



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

**(11) BR 112013023456-3 B1**



**(22) Data do Depósito:** 19/03/2012

**(45) Data de Concessão:** 17/11/2020

---

**(54) Título:** COMPOSIÇÕES IMUNOTERAPÊUTICAS DE LEVEDURA BRACHYURY, E SEUS USOS

**(51) Int.Cl.:** A61K 36/06; A61K 39/00; A61K 38/17; A61P 35/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 17/03/2011 US 61/453,656.

**(73) Titular(es):** GLOBEIMMUNE, INC.; THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES.

**(72) Inventor(es):** CLAUDIA PALENA; ZHIMIN GUO; DAVID APELIAN; JEFFREY SCHLOM.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2012029636 de 19/03/2012

**(87) Publicação PCT:** WO 2012/125998 de 20/09/2012

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 12/09/2013

**(57) Resumo:** COMPOSIÇÕES IMUNOTERAPÊUTICAS DE LEVEDURA BRACHYURY. A invenção descreve composições imunoterapêuticas à base de levedura compreendendo antígenos de Brachyury, e métodos para a prevenção e/ou tratamento de cânceres caracterizados pela expressão ou superexpressão de Brachyury.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"COMPOSIÇÕES IMUNOTERAPÊUTICAS DE LEVEDURA  
BRACHYURY, E SEUS USOS".**

REFERÊNCIA CRUZADA COM PEDIDOS  
RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade sob 35 USC § 119 (e) a Pedido Provisório dos EUA. No. 61/453.656, depositado em 17 de março de 2011. Toda a descrição de Pedido Provisório dos EUA. Nº 61/453.656, depositado em 17 de março de 2011 é incorporada como referência neste relatório.

DIREITOS DO GOVERNO

[0002] Esta invenção foi criada no desempenho de um Acordo Cooperativo de Pesquisa e Desenvolvimento com o Instituto Nacional de Saúde (*National Institutes of Health*), uma Agência do Departamento de Saúde e Serviços Humanos. O Governo dos Estados Unidos tem certos direitos nesta invenção.

DECLARAÇÃO COM RELAÇÃO A ACORDO CONJUNTO  
DE PESQUISA

[0003] Esta invenção foi feita por, ou em nome de partes de um Acordo Cooperativo de Pesquisa e Desenvolvimento, executado em 08 de maio de 2008. As partes para o Acordo Cooperativo de Pesquisa e Desenvolvimento são: *GlobelImmune, Inc.* e o Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, conforme representado pelo Instituto Nacional do Câncer, um Instituto, Centros ou Divisão do Instituto Nacional de Saúde.

REFERÊNCIA A UMA LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[0004] Este pedido contém uma listagem de Sequência submetida eletronicamente como um arquivo de texto por EFS-Web. O arquivo de texto, chamado "3923-34-PCT\_ST25", apresenta um tamanho em *bytes* de 76 KB, e foi registrado em 13 de março de 2012. A

informação contida no arquivo de texto é incorporada como referência neste relatório em sua totalidade de conformidade com 37 CFR § 1.52 (e) (5).

#### CAMPO DA INVENÇÃO

[0005] A presente invenção geralmente refere-se a composições imunoterapêuticas à base de levedura e a métodos para a prevenção e/ou tratamento de cânceres caracterizados pela expressão ou superexpressão de *Brachyury*.

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0006] *Brachyury*, também conhecido como "T", é um fator de transcrição mesodérmica e membro do complexo de genes caixa-T. O gene que codifica *Brachyury* (denominado como gene T ou gene *Brachyury* em humanos) foi inicialmente identificado em 1927 por *Nadine Dobrovolskaïa-Zavadskaïa* através de uma mutação em camundongos que afetou o comprimento da cauda e vértebras sacrais em animais heterozigotos. O gene *Brachyury* foi clonado em camundongos em 1990 por Hermann et al. (Herrmann e outros, 1990, *Nature* 343:617-622) e em seres humanos em 1996 por Edwards et al. (Edwards e outros, 1996, *Genome Res.* 6: 226-223), que também descreveu a sequência de aminoácidos deduzida para *Brachyury* humano.

[0007] Como um membro da família caixa-T de fatores de transcrição, *Brachyury* contém o motivo (*motif*) do domínio de ligação com DNA altamente conservado, chamado de "caixa-T" ou domínio-T, que se liga a uma sequência consensual palindrômica. *Brachyury*, como outras proteínas caixa-T, mostrou desempenhar um papel no desenvolvimento precoce, e é vital para a formação e diferenciação de mesoderme posterior e desenvolvimento axial em vertebrados (ver, por exemplo, Wilkinson e outros, 1990, *Nature* 343 (6259):657-659); Beddington e outros, 1992, *Development (Suppl.)*:157-165; Schulte-

Merker e outros, 1994, *Development* 120:1009-1015; Kispert e Herrmann, 1994, *Dev. Biol.* 161:179-193; Showell e outros, 2004, *Dev. Dyn.* 229:201-218). Mais recentemente, Palena et al. têm demonstrado que *Brachyury* é expresso em uma variedade de tecidos de tumores humanos e linhagens celulares de câncer e têm demonstrado que peptídeos de *Brachyury* podem ser usados para gerar linhagens de células T específicas de *Brachyury* em doadores normais e pacientes com câncer (Palena e outros, 2007, *Clin. Res.* 13(8):2471-2478). Estudos por Fernando e outros, demonstraram que *Brachyury* promove a transição epitelial-mesenquimatosa (EMT) em células de tumores humanos, que confere em células tumorais um fenótipo mesenquimatoso, bem como capacidades migratórias e invasivas, enquanto atenua a progressão do ciclo de células tumorais (Fernando e outros, 2010, *J. Clin. Invest.* 120(2):533-544). Consequentemente, *Brachyury* está envolvido na progressão metastática de câncer.

[0008] Câncer é uma das principais causas de morte no mundo, e o desenvolvimento de terapias eficazes para câncer continua a ser uma das áreas mais ativas de pesquisa e desenvolvimento clínico. Embora uma variedade de abordagens inovadoras para tratar e evitar cânceres é proposta, muitos cânceres continuam a apresentar uma elevada taxa de mortalidade e podem ser difíceis de tratar ou relativamente insensíveis às terapias convencionais. Cânceres associados à expressão de *Brachyury* podem ser encontrados em uma variedade de tecidos, incluindo mama, intestino delgado, estômago, rim, bexiga, útero, ovário, testículos, pulmões, cólon e próstata, e inclui cânceres metastáticos e de fase final. Além disso, *Brachyury* é expresso em tumores de origem de célula B, tais como, leucemia linfocítica crônica (CLL), vírus de células B transformadas por vírus de *Epstein-Barr*, linfomas de Burkitt e Hodgkin. Portanto, *Brachyury* parece desempenhar um papel em um grande número de cânceres

