO:8). As sequências de aminoácidos usadas nesta proteína de fusão podem ser modificadas por meio da utilização de aminoácidos adicionais ou alternativos a flanquear qualquer uma das extremidades do antígeno de Brachyury, se desejado, e porções mais curtas do antígeno de Brachyury também poderão ser usadas. Uma sequência de ácido nucleico que codifica a proteína de fusão de SEQ ID NO:8 (otimizada em termos de códons para a expressão em levedura) é aqui representada por SEQ ID NO:7.

Resumidamente, o ADN que codifica uma proteína Brachyury humana completa, proveniente de um plasmídeo Brachyury-PCR11 fornecido pelo National Cancer Institute (Dr. Jeffrey Schlom), foi amplificado por PCR e, em seguida, inserido nos sítios de clonagem *EcoRI* e *SpeI* depois do promotor *CUP1* (vetor pGI-100) ou do promotor *TEF2* (vetores plu011 ou pGI-172), em vetores de expressão 2 μ m de levedura. As sequências nucleotídicas que codificam o péptido de estabilização N-terminal, MADEAP (SEQ ID NO:11), e um péptido de hexa-histidina C-terminal também foram adicionadas ao vetor plasmídico para codificar a proteína de fusão completa representada por SEQ ID NO:8. Os plasmídeos resultantes foram transformados em DH5 α para armazenamento dos plasmídeos e em *Saccharomyces cerevisiae* W303 α para a produção das composições imunoterapêuticas de levedura-Brachyury.

A transformação em *Saccharomyces cerevisiae* foi efetuada por transfeção com acetato de lítio/polietilenoglicol, e os transfetantes primários foram selecionados em placas de meio mínimo sólido sem uracilo (UDM; meio isento de uridina). As colónias foram selecionadas por crescimento em meio U2 (meio

isento de uridina) ou UL2 (meio isento de uridina e de leucina) a 30 °C.

A composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury compreendendo um polinucleótido que codifica a proteína de fusão de Brachyury humano representada por SEQ ID NO:8, sob o controlo do promotor *CUP1*, é aqui também designada por GI-6301. A composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury compreendendo um polinucleótido que codifica a proteína de fusão de Brachyury humano representada por SEQ ID NO:8, sob o controlo do promotor *TEF2* (no vetor plu011), é aqui também designada por GI-6302. A composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury compreendendo um polinucleótido que codifica a proteína de fusão de Brachyury humano representada por SEQ ID NO:8, sob o controlo do promotor *TEF2* (no vetor pGI-172), é aqui também designada por GI-6303.

As culturas líquidas sem uridina (U2) ou sem uridina e sem leucina (UL2) foram inoculadas utilizando as placas e as culturas iniciais descritas acima e foram crescidas durante 20 h a 30 °C, com agitação a 250 rpm. Inocularam-se também os meios tamponados contendo 4,2 g/l de Bis-Tris (BT-U2; BT-UL2) para avaliar os compostos imunoterapêuticos de levedura-Brachyury produzidos em condições de fabrico a pH neutro (resultados não apresentados). As culturas primárias foram utilizadas para inocular as culturas finais da mesma formulação.

Receita para o meio líquido U2:

- . 15 g/l de glucose
- . 6,7 g/l de Yeast Nitrogen Base contendo sulfato de amónio
- . 0,04 g/l de cada um dos compostos histidina, triptofano, adenina e 0,06 g/l de leucina

Receita para o meio líquido UL2:

- . 15 g/l de glucose
- . 6,7 g/l de Yeast Nitrogen Base contendo sulfato de amónio
- . 0,04 g/l de cada um dos compostos histidina, triptofano e adenina

Nas experiências iniciais de comparação das composições imunoterapêuticas de levedura-Brachyury sob o controlo dos diferentes promotores, a expressão de levedura-Brachyury controlada por *CUP1* (expressão indutível) foi iniciada pela adição de sulfato de cobre 0,5 mM após a cultura de levedura-Brachyury ter atingido uma densidade de aproximadamente 0,2 Y.U./ml, tendo prosseguido até a cultura atingir uma densidade de 0,5-1,5 Y.U. (a levedura-Brachyury duplicou apenas cerca de 1-1,5x após a adição do sulfato de cobre, mas as células produziram uma grande quantidade de proteína Brachyury). A expressão de levedura-Brachyury controlada por *TEF2* é constitutiva, e o crescimento destas células continuou até as culturas atingirem uma densidade de entre 1,1 e 4,0 Y.U./ml. As células de cada cultura foram depois colhidas, lavadas e mortas termicamente a 56 °C durante 1 hora em PBS. As células vivas de cada cultura também foram processadas para comparação.

Após a morte térmica das culturas, as células foram lavadas três vezes em PBS. A expressão de proteína total foi medida por meio de um ensaio de precipitação com TCA/ligação a nitrocelulose e transferência de Western usando um anticorpo monoclonal anti-marca de histidina e um anticorpo anti-Brachyury (Abcam, Cambridge, Massachussets). O teor de proteína foi quantificado utilizando métodos de imagem digitais semiquantitativos.

Os resultados das experiências de expressão iniciais (resultados não apresentados) demonstraram que cada uma das composições de imunoterapia de levedura-Brachyury do invento expressou a proteína de fusão de Brachyury, isto é, usando quer o promotor *CUP1* quer o promotor *TEF2*, e a expressão foi detetada utilizando qualquer um dos meios (U2 e UL2). Além disso, a expressão do antigénio foi detetável tanto nas células de levedura mortas termicamente como nas células vivas (resultados não apresentados). A expressão de Brachyury foi significativamente superior na composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury compreendendo o promotor *CUP1* (GI-6301), pelo que esta composição foi selecionada para estudos adicionais, incluindo de otimização da expressão e para experiências *in vitro* e *in vivo* (ver os Exemplos abaixo).

A Fig. 1A ilustra a expressão de Brachyury em GI-6301 utilizando ambos os meios U2 e UL2, usando o anticorpo anti-Brachyury para a deteção. A levedura de controlo expressando um antígeno distinto de Brachyury não corou com o anticorpo. A Fig. 1B mostra a expressão de Brachyury nas mesmas preparações de GI-6301, utilizando o anticorpo anti-His para identificar a marca de hexa-histidina na proteína de fusão de Brachyury. A levedura de controlo expressando um antígeno distinto de Brachyury mas possuindo uma marca de hexa-histidina também está representada. Estes resultados mostraram uma boa expressão de Brachyury usando qualquer um dos meios, embora a expressão no meio UL2 tenha sido significativamente superior.

Exemplo 2

O exemplo seguinte descreve a identificação de condições para a expressão do antígeno e a produção da composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury, GI-6301.

Para determinar a densidade ótima para a indução pelo cobre da expressão do antígeno em GI-6301, prepararam-se culturas iniciais e intermédias de GI-6301 utilizando as condições padrão de crescimento em meio UL2 descritas no Exemplo 1 acima. Em seguida, diluíram-se alíquotas da cultura para 0,5 Y.U./ml, 1,0 Y.U./ml e 1,5 Y.U./ml e incubou-se a 30 °C durante 1 hora. Adicionou-se CuSO_4 0,5 mM às culturas para induzir a expressão de Brachyury e prosseguiu-se a cultura. As células foram colhidas e contadas às 6 horas e às 14 horas para medição da densidade celular. Efetuou-se a lise de 20 Y.U. de leveduras mortas termicamente de cada condição, mediu-se a proteína total e produziram-se transferências de Western utilizando o anticorpo anti-His.

Tabela 1

	Tempo de indução		
	0 horas	6 horas	14 horas
	0,5	1,03	0,96
	1,0	1,88	1,74
	1,5	3,14	2,7

Como ilustrado na Tabela 1, a levedura duplicou apenas cerca de 1 vez após a indução por cobre (outras experiências mostraram uma duplicação até 1,5x), e a densidade e a viabilidade celulares (não apresentadas) diminuíram após 6 horas de indução por cobre. A Fig. 2 mostra que as três densidades de indução deram todas origem a uma expressão significativa de Brachyury, com uma tendência no sentido de maior expressão de Brachyury às densidades de indução mais elevadas. Contudo, experiências adicionais utilizando densidades de início da indução de 2,1 Y.U./ml e 2,8 Y.U./ml e CuSO_4 375 μM revelaram que a expressão da proteína começou a diminuir à medida que a densidade das culturas no início da indução por cobre aumentou e não melhorou de forma significativa após cerca de 6-8 horas (resultados não apresentados).

Em seguida, investigou-se o efeito da quantidade de CuSO_4 na expressão de Brachyury. GI-6301 foi crescida a partir de culturas iniciais e intermédias em meio UL2 como descrito no Exemplo 1. Em seguida, diluíram-se alíquotas da cultura para 1,0 Y.U./ml e incubou-se a 30 °C durante 1 hora. Adicionou-se CuSO_4 a cada cultura numa concentração de 375 μM ou de 500 μM e permitiu-se que a indução da expressão da proteína prosseguisse para vários pontos temporais (2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 24 horas), altura em que as células foram colhidas, mortas termicamente e processadas para avaliação da expressão de proteína, utilizando transferências de Western com anticorpo anti-His como descrito acima. Embora ambas as concentrações de CuSO_4 tenham resultado em boa expressão de Brachyury, a expressão da proteína usando 375 μM aparentou ser ligeiramente melhor, particularmente em pontos temporais tardios (resultados não apresentados).

Por conseguinte, para a composição de levedura-Brachyury controlada por *CUP1* (expressão indutível), os inventores constataram que a indução da expressão do antigénio a meio da fase exponencial de crescimento da levedura foi ótima para a produção do antigénio. Para a produção da composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury (GI-6301) usada nos Exemplos seguintes, as células foram crescidas em meio UL2

como descrito no Exemplo 1 para densidades entre 1 e 2 Y.U./ml e foram depois induzidas pela adição de sulfato de cobre 0,375-0,5 mM durante até 6-8 horas a 30 °C, 250 rpm. As células foram colhidas, lavadas e mortas termicamente a 56 °C durante 1 h em PBS.

Exemplo 3

O exemplo seguinte descreve a construção e produção de uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury adicional, em que o antígeno de Brachyury contém um epitopo agonista de células T.

Nesta experiência, as leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) foram manipuladas para expressar um antígeno de Brachyury humano que é uma proteína Brachyury quase completa compreendendo o epitopo de células T WLLPGTSTV (SEQ ID NO:13), que é um epitopo agonista. O epitopo nativo de células T de Brachyury, presente em SEQ ID NO:6 ou 8, por exemplo, é WLLPGTSTL (SEQ ID NO:12). O antígeno agonista de Brachyury humano foi expresso sob o controlo do promotor indutível por cobre *CUP1*, produzindo uma composição de imunoterapia de levedura-Brachyury. Mais particularmente, produziu-se uma proteína de fusão compreendendo um antígeno agonista de Brachyury (isto é, um antígeno de Brachyury contendo pelo menos um epitopo agonista) como um polipéptido único com os seguintes elementos de sequência fundidos *in-frame* da extremidade N-terminal para a extremidade C-terminal, representada por SEQ ID NO:20 (1) um péptido N-terminal para conferir resistência à degradação proteossômica e estabilizar a expressão (posições 1-6 de SEQ ID NO:20, em que a sequência do péptido é aqui também representada por SEQ ID NO:11); (2) os aminoácidos 2-435 de SEQ ID NO:18 (representados pelas posições 7-440 de SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:18 representa uma proteína agonista Brachyury humana completa possuindo uma única substituição de aminoácido na posição 254 em comparação com a proteína Brachyury de tipo selvagem); e (3) uma marca de hexa-histidina (posições 441-446 de SEQ ID NO:20). O epitopo agonista (SEQ ID NO:13) está localizado nas posições 251 a 259 de SEQ ID NO:20 (posições 246 a 254 de SEQ ID NO:18). As sequências de aminoácidos usadas nesta proteína de fusão podem ser modificadas por meio

da utilização de aminoácidos adicionais ou alternativos a flanquear qualquer uma das extremidades do antigénio de Brachyury, se desejado, e porções mais curtas do antigénio de Brachyury também poderão ser usadas. Uma sequência de ácido nucleico que codifica a proteína de fusão de SEQ ID NO:20 (otimizada em termos de codões para a expressão em levedura) é aqui representada por SEQ ID NO:19.

Resumidamente, o ADN que codifica a proteína Brachyury humana quase completa como descrita no Exemplo 1 (isto é, Brachyury completo menos a metionina N-terminal), modificado por mutagénese dirigida para introduzir uma substituição da leucina por uma valina na posição 254 relativamente à proteína Brachyury completa, foi amplificado por PCR e, em seguida, inserido nos sítios de clonagem *EcoRI* e *SpeI* depois do promotor *CUP1* (vetor pGI-100), em vetores de expressão 2 µm de levedura. As sequências nucleotídicas que codificam o péptido de estabilização N-terminal, MADEAP (SEQ ID NO:11), e um péptido de hexa-histidina C-terminal também foram adicionadas ao vetor plasmídico para codificar a proteína de fusão completa representada por SEQ ID NO:20. Os plasmídeos resultantes foram transformados em DH5α para armazenamento dos plasmídeos e em *Saccharomyces cerevisiae* W303α para a produção das composições imunoterapêuticas de levedura-Brachyury.

A transformação em *Saccharomyces cerevisiae* foi efetuada por transfeção com acetato de lítio/polietilenoglicol, e os transfetantes primários foram selecionados em placas de meio mínimo sólido sem uracilo (UDM; meio isento de uridina). As colónias foram selecionadas por crescimento em meio UL2 (meio isento de uridina e de leucina) a 30 °C.

A composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury compreendendo um polinucleótido que codifica a proteína de fusão agonista de Brachyury humano representada por SEQ ID NO:20, sob o controlo do promotor *CUP1*, é aqui também designada por GI-6305.

As células de GI-6305 foram crescidas em meio UL2 como descrito no Exemplo 1 para densidades entre 1 e 2 Y.U./ml e depois foram induzidas pela adição de sulfato de cobre 0,375-

0,5 mM durante até 6-8 horas a 30 °C, 250 rpm, utilizando as condições desenvolvidas pelos inventores para GI-6301 como descrito no Exemplo 2. As células foram colhidas, lavadas e mortas termicamente a 56 °C durante 1 h em PBS.

Após a morte térmica das culturas, as células foram lavadas três vezes em PBS. A expressão de proteína total foi medida por meio de um ensaio de precipitação com TCA/ligação a nitrocelulose e transferência de Western usando um anticorpo monoclonal anti-marca de histidina e um anticorpo anti-Brachyury (Abcam, Cambridge, Massachussets). O teor de proteína foi quantificado utilizando métodos de imagem digitais semiquantitativos.