humanos. Embora *Brachyury*, tem sido proposto ser um alvo para imunoterapia de câncer (ver, por exemplo, Palena e outros, *supra*, Fernando e outros, *supra*, e WO 2008/106551), uma vez que este é um alvo de câncer relativamente novo, há uma necessidade no estado da técnica de novos produtos imunoterapêuticos que eficazmente tratam e/ou evitam cânceres associados à expressão ou superexpressão de *Brachyury*.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0009] Uma modalidade da invenção refere-se a um método de reduzir, deter, reverter, retardar ou impedir a progressão metastática de câncer em um indivíduo que tem câncer. O método inclui a etapa de administrar, a um indivíduo que apresenta um tipo de câncer que está sofrendo de progressão metastática, está sob risco de sofrer progressão metastática, ou está predito começar a sofrer progressão metastática, uma composição imunoterapêutica que compreende: (a) um veículo de levedura; e (b) um antígeno de câncer compreendendo pelo menos um antígeno de *Brachyury*. Outra modalidade da invenção refere-se ao uso de uma composição imunoterapêutica que compreende um veículo de levedura e um antígeno de câncer compreendendo pelo menos um antígeno de *Brachyury*, para reduzir, deter, reverter ou impedir a progressão metastática de câncer em um indivíduo que apresenta câncer.

[00010] Em um aspecto, dessas modalidades da invenção, *Brachyury* não é detectado no câncer do indivíduo, no momento que a composição é primeiro, administrada. Em um aspecto, expressão de *Brachyury* é detectada no câncer do indivíduo no momento que a composição é primeiro, administrada. O indivíduo poderá apresentar câncer de estágio I, câncer de estágio II, câncer de estágio III, ou câncer de estágio IV.

[00011] Outra modalidade da invenção refere-se a um método de

impedir ou retardar o início de um câncer expressando *Brachyury*. O método inclui a etapa de administrar a um indivíduo uma composição imunoterapêutica que compreende: (a) um veículo de levedura; e (b) um antígeno de câncer compreendendo pelo menos um antígeno de *Brachyury*. Outra modalidade da invenção refere-se ao uso de uma composição imunoterapêutica que compreende um veículo de levedura e um antígeno de câncer compreendendo pelo menos um antígeno de *Brachyury* para impedir ou retardar o início de um câncer expressando *Brachyury*.

[00012] Em um aspecto dessas modalidades, câncer não é detectado no indivíduo. Em um aspecto, o indivíduo está sob alto risco de desenvolver câncer (por exemplo, via uma predisposição genética). Em um aspecto, o indivíduo apresenta uma lesão pré-cancerosa.

[00013] Em um aspecto dessas modalidades, o indivíduo apresenta câncer, mas células de câncer expressando *Brachyury* não foram detectadas no câncer. Em um aspecto, o câncer não é ainda metastático. Em um aspecto, o câncer apresenta um alto risco de metastatização. Em um aspecto, o indivíduo apresenta câncer de estágio I. Em um aspecto, o indivíduo apresenta câncer de estágio II.

[00014] Outra modalidade da invenção refere-se a um método de reduzir ou impedir resistência à quimioterapia ou resistência à radiação de células tumorais em um paciente com câncer. O método inclui as etapas de administração a um indivíduo que apresenta câncer e está recebendo terapia de quimioterapia e/ou radiação de uma composição imunoterapêutica que compreende: (a) um veículo de levedura; e (b) um antígeno de câncer compreendendo pelo menos um antígeno de *Brachyury*. Outra modalidade da invenção refere-se ao uso de uma composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um antígeno de câncer que compreende pelo menos um antígeno de *Brachyury* para reduzir ou impedir resistência à quimioterapia ou

resistência à radiação de células tumorais em um paciente com câncer. Em um aspecto dessa modalidade da invenção, *Brachyury* não é detectada no câncer do indivíduo no momento em que a composição é primeiro, administrada. Em um aspecto, expressão de *Brachyury* é detectada no câncer do indivíduo, no momento em que a composição é primeiro, administrada.

[00015] Ainda outra modalidade da invenção refere-se a um método para tratar câncer. O método inclui as etapas de: (a) administrar a um indivíduo que apresenta câncer em que expressão de *Brachyury* não é detectada, uma primeira composição imunoterapêutica que compreende um veículo de levedura e um primeiro antígeno de câncer que não compreende um antígeno de *Brachyury*; (b) administrar ao indivíduo, antes de, simultaneamente com, sequencialmente com, ou subsequente a, administração da primeira composição imunoterapêutica, uma segunda composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um segundo antígeno de câncer compreendendo um antígeno de *Brachyury*. Em um aspecto, o método adicionalmente compreende, na etapa (a), administrar uma ou mais composições imunoterapêuticas adicionais, em que cada uma ou mais das composições imunoterapêuticas adicionais compreende um antígeno de câncer adicional. Em um aspecto, de cada modalidade acima, o antígeno de câncer é selecionado de: Ras mutante, antígeno carcinoembrionário (CEA), MUC-1, EGFR, BCR-Ab1, 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, polipose adenomatosa *coli* (APC), Myc, proteína de *Von Hippel-Lindau* (VHL), Rb-1, Rb-2, receptor andrógeno (RA), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ews-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, Mesotelina e NGEP. Em um aspecto, o antígeno de câncer é selecionado do grupo que consiste em: Ras mutante,

antígeno carcinoembrionário (CEA) e MUC-1. Outra modalidade da invenção refere-se ao uso de uma combinação de composições imunoterapêuticas para tratar câncer, as composições imunoterapêuticas compreendendo: (a) uma primeira composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um primeiro antígeno de câncer que não compreende um antígeno de *Brachyury*; e (b) uma segunda composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um segundo antígeno de câncer compreendendo um antígeno de *Brachyury*.

[00016] Ainda outra modalidade da invenção refere-se a um método para tratar câncer. O método inclui as etapas de: (a) administrar a um indivíduo que tem câncer uma primeira composição imunoterapêutica que compreende um veículo de levedura e um antígeno de Ras mutante; (b) administrar ao indivíduo de (a) uma segunda composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um antígeno selecionado do grupo que consiste em antígeno 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 antígeno de *Brachyury*. Em um aspecto, as etapas de administração em (a), (b) e (c) são concorrentes. Outra modalidade da invenção refere-se ao uso de uma combinação de composições imunoterapêuticas para tratar câncer, as composições imunoterapêuticas compreendendo: (a) uma primeira composição imunoterapêutica que compreende um veículo de levedura e um antígeno de Ras mutante; (b) uma segunda composição imunoterapêutica que compreende um veículo de levedura e um antígeno selecionado do grupo que consiste em antígeno carcinoembrionário (CEA) e mucina-1 (MUC-1); e (c) uma terceira composição imunoterapêutica que compreende um veículo de levedura e um antígeno de *Brachyury*.