A Fig. 1C ilustra a expressão robusta do antigénio agonista de Brachyury em GI-6305, utilizando o anticorpo anti-His para identificar a marca de hexa-histidina na proteína de fusão de Brachyury. O teor aproximado de antigénio para GI-6305 crescida em meio UL2 nesta experiência foi >22 615 ng/Y.U.

Exemplo 4

O exemplo seguinte demonstra a expansão de células T específicas para Brachyury, utilizando uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury do invento.

Para determinar se as células T de dadores normais eram capazes de gerar células T específicas para o antigénio de Brachyury, prepararam-se células dendríticas (DC de *Dendritic Cell*) a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC de *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) de dois dadores normais. Resumidamente, as PBMC isoladas foram cultivadas durante 5 dias na presença de GM-CSF e IL-4 e foram subsequentemente incubadas com levedura de controlo (também designada por "YVEC", que é uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* transformada com um vetor vazio, ou um vetor que não contém uma inserção que codifica um antigénio) ou com levedura-Brachyury (GI-6301, descrita nos Exemplos 1 e 2 acima), utilizando uma relação levedura:DC = 1:1. Após 48 horas de co-cultura, as DC foram utilizadas como APC (de *Antigen Presenting Cell*; célula apresentadora de antigénio)

para a estimulação de células T autólogas. Cada ciclo de estimulação, designado por IVS (estimulação *in vitro*), consistiu em 3 dias de cultura na ausência de IL-2, seguidos de 4 dias adicionais na presença de IL-2 recombinante (20 U/ml). No final do IVS 2, as células T foram coradas com um tetrâmero de controlo ou um tetrâmero específico para o péptido Tp2 de Brachyury (WLLPGTSTL, posições 246 a 254 de SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:6). A Tabela 2 mostra a percentagem de células T CD8⁺ que foram coradas positivamente com cada tetrâmero.

Tabela 2

Dador	Estimulação	Tetrâmero de controlo	Tetrâmero de Brachyury
07706	Levedura de controlo	0,21	0,30
	Levedura-Brachyury	0,28	0,67
17663	Levedura de controlo	0,04	0,29
	Levedura-Brachyury	0,05	0,54

Numa segunda experiência, as células dendríticas (DC) foram preparadas a partir de PBMC de nove dadores normais, utilizando uma cultura de 5 dias na presença de GM-CSF e IL4, e subsequentemente incubadas com levedura-Brachyury (GI-6301) numa relação levedura:DC = 1:1, como descrito acima. Após 48 horas em co-cultura, as DC foram utilizadas como APC para a estimulação de células T autólogas. Cada ciclo de IVS foi efetuado da forma descrita acima. No final do IVS 2, as células T foram coradas com um tetrâmero de controlo ou um tetrâmero específico para o péptido Tp2 de Brachyury. A Tabela 3 apresenta a percentagem de células T CD8⁺ que foram coradas positivamente com cada tetrâmero.

Tabela 3

Dador	Estimulação	Tetrâmero de controlo	Tetrâmero de Brachyury
07706	Levedura-Brachyury	0,28	0,67
17663	Levedura-Brachyury	0,05	0,54
32249	Levedura-Brachyury	0,01	1,24
29004	Levedura-Brachyury	0,02	0,36
19063	Levedura-Brachyury	0,10	2,57
06852	Levedura-Brachyury	0,05	0,33
26532	Levedura-Brachyury	0,07	0,11
12172	Levedura-Brachyury	0,01	0,11
26725	Levedura-Brachyury	0,01	0,20

Os resultados nas Tabelas 2 e 3 mostram que a estimulação de células T de dadores normais com um composto imunoterapêutico de levedura-Brachyury do invento aumenta a percentagem de células T CD8⁺ positivas para o tetrâmero numa maioria dos dadores normais, comparativamente aos controlos, indicando que as células T humanas normais têm a capacidade de reconhecer o Brachyury como um imunogénio.

Exemplo 5

O exemplo seguinte demonstra a capacidade de uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury para gerar células Tc específicas para Brachyury que lisam alvos expressando Brachyury, a partir de PBMC de dadores normais.

Nesta experiência, as células T específicas para Brachyury de três dos dadores normais da Tabela 2 acima foram expandidas *in vitro*, utilizando DC incubadas com levedura-Brachyury (GI-6301) durante 2 ciclos de IVS (como descrito no Exemplo 4). Efetuou-se um terceiro IVS com DC maturadas na presença de CD40L e pulsadas com o péptido Tp2 específico de Brachyury (WLLPGTSTL, posições 246 a 254 de SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:6). No dia 5, as células T CD8⁺ foram isoladas e usadas num ensaio de células T citotóxicas contra alvos constituídos por células tumorais SW480 (HLA-A2⁺/nível

elevado de Brachyury) e MCF7 (HLA-A2⁺/nível reduzido de Brachyury), às relações efetor:alvo (EA) indicadas, realizado durante a noite (ver Figura 3). A Tabela 4 ilustra a percentagem de células T CD8⁺ que coraram positivamente com um tetrâmero de controlo versus um tetrâmero para Tp2 específico de Brachyury.

Tabela 4

Dador normal	Estimulação	Tetrâmero de controlo	Tetrâmero de Brachyury
07706	Levedura- Brachyury/Tp2	0,33	1,84
17663	Levedura- Brachyury/Tp2	0,11	0,65
26532	Levedura- Brachyury/Tp2	0,05	0,11

As Figs. 3A (dador 07706), 3B (dador 17663) e 3C (dador 26532) mostram que as PBMC de dois dos três dadores normais foram capazes de gerar células Tc CD8⁺ que conseguiram matar alvos expressando Brachyury. Em conjunto, estes resultados demonstram que as composições imunoterapêuticas de levedura-Brachyury conseguem produzir células Tc específicas para Brachyury que são capazes de matar uma célula tumoral expressando Brachyury.

De forma a mostrar que a imunoterapia à base de levedura-Brachyury consegue induzir células Tc específicas para Brachyury na ausência de pulsos com um péptido específico (isto é, gerando células Tc contra potencialmente múltiplos epitopos de células Tc diferentes), realizaram-se experiências adicionais usando células T de dadores normais expandidas *in vitro* com recurso apenas à composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury, GI-6301 (isto é, sem pulso com péptido). Resumidamente, as células T específicas para Brachyury obtidas das PBMC de um dador normal (dador 19063) foram expandidas *in vitro*, utilizando DC incubadas com GI-6301 durante 2 ciclos de IVS (como descrito no Exemplo 4). No dia 5, as células T CD8⁺ foram isoladas e usadas num

ensaio de células T citotóxicas contra células tumorais SW480 (HLA-A2⁺/nível elevado de Brachyury) e H226 (HLA-A2⁻/nível elevado de Brachyury), numa relação efetor:alvo (EA) de 15:1, realizado durante a noite. A Fig. 4A ilustra a percentagem de lise específica das células tumorais SW480 e H226. A Fig. 4B apresenta a expressão do ARNm de Brachyury em relação ao de GAPDH nas células tumorais SW480 e H226, determinada por RT-PCR em tempo real. Estas experiências demonstram adicionalmente que a composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury consegue gerar células Tc específicas para Brachyury que são capazes de matar uma célula tumoral expressando Brachyury.

Exemplo 6

O exemplo seguinte demonstra que uma composição de levedura-Brachyury do invento pode expandir as células T específicas para Brachyury de doentes com cancro.

Nesta experiência, as DC foram preparadas a partir das PBMC de duas doentes com cancro da mama, pós-vacinação com vacinas à base de vetores virais compreendendo os antigénios CEA e MUC-1. As DC foram preparadas por cultura durante 5 dias na presença de GM-CSF e IL-4 como descrito no Exemplo 4, seguida de incubação na presença de levedura-Brachyury (GI-6301) utilizando uma relação levedura:DC = 1:1 Após 48 horas de co-cultura, as DC foram utilizadas como APC para a estimulação de células T autólogas. Cada ciclo de IVS consistiu em 3 dias na ausência de IL-2, seguidos de 4 dias adicionais na presença de 20 U/ml de IL-2 recombinante. A Tabela 5 mostra a percentagem de células T CD8⁺ (IVS1) que foram coradas positivamente com um tetrâmero de controlo ou um tetrâmero específico para o péptido Tp2 de Brachyury.

Tabela 5

<i>Doente</i>	<i>Estimulação</i>	<i>Tetrâmero de controlo</i>	<i>Tetrâmero de Brachyury</i>
Dt 01 Mama	Levedura-Brachyury	0,11	0,42
Dt 10 Mama	Levedura-Brachyury	0,23	0,91

Os resultados na Tabela 5 demonstram que a estimulação de células T de dadores com cancro da mama com uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury do invento aumenta a percentagem de células T CD8⁺ positivas para o tetrâmero numa maioria dos dadores, comparativamente aos controlos, indicando que as células T de dadores com um cancro em curso têm a capacidade de reconhecer o Brachyury como um imunogénio.

Exemplo 7

O exemplo seguinte demonstra a geração de respostas de células T CD4⁺ específicas para Brachyury *in vivo*, utilizando imunoterapia à base de levedura-Brachyury.

Nesta experiência, ratinhos C57BL/6 foram vacinados semanalmente num total de 4 vezes com 4 YU de levedura-hBrachyury (GI-6301), administrada em quatro sítios de injeção separados numa quantidade de 1 YU por sítio. Duas semanas após o reforço final, os ratinhos foram sacrificados, e as células T CD4⁺ foram purificadas e analisadas quanto a proliferação na presença de várias concentrações de proteína Brachyury purificada (obtida de células de inseto). Como controlo, utilizou-se β -Gal numa concentração de 40 μ g/ml.

Os resultados ilustrando a proliferação de células T CD4⁺ isoladas dos baços de animais vacinados com levedura de controlo (YVEC, ver Exemplo 4) e levedura-hBrachyury (GI-6301) estão apresentados na Fig. 5. A Fig. 5 mostra que a imunização com levedura-Brachyury (GI-6301) produz células T CD4⁺ específicas para Brachyury.

Exemplo 8

O exemplo seguinte demonstra que a imunização com uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury reduz os tumores que expressam Brachyury *in vivo*.

Nesta experiência, ratinhos C57BL/6 receberam 1 x 10⁶ células MC38-phBrachyury (células tumorais MC38 expressando um Brachyury humano recombinante) via a veia da cauda (dia 0). Quatro dias após a implantação do tumor, os

animais começaram a receber vacinações semanais com levedura de controlo (YVEC, ver Exemplo 4) ou levedura-hBrachyury (GI-6301), administradas numa dose de 1 YU por sítio em quatro sítios diferentes (total de 4 YU por dose). No dia 40 após a implantação do tumor, os animais foram sacrificados e avaliou-se o número de nódulos tumorais no pulmão. Os resultados de duas experiências combinadas estão apresentados na Fig. 6. A Tabela 6 mostra o número médio de tumores no pulmão (\pm EPM) e o número (e percentagem) de animais portadores ≥ 5 nódulos no pulmão.

Tabela 6

Tratamento com vacina	Tumores no pulmão (média \pm EPM)	Animais portadores ≥ 5 nódulos no pulmão
Levedura de controlo (YVEC)	4,1 \pm 1,2	7/15 (46,7%)
Levedura-Brachyury (GI-6301)	1,9 \pm 0,5	2/15 (13,3%)

Os resultados na Fig. 6 e na Tabela 6 demonstram que a administração de uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury do invento é capaz de reduzir os tumores que expressam Brachyury em ratinhos, em comparação com ratinhos que recebem a levedura sozinha (sem antigénio de Brachyury).

Exemplo 9

O exemplo seguinte demonstra a geração de respostas de células T CD4⁺ específicas para Brachyury *in vitro*, utilizando imunoterapia à base de levedura-Brachyury em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humano obtidas de dadores saudáveis.

Nas experiências seguintes, uma proteína Brachyury humana completa foi expressa em células de inseto via expressão em baculovírus e subsequentemente purificada.

As células dendríticas (DC) foram preparadas a partir de PBMC de dadores saudáveis por cultura durante 5 dias com GM-

CSF e IL-4 e subsequentemente tratadas *in vitro* com levedura de controlo (YVEC, ver Exemplo 4) ou levedura-Brachyury (GI-6301, ver Exemplos 1 e 2) (relação levedura:DC = 1:1). Após 48 horas, as DC foram colhidas, irradiadas (30 Gy) e utilizadas para estimulação de PBMC autólogas, utilizando uma relação DC:PBMC = 1:10. No dia 3, adicionou-se IL-2 (10 U/ml) às culturas. No dia 7, as células T estimuladas foram colhidas e subsequentemente testadas quanto a produção de IFN- γ em resposta a PBMC autólogas irradiadas (relação células T:PBMC = 1:3) sozinhas ou na presença de 10 μ g/ml de proteína Brachyury purificada ou proteína albumina sérica humana de controlo. Após 96 horas de estimulação, recolheram-se os sobrenadantes e avaliaram-se quanto aos níveis de IFN- γ por ensaio ELISA. Avaliou-se um total de 9 dadores saudáveis, com 3/9 dadores mostrando respostas de células T CD4⁺ específicas para Brachyury após a estimulação *in vitro* com DC tratadas com levedura-Brachyury. Os resultados para 3 casos positivos estão apresentados na Tabela 7 (os valores indicam os níveis de IFN- γ em resposta à proteína Brachyury, após subtração do fundo referente à estimulação com a proteína albumina sérica humana de controlo; para o dador 3, efetuaram-se dois ciclos de estimulação antes de avaliar a resposta à proteína Brachyury).