[00017] Em qualquer uma das modalidades ou aspectos da invenção descrita acima ou em qualquer outro lugar neste relatório, em que o indivíduo apresenta câncer ou uma lesão pré-cancerosa, em um aspecto da invenção, o indivíduo está sendo tratado ou foi tratado com outra terapia para câncer. Por exemplo, tal terapia pode incluir, mas não se limita a mesma, quimioterapia, terapia direcionada a câncer, terapia de radiação, transferência de célula T adotiva, e/ou administração de uma ou mais composições imunoterapêuticas adicionais. Em um aspecto, uma composição imunoterapêutica adicional compreende um veículo de levedura e um segundo antígeno de câncer que não inclui antígeno de *Brachyury*. O segundo antígeno de câncer pode incluir, mas não se limita a, Ras mutante, antígeno carcinoembrionário (CEA), MUC-1, EGFR, BCR-Ab1, 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, polipose adenomatosa *coli* (APC), Myc, proteína de *Von Hippel-Lindau* (VHL), Rb-1, Rb-2, receptor andrógeno (RA), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ewsfli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, Mesotelina e NGEF. Em um aspecto, o segundo antígeno de câncer é selecionado de: Ras mutante, antígeno carcinoembrionário (CEA), e MUC-1.

[00018] Em um aspecto de qualquer uma das modalidades ou aspectos da invenção descrita acima, ou em qualquer outro lugar neste relatório, o método ou uso reduz carga tumoral no indivíduo, aumenta sobrevivência do indivíduo, e/ou inibe crescimento tumoral no indivíduo.

[00019] Em um aspecto de qualquer uma das modalidades ou aspectos da invenção descrita acima ou em qualquer outro lugar neste relatório, o método adicionalmente compreende ressecção cirúrgica de um tumor do indivíduo.

[00020] Em um aspecto de qualquer uma das modalidades ou aspectos da invenção descrita acima ou em qualquer outro lugar neste relatório, o câncer é de origem celular epitelial. Em um aspecto, o câncer pode incluir, mas não se limita aos mesmos, câncer de mama, câncer de intestino delgado, câncer de estômago, câncer pancreático, câncer renal, câncer de bexiga, câncer uterino, câncer ovariano, câncer testicular, câncer de pulmão, câncer de cólon, câncer de próstata, leucemia linfocítica crônica (LLC), células B transformadas por vírus de *Epstein-Barr*, linfoma de *Burkitt*, linfoma de *Hodgkin* e cânceres metastáticos destes.

[00021] Em um aspecto de qualquer uma das modalidades ou aspectos da invenção descrita acima, o antígeno de *Brachyury* é *Brachyury* humano de comprimento total. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* não é *Brachyury* de comprimento total. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* apresenta uma sequência de aminoácidos representada por ID SEQ NO: 6, ID SEQ NO: 18, ID SEQ NO: 2, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica a ID SEQ NO: 6, ID SEQ NO: 18, ou ID SEQ NO: 2. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende de, pelo menos, posição 1 ou 2 entre a posição 255 e o término C de ID SEQ NO: 6, ID SEQ NO: 18, ou ID SEQ NO: 2. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende de, pelo menos, a posição 1 ou 2 entre a posição 430 e o término C de ID SEQ NO: 6, ID SEQ NO: 18, ou ID SEQ NO: 2. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende posições 246 a 254 de ID SEQ NO: 6, ID SEQ NO: 18, ou ID SEQ NO: 2. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende ID SEQ NO: 6; posições 2-435 de ID SEQ NO: 6, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica a ID SEQ NO: 6. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende ID SEQ NO: 18; posições 2-435 de ID SEQ NO: 18, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95%

idêntica a ID SEQ NO: 18. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende ID SEQ NO: 2, posições 2-435, de ID SEQ NO: 2, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica a ID SEQ NO: 2. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende a SEQ ID NO: 6, posições 2-435, de ID SEQ NO: 6, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 99% idêntica a ID SEQ NO: 6. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende ID SEQ NO: 18, as posições 2-435 de ID SEQ NO: 18, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 99% idêntica a ID SEQ NO: 18. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende ID SEQ NO: 2; posições 2-435 de ID SEQ NO: 2, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 99% idêntica a ID SEQ NO: 2. Em um aspecto, o antígeno de câncer é pelo menos 25 aminoácidos no comprimento. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* é pelo menos 25 aminoácidos no comprimento. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* é maior que 30 aminoácidos no comprimento. Em um aspecto, o antígeno de câncer compreende dois ou mais domínios imunogênicos de *Brachyury*.

[00022] Em um aspecto de qualquer uma das modalidades ou aspectos da invenção descrita acima ou em qualquer outro lugar neste relatório, o antígeno de câncer é uma proteína de fusão. Em um aspecto, a proteína de fusão apresenta uma sequência de aminoácidos representada por ID SEQ NO: 8, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica a ID SEQ NO: 8. Em um aspecto, a proteína de fusão apresenta uma sequência de aminoácidos representada por ID SEQ NO: 20, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica a ID SEQ NO: 20.

[00023] Outra modalidade da invenção refere-se a uma composição imunoterapêutica de levedura de *Brachyury*, em que a composição imunoterapêutica compreende: (a) um veículo de levedura; e (b) um antígeno expresso pelo veículo de levedura e compreendendo pelo

menos um antígeno de *Brachyury*, em que o antígeno de *Brachyury* compreende mais de 30 aminoácidos de uma sequência de aminoácidos representada por ID SEQ NO: 6, ID SEQ NO: 18 ou ID SEQ NO: 2. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica a ID SEQ NO: 6, ID SEQ NO: 18 ou ID SEQ NO: 2. Em um aspecto, o antígeno *Brachyury* compreende de, pelo menos, posição 1 ou 2 entre a posição 255 e o término C de ID SEQ NO: 6, ID SEQ NO: 18 ou ID SEQ NO: 2. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende de, pelo menos, posição 1 ou 2 entre posição 430 e o término C de ID SEQ NO: 6, ID SEQ NO: 18 ou ID SEQ NO: 2. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende posições 246 a 254 de ID SEQ NO: 6, ID SEQ NO: 18 ou ID SEQ NO: 2. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende ID SEQ NO: 6; posições 2-435 de ID SEQ NO: 6, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica a ID SEQ NO: 6. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende ID SEQ NO: 18; posições 2-435 de ID SEQ NO: 18, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica a ID SEQ NO: 18. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende ID SEQ NO: 2; posições 2-435 de ID SEQ NO: 2, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica a ID SEQ NO: 2. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende ID SEQ NO: 6; posições 2-435 de ID SEQ NO: 6, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 99% idêntica a ID SEQ NO: 6. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende ID SEQ NO: 18; posições 2-435 de ID SEQ NO: 18, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 99% idêntica a ID SEQ NO: 18. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende ID SEQ NO: 2; posições 2-435 de ID SEQ NO: 2, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 99% idêntica a ID SEQ NO: 2. Em um aspecto, o antígeno de câncer é uma proteína

de fusão. Em um aspecto, a proteína de fusão apresenta uma sequência de aminoácidos que é ID SEQ NO: 8, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica a ID SEQ NO: 8. Em um aspecto, a proteína de fusão apresenta uma sequência de aminoácidos de ID SEQ NO: 20, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica a ID SEQ NO: 20. Em um aspecto, o veículo de levedura é uma levedura total. Em um aspecto, a levedura total é inativada por calor.

[00024] Ainda outra modalidade da invenção refere-se a uma composição imunoterapêutica de levedura de *Brachyury* compreendendo: (a) uma levedura total inativada; e (b) uma proteína de fusão *Brachyury* compreendendo a sequência de aminoácidos de posições 2-435 de ID SEQ NO: 6. A expressão da proteína de fusão *Brachyury* está sob o controle do promotor *CUP1*, a proteína de fusão *Brachyury* é expressa pela levedura, e a composição induz uma resposta de célula T específica de *Brachyury*. Em um aspecto, a proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de ID SEQ NO: 8.

[00025] Ainda outra modalidade da invenção refere-se a uma composição imunoterapêutica de levedura de *Brachyury* compreendendo: (a) uma levedura total, inativada; e (b) uma proteína de fusão *Brachyury* compreendendo a sequência de aminoácidos de posições 2-435 de ID SEQ NO: 18. A expressão da proteína de fusão *Brachyury* está sob o controle do promotor *CPU1*, a proteína de fusão *Brachyury* é expressa pela levedura, e a composição induz uma resposta de célula T específica de *Brachyury*. Em um aspecto, a proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de ID SEQ NO: 20.

[00026] Em um aspecto de qualquer uma das modalidades ou aspectos da invenção descrita acima ou em qualquer outro lugar neste

relatório, o veículo de levedura é uma levedura total. Em um aspecto, a levedura total é morta. Em um aspecto, a levedura total é inativada por calor. Em um aspecto, a levedura expressa o antígeno. Em um aspecto, a levedura é de um gênero selecionado do grupo que consiste em: *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* e *Yarrowia*. Em um aspecto, a levedura é de *Saccharomyces*. Em um aspecto, a levedura é de *Saccharomyces cerevisiae*.

[00027] Em um aspecto de qualquer uma das modalidades da invenção descrita acima ou em qualquer outro lugar neste relatório, a composição é formulada em um excipiente farmacêuticamente aceitável adequado para administração a um indivíduo.

[00028] Ainda outra modalidade da invenção refere-se ao uso de qualquer uma das composições imunoterapêuticas de levedura de *Brachyury* descritas neste relatório para tratar uma doença. Em um aspecto, a doença é câncer. Em um aspecto, a doença é associada a um agente infeccioso. Em um aspecto, a doença é associada a um vírus ou infecção viral. Tal vírus pode incluir, mas não se limita a, Vírus de *Epstein-Barr* (EBV).

[00029] Outra modalidade da invenção refere-se a um método para tratar ou prevenir uma doença ou condição associada à infecção por Vírus de *Epstein-Barr* (EBV). O método inclui a etapa de administrar a um indivíduo qualquer uma das composições imunoterapêuticas de levedura de *Brachyury* descritas neste relatório.

[00030] Ainda outra modalidade da invenção refere-se a um método para produzir uma composição imunoterapêutica de levedura de *Brachyury*. O método inclui as etapas de: (a) cultivar levedura que foi transformada com uma molécula de ácido nucleico recombinante que codifica um antígeno de *Brachyury* sob o controle de um promotor *CUP1* em um meio adequado na ausência de  $\text{CuSO}_4$  até a levedura

atingir fase de crescimento *log* médio; (b) induzir expressão do antígeno de *Brachyury* na levedura adicionando  $\text{CuSO}_4$  ao meio; (c) cultivar a levedura após etapa (b) por, até entre 6 e 8 horas; e (d) colher a levedura. Em um aspecto, a levedura na etapa (a) é cultivada a uma densidade celular de, entre 1,0 e 2,0 Y. U. por mililitro de volume total de cultura. Em um aspecto, a levedura na etapa (a) é cultivada a uma densidade celular de, entre 1,0 e 1,5 Y. U. por mililitro de volume total de cultura. Em um aspecto, a levedura é cultivada nas etapas (a)-(c) em um meio em que o pH é mantido sob pH 5,5 ou maior. Em um aspecto, o método adicionalmente inclui uma etapa de inativação por calor da levedura após etapa (d). Por exemplo, em um aspecto, a levedura é inativada por calor em aproximadamente 56°C por cerca de 1 hora. Em um aspecto adicional dessa modalidade, a levedura pode ser formulada para injeção com um excipiente farmacologicamente aceitável. Em um aspecto, a levedura é de *Saccharomyces*. Em um aspecto, a levedura é de *Saccharomyces cerevisiae*.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00031] Fig. 1A é uma imagem digitalizada de um *Western blot* mostrando detecção por anti-*Brachyury* de expressão de *Brachyury* em uma composição imunoterapêutica de levedura de *Brachyury*, com ambos os meios U2 e UL2.

[00032] Fig. 1B é uma imagem digitalizada de um *Western blot* mostrando detecção por anti-His de expressão de *Brachyury* em uma composição imunoterapêutica de levedura de *Brachyury*, com ambos os meios U2 e UL2.

[00033] Fig. 2 é uma imagem digitalizada de um *Western blot* mostrando expressão de *Brachyury* em uma composição imunoterapêutica de levedura de *Brachyury*, em que a densidade celular sob indução de antígeno e o tempo de colheita após indução

de antígeno foram variáveis.

[00034] Figuras 3A-3C são gráficos mostrando que células mononucleares periféricas sanguíneas (PBMCs) a partir de dois fora de três doadores saudáveis, pulsadas com levedura *Brachyury* para dois ciclos de estimulação, seguido por pulsação com peptídeo CTL de *Brachyury*, foram capazes de gerar CTLs CD8<sup>+</sup> que podem matar células de carcinoma SW480 (HLA-A2 positivo/alto *Brachyury*), com lise mínima de carcinoma MCF7 (HLA-A2 positivo/baixo *Brachyury*); (Fig. 3A, doador 07706; Fig. 3B, doador 17663; Fig. 3C, doador 26532).

[00035] Fig. 4A é um gráfico mostrando que células T específicas de *Brachyury* de doador saudável PBMCs estimuladas com uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* especificamente lise de células tumorais que apresentam as células de carcinoma MHC (SW480, HLA-A2 positivo/alto *Brachyury*) versus H226 (HLA-A2 negativo/alto *Brachyury*) apropriadas.

[00036] Fig. 4B é um gráfico mostrando a expressão de mRNA de *Brachyury* em relação àquela de um gene de controle (GAPDH) nas células tumorais SW480 e H226 usadas no experimento mostrado na Fig. 4A.