Tabela 7

ID do dador	Estimulação de DC	Δ IFN- γ (pg/ml)
1	Levedura de controlo	1500,00
	Levedura-Brachyury	2950,0
2	Levedura de controlo	13,4
	Levedura-Brachyury	889,0
3	Levedura de controlo	17,4
	Levedura-Brachyury	102,8

Avaliaram-se seis dadores saudáveis adicionais quanto a respostas de células T CD4⁺ à proteína Brachyury após estimulação *in vitro* com DC tratadas com levedura-Brachyury (GI-6301), via coloração da citocina IFN- γ intracelular em

células CD4⁺. As células dendríticas foram preparadas a partir de PBMC de dadores saudáveis por cultura durante 5 dias com GM-CSF e IL-4 e subsequentemente tratadas *in vitro* com levedura de controlo (YVEC) ou levedura-Brachyury (GI-6301) (relação levedura:DC = 1:1). Após 48 horas, as DC foram colhidas, irradiadas (30 Gy) e utilizadas para estimulação de PBMC autólogas, utilizando uma relação DC:PBMC = 1:10. No dia 3, adicionou-se IL-2 (10 U/ml) às culturas. No dia 7, as células T estimuladas foram colhidas e subsequentemente testadas quanto a produção de IFN- γ em resposta a PBMC autólogas (relação células T:PBMC = 1:3) sozinhas ou na presença de 10 μ g/ml de proteína Brachyury purificada ou proteína albumina sérica humana de controlo. Após 2 horas de estimulação, adicionou-se o inibidor do transporte de proteínas BD GOLGISTOP™ (BD Biosciences) às culturas. Após 4 horas de estimulação, as células foram colhidas, permeabilizadas e coradas quanto a CD4 e IFN- γ utilizando anticorpos anti-CD4 PerCP-Cy5.5 e anti-IFN- γ FITC (BD Biosciences). Avaliou-se um total de 6 dadores saudáveis, com 2/6 dadores mostrando respostas de células T CD4⁺ específicas para Brachyury após a estimulação *in vitro* com DC tratadas com levedura-Brachyury. Os resultados para os casos positivos estão apresentados na Tabela 8 (os valores indicam a percentagem de células T que foram simultaneamente positivas para CD4 e IFN- γ intracelular em resposta a albumina sérica humana (HSA de *Human Serum Albumin*) de controlo ou proteína Brachyury, após subtração do fundo referente à estimulação com PBMC sozinhas).

Tabela 8

Dador	Número de estimulações <i>in vitro</i>	% células CD4 ⁺ /IFN- γ ⁺	
		HSA	Brachyury
4	1	0,07	0,24
5	2	0,00	1,00

Exemplo 10

O exemplo seguinte demonstra que uma composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury expressando um antígeno agonista de Brachyury gera células T específicas para Brachyury de um doente com cancro da próstata.

Para gerar uma linha de células T específicas para Brachyury, expuseram-se células dendríticas (DC) autólogas imaturas à composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury conhecida como GI-6305 (ver Exemplo 3), numa relação DC:GI-6305 = 1:1, durante 48 horas, e subsequentemente usaram-se como células apresentadoras de antígeno (APC) para estimular células autólogas não aderentes, numa relação efetor:APC de 10:1. As culturas foram incubadas durante 3 dias a 37 °C, numa atmosfera humidificada contendo 5% CO₂, e depois suplementadas com IL-2 humana recombinante, numa concentração de 20 U/ml, durante 7 dias adicionais. A cultura com 10 dias constituiu um ciclo de estimulação *in vitro* (IVS). As células T foram reestimuladas no dia 11 com DC autólogas expostas a GI-6305 como descrito acima, para iniciar o ciclo IVS seguinte. As DC autólogas expostas a GI-6305 foram usadas como APC para três ciclos IVS. Após o terceiro IVS, utilizaram-se células B autólogas transformadas com EBV irradiadas (23000 rad), pulsadas com um péptido agonista de Brachyury, WLLPGTSTV (SEQ ID NO:13), como APC. Estabeleceu-se uma linha de células T específicas para Brachyury, denominada T-2-BR-A. Esta linha de células T foi usada nos imunoensaios descritos abaixo.

A Tabela 9 demonstra que as células T específicas para Brachyury (T-2-BR-A) libertam níveis significativos de IFN- γ após a estimulação com DC alogénicas tratadas com GI-6305, enquanto a levedura de controlo (YVEC, ver Exemplo 4) não estimulou a libertação de IFN- γ pelas células T-2-BR-A. Os resultados estão expressos em pg/ml/10⁵ células T. Resumidamente, as células DC HLA-A2⁺ alogénicas de um dador normal foram tratadas com GI-6305 durante 48 horas, utilizando várias relações levedura:DC (indicadas na Tabela 9), e depois foram usadas para estimular as células T específicas para um epitopo agonista de Brachyury (T-2-BR-A). Nesta experiência, a relação DC:células T foi de 1:10.

Tabela 9

Células dendríticas	Tratamento	Relação levedura/DC	Células T	IFN-γ
+	Levedura de controlo	10:1	-	<15,6
+	Levedura de controlo	10:1	+	<15,6
-	-	-	+	52,1
+	GI-6305	10:1	-	<15,6
+	GI-6305	10:1	+	589,0
+	GI-6305	5:1	-	<15,6
+	GI-6305	5:1	+	661,1
+	GI-6305	2,5:1	-	<15,6
+	GI-6305	2,5:1	+	341,3
+	GI-6305	1:1	-	<15,6
+	GI-6305	1:1	+	388,2

A Tabela 10 demonstra que as células T específicas para Brachyury, estabelecidas utilizando DC tratadas com GI-6305, podem efetuar a lise eficaz de células de cancro da mama MDA-MB-231 que são HLA-A2⁺/Brachyury⁺, mas não lisam as células de cancro pancreático ASPC-1 que são HLA-A2⁻/Brachyury⁺. Resumidamente, utilizou-se a linha de células T específicas para Brachyury T-2-BR-A, no IVS 6, num ensaio de células T citotóxicas (Tc) contra alvos constituídos por células tumorais MDA-MB-231 (HLA-A2⁺/Brachyury⁺) e ASPC-1 (HLA-A2⁻/Brachyury⁺), às relações efetor:alvo (EA) indicadas (ver Tabela 10), durante a noite. Os resultados estão expressos como a percentagem de lise específica.

Tabela 10

Relação E:A	MDA-MB-231	ASPC-1
25:1	52,2 (2,8)	-5,1 (2,6)
12,5:1	23,8 (1,4)	0,2 (5,6)
6,25:1	13,9 (4,4)	2,3 (3,3)

Noutra experiência, avaliou-se a capacidade da linha celular T-2-BR-A para se ligar a tetrâmeros HLA-A2 específicos para Brachyury. Resumidamente, as células T-2-BR-A (usadas no IVS 4) foram coradas com um tetrâmero de controlo ou um tetrâmero específico para o péptido agonista de Brachyury. As Figuras 7A e 7B mostram que 10,8% das células T CD8+ na linha celular T-2-BR-A gerada com células DC tratadas com GI-6305 ligam-se especificamente a um tetrâmero Brachyury-HLA-A2 (Fig. 7B) e não se ligam a um tetrâmero de controlo (Fig. 7A).

A expressão de perforina da linha de células T T-2-BR-A foi analisada por citometria de fluxo (a perforina é um mediador da atividade citolítica das células T citotóxicas (células Tc)). Resumidamente, as células T foram testadas no dia 5 após a reestimulação com células B autólogas transformadas com EBV e pulsadas com o péptido agonista de Brachyury. A Fig. 8 apresenta a expressão de perforina na linha celular T-2-BR-A após estimulação com as células B autólogas pulsadas com o péptido agonista de Brachyury, demonstrando adicionalmente a capacidade citotóxica desta linha de células T específica para Brachyury, que foi produzida utilizando células DC tratadas com GI-6305.

Exemplo 11

O exemplo seguinte descreve um ensaio clínico de fase 1 em sujeitos com cancro positivo para Brachyury.

Iniciou-se um ensaio clínico de fase 1, aberto, com escalonamento de dose sequencial, utilizando a composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury conhecida como GI-6301 descrita nos Exemplos 1, 2 e 4-9. Ao abrigo deste protocolo de ensaio clínico, 9-18 doentes com cancro (3-6 doentes por coorte de dose) recebem a composição de imunoterapia à base de levedura-Brachyury conhecida como GI-6301 num protocolo de escalonamento de dose sequencial, utilizando intervalos de dose de 4 Y.U. (1 Y.U. x 4 sítios, o que significa que é administrada 1 Y.U. de GI-6301 em 4 sítios diferentes no corpo do doente em cada visita), 16 Y.U. (4 Y.U. x 4 sítios) e 40 Y.U. (10 Y.U. x 4 sítios), administrada subcutaneamente. GI-6301 é administrada com

intervalos de 2 semanas durante um total de 7 visitas (~3 meses) e depois disso mensalmente até os doentes atingirem os critérios *off-study*. Seleciona-se uma coorte expandida de doentes (n = 10) à dose máxima tolerada (MTD) ou à melhor dose observada para estudo adicional. Os resultados são monitorizar a segurança e a tolerabilidade como um parâmetro de avaliação primário e, na coorte expandida, se é detetável uma alteração significativa nos precursores de células T conforme medida por um aumento das células T específicas para Brachyury no ensaio ELISpot e proliferação em resposta à proteína Brachyury (por exemplo, surgimento ou aumento de células T CD8⁺ ou CD4⁺ específicas para Brachyury com o tratamento). Como parâmetros de avaliação secundários, mede-se o benefício clínico, como a sobrevivência livre de progressão, a resposta radiográfica clínica, uma redução dos marcadores séricos e/ou uma redução das células tumorais circulantes, assim como parâmetros da ativação imune geral, incluindo a frequência de subconjuntos de células imunitárias no sangue periférico (células T CD8⁺ memória/efetoras, células T CD4⁺ memória/efetoras, células Treg, células NK, células DC) e alterações nos níveis séricos de citocinas (por exemplo, IFN- γ , IL-10, IL-12, IL-2, IL-4, TGF- β , etc.).

Espera-se que GI-6301 seja segura e bem tolerada sem toxicidades significativas. Além disso, espera-se que GI-6301 produza respostas de células T específicas para Brachyury emergentes do tratamento ou uma melhoria das respostas de células T basais específicas para Brachyury pré-existentes em pelo menos alguns ou numa maioria dos doentes. Espera-se também que alguns doentes tenham a doença estabilizada.

Num estudo adicional ou numa expansão deste estudo, a composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury conhecida como GI-6305 (ver Exemplo 3) é administrada a uma coorte adicional de doentes, utilizando a dose máxima tolerada ou a melhor dose observada determinada acima, e medem-se os mesmos parâmetros de avaliação primários e secundários. Espera-se que GI-6305 também seja segura e bem tolerada sem toxicidades significativas, assim como produza respostas de células T específicas para Brachyury emergentes do tratamento ou uma melhoria das respostas de células T basais específicas para Brachyury pré-existentes em pelo menos alguns ou numa maioria dos doentes. Espera-se também que alguns doentes tenham a doença estabilizada.

Exemplo 12

O exemplo seguinte descreve um ensaio clínico de fase 2 utilizando composições imunoterapêuticas de levedura-Brachyury.

Efetua-se um ensaio clínico randomizado de fase 2 em doentes com cancro da mama, utilizando uma composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury como descrita no Exemplo 1 e 2 (por exemplo, GI-6301) ou no Exemplo 3 (GI-6305). Incluem-se no estudo pelo menos 100 ou mais sujeitos com cancro da mama positivo para Brachyury em estágio I, II ou III. Os critérios de inclusão dos sujeitos podem incluir sujeitos com cancros de grau 1, 2 ou 3. Os critérios de inclusão dos sujeitos também podem incluir sujeitos com cancro da mama "triplo negativo" (cancros que são negativos para recetor de estrogénio (ER), recetor de progesterona (PR) e HER2). Os critérios de inclusão dos sujeitos também podem incluir doentes com cancro negativo nos gânglios linfáticos.

O ensaio é realizado como um ensaio multicêntrico, controlado por placebo, aberto ou duplamente cego. Todos os doentes recebem um padrão de cuidados terapêutico, e os doentes do braço de tratamento recebem várias injeções em série da composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury durante o tratamento. O parâmetro de avaliação primário é a sobrevivência livre de recidivas ou a sobrevivência geral. Os parâmetros de avaliação adicionais podem incluir respostas de células T específicas para antigénio (por exemplo, surgimento ou aumento de células T CD8⁺ específicas para Brachyury com o tratamento), manutenção de negatividade nos gânglios linfáticos, progressão para metástases e expressão de Brachyury nas células tumorais.

Espera-se que a composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury seja segura e bem tolerada sem toxicidades significativas. Além disso, espera-se que a composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury produza respostas de células T específicas para Brachyury emergentes do tratamento e/ou uma melhoria das respostas de células T basais específicas para Brachyury pré-existentes em pelo menos

alguns ou numa maioria dos doentes. Espera-se também que alguns ou uma maioria dos doentes tenham a doença estabilizada, mantenham negatividade nos gânglios linfáticos e/ou prevenção, redução ou paragem da progressão metastática.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> OS ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, representados pelo Secretário,
Department of Health
GlobeImmune, Inc.
Palena, Claudia
Guo, Zhimin
Apelian, David
Schlom, Jeffrey

<120> Composições imunoterapêuticas de levedura-Brachyury para o cancro

<130> 3923-34-PCT

<150> 61/453,656

<151> 2011-03-17

<160> 20

<170> PatentIn, versão 3.5

<210> 1

<211> 2518

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (494) .. (1801)