[00037] Fig. 5 é um gráfico mostrando proliferação de células T CD4<sup>+</sup> isoladas a partir do baço de camundongos que foram vacinados com levedura *Brachyury* (GI-6301, círculos) ou levedura de controle (controle de levedura, triângulos), em resposta a doses indicadas de proteína de *Brachyury* purificada ou proteína β-gal de controle.

[00038] Fig. 6 é um gráfico mostrando que administração de uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* (GI-6301, círculos) da invenção mostra uma tendência no sentido de reduzir tumores expressando *Brachyury* em camundongos comparados com camundongos que recebem levedura isolada (nenhum antígeno de



*Brachyury*).

[00039] Figuras 7A e 7B são análises de citometria de fluxo mostrando que a linhagem de células T específicas de *Brachyury*, T-2-BR-A, liga-se a um tetrâmero HLA-A2 específico de *Brachyury* (Fig. 7B) e não a um tetrâmero de controle (Fig. 7A).

[00040] Fig. 8 é uma análise de citometria de fluxo mostrando a expressão de perforina na linhagem de células T específicas de *Brachyury*, T-2-BR-A, após estimulação com células B autólogas pulsadas por peptídeo agonista de *Brachyury*.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00041] Esta invenção geralmente refere-se às composições imunoterapêuticas à base de levedura e a métodos para a prevenção e/ou tratamento de cânceres que expressam ou superexpressam *Brachyury*. A invenção inclui o uso de uma composição imunoterapêutica à base de levedura (também referida como imunoterapia à base de levedura), a qual compreende um veículo de levedura e antígenos de *Brachyury* ou domínios imunogênicos destes (também referidos neste relatório como "imunoterapia de levedura *Brachyury*" ou "composições imunoterapêuticas de levedura *Brachyury*"). Os inventores descrevem neste relatório, a construção e produção de novos produtos imunoterápicos de levedura *Brachyury*, e demonstraram que imunoterapia de levedura *Brachyury* expandem células T específicas de *Brachyury*, incluindo CTLs CD8', de indivíduos normais e de pacientes com câncer. Além disso, camundongos imunizados com composições imunoterapêuticas de levedura *Brachyury* geraram respostas de células T específicas de *Brachyury in vivo*, e crescimento de tumor expressando *Brachyury* foi inibido nesses camundongos. Tomados juntamente, os dados apresentados neste relatório mostram que imunoterapia de levedura *Brachyury* é útil para a eliciação de respostas imunes celulares específicas de *Brachyury*

(CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) e para a prevenção e tratamento de tumores expressando *Brachyury*, oferecendo terapia nova para a prevenção e/ou tratamento de cânceres metastáticos e condições associadas.

[00042] Composições imunoterapêuticas de levedura *Brachyury* úteis na presente invenção são unicamente adaptadas para cânceres expressando *Brachyury* eficazmente direcionados por várias razões. Primeiro *Brachyury* está envolvido em processos EMT, e, portanto, sem estarem ligados por teoria, os inventores acreditam que *Brachyury* desempenha um papel em tumores de estágio tardio e processos metastáticos. Consequentemente, em um aspecto da invenção, imunoterapia de levedura *Brachyury* é eficaz em alvejar células tumorais, antes ou no momento, em que durante as quais começam a adquirir motilidade e invadir outros tecidos, desse modo, impedindo, inibindo, detendo, revertendo ou retardando o início de câncer metastático e/ou a progressão de câncer, e especialmente, câncer metastático. Há uma grande necessidade de terapias eficazes para cânceres de estágio tardio, especialmente cânceres metastáticos, que poderão apresentar poucas opções de tratamento uma vez que terapia convencional de câncer foi insuficiente. Levedura *Brachyury* apresenta uma nova abordagem para o tratamento de tais cânceres, ou para retardar, inibir, reverter, ou impedi-los completamente. Além disso, imunoterapia de levedura *Brachyury* pode ser utilizada para prevenir ou retardar câncer metastático ou progressão de câncer em indivíduos que apresentam câncer de estágio precoce. A terapia é útil, em uma modalidade, em cânceres que apresentam uma elevada taxa de progressão metastática, e pode ser útil para deter progressão do câncer. Além disso, imunoterapia de levedura *Brachyury* é útil em indivíduos que apresentam uma lesão pré-cancerosa (pré-maligna) ou tumor, em indivíduos que estão sob um alto risco de desenvolver um câncer, particularmente, aquele que apresenta uma elevada taxa de

metástases, e ainda em indivíduos normais, como um agente profilático para a prevenção de câncer, a qual pode ser usada em conjunto com outras imunoterapias profiláticas para câncer, tal como descrita neste relatório.

[00043] Imunoterapia de levedura *Brachyury* também proporciona um benefício a indivíduos que são submetidos à outra terapia para câncer, incluindo, quimioterapia e terapia de radiação. Mais particularmente, cânceres metastáticos são conhecidos em alguns casos ser mais resistentes à quimioterapia e/ou terapia de radiação que os cânceres primários. Portanto, as composições de imunoterapia de levedura *Brachyury* da invenção, podem ser utilizadas para inibir ou reduzir, ou eliminar resistência à quimioterapia ou resistência à radiação que podem ocorrer em cânceres metastáticos por meio de inibição de expressão de *Brachyury* no câncer (e, desse modo, inibindo influências antiproliferativas), e as composições da invenção poderão acentuar o desempenho de terapia de quimioterapia ou radiação em um indivíduo.

[00044] Imunoterapia de levedura *Brachyury* pode também ser usada para tratar condições ou doenças associadas à expressão de *Brachyury* que podem ser de natureza não-oncológicas, ou que podem preceder transformação maligna. Por exemplo, *Brachyury* pode ser induzida em células que são infectadas com um agente infeccioso, *por exemplo*, um vírus, tal como Vírus de *Epstein-Barr* (EBV). Consequentemente, imunoterapia de levedura *Brachyury* pode ser usada para tratar ou impedir qualquer doença ou condição associada à expressão de *Brachyury*, incluindo, mas não se limita a, doenças infecciosas, tal como infecção viral, incluindo, mas não se limita a, condições associadas a Vírus de *Epstein-Barr* (por exemplo, mononucleose).

[00045] Imunoterapia de levedura *Brachyury* é também

prontamente adaptável para o uso de antígenos tumorais adicionais dentro da mesma composição de levedura, ou para usar em combinação com outros imunoterapêuticos à base de levedura que direcionam outros antígenos tumorais (sequencial ou concorrentemente) ou outros imunoterapêuticos e tratamentos/terapias para câncer. Consequentemente, a imunoterapia de levedura *Brachyury* pode ser adaptada para o tipo de câncer; o estágio de câncer, o grau de câncer, os antígenos expressados pelo tumor, e o estado geral médico do indivíduo (isto é, a terapia é facilmente personalizada), e para o indivíduo que já apresenta câncer seu uso pode ser modificado quando o câncer evolui em um indivíduo, a fim de proporcionar eficácia máxima sob uma variedade de estágios de tumores. Imunoterapia de levedura *Brachyury* oferece a oportunidade de projetar abordagens individualizadas, sofisticadas e eficazes para o tratamento profilático e/ou terapêutico à base ampla de uma faixa extensa de cânceres.

[00046] Composições de levedura *Brachyury* descritas neste relatório induzem respostas imunes inatas, bem como respostas imunes adaptáveis contra o antígeno alvo (*Brachyury*), incluindo, respostas a células T, TH17 e TH1 dependentes de CD4 e respostas de células T CD8<sup>+</sup> específicas de antígenos, as quais incluem respostas citotóxicas T linfocitárias (CTL), todas sem o uso de adjuvantes exógenos, citocinas, ou outras moléculas imunoestimulatórias, muitas das quais apresentam tecidos de toxicidade. Além disso, composições imunoterapêuticas de levedura *Brachyury* inibem números reguladores de células T (Treg) e/ou funcionalidade, desse modo, intensificando respostas de células T efetadoras que podiam normalmente ser suprimidas pela presença do tumor, por exemplo. Além disso, quando comparadas a composições imunoterapêuticas que imunizam por meio de geração

de respostas de anticorpos, as respostas imunes celulares específicas de antígeno, de base ampla, e potente, induzidas por imunoterapia de levedura *Brachyury* acreditam-se ser, particularmente, eficazes direcionar células tumorais. Na verdade, numerosos estudos têm mostrado que abordagens imunoterapêuticas são intensificadas quando células tumorais são direcionadas via CTLs CD8<sup>+</sup>, as quais reconhecem peptídeos de tumor no contexto de moléculas Classe I MHC.

[00047] Imunoterapia de levedura *Brachyury* é altamente competente em ativar células apresentando antígeno, e apresenta uma capacidade única de *cross-prime* para resposta imune, gerando respostas CTL CD8<sup>+</sup> que são tipicamente eficazes contra tumores, mesmo em caso de que podem de outra maneira ser um ambiente supressivo. Uma vez que esse tipo de imunoterapia utiliza a capacidade natural da célula apresentando antígeno que exhibe imunógenos relevantes, não é necessário conhecer a identidade exata de epítomos de CTL ou epítomos de MHC Classe II de *Brachyury* para produzir um imunoterapêutico eficaz de acordo com a presente invenção. De fato, epítomos de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> podem ser direcionados em uma única composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury*, e assim os imunoterapêuticos de levedura *Brachyury* da invenção não se limitam à utilização de peptídeos curtos e, de fato, o uso de polipeptídeos mais longos, e proteínas de fusão nessas composições torna-se eficaz. Consequentemente, utilizando imunoterapia de levedura *Brachyury*, o uso de algoritmos e fórmulas complexas para identificar epítomos de células T putativos é eliminado.

[00048] Além disso, uma vez que *Brachyury* não é expresso por tecidos mais normais (não-tumorosos), e é tipicamente superexpresso em células tumorais, quaisquer efeitos "fora de alvo", relacionados a tecidos normais não são de preocupação. Conforme mencionado

acima, levedura de *Brachyury* pode ser eficazmente utilizada em um protocolo de imunização (profilático ou terapêutico) sem o uso de adjuvantes exógenos, agentes ou moléculas imunoestimulatórias, moléculas coestimulatórias, ou citocinas, embora tais agentes possam ser incluídos, se desejados. Além disso, imunoterapia de levedura *Brachyury* pode ser administrada repetidamente sem perder eficácia, como poderá ser problemática com outros tipos de imunoterapia.

#### Composições da Invenção

[00049] Uma modalidade da presente invenção refere-se a uma composição imunoterapêutica à base de levedura que pode ser utilizada para impedir e/ou tratar cânceres caracterizados por expressão ou superexpressão de *Brachyury* (incluindo, cânceres que podem não conter células expressando *Brachyury* detectável inicialmente, mas que poderão ou conterão células expressando *Brachyury* em estágios mais tardios do desenvolvimento do câncer). A composição é uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* compreendendo: (a) um veículo de levedura; e (b) um antígeno de câncer que compreende um ou mais antígenos de *Brachyury* e/ou domínio(s) imunogênico(s) destes. O antígeno de *Brachyury* ou domínio imunogênico deste é mais tipicamente expresso como uma proteína recombinante pelo veículo de levedura (*por exemplo*, por uma levedura intacta ou esferoplasto de levedura, que pode ser opcional e adicionalmente processada para um citoplasto de levedura, espectro de levedura ou extrato de membrana de levedura ou fração da mesma), embora seja uma modalidade da invenção que um ou mais antígenos de *Brachyury* são carregados para um veículo de levedura, ou de outra maneira complexados com, ligados a, misturados com, ou administrados com um veículo de levedura, conforme descrito neste relatório para formar uma composição da presente invenção.

[00050] Uma "composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury*" é um tipo específico de "composição imunoterapêutica à base de levedura", que contém pelo menos um antígeno de *Brachyury* ou domínio imunogênico deste. A expressão "composição imunoterapêutica à base levedura" pode ser usada alternadamente com "produto de imunoterapia à base de levedura", "composição de imunoterapia à base de levedura", "composição à base de levedura", "imunoterapêutico à base de levedura", "vacina à base de levedura", ou derivados dessas expressões. Uma "composição imunoterapêutica" é uma composição que induz uma resposta imune suficiente para obter pelo menos um benefício terapêutico em um indivíduo. Conforme usado neste relatório, composição imunoterapêutica à base de levedura refere-se a uma composição que inclui um componente veículo de levedura e que induz uma resposta imune suficiente para obter pelo menos, um benefício terapêutico em um indivíduo. Mais particularmente, uma composição imunoterapêutica baseada em levedura é uma composição que inclui um componente veículo de levedura e tipicamente, um componente de antígeno, e pode provocar ou induzir uma resposta imune, tal como uma resposta imune celular, incluindo, sem limitação, uma resposta imune celular mediada por células T. Em um aspecto, uma composição imunoterapêutica baseada em levedura útil na invenção é capaz de induzir uma resposta imune mediada por célula T CD8<sup>+</sup> e/ou CD4<sup>+</sup> e, em um aspecto, uma resposta imune mediada por célula T de CD8<sup>+</sup> e de CD4<sup>+</sup>, particularmente, contra um antígeno-alvo (por exemplo, um antígeno de câncer). Uma resposta imune CD4<sup>+</sup> pode incluir respostas imunes de TH1 respostas imunes de TH2, respostas imunes de TH17, ou qualquer combinação dos acima. Imunoterapêuticos à base de levedura são particularmente capazes de gerar respostas de TH1 e TH17. Uma resposta imune de CD8<sup>+</sup> pode incluir uma resposta

citotóxica T linfocitária (CTL), e imunoterapêuticos à base de levedura são capazes de gerar tais respostas. Em um aspecto, uma composição imunoterapêutica baseada em levedura modula o número e/ou a funcionalidade de células T reguladoras (Tregs) em um indivíduo. Imunoterapia baseada em levedura pode ser também modificada para promover um tipo de resposta sobre outro, por exemplo, pela adição de citocinas, anticorpos, e/ou modular o processo de produção da levedura. Opcionalmente, uma composição imunoterapêutica à base de levedura é capaz de induzir uma resposta imune humoral.