<400> 1

tttgcttttg cttatttccg tccatttccc tctctgcgcg cggaccttcc ttttccagat	60
ggtgagagcc gcggggacac ccgacgcgcg ggcaggctga tccacgatcc tgggtgtgcg	120
taacgcgcgc tggggctccg tgggcgaggg acgtgtgggg acaggtgcac cggaaactgc	180
cagactggag agttgaggca tcggaggcgc gagaacagca ctactactgc ggcgagacga	240
gcgcggcgca tcccaaagcc cggccaaatg cgctcgtccc tgggagggga gggaggcgcg	300
cctggagcgg ggacagtctt ggtccgcgcc ctctcccggt gtctgtgcgc ggaccgggga	360
cccgggagcc gtcgcaggtc tcggtccaag gggccccctt tctcggaagg gcggcggcca	420
agagcagggga aggtggatct caggtagcga gtctgggctt cggggacggc ggggagggga	480
gccggacggg agg atg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg gga aag agc	529
Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser	
1 5 10	
ctg cag tac cga gtg gac cac ctg ctg agc gcc gtg gag aat gag ctg	577
Leu Gln Tyr Arg Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu	
15 20 25	
cag gcg ggc agc gag aag ggc gac ccc aca gag cgc gaa ctg cgc gtg	625
Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val	
30 35 40	
ggc ctg gag gag agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag ctc acc aat	673
Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn	
45 50 55 60	

gag atg atc gtg acc aag aac ggc agg agg atg ttt ccg gtg ctg aag Glu Met Ile Val Ser Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys 65 70 75	721
gtg aac gtg tct ggc ctg gac ccc aac gcc atg tac tcc ttc ctg ctg Val Asn Val Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu 80 85 90	769
gac ttc gtg gcg gcg gac aac cac cgc tgg aag tac gtg aac ggg gaa Asp Phe Val Ala Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu 95 100 105	817
tgg gtg ccg ggg ggc aag ccg gag ccg cag gcg ccc agc tgc gtc tac Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr 110 115 120	865
atc cac ccc gac tgc ccc aac ttc ggg gcc cac tgg atg aag gct ccc Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro 125 130 135 140	913
gtc tcc ttc agc aaa gtc aag ctc acc aac aag ctc aac gga ggg ggc Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly 145 150 155	961
cag atc atg ctg aac tcc ttg cat aag tat gag cct cga atc cac ata Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile 160 165 170	1009
gtg aga gtt ggg ggt cca cag cgc atg atc acc agc cac tgc ttc cct Val Arg Val Gly Gly Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro 175 180 185	1057
gag acc cag ttc ata gcg gtg act gct tat cag aac gag gag atc aca Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr 190 195 200	1105
gct ctt aaa att aag tac aat cca ttt gca aaa gct ttc ctt gat gca Ala Leu Lys Ile Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala 205 210 215 220	1153
aag gaa aga agt gat cac aaa gag atg atg gag gaa ccc gga gac agc Lys Glu Arg Ser Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser 225 230 235	1201
cag caa cct ggg tac tcc caa tgg ggg tgg ctt ctt cct gga acc agc Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser 240 245 250	1249
acc ctg tgt cca cct gca aat cct cat cct cag ttt gga ggt gcc ctc Thr Leu Cys Pro Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu 255 260 265	1297
tcc ctc ccc tcc acg cac agc tgt gac agg tac cca acc ctg agg agc Ser Leu Pro Ser Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser 270 275 280	1345
cac cgg tcc tca ccc tac ccc agc ccc tat gct cat cgg aac aat tct His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser 285 290 295 300	1393
cca acc tat tct gac aac tca cct gca tgt tta tcc atg ctg caa tcc Pro Thr Tyr Ser Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser	1441

305	310	315	
cat gac aat tgg tcc agc ctt gga atg cct gcc cat ccc agc atg ctc His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu 320 325 330			1489
ccc gtg agc cac aat gcc agc cca cct acc agc tcc agt cag tac ccc Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro 335 340 345			1537
agc ctg tgg tct gtg agc aac ggc gcc gtc acc ccg ggc tcc cag gca Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala 350 355 360			1585
gca gcc gtg tcc aac ggg ctg ggg gcc cag ttc ttc ccg ggc tcc ccc Ala Ala Val Ser Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro 365 370 375 380			1633
gcg cac tac aca ccc ctc acc cat ccg gtc tcg gcg ccc tct tcc tcg Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser 385 390 395			1681
gga tcc cca ctg tac gaa ggg gcg gcc gcg gcc aca gac atc gtg gac Gly Ser Pro Leu Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Thr Asp Ile Val Asp 400 405 410			1729
agc cag tac gac gcc gca gcc caa ggc cgc ctc ata gcc tca tgg aca Ser Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr 415 420 425			1777
cct gtg tcg cca cct tcc atg tga agcagcaagg ccaggtccc gaaagatgca Pro Val Ser Pro Pro Ser Met 430 435			1831
gtgacttttt gtcggtggcag ccagtggtga ctggattgac ctactaggta ccagtggtga			1891
gtctcaggtt aagaaggaaa tgcagcctca gtaacttcct tttcaaagca gtggaggagc			1951
acacggcacc tttcccaga gccccagcat cccttgctca cacctgcagt agcgggtgctg			2011
tcccaggtgg cttacagatg aacccaactg tggagatgat gcagttggcc caacctcact			2071
gacggtgaaa aaatgtttgc cagggtccag aaactttttt tggttttattt ctcatacagt			2131
gtattggcaa ctttggcaca ccagaatttg taaactccac cagtcctact ttagtgagat			2191
aaaaagcaca ctcttaattct tcttccttgt tgctttcaag tagttagagt tgagctgtta			2251
aggacagaat aaaatcatag ttgaggacag caggttttag ttgaattgaa aatttgactg			2311
ctctgcccc tagaatgtgt gtattttaag catatgtagc taatctcttg tgttggttaa			2371
ctataactgt ttcataatttt tcttttgaca aagtagccaa agacaatcag cagaaagcat			2431
tttctgcaaa ataaacgcaa tatgcaaaat gtgattcgtc cagttattag tgaagcccct			2491
ccttttgtga gtatttactg tttattg			2518

<210> 2

<211> 435

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg
 1           5           10           15

Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser
      20           25           30

Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu
      35           40           45

Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val
 50           55           60

Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser
 65           70           75           80

Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala
      85           90           95

Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly
      100          105          110

Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp
 115           120           125

Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser
 130           135          140

Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu
 145           150          155          160

Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly
      165          170          175

Gly Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe
      180          185          190

Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile
      195          200          205

Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Arg Ser
 210           215          220

Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly
 225           230          235          240

```

Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Leu Cys Pro
 245 250 255
 Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser
 260 265 270
 Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser
 275 280 285
 Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser
 290 295 300
 Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp
 305 310 315 320
 Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His
 325 330 335
 Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser
 340 345 350
 Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Val Ser
 355 360 365
 Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr
 370 375 380
 Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu
 385 390 395 400
 Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asp Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp
 405 410 415
 Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro
 420 425 430
 Pro Ser Met
 435

<210> 3

<211> 2046

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (109) .. (1419)

<400> 3

```

ggctccgcag agtgaccctt tttcttgaa aagcgggtggc gagagaagtg aaggtggctg      60
ttgggtaggg agtcaagact cctggaaggt ggagaggggtg gcggggagg atg agc tcg      117
                                     Met Ser Ser
                                     1

ccg ggc aca gag agc gca ggc aag agc ctg cag tac cga gtg gac cac      165
Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg Val Asp His
   5                                10                                15

ctg ctc agc gcc gtg gag agc gag ctg cag gcg ggc agc gag aag gga      213
Leu Leu Ser Ala Val Glu Ser Glu Leu Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly
  20                                25                                30                                35

gac ccc acc gaa cgc gaa ctg cga gtg ggc ctg gag gag agc gag ctg      261
Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu
          40                                45                                50

tgg ctg cgc ttc aag gag cta act aac gag atg att gtg acc aag aac      309
Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val Thr Lys Asn
          55                                60                                65

ggc agg agg atg ttc ccg gtg ctg aag gta aat gtg tca ggc ctg gac      357
Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser Gly Leu Asp
          70                                75                                80

ccc aat gcc atg tac tct ttc ttg ctg gac ttc gtg acg gct gac aac      405
Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Thr Ala Asp Asn
   85                                90                                95

cac cgc tgg aaa tat gtg aac ggc gag tgg gta cct ggc ggc aaa cca      453
His Arg Trp Lys Tyr Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro
 100                                105                                110                                115

gag cct cag gcg ccc agc tgc gtc tac atc cac cca gac tcg ccc aat      501
Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Asn
          120                                125                                130

ttt ggg gcc cac tgg atg aag gcg cct gtg tct ttc agc aaa gtc aaa      549
Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser Lys Val Lys
          135                                140                                145

ctc acc aac aag ctc aat gga ggc gga cag atc atg tta aac tcc ttg      597
Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu
          150                                155                                160

cat aag tat gaa cct cgg att cac atc gtg aga gtt ggc ggc ccg caa      645
His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly Gly Pro Gln
          165                                170                                175

cgc atg atc acc agc cac tgc ttt ccc gag acc cag ttc ata gct gtg      693
Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val
 180                                185                                190                                195

act gcc tac cag aat gag gag att aca gcc ctt aaa att aaa tac aac      741
Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile Lys Tyr Asn
          200                                205                                210

cca ttt gct aaa gcc ttc ctt gat gcc aaa gaa aga aac gac cac aaa      789
Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Arg Asn Asp His Lys
          215                                220                                225

gat gta atg gag gaa ccg ggc gac tgc cag cag ccg ggc tat tcc caa      837

```

Asp	Val	Met	Glu	Glu	Pro	Gly	Asp	Cys	Gln	Gln	Pro	Gly	Tyr	Ser	Gln		
		230					235					240					
tgg	ggg	tgg	ctt	gtt	cct	ggt	gct	ggc	acc	ctc	tgc	cgg	cct	gcc	agc	885	
Trp	Gly	Trp	Leu	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Thr	Leu	Cys	Pro	Pro	Ala	Ser		
		245					250				255						
tcc	cac	cct	cag	ttt	gga	ggc	tcg	ctc	tct	ctc	ccc	tcc	aca	cac	ggc	933	
Ser	His	Pro	Gln	Phe	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Leu	Pro	Ser	Thr	His	Gly		
		260				265				270					275		
tgt	gag	agg	tac	cca	gct	cta	agg	aac	cac	cgg	tca	tcg	ccc	tac	ccc	981	
Cys	Glu	Arg	Tyr	Pro	Ala	Leu	Arg	Asn	His	Arg	Ser	Ser	Pro	Tyr	Pro		
				280					285					290			
agc	ccc	tat	gct	cat	cgg	aac	agc	tct	cca	acc	tat	gcg	gac	aat	tca	1029	
Ser	Pro	Tyr	Ala	His	Arg	Asn	Ser	Ser	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asn	Ser		
			295					300					305				
tct	gct	tgt	ctg	tcc	atg	ctg	cag	tcc	cat	gat	aac	tgg	tct	agc	ctc	1077	
Ser	Ala	Cys	Leu	Ser	Met	Leu	Gln	Ser	His	Asp	Asn	Trp	Ser	Ser	Leu		
		310					315					320					
gga	gtg	cct	ggc	cac	acc	agc	atg	ctg	cct	gtg	agt	cat	aac	gcc	agc	1125	
Gly	Val	Pro	Gly	His	Thr	Ser	Met	Leu	Pro	Val	Ser	His	Asn	Ala	Ser		
		325					330				335						
cca	cct	act	ggc	tct	agc	cag	tat	ccc	agt	ctc	tgg	tct	gtg	agc	aat	1173	
Pro	Pro	Thr	Gly	Ser	Ser	Gln	Tyr	Pro	Ser	Leu	Trp	Ser	Val	Ser	Asn		
					345					350					355		
ggt	acc	atc	acc	cca	ggc	tcc	cag	aca	gct	ggg	gtg	tcc	aac	ggg	ctg	1221	
Gly	Thr	Ile	Thr	Pro	Gly	Ser	Gln	Thr	Ala	Gly	Val	Ser	Asn	Gly	Leu		
				360				365						370			
gga	gct	cag	ttc	ttt	cga	ggc	tcc	cct	gca	cat	tac	aca	cca	ctg	acg	1269	
Gly	Ala	Gln	Phe	Phe	Arg	Gly	Ser	Pro	Ala	His	Tyr	Thr	Pro	Leu	Thr		
			375					380				385					
cac	acg	gtc	tca	gct	gcc	acg	tcc	tcg	tct	tct	ggg	tct	cgg	atg	tat	1317	
His	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Pro	Met	Tyr		
		390					395				400						
gaa	ggg	gct	gct	aca	gtc	aca	gac	att	tct	gac	agc	cag	tat	gac	acg	1365	
Glu	Gly	Ala	Ala	Thr	Val	Thr	Asp	Ile	Ser	Asp	Ser	Gln	Tyr	Asp	Thr		
		405				410				415							
gcc	caa	agc	ctc	ctc	ata	gcc	tcg	tgg	aca	cct	gtg	tca	ccc	cca	tct	1413	
Ala	Gln	Ser	Leu	Leu	Ile	Ala	Ser	Trp	Thr	Pro	Val	Ser	Pro	Pro	Ser		
				425						430					435		
atg	tga	attgaacttt				cctccatgtg		ctgagacttg		taacaaccgg				tgtcaactgg			1469
Met																	
atcttctagg ctcaaagtgg caggctcttg ggacaaggga aaaataaata aataaaagct																	1529
agatactaac aactccattt tcaaataaga gcaataatac atgtccctata atcatgttct																	1589
acagcctctt gtttgatacc tacagtagtg atatgtgtcc tacattatga agccaaggac																	1649
agagagacgg ctgtggtcca gtttttttg actggcagtt aatcagagtc ctttgctagg																	1709
tagggctcta tatcttgtgt ttctctacaa catatatgtg actttgaaat cctggaattc																	1769
gtccaccccc tgtcctaact tagtgagaca caaggtacac ctctaagtgc ctcccttggt																	1829
gccttagagt agttaacttt gaggacagaa aaaagcatag ccagaagatt gtaactgaac																	1889
cgtcaactgt totgcccttg gaacatgcct actttaagca cacgtagctt tttgtgttg																	1949
gaagtcaact gtatggatac ttttctgttg acaaagtagc caaagacaat ctgcagaaag																	2009
tgttttctgc acaataaaqg caatatatac cacctgg																	2049

<210> 4

<211> 436

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met	Ser	Ser	Pro	Gly	Thr	Glu	Ser	Ala	Gly	Lys	Ser	Leu	Gln	Tyr	Arg
1				5					10					15	

Val	Asp	His	Leu	Leu	Ser	Ala	Val	Glu	Ser	Glu	Leu	Gln	Ala	Gly	Ser
			20					25					30		

Glu	Lys	Gly	Asp	Pro	Thr	Glu	Arg	Glu	Leu	Arg	Val	Gly	Leu	Glu	Glu
		35					40					45			

Ser	Glu	Leu	Trp	Leu	Arg	Phe	Lys	Glu	Leu	Thr	Asn	Glu	Met	Ile	Val
	50					55					60				

Thr	Lys	Asn	Gly	Arg	Arg	Met	Phe	Pro	Val	Leu	Lys	Val	Asn	Val	Ser
65					70					75					80

Gly	Leu	Asp	Pro	Asn	Ala	Met	Tyr	Ser	Phe	Leu	Leu	Asp	Phe	Val	Thr
				85					90					95	

Ala	Asp	Asn	His	Arg	Trp	Lys	Tyr	Val	Asn	Gly	Glu	Trp	Val	Pro	Gly
			100					105					110		

Gly	Lys	Pro	Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	Ser	Cys	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Asp
		115					120					125			

Ser	Pro	Asn	Phe	Gly	Ala	His	Trp	Met	Lys	Ala	Pro	Val	Ser	Phe	Ser
	130					135					140				

Lys	Val	Lys	Leu	Thr	Asn	Lys	Leu	Asn	Gly	Gly	Gly	Gln	Ile	Met	Leu
145					150					155					160

Asn	Ser	Leu	His	Lys	Tyr	Glu	Pro	Arg	Ile	His	Ile	Val	Arg	Val	Gly
				165					170					175	

Gly Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe
 180 185 190
 Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile
 195 200 205
 Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Arg Asn
 210 215 220
 Asp His Lys Asp Val Met Glu Glu Pro Gly Asp Cys Gln Gln Pro Gly
 225 230 235 240
 Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Val Pro Gly Ala Gly Thr Leu Cys Pro
 245 250 255
 Pro Ala Ser Ser His Pro Gln Phe Gly Gly Ser Leu Ser Leu Pro Ser
 260 265 270
 Thr His Gly Cys Glu Arg Tyr Pro Ala Leu Arg Asn His Arg Ser Ser
 275 280 285
 Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Ser Ser Pro Thr Tyr Ala
 290 295 300
 Asp Asn Ser Ser Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp
 305 310 315 320
 Ser Ser Leu Gly Val Pro Gly His Thr Ser Met Leu Pro Val Ser His
 325 330 335
 Asn Ala Ser Pro Pro Thr Gly Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser
 340 345 350
 Val Ser Asn Gly Thr Ile Thr Pro Gly Ser Gln Thr Ala Gly Val Ser
 355 360 365
 Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr
 370 375 380
 Pro Leu Thr His Thr Val Ser Ala Ala Thr Ser Ser Ser Ser Gly Ser
 385 390 395 400
 Pro Met Tyr Glu Gly Ala Ala Thr Val Thr Asp Ile Ser Asp Ser Gln
 405 410 415
 Tyr Asp Thr Ala Gln Ser Leu Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser
 420 425 430
 Pro Pro Ser Met
 435

<210> 5

<211> 1305

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1305)

<400> 5

atg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg gga aag agc ctg cag tac cga	48
Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg	
1 5 10 15	
gtg gac cac ctg ctg agc gcc gtg gag aat gag ctg cag gcg gcc agc	96
Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser	
20 25 30	
gag aag ggc gac ccc aca gag cgc gaa ctg cgc gtg gcc ctg gag gag	144
Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu	
35 40 45	
agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag ctc acc aat gag atg atc gtg	192
Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val	
50 55 60	
acc aag aac ggc agg agg atg ttt ccg gtg ctg aag gtg aac gtg tct	240
Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser	
65 70 75 80	
ggc ctg gac ccc aac gcc atg tac tcc ttc ctg ctg gac ttc gtg gcg	288
Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala	
85 90 95	
gcg gac aac cac cgc tgg aag tac gtg aac ggg gaa tgg gtg ccg ggg	336
Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly	
100 105 110	
ggc aag ccg gag ccg cag gcg ccc agc tgc gtc tac atc cac ccc gac	384
Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp	
115 120 125	
tcg ccc aac ttc ggg gcc cac tgg atg aag gct ccc gtc tcc ttc agc	432
Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser	
130 135 140	
aaa gtc aag ctc acc aac aag ctc aac gga ggg gcc cag atc atg ctg	480
Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu	
145 150 155 160	
aac tcc ttg cat aag tat gag cct cga atc cac ata gtg aga gtt ggg	528
Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly	
165 170 175	
gat cca cag cgc atg atc acc agc cac tgc ttc cct gag acc cag ttc	576
Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe	

180	185	190	
ata gcg gtg act gct tat cag aac gag gag atc aca gct ctt aaa att			624
Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile			
195	200	205	
aag tac aat cca ttt gca aaa gct ttc ctt gat gca aag gaa aga agt			672
Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Arg Ser			
210	215	220	
gat cac aaa gag atg atg gag gaa ccc gga gac agc cag caa cct ggg			720
Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly			
225	230	235	240
tac tcc caa tgg ggg tgg ctt ctt cct gga acc agc acc ctg tgt cca			768
Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Leu Cys Pro			
	245	250	255
cct gca aat cct cat cct cag ttt gga ggt gcc ctc tcc ctc ccc tcc			816
Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser			
	260	265	270
acg cac agc tgt gac agg tac cca acc ctg agg agc cac cgg tcc tca			864
Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser			
	275	280	285
ccc tac ccc agc ccc tat gct cat cgg aac aat tct cca acc tat tct			912
Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser			
	290	295	300
gac aac tca cct gca tgt tta tcc atg ctg caa tcc cat gac aat tgg			960
Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp			
305	310	315	320
tcc agc ctt gga atg cct gcc cat ccc agc atg ctc ccc gtg agc cac			1008
Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His			
	325	330	335
aat gcc agc cca cct acc agc tcc agt cag tac ccc agc ctg tgg tct			1056
Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser			
	340	345	350
gtg agc aac ggc gcc gtc acc ccg ggc tcc cag gca gca gcc gtg acc			1104
Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Ala Val Thr			
	355	360	365
aac ggg ctg ggg gcc cag ttc ttc cgg ggc tcc ccc gcg cac tac aca			1152
Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr			
	370	375	380
ccc ctc acc cat ccg gtc tgg gca ccc tct tcc tgg gga tcc cca ctg			1200
Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu			
	385	390	395
tac gaa ggg gcg gcc gcg gcc aca aac atc gtg gac agc cag tac gac			1248
Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Thr Asn Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp			
	405	410	415
gcc gca gcc caa ggc cgc ctc ata gcc tca tgg aca cct gtg tgg cca			1296
Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro			
	420	425	430
cct tcc atg			1305
Pro Ser Met			
	435		

<210> 6

<211> 435

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg
 1           5           10           15

Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser
      20           25           30

Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu
      35           40           45

Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val
 50           55           60

Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser
 65           70           75           80

Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala
      85           90           95

Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly
      100          105          110

Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp
      115          120          125

Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser
      130          135          140

Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu
      145          150          155          160

Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly
      165          170          175

Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe
      180          185          190

Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile
      195          200          205