[00051] Composições imunoterapêuticas de levedura *Brachyury* da invenção poderão ser "profiláticas" ou "terapêuticas". Quando proporcionadas profilaticamente, as composições da presente invenção são proporcionadas com antecipação do desenvolvimento de, ou a detecção do desenvolvimento de, um câncer que expressa *Brachyury*, com o objetivo de impedir, inibir ou retardar o desenvolvimento de tumores expressando *Brachyury*; e/ou impedir, inibir ou retardar migração do tumor e/ou invasão do tumor de outros tecidos (metástases); e/ou geralmente impedir ou inibir progressão de câncer em um indivíduo. Conforme discutido neste relatório, *Brachyury* é expresso em diversos cânceres, incluindo cânceres de estágio avançado, e tem mostrado estar envolvido no processo de EMT, que é um processo associado à invasividade e migração de tumores, tal como em câncer metastático. Portanto, composições profiláticas podem ser administradas a indivíduos que parecem estar livres de câncer (saudável, ou indivíduos normais), para indivíduos com lesões pré-cancerosas (lesões pré-malignas) e, também, para indivíduos que têm câncer, mas, em que *Brachyury* ainda não foi detectada (isto é, antes da expressão de *Brachyury* por células tumorais no câncer). Os indivíduos que estão sob alto risco de desenvolvimento de um câncer,



particularmente, um câncer com o qual expressão de *Brachyury* e/ou metástases são, tipicamente associadas, poderão ser tratados profilaticamente com uma composição da invenção. Quando proporcionados terapeuticamente, as composições de imunoterapia são proporcionadas a um indivíduo com um câncer expressando *Brachyury*, com o objetivo de melhoramento do câncer, tal como, reduzindo a carga tumoral no indivíduo; inibindo crescimento do tumor no indivíduo; aumentando sobrevivência do indivíduo; impedindo, inibindo, revertendo, ou retardando desenvolvimento de migração do tumor e/ou invasão do tumor de outros tecidos (câncer metastático) e/ou impedindo, inibindo, revertendo ou retardando a progressão do câncer no indivíduo. Em um aspecto, a imunoterapia de levedura *Brachyury* é utilizada terapeuticamente para inibir, reduzir ou eliminar resistência à quimioterapia ou resistência à radiação que pode ocorrer em câncer metastático por meio de inibição da expressão de *Brachyury* no câncer, e composições da invenção podem melhorar o desempenho de terapia de quimioterapia ou radiação em um indivíduo.

[00052] Tipicamente, uma composição de imunoterapia de levedura *Brachyury* inclui um veículo de levedura e, pelo menos um antígeno de câncer compreendendo um antígeno de *Brachyury* ou domínio imunogênico deste, em que o antígeno de câncer é expresso, ligado com, carregado para, ou misturado com o veículo de levedura. Em algumas modalidades, o antígeno de câncer, antígeno de *Brachyury*, ou domínio imunogênico deste, é proporcionado como uma proteína de fusão. Diversas proteínas de *Brachyury* e proteínas de fusão adequadas para uso nas composições e métodos da invenção são descritas abaixo. Em algumas modalidades, o antígeno de câncer e o antígeno de *Brachyury* são os mesmos elementos. Em algumas modalidades, o antígeno de câncer inclui outros antígenos, incluindo outros antígenos de câncer, além do antígeno de *Brachyury*. Em um

aspecto da invenção, uma proteína de fusão útil como um antígeno de câncer pode incluir dois ou mais antígenos, por exemplo, um antígeno de *Brachyury* e outro antígeno de câncer que não é um antígeno de *Brachyury*, ou dois diferentes antígenos de *Brachyury*. Em um aspecto, a proteína de fusão pode incluir dois ou mais domínios imunogênicos de um ou mais antígenos, tais como, dois ou mais domínios imunogênicos de um antígeno de *Brachyury*, ou dois ou mais epítomos de um ou mais antígenos, tais como, dois ou mais epítomos de um antígeno de *Brachyury*.

[00053] De acordo com a presente invenção, um veículo de levedura usado em uma composição de imunoterapia de levedura *Brachyury* é qualquer célula de levedura (*por exemplo*, uma célula total ou intacta) ou um derivado desta (ver abaixo) que pode ser usada juntamente com um ou mais antígenos, domínios destes, ou epítomos destes, em uma composição da invenção (por exemplo, uma composição terapêutica ou profilática). O veículo de levedura pode, portanto, incluir, mas sem se limitar aos mesmos, um microrganismo de levedura vivo intacto (total) (isto é, uma célula de levedura apresentando todos seus componentes, incluindo, uma parede celular), um microrganismo de levedura destruído (morto) ou microrganismo de levedura intacto inativado, ou derivados de 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 uma parede celular e do núcleo), um espectro de levedura (isto é, uma célula de levedura desprovida de uma parede celular, do núcleo e do citoplasma), um extrato de membrana de levedura subcelular ou fração deste (também referido como uma partícula de membrana de levedura e, anteriormente, como uma partícula de levedura subcelular), qualquer outra partícula de levedura, ou uma preparação de parede celular de

levedura.

[00054] Esferoplastos de levedura são tipicamente produzidos, por digestão enzimática da parede celular de levedura. Tal método é descrito, por exemplo, em Franzusoff e outros, 1991, *Meth. Enzymol.* 194, 662-674, incorporado neste relatório como referência em sua totalidade.

[00055] Citoplastos de levedura são tipicamente produzidos, por enucleação de células de levedura. Tal método é descrito, por exemplo, em Coon, 1978, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 48, 45-55 incorporado neste relatório como referência em sua totalidade.

[00056] Espectros de levedura são tipicamente produzidos por meio de resselagem de uma célula permeabilizada ou lisada e podem, mas não necessariamente, conter pelo menos algumas das organelas dessa célula. Tal método é descrito, por exemplo, em Franzusoff e outros, 1983, *J. Biol. Chem.* 258, 3608-3614, e Bussey e outros, 1979, *Biochim. Biophys. Acta* 553, 185-196, cada um dos quais é incorporado neste relatório como referência em sua totalidade.