```

Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Arg Ser
 210 215 220
 Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly
 225 230 235 240
 Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Leu Cys Pro
 245 250 255
 Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser
 260 265 270
 Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser
 275 280 285
 Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser
 290 295 300
 Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp
 305 310 315 320
 Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His
 325 330 335
 Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser
 340 345 350
 Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Val Thr
 355 360 365
 Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr
 370 375 380
 Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu
 385 390 395 400
 Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asn Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp
 405 410 415
 Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro
 420 425 430
 Pro Ser Met
 435

<210> 7

<211> 1357

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> CDS

<222> (10)..(1347)

<400> 7

```

gaattccgc atg gcc gat gaa gct ccg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg      51
      Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala
        1              5              10

gga aag agc ctg cag tac cga gtg gac cac ctg ctg agc gcc gtg gag      99
Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu
15              20              25              30

aat gag ctg cag gcg ggc agc gag aag ggc gac ccc aca gag cgc gaa      147
Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu
              35              40              45

ctg cgc gtg ggc ctg gag gag agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag      195
Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu
              50              55              60

ctc acc aat gag atg atc gtg acc aag aac ggc agg agg atg ttt ccg      243
Leu Thr Asn Glu Met Ile Val Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro
              65              70              75

gtg ctg aag gtg aac gtg tct ggc ctg gac ccc aac gcc atg tac tcc      291
Val Leu Lys Val Asn Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser
80              85              90

ttc ctg ctg gac ttc gtg gcg gcg gac aac cac cgc tgg aag tac gtg      339
Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val
95              100              105              110

aac ggg gaa tgg gtg ccg ggg ggc aag ccg gag ccg cag gcg ccc agc      387
Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser
              115              120              125

tgc gtc tac atc cac ccc gac tcg ccc aac ttc ggg gcc cac tgg atg      435
Cys Val Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met
              130              135              140

aag gct ccc gtc tcc ttc agc aaa gtc aag ctc acc aac aag ctc aac      483
Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn
              145              150              155

gga ggg ggc cag atc atg ctg aac tcc ttg cat aag tat gag cct cga      531
Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg
160              165              170

atc cac ata gtg aga gtt ggg gat cca cag cgc atg atc acc agc cac      579
Ile His Ile Val Arg Val Gly Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His
175              180              185              190

tgc ttc cct gag acc cag ttc ata gcg gtg act gct tat cag aac gag      627
Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu
              195              200              205

```

gag atc aca gct ctt aaa att aag tac aat cca ttt gca aaa gct ttc 675
 Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe
 210 215 220
 ctt gat gca aag gaa aga agt gat cac aaa gag atg atg gag gaa ccc 723
 Leu Asp Ala Lys Glu Arg Ser Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro
 225 230 235
 gga gac agc cag caa cct ggg tac tcc caa tgg ggg tgg ctt ctt cct 771
 Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro
 240 245 250
 gga acc agc acc ctg tgt cca cct gca aat cct cat cct cag ttt gga 819
 Gly Thr Ser Thr Leu Cys Pro Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly
 255 260 265 270
 ggt gcc ctc tcc ctc ccc tcc acg cac agc tgt gac agg tac cca acc 867
 Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr
 275 280 285
 ctg agg agc cac cgg tcc tca ccc tac ccc agc ccc tat gct cat cgg 915
 Leu Arg Ser His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg
 290 295 300
 aac aat tct cca acc tat tct gac aac tca cct gca tgt tta tcc atg 963
 Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met
 305 310 315
 ctg caa tcc cat gac aat tgg tcc agc ctt gga atg cct gcc cat ccc 1011
 Leu Gln Ser His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro
 320 325 330
 agc atg ctc ccc gtg agc cac aat gcc agc cca cct acc agc tcc agt 1059
 Ser Met Leu Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser
 335 340 345 350
 cag tac ccc agc ctg tgg tct gtg agc aac ggc gcc gtc acc ccg ggc 1107
 Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly
 355 360 365
 tcc cag gca gca gcc gtg acc aac ggg ctg ggg gcc cag ttc ttc cgg 1155
 Ser Gln Ala Ala Val Thr Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg
 370 375 380
 ggc tcc ccc gcg cac tac aca ccc ctc acc cat ccg gtc tcg gca ccc 1203
 Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro
 385 390 395
 tct tcc tcg gga tcc cca ctg tac gaa ggg gcg gcc gcg gcc aca aac 1251
 Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asn
 400 405 410
 atc gtg gac agc cag tac gac gcc gca gcc caa ggc cgc ctc ata gcc 1299
 Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala
 415 420 425 430
 tca tgg aca cct gtg tcg cca cct tcc atg cat cac cat cac cat cac 1347
 Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro Pro Ser Met His His His His His His
 435 440 445
 tgagactagt 1357

<210> 8

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 8

```

Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys
1           5           10           15

Ser Leu Gln Tyr Arg Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu
                20           25           30

Leu Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg
          35           40           45

Val Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr
    50           55           60

Asn Glu Met Ile Val Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu
65           70           75           80

Lys Val Asn Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu
          85           90           95

Leu Asp Phe Val Ala Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly
          100           105           110

Glu Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val
    115           120           125

Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala
    130           135           140

Pro Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly
145           150           155           160

Gly Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His
          165           170           175

Ile Val Arg Val Gly Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe
          180           185           190

Pro Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile
    195           200           205

Thr Ala Leu Lys Ile Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp

```

210	215	220
Ala Lys Glu Arg Ser Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp 225 230 235 240		
Ser Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr 245 250 255		
Ser Thr Leu Cys Pro Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala 260 265 270		
Leu Ser Leu Pro Ser Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg 275 280 285		
Ser His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn 290 295 300		
Ser Pro Thr Tyr Ser Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln 305 310 315 320		
Ser His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met 325 330 335		
Leu Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr 340 345 350		
Pro Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln 355 360 365		
Ala Ala Ala Val Thr Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser 370 375 380		
Pro Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser 385 390 395 400		
Ser Gly Ser Pro Leu Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asn Ile Val 405 410 415		
Asp Ser Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp 420 425 430		
Thr Pro Val Ser Pro Pro Ser Met His His His His His His 435 440 445		

<210> 9

<211> 1360

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> CDS

<222> (10)..(1353)

<400> 9

```

gaattccgc atg gcc gat gaa gct ccg agc tcg ccg ggc aca gag agc gca      51
      Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala
        1              5              10

ggg aag agc ctg cag tac cga gtg gac cac ctg ctc agc gcc gtg gag      99
Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu
15              20              25              30

agc gag ctg cag gcg ggc agc gag aag gga gac ccc acc gaa cgc gaa      147
Ser Glu Leu Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu
              35              40              45

ctg cga gtg ggc ctg gag gag agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag      195
Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu
              50              55              60

cta act aac gag atg att gtg acc aag aac ggc agg agg atg ttc ccg      243
Leu Thr Asn Glu Met Ile Val Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro
              65              70              75

gtg ctg aag gta aat gtg tca ggc ctg gac ccc aat gcc atg tac tct      291
Val Leu Lys Val Asn Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser
      80              85              90

ttc ttg ctg gac ttc gtg acg gct gac aac cac cgc tgg aaa tat gtg      339
Phe Leu Leu Asp Phe Val Thr Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val
95              100              105              110

aac ggg gag tgg gta cct ggg ggc aaa cca gag cct cag gcg ccc agc      387
Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser
              115              120              125

tgc gtc tac atc cac cca gac tcg ccc aat ttt ggg gcc cac tgg atg      435
Cys Val Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met
              130              135              140

aag gcg cct gtg tct ttc agc aaa gtc aaa ctc acc aac aag ctc aat      483
Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn
              145              150              155

gga ggg gga cag atc atg tta aac tcc ttg cat aag tat gaa cct cgg      531
Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg
      160              165              170

att cac atc gtg aga gtt ggg ggc ccg caa cgc atg atc acc agc cac      579
Ile His Ile Val Arg Val Gly Gly Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His
175              180              185              190

tgc ttt ccc gag acc cag ttc ata gct gtg act gcc tac cag aat gag      627
Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu
              195              200              205

gag att aca gcc ctt aaa att aaa tac aac cca ttt gct aaa gcc ttc      675

```

Glu Ile Thr	Ala Leu Lys Ile Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe	
	210 215 220	
ctt gat gcc aaa gaa aga aac gac cac aaa gat gta atg gag gaa ccg		723
Leu Asp Ala Lys Glu Arg Asn Asp His Lys Asp Val Met Glu Glu Pro	225 230 235	
ggg gac tgc cag cag ccg ggg tat tcc caa tgg ggg tgg ctt gtt cct		771
Gly Asp Cys Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Val Pro	240 245 250	
ggg gct ggc acc ctc tgc ccg cct gcc agc tcc cac cct cag ttt gga		819
Gly Ala Gly Thr Leu Cys Pro Pro Ala Ser Ser His Pro Gln Phe Gly	255 260 265 270	
ggc tcg ctc tct ctc ccc tcc aca cac ggc tgt gag agg tac cca gct		867
Gly Ser Leu Ser Leu Pro Ser Thr His Gly Cys Glu Arg Tyr Pro Ala	275 280 285	
cta agg aac cac ccg tca tcg ccc tac ccc agc ccc tat gct cat ccg		915
Leu Arg Asn His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg	290 295 300	
aac agc tct cca acc tac gcg gac aat tca tct gct tgt ctg tcc atg		963
Asn Ser Ser Pro Thr Tyr Ala Asp Asn Ser Ser Ala Cys Leu Ser Met	305 310 315	
ctg cag tcc cat gat aac tgg tct agc ctc gga gtg cct ggc cac acc		1011
Leu Gln Ser His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly Val Pro Gly His Thr	320 325 330	
agc atg ctg cct gtg agt cat aac gcc agc cca cct act ggc tct agc		1059
Ser Met Leu Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro Pro Thr Gly Ser Ser	335 340 345 350	
cag tat ccc agt ctc tgg tct gtg agc aat ggt acc atc acc cca ggc		1107
Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn Gly Thr Ile Thr Pro Gly	355 360 365	
tcc cag aca gct ggg gtg tcc aac ggg ctg gga gct cag ttc ttt cga		1155
Ser Gln Thr Ala Gly Val Ser Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg	370 375 380	
ggc tcc cct gca cat tac aca cca ctg aca cac acg gtc tca gct gcc		1203
Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His Thr Val Ser Ala Ala	385 390 395	
acg tcc tcg tct tct ggt tct ccg atg tat gaa ggg gct gct aca gtc		1251
Thr Ser Ser Ser Ser Gly Ser Pro Met Tyr Glu Gly Ala Ala Thr Val	400 405 410	
aca gac att tct gac agc cag tat gac acg gcc caa agc ctc ctc ata		1299
Thr Asp Ile Ser Asp Ser Gln Tyr Asp Thr Ala Gln Ser Leu Leu Ile	415 420 425 430	
gcc tcg tgg aca cct gtg tca ccc cca tct atg cat cac cat cac cat		1347
Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro Pro Ser Met His His His His His	435 440 445	
cac tga gactagt		1360
His		

<210> 10

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 10

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

Thr Ala Leu Lys Ile Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp
 210 215 220
 Ala Lys Glu Arg Asn Asp His Lys Asp Val Met Glu Glu Pro Gly Asp
 225 230 235 240
 Cys Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Val Pro Gly Ala
 245 250 255
 Gly Thr Leu Cys Pro Pro Ala Ser Ser His Pro Gln Phe Gly Gly Ser
 260 265 270
 Leu Ser Leu Pro Ser Thr His Gly Cys Glu Arg Tyr Pro Ala Leu Arg
 275 280 285
 Asn His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Ser
 290 295 300
 Ser Pro Thr Tyr Ala Asp Asn Ser Ser Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln
 305 310 315 320
 Ser His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly Val Pro Gly His Thr Ser Met
 325 330 335
 Leu Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro Pro Thr Gly Ser Ser Gln Tyr
 340 345 350
 Pro Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn Gly Thr Ile Thr Pro Gly Ser Gln
 355 360 365
 Thr Ala Gly Val Ser Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser
 370 375 380
 Pro Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His Thr Val Ser Ala Ala Thr Ser
 385 390 395 400
 Ser Ser Ser Gly Ser Pro Met Tyr Glu Gly Ala Ala Thr Val Thr Asp
 405 410 415
 Ile Ser Asp Ser Gln Tyr Asp Thr Ala Gln Ser Leu Leu Ile Ala Ser
 420 425 430
 Trp Thr Pro Val Ser Pro Pro Ser Met His His His His His His
 435 440 445

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 11

Met Ala Asp Glu Ala Pro**1 5**

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Leu**1 5**

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Val**1 5**

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser Val**1 5**

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val**1 5**

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val**1****5****10**

<210> 17

<211> 1305

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1305)

<400> 17

atg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg gga aag agc ctg cag tac cga	48
Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg	
1 5 10 15	
gtg gac cac ctg ctg agc gcc gtg gag aat gag ctg cag gcg ggc agc	96
Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser	
20 25 30	
gag aag ggc gac ccc aca gag cgc gaa ctg cgc gtg ggc ctg gag gag	144
Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu	
35 40 45	
agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag ctc acc aat gag atg atc gtg	192
Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val	
50 55 60	
acc aag aac ggc agg agg atg ttt ccg gtg ctg aag gtg aac gtg tct	240
Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser	
65 70 75 80	
ggc ctg gac ccc aac gcc atg tac tcc ttc ctg ctg gac ttc gtg gcg	288
Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala	
85 90 95	
gcg gac aac cac cgc tgg aag tac gtg aac ggg gaa tgg gtg ccg ggg	336
Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly	
100 105 110	
ggc aag ccg gag ccg cag gcg ccc agc tgc gtc tac atc cac ccc gac	384
Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp	
115 120 125	
tcg ccc aac ttc ggg gcc cac tgg atg aag gct ccc gtc tcc ttc agc	432
Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser	
130 135 140	
aaa gtc aag ctc acc aac aag ctc aac gga ggg ggc cag atc atg ctg	480
Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu	
145 150 155 160	
aac tcc ttg cat aag tat gag cct cga atc cac ata gtg aga gtt ggg	528
Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly	
165 170 175	
gat cca cag cgc atg atc acc agc cac tgc ttc cct gag acc cag ttc	576
Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe	

180	185	190	
ata gcg gtg act gct tat cag aac gag gag atc aca gct ctt aaa att			624
Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile			
195	200	205	
aag tac aat cca ttt gca aaa gct ttc ctt gat gca aag gaa aga agt			672
Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp Ala Lys Glu Arg Ser			
210	215	220	
gat cac aaa gag atg atg gag gaa ccc gga gac agc cag caa cct ggg			720
Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp Ser Gln Gln Pro Gly			
225	230	235	240
tac tcc caa tgg ggg tgg ctt ctt cct gga acc agc acc gtg tgt cca			768
Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Val Cys Pro			
	245	250	255
cct gca aat cct cat cct cag ttt gga ggt gcc ctc tcc ctc ccc tcc			816
Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala Leu Ser Leu Pro Ser			
	260	265	270
acg cac agc tgt gac agg tac cca acc ctg agg agc cac cgg tcc tca			864
Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg Ser His Arg Ser Ser			
	275	280	285
ccc tac ccc agc ccc tat gct cat cgg aac aat tct cca acc tat tct			912
Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn Ser Pro Thr Tyr Ser			
	290	295	300
gac aac tca cct gca tgt tta tcc atg ctg caa tcc cat gac aat tgg			960
Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln Ser His Asp Asn Trp			
305	310	315	320
tcc agc ctt gga atg cct gcc cat ccc agc atg ctc ccc gtg agc cac			1008
Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met Leu Pro Val Ser His			
	325	330	335
aat gcc agc cca cct acc agc tcc agt cag tac ccc agc ctg tgg tct			1056
Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Gln Tyr Pro Ser Leu Trp Ser			
	340	345	350
gtg agc aac ggc gcc gtc acc ccg ggc tcc cag gca gca gcc gtg acc			1104
Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln Ala Ala Ala Val Thr			
	355	360	365
aac ggg ctg ggg gcc cag ttc ttc cgg ggc tcc ccc gcg cac tac aca			1152
Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser Pro Ala His Tyr Thr			
	370	375	380
ccc ctc acc cat ccg gtc tgg gca ccc tct tcc tgg gga tcc cca ctg			1200
Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Gly Ser Pro Leu			
	385	390	395
tac gaa ggg gcg gcc gcg gcc aca aac atc gtg gac agc cag tac gac			1248
Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Thr Asn Ile Val Asp Ser Gln Tyr Asp			
	405	410	415
gcc gca gcc caa ggc cgc ctc ata gcc tca tgg aca cct gtg tgg cca			1296
Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp Thr Pro Val Ser Pro			
	420	425	430
cct tcc atg			1305
Pro Ser Met			
435			

<210> 18

<211> 435

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 18

```

Met Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg
1      5      10      15

Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser
      20      25      30

Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu
      35      40      45

Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Asn Glu Met Ile Val
      50      55      60

Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro Val Leu Lys Val Asn Val Ser
      65      70      75      80

Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala
      85      90      95

Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly
      100      105      110

Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser Cys Val Tyr Ile His Pro Asp
      115      120      125

Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser
      130      135      140

Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu
      145      150      155      160

Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg Ile His Ile Val Arg Val Gly
      165      170      175

Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His Cys Phe Pro Glu Thr Gln Phe
      180      185      190

Ile Ala Val Thr Ala Tyr Gln Asn Glu Glu Ile Thr Ala Leu Lys Ile

```


195	200	205
Lys Tyr Asn Pro Phe Ala 210	Lys Ala Phe Leu Asp 215	Ala Lys Glu Arg Ser 220
Asp His Lys Glu Met Met 225	Glu Glu Pro Gly Asp 230	Ser Gln Gln Pro Gly 235
Tyr Ser Gln Trp Gly Trp 245	Leu Leu Pro Gly Thr 250	Ser Thr Val Cys Pro 255
Pro Ala Asn Pro His Pro 260	Gln Phe Gly Gly Ala 265	Leu Ser Leu Pro Ser 270
Thr His Ser Cys Asp Arg 275	Tyr Pro Thr Leu Arg 280	Ser His Arg Ser Ser 285
Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr 290	Ala His Arg Asn Asn 295	Ser Pro Thr Tyr Ser 300
Asp Asn Ser Pro Ala Cys 305	Leu Ser Met Leu Gln 310	Ser His Asp Asn Trp 315
Ser Ser Leu Gly Met Pro 325	Ala His Pro Ser Met 330	Leu Pro Val Ser His 335
Asn Ala Ser Pro Pro Thr 340	Ser Ser Ser Gln Tyr 345	Pro Ser Leu Trp Ser 350
Val Ser Asn Gly Ala Val 355	Thr Pro Gly Ser Gln 360	Ala Ala Val Thr 365
Asn Gly Leu Gly Ala Gln 370	Phe Phe Arg Gly Ser 375	Pro Ala His Tyr Thr 380
Pro Leu Thr His Pro Val 385	Ser Ala Pro Ser Ser 390	Ser Gly Ser Pro Leu 395
Tyr Glu Gly Ala Ala Ala 405	Ala Thr Asn Ile Val 410	Asp Ser Gln Tyr Asp 415
Ala Ala Ala Gln Gly Arg 420	Leu Ile Ala Ser Trp 425	Thr Pro Val Ser Pro 430
Pro Ser Met 435		

<210> 19

<211> 1370

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<220>

<221> CDS

<222> (10)..(1350)

<400> 19

```

gaattccgc atg gcc gat gaa gct ccg agc tcc cct ggc acc gag agc gcg      51
      Met Ala Asp Glu Ala Pro Ser Ser Pro Gly Thr Glu Ser Ala
        1              5              10

gga aag agc ctg cag tac cga gtg gac cac ctg ctg agc gcc gtg gag      99
Gly Lys Ser Leu Gln Tyr Arg Val Asp His Leu Leu Ser Ala Val Glu
15              20              25              30

aat gag ctg cag gcg ggc agc gag aag ggc gac ccc aca gag cgc gaa      147
Asn Glu Leu Gln Ala Gly Ser Glu Lys Gly Asp Pro Thr Glu Arg Glu
              35              40              45

ctg cgc gtg ggc ctg gag gag agc gag ctg tgg ctg cgc ttc aag gag      195
Leu Arg Val Gly Leu Glu Glu Ser Glu Leu Trp Leu Arg Phe Lys Glu
              50              55              60

ctc acc aat gag atg atc gtg acc aag aac ggc agg agg atg ttt ccg      243
Leu Thr Asn Glu Met Ile Val Thr Lys Asn Gly Arg Arg Met Phe Pro
        65              70              75

gtg ctg aag gtg aac gtg tct ggc ctg gac ccc aac gcc atg tac tcc      291
Val Leu Lys Val Asn Val Ser Gly Leu Asp Pro Asn Ala Met Tyr Ser
        80              85              90

ttc ctg ctg gac ttc gtg gcg gcg gac aac cac cgc tgg aag tac gtg      339
Phe Leu Leu Asp Phe Val Ala Ala Asp Asn His Arg Trp Lys Tyr Val
        95              100              105              110

aac ggg gaa tgg gtg ccg ggg ggc aag ccg gag ccg cag gcg ccc agc      387
Asn Gly Glu Trp Val Pro Gly Gly Lys Pro Glu Pro Gln Ala Pro Ser
              115              120              125

tgc gtc tac atc cac ccc gac tcg ccc aac ttc ggg gcc cac tgg atg      435
Cys Val Tyr Ile His Pro Asp Ser Pro Asn Phe Gly Ala His Trp Met
              130              135              140

aag gct ccc gtc tcc ttc agc aaa gtc aag ctc acc aac aag ctc aac      483
Lys Ala Pro Val Ser Phe Ser Lys Val Lys Leu Thr Asn Lys Leu Asn
              145              150              155

gga ggg ggc cag atc atg ctg aac tcc ttg cat aag tat gag cct cga      531
Gly Gly Gly Gln Ile Met Leu Asn Ser Leu His Lys Tyr Glu Pro Arg
        160              165              170

atc cac ata gtg aga gtt ggg gat cca cag cgc atg atc acc agc cac      579
Ile His Ile Val Arg Val Gly Asp Pro Gln Arg Met Ile Thr Ser His
        175              180              185              190

tgc ttc cct gag acc cag ttc ata gcg gtg act gct tat cag aac gag      627

```

Cys	Phe	Pro	Glu	Thr	Gln	Phe	Ile	Ala	Val	Thr	Ala	Tyr	Gln	Asn	Glu		
				195					200					205			
gag	atc	aca	gct	ctt	aaa	att	aag	tac	aat	cca	ttt	gca	aaa	gct	ttc	675	
Glu	Ile	Thr	Ala	Leu	Lys	Ile	Lys	Tyr	Asn	Pro	Phe	Ala	Lys	Ala	Phe		
			210					215					220				
ctt	gat	gca	aag	gaa	aga	agt	gat	cac	aaa	gag	atg	atg	gag	gaa	ccc	723	
Leu	Asp	Ala	Lys	Glu	Arg	Ser	Asp	His	Lys	Glu	Met	Met	Glu	Glu	Pro		
		225					230					235					
gga	gac	agc	cag	caa	cct	ggg	tac	tcc	caa	tgg	ggg	tgg	ctt	ctt	cct	771	
Gly	Asp	Ser	Gln	Gln	Pro	Gly	Tyr	Ser	Gln	Trp	Gly	Trp	Leu	Leu	Pro		
	240					245					250						
gga	acc	agc	acc	gtg	tgt	cca	cct	gca	aat	cct	cat	cct	cag	ttt	gga	819	
Gly	Thr	Ser	Thr	Val	Cys	Pro	Pro	Ala	Asn	Pro	His	Pro	Gln	Phe	Gly		
	255				260					265					270		
ggc	ccc	ctc	tcc	ctc	ccc	tcc	acg	cac	agc	tgt	gac	agg	tac	cca	acc	867	
Gly	Ala	Leu	Ser	Leu	Pro	Ser	Thr	His	Ser	Cys	Asp	Arg	Tyr	Pro	Thr		
				275					280					285			
ctg	agg	agc	cac	cgg	tcc	tca	ccc	tac	ccc	agc	ccc	tat	gct	cat	cgg	915	
Leu	Arg	Ser	His	Arg	Ser	Ser	Pro	Tyr	Pro	Ser	Pro	Tyr	Ala	His	Arg		
			290					295					300				
aac	aat	tct	cca	acc	tat	tct	gac	aac	tca	cct	gca	tgt	tta	tcc	atg	963	
Asn	Asn	Ser	Pro	Thr	Tyr	Ser	Asp	Asn	Ser	Pro	Ala	Cys	Leu	Ser	Met		
		305					310					315					
ctg	caa	tcc	cat	gac	aat	tgg	tcc	agc	ctt	gga	atg	cct	gcc	cat	ccc	1011	
Leu	Gln	Ser	His	Asp	Asn	Trp	Ser	Ser	Leu	Gly	Met	Pro	Ala	His	Pro		
	320					325					330						
agc	atg	ctc	ccc	gtg	agc	cac	aat	gcc	agc	cca	cct	acc	agc	tcc	agt	1059	
Ser	Met	Leu	Pro	Val	Ser	His	Asn	Ala	Ser	Pro	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser		
	335				340					345					350		
cag	tac	ccc	agc	ctg	tgg	tct	gtg	agc	aac	ggc	gcc	gtc	acc	ccg	ggc	1107	
Gln	Tyr	Pro	Ser	Leu	Trp	Ser	Val	Ser	Asn	Gly	Ala	Val	Thr	Pro	Gly		
				355					360					365			
tcc	cag	gca	gca	gcc	gtg	acc	aac	ggg	ctg	ggg	gcc	cag	ttc	ttc	cgg	1155	
Ser	Gln	Ala	Ala	Ala	Val	Thr	Asn	Gly	Leu	Gly	Ala	Gln	Phe	Phe	Arg		
		370						375					380				
ggc	tcc	ccc	gcg	cac	tac	aca	ccc	ctc	acc	cat	ccg	gtc	tcg	gca	ccc	1203	
Gly	Ser	Pro	Ala	His	Tyr	Thr	Pro	Leu	Thr	His	Pro	Val	Ser	Ala	Pro		
		385					390					395					
tct	tcc	tcg	gga	tcc	cca	ctg	tac	gaa	ggg	gcg	gcc	gcg	gcc	aca	aac	1251	
Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Pro	Leu	Tyr	Glu	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Asn		
	400					405					410						
atc	gtg	gac	agc	cag	tac	gac	gcc	gca	gcc	caa	ggc	cgc	ctc	ata	gcc	1299	
Ile	Val	Asp	Ser	Gln	Tyr	Asp	Ala	Ala	Ala	Gln	Gly	Arg	Leu	Ile	Ala		
	415				420					425				430			
tca	tgg	aca	cct	gtg	tcg	cca	cct	tcc	atg	cat	cac	cat	cac	cat	cac	1347	
Ser	Trp	Thr	Pro	Val	Ser	Pro	Pro	Ser	Met	His	His	His	His	His	His		
				435					440					445			
tga	gactagtccc	ggcgggccgc														1370	

<210> 20

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 20

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

Thr Ala Leu Lys Ile Lys Tyr Asn Pro Phe Ala Lys Ala Phe Leu Asp
 210 215 220
 Ala Lys Glu Arg Ser Asp His Lys Glu Met Met Glu Glu Pro Gly Asp
 225 230 235 240
 Ser Gln Gln Pro Gly Tyr Ser Gln Trp Gly Trp Leu Leu Pro Gly Thr
 245 250 255
 Ser Thr Val Cys Pro Pro Ala Asn Pro His Pro Gln Phe Gly Gly Ala
 260 265 270
 Leu Ser Leu Pro Ser Thr His Ser Cys Asp Arg Tyr Pro Thr Leu Arg
 275 280 285
 Ser His Arg Ser Ser Pro Tyr Pro Ser Pro Tyr Ala His Arg Asn Asn
 290 295 300
 Ser Pro Thr Tyr Ser Asp Asn Ser Pro Ala Cys Leu Ser Met Leu Gln
 305 310 315 320
 Ser His Asp Asn Trp Ser Ser Leu Gly Met Pro Ala His Pro Ser Met
 325 330 335
 Leu Pro Val Ser His Asn Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ser Ser Gln Tyr
 340 345 350
 Pro Ser Leu Trp Ser Val Ser Asn Gly Ala Val Thr Pro Gly Ser Gln
 355 360 365
 Ala Ala Ala Val Thr Asn Gly Leu Gly Ala Gln Phe Phe Arg Gly Ser
 370 375 380
 Pro Ala His Tyr Thr Pro Leu Thr His Pro Val Ser Ala Pro Ser Ser
 385 390 395 400
 Ser Gly Ser Pro Leu Tyr Glu Gly Ala Ala Ala Ala Thr Asn Ile Val
 405 410 415
 Asp Ser Gln Tyr Asp Ala Ala Ala Gln Gly Arg Leu Ile Ala Ser Trp
 420 425 430
 Thr Pro Val Ser Pro Pro Ser Met His His His His His His
 435 440 445

Lisboa, 2017-08-02

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunoterapêutica compreendendo:

a) um veículo de levedura e

b) um antigénio do cancro compreendendo pelo menos um antigénio de Brachyury,

para utilização num método para reduzir, deter, inverter, atrasar ou prevenir a progressão metastática do cancro num indivíduo que tem um cancro.

2. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a expressão de Brachyury não é detetada no cancro do indivíduo no momento em que a composição é administrada pela primeira vez.

3. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a expressão de Brachyury é detetada no cancro do indivíduo no momento em que a composição é administrada pela primeira vez.

4. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o indivíduo tem um cancro em estágio I, um cancro em estágio II, um cancro em estágio III ou um cancro em estágio IV.

5. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que o indivíduo está a ser tratado ou foi tratado com outra terapia para o cancro.

6. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com a reivindicação 5, em que a terapia é uma quimioterapia, uma terapia dirigida, uma radioterapia, uma transferência adotiva de células T ou a ressecção cirúrgica de um tumor do indivíduo.

7. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com a reivindicação 5, em que a terapia é a administração de uma ou mais composições imunoterapêuticas adicionais.

8. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com a reivindicação 7, em que as composições imunoterapêuticas adicionais compreendem um veículo de levedura e um segundo antigénio do cancro que não inclui um antigénio de Brachyury.

9. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com a reivindicação 8, em que o segundo antigénio do cancro é selecionado entre o grupo constituído por: Ras mutada, antigénio carcinoembrionário (CEA), MUC-1, EGFR, BCR-Abl, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, PSMA, tirosinase, TRP-1 (gp75), NY-ESO-1, TRP-2, TAG72, KSA, CA-125, PSA, HER-2/neu/c-erb/B2, hTERT, p73, B-RAF, APC (adenomatous polyposis coli), Myc, proteína von Hippel-Lindau (VHL), Rb-1, Rb-2, recetor de androgénios (AR), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ews-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, mesotelina e NGEP.

10. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que o cancro é selecionado entre o grupo constituído por: cancro da mama, cancro do intestino delgado, cancro do estômago, cancro do pâncreas, cancro do rim, cancro da bexiga, cancro do útero, cancro do ovário, cancro testicular, cancro do pulmão, cancro do cólon, cancro da próstata, leucemia linfocítica crónica (LLC), células B transformadas com o vírus de Epstein-Barr, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin e seus cancros metastáticos.

11. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que o antigénio de Brachyury possui uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:2, ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 85% com SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:2.

12. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que o antigénio de Brachyury possui uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:2, ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 90% com SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:2.

13. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que o antigénio de Brachyury possui uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:2, ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 95% com SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:2.

14. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, em que o antigénio de Brachyury compreende as posições 246 a 254 de SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:2.

15. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, em que o antigénio de Brachyury compreende as posições 246 a 254 de SEQ ID NO:18.

16. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, em que o antigénio de Brachyury compreende uma substituição de uma leucina na posição 254 por uma valina de SEQ ID NO:18.

17. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que o antigénio de Brachyury compreende SEQ ID NO:18, as posições 2-435 de SEQ ID NO:18, uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 85% com SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:6, as posições 2-435 de SEQ ID NO:6, uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 85% com SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:2, as posições 2-435 de SEQ ID NO:2 ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 85% com SEQ ID NO:2.

18. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que o antigénio de Brachyury compreende uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 99% com SEQ ID NO:18, uma identidade de pelo menos 99% com SEQ ID NO:6 ou uma identidade de pelo menos 99% com SEQ ID NO:2.

19. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com as reivindicações 1 a 18, em que o antigénio do cancro é

uma proteína de fusão possuindo uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:20 ou uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 95% com SEQ ID NO:8 ou SEQ ID NO:20

20. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com a reivindicação 19, em que a expressão da proteína de fusão está sob o controle do promotor *CUP1*.

21. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, em que o veículo de levedura é uma levedura inteira morta.

22. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com a reivindicação 21, em que a levedura inteira é inativada pelo calor.

23. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, em que o veículo de levedura expressa o antigénio.

24. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, em que a levedura é proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*.

25. Composição imunoterapêutica para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, em que a composição é formulada num excipiente farmacologicamente aceitável adequado para administração a um sujeito.

26. Composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury, em que a composição imunoterapêutica compreende:

- a) um veículo de levedura;
- b) um antigénio expresso pelo veículo de levedura e compreendendo pelo menos um antigénio de Brachyury, em que o antigénio de Brachyury compreende uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 85% com SEQ ID NO:18 e inclui uma substituição de uma leucina na posição 254 por uma valina; e
- c) um excipiente farmacologicamente aceitável adequado para administração a um ser humano.

27. Composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury da reivindicação 26, em que o antigénio de Brachyury compreende uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 90% com SEQ ID NO:18.

28. Composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury da reivindicação 26, em que o antigénio de Brachyury compreende uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de pelo menos 95% com SEQ ID NO:18.

29. Composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury da reivindicação 26, em que o antigénio de Brachyury compreende as posições 2 a 435 de SEQ ID NO:18.

30. Composição imunoterapêutica de levedura-Brachyury de qualquer uma das reivindicações 26 a 29 para utilização para tratar uma doença.

Lisboa, 2017-08-02

FIG. 1A

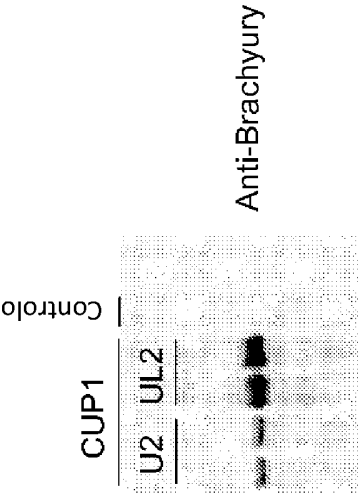


FIG. 1B

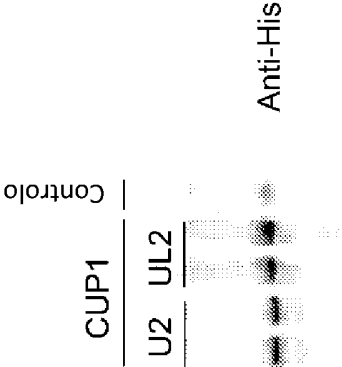


FIG. 1C

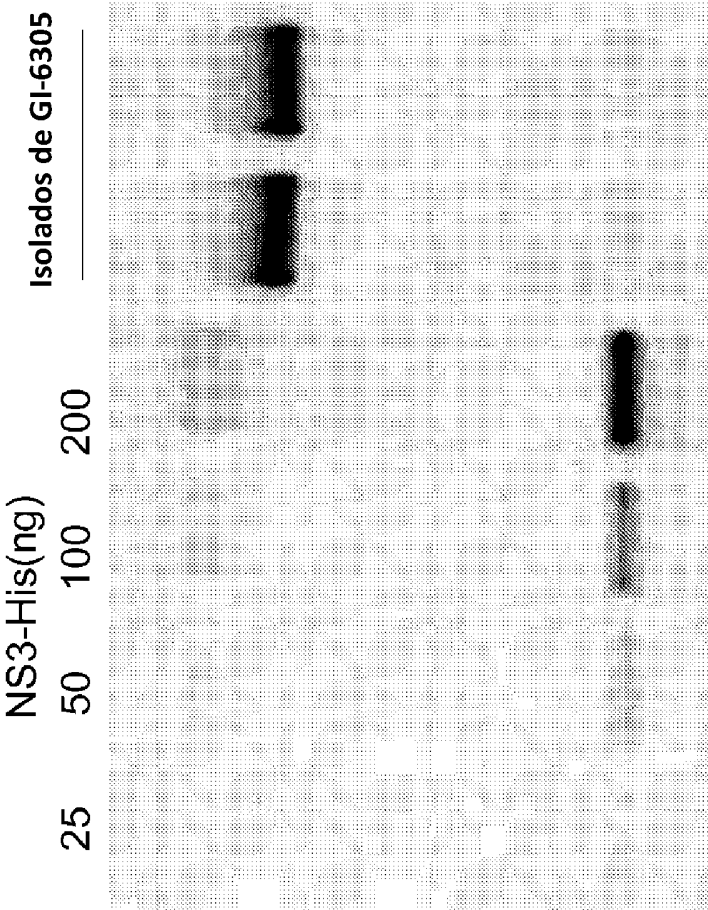
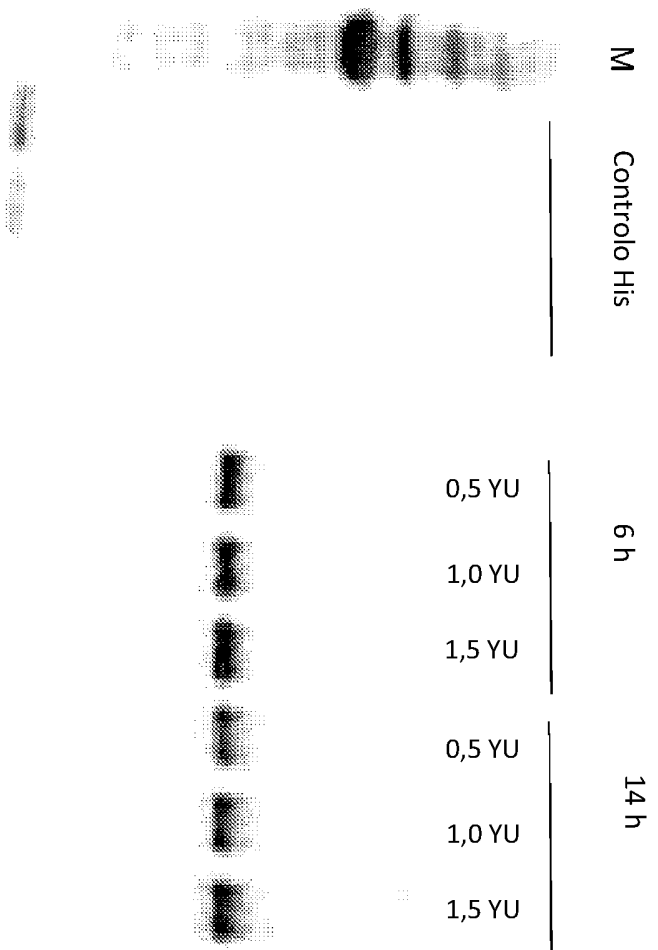


FIG. 2



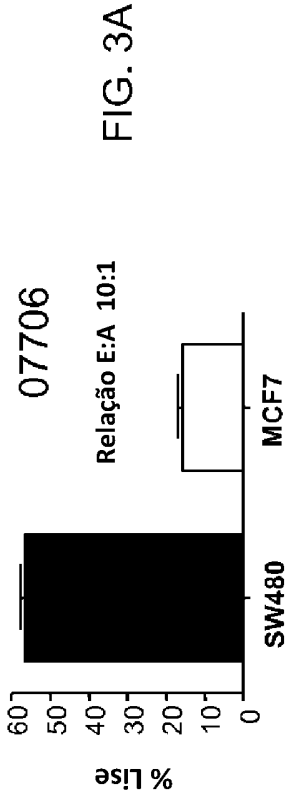


FIG. 3A

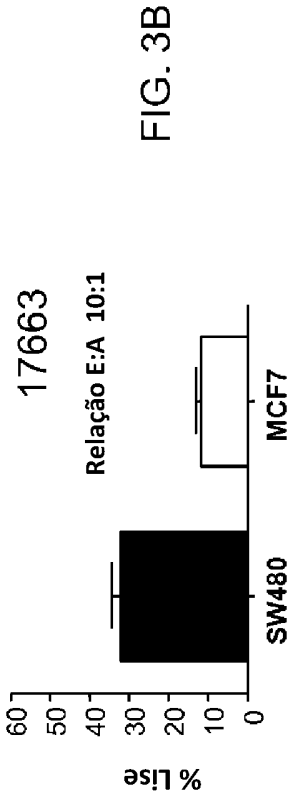


FIG. 3B

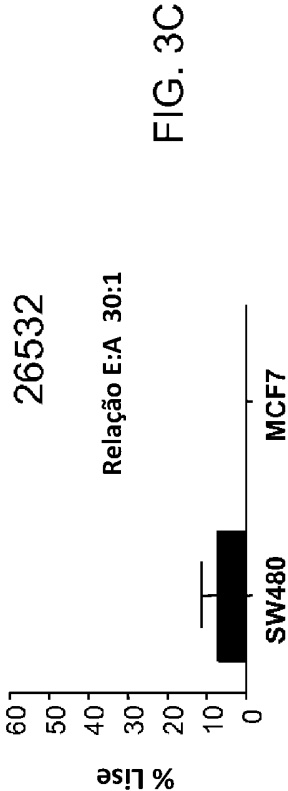


FIG. 3C

FIG. 4A

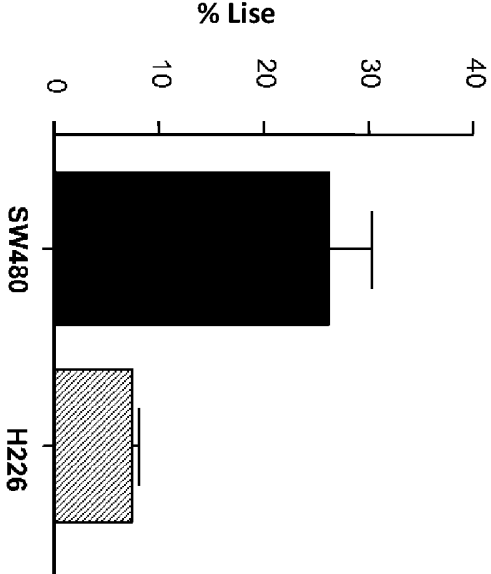


FIG. 4B

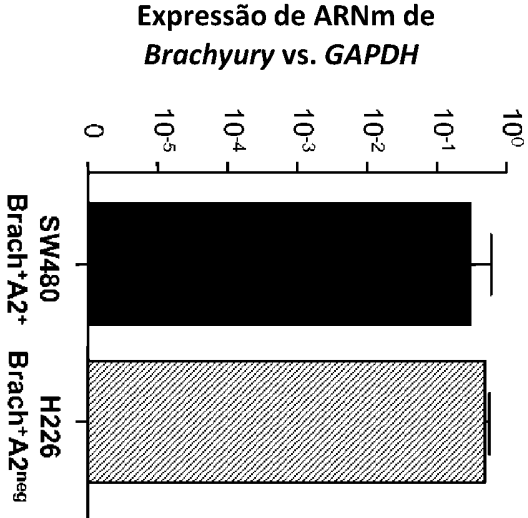


FIG. 5

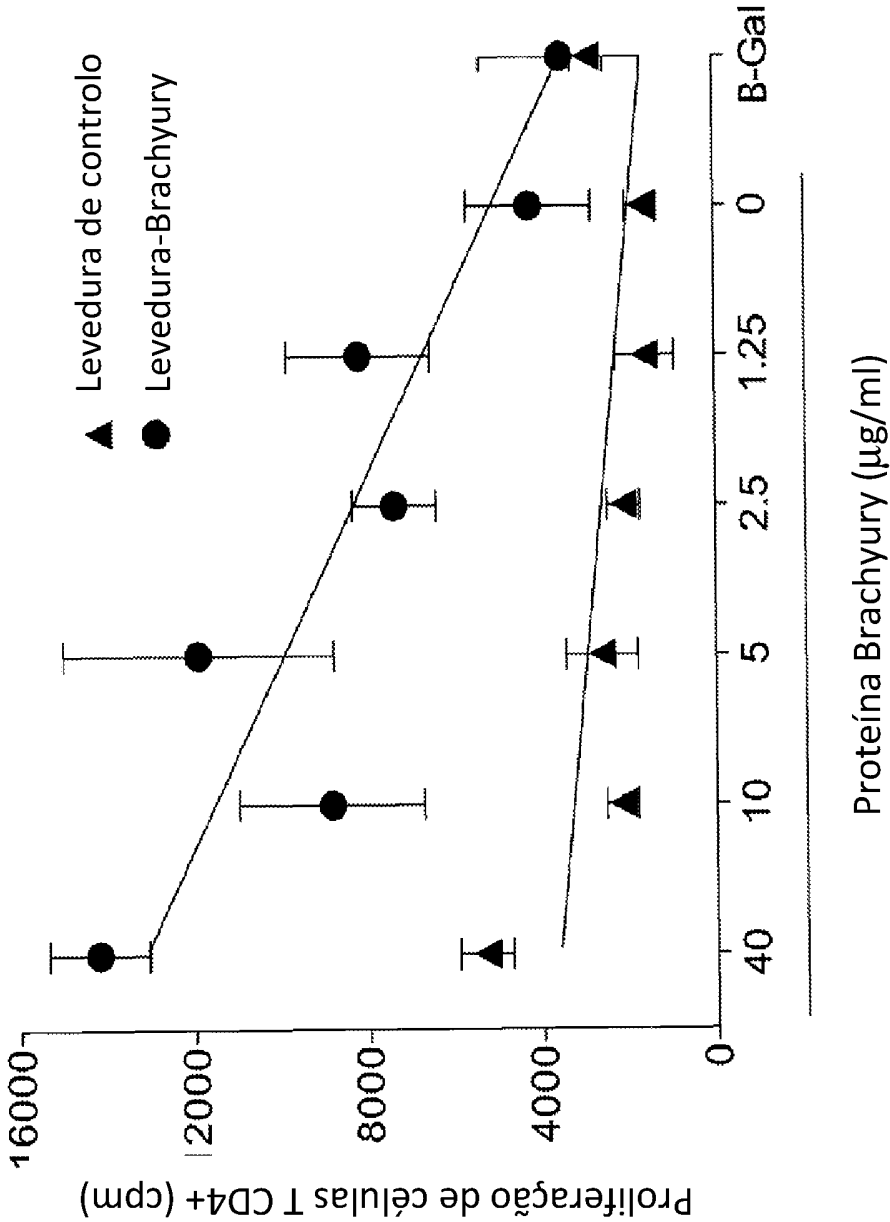


FIG. 6

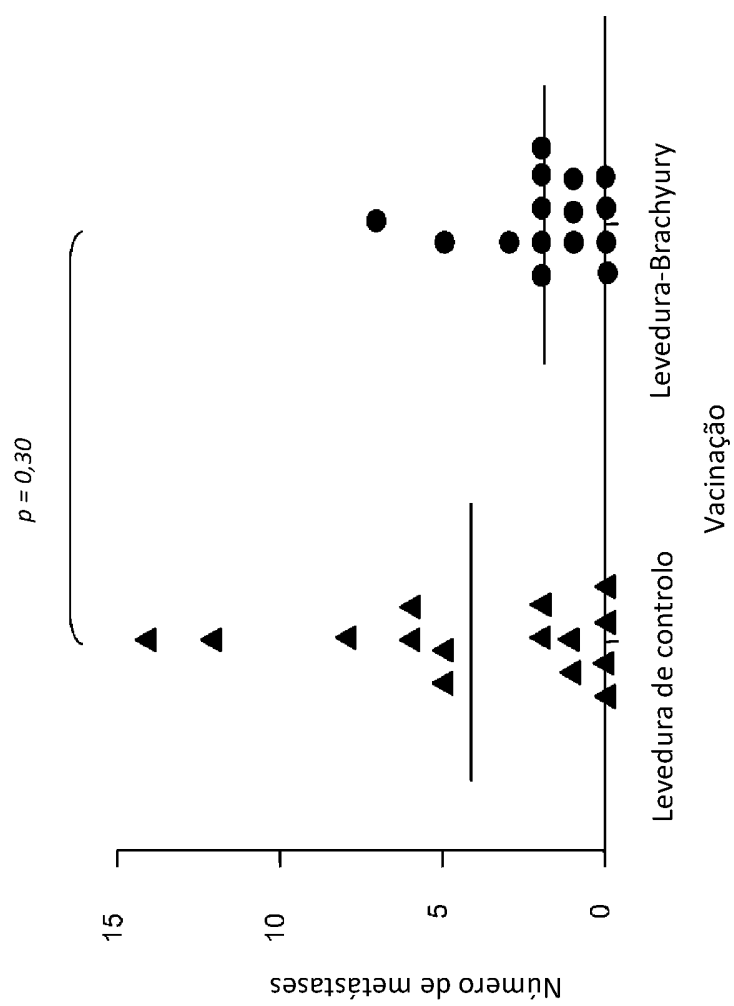


FIG. 7A

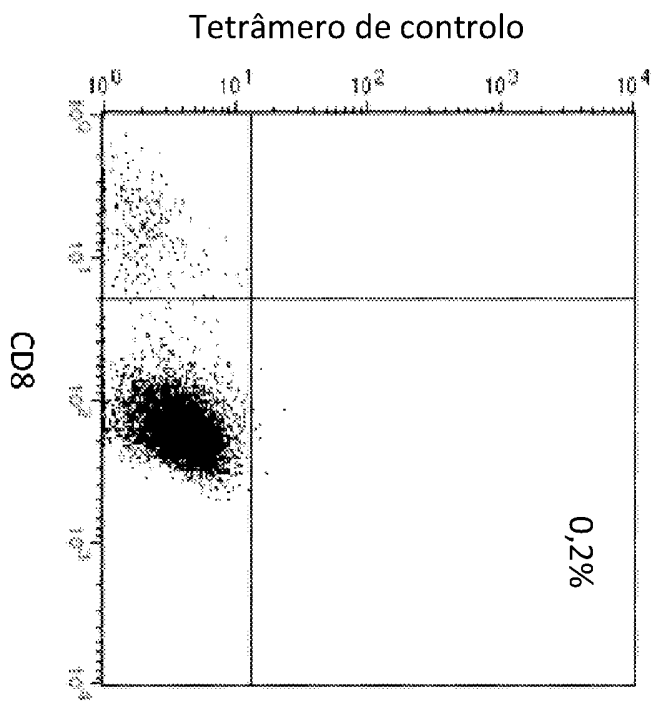


FIG. 7B

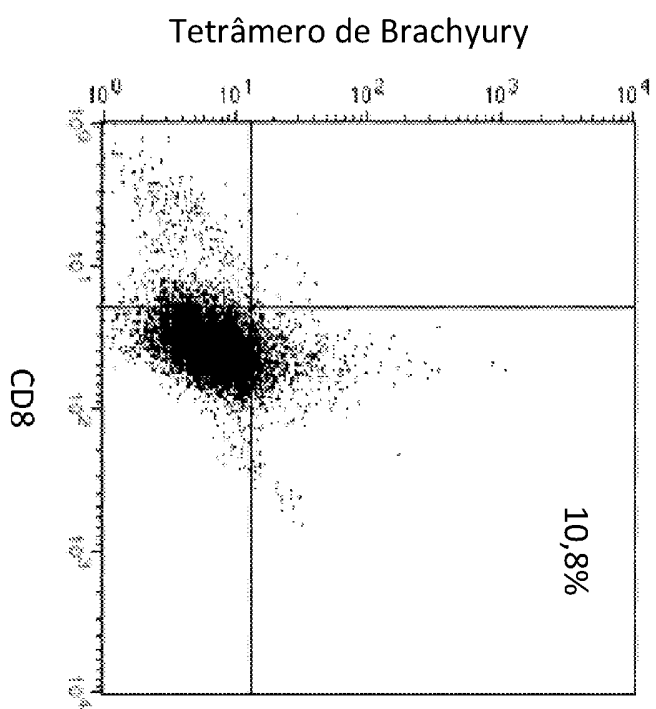


FIG. 8