[00057] Uma partícula de membrana de levedura (extrato de membrana de levedura subcelular ou fração deste) refere-se a uma membrana de levedura que falta um núcleo natural ou citoplasma. A partícula pode ser de qualquer tamanho, incluindo, tamanhos que variam do tamanho de uma membrana de levedura natural a micropartículas produzidas por meio de ultrassons ou por outros métodos de ruptura da membrana conhecidos daqueles versados no estado da técnica, seguido por resselagem. Um método para produzir extratos de membrana de levedura subcelulares é descrito, por exemplo, em Franzusoff e outros, 1991, *Meth. Enzymol.* 194, 662-674. Um método poderá também utilizar frações de particular de membrana de levedura que contêm porções da membrana de levedura e, quando o antígeno, ou outras proteínas foram expressas

recombinantemente pela levedura antes da preparação das partículas de membrana de levedura, o antígeno ou outras proteínas de interesse. Antígenos, ou outras proteínas de interesse podem ser transportadas para o interior da membrana, em qualquer superfície da membrana, ou combinações destes (isto é, a proteína pode estar tanto no interior como no exterior da membrana e/ou abrangendo a membrana da partícula de membrana de levedura). Em uma modalidade, uma partícula de membrana da levedura é uma partícula de membrana da levedura recombinante que pode ser uma membrana de levedura intacta, rompida; ou rompida e resselada que inclui pelo menos um antígeno desejado ou outra proteína de interesse, sobre a superfície da membrana ou, pelo menos, parcialmente embutida no interior da membrana.

[00058] Um exemplo de uma preparação de parede celular de levedura é uma preparação de paredes celulares de levedura isolada que transporta um antígeno em sua superfície, ou pelo menos parcialmente embutida dentro da parede celular, de tal modo que a preparação de parede celular de levedura, quando administrada a um animal, estimula uma resposta imune desejada contra uma doença-alvo.

[00059] Qualquer cepa de levedura pode ser utilizada para produzir um veículo de levedura da presente invenção. Levedura são microrganismos unicelulares que pertencem a uma das três classes: *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* e *Fungi Imperfect*. Uma consideração para a seleção de um tipo de levedura para uso como um modulador imune é a patogenicidade da levedura. Em uma modalidade, a levedura é uma cepa não patogênica, tal como *Saccharomyces cerevisiae*. A seleção de uma cepa de levedura não patogênica minimiza quaisquer efeitos adversos ao indivíduo, ao qual o veículo de levedura é administrado. Entretanto, levedura patogênica poderá ser

utilizada se a patogenicidade da levedura pode ser negada por quaisquer meios conhecidos daquele versado no estado da técnica (por exemplo, cepas mutantes). De acordo com um aspecto da presente invenção, são utilizadas cepas de levedura não patogênicas.

[00060] Gêneros de cepas de levedura que podem ser usadas na invenção incluem, mas não se limitam aos mesmos, *Saccharomyces*, *Candida* (que pode ser patogênica), *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* e *Yarrowia*. Em um aspecto, gêneros de levedura são selecionados a partir de *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* ou *Schizosaccharomyces*, e em um aspecto, *Saccharomyces* é usado. Espécies de cepas de levedura que podem ser usadas na invenção incluem, mas não se limitam as mesmas, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Candida albicans*, *Candida kefir*, *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*. Deve ser considerado que várias dessas espécies incluem uma variedade de subespécies, tipos, subtipos, etc., que se pretendem ser incluídas nas espécies acima mencionadas. Em um aspecto, espécies de levedura utilizadas na invenção incluem *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *H. polymorpha*, *P. pastoris* e *S. pombe*. *S. cerevisiae* é útil, pois é relativamente fácil de manipular e de ser "geralmente reconhecida como segura" "Generally Recognized As Safe" ou ("GRAS") para uso como aditivos alimentícios (GRAS, FDA propôs Regra 62FR18938, 17 de abril de 1997). Uma modalidade da presente invenção é uma cepa de levedura que é capaz de replicar plasmídeos até um número de cópias particularmente elevado, tal como uma cepa de *S. cerevisiae* *cir*<sup>o</sup>. A cepa de *S. cerevisiae* é aquela cepa que é

capaz de suportar vetores de expressão que permitem um ou mais antígenos-alvo e/ou proteína(s) de fusão de antígeno, e/ou outras proteínas que devem ser expressas em níveis elevados. Outra cepa de levedura que é útil na invenção é *Saccharomyces cerevisiae* W303α. Além disso, quaisquer cepas mutantes de levedura podem ser utilizadas na presente invenção, incluindo, aquelas que exibem modificações pós-translacionais reduzidas de antígenos alvo expressos ou outras proteínas, tais como, mutações nas enzimas que se estendem a glicosilação ligada a N.

[00061] A composição de imunoterapia de levedura *Brachyury* da invenção inclui pelo menos um antígeno de câncer compreendendo um antígeno de *Brachyury*. De acordo com a presente invenção, o uso geral neste relatório, do termo "antígeno" refere-se: a qualquer porção de uma proteína (por exemplo, peptídeo, proteína parcial, proteína de comprimento total), em que a proteína ocorre naturalmente ou derivada sinteticamente ou projetada, para uma composição celular (célula total, lisato celular ou células rompidas), para um organismo (organismo total, lisato ou células rompidas); ou a um carboidrato, ou outra molécula, ou uma porção desta. Um antígeno pode induzir uma resposta imune específica de antígeno (por exemplo, uma resposta humoral e/ou uma resposta imune mediada por células) contra o mesmo ou antígenos similares que são encontrados por um elemento do sistema imune (por exemplo, células T, anticorpos).

[00062] Um antígeno pode ser tão pequeno quanto um epítopo único, um único domínio imunogênico ou maior, e pode incluir epítopos múltiplos ou domínios imunogênicos. Como tal, o tamanho de um antígeno pode ser tão pequeno quanto cerca de 8-11 aminoácidos (isto é, um peptídeo) e tão grande quanto: uma proteína de comprimento completo, um multímero, uma proteína de fusão, uma proteína quimérica, uma célula total, um microrganismo inteiro, ou

qualquer porção deste (por exemplo, fragmentos proteicos (polipeptídeos), lisatos de células inteiras ou extratos de microrganismos). Antígenos úteis no imunoterapêutico de levedura *Brachyury* da presente invenção são peptídeos, polipeptídeos, proteínas de comprimento completo, multímeros, proteínas de fusão e proteínas quiméricas. Além disso, os antígenos podem incluir carboidratos, que podem ser carregados em um veículo de levedura ou em uma composição da invenção. Será considerado que em algumas modalidades (por exemplo, quando o antígeno é expresso pelo veículo de levedura a partir de uma molécula de ácido nucleico recombinante), o antígeno é uma proteína, proteína de fusão, proteína quimérica, ou fragmento desta, em vez de uma célula inteira ou microrganismo. Para expressão em levedura, um antígeno é de um tamanho mínimo capaz de ser expresso de forma recombinante em levedura, se o antígeno é a proteína inteira que deve ser expressa pela levedura, e é tipicamente, pelo menos ou maior que 25 aminoácidos de comprimento, ou pelo menos, ou maior que 26, pelo menos ou maior que 27, pelo menos ou maior que 28, pelo menos ou maior que 29, pelo menos ou maior que 30, pelo menos ou maior que 31, pelo menos ou maior que 32, pelo menos ou maior que 33, pelo menos ou maior que 34, pelo menos ou maior que 35, pelo menos ou maior que 36, pelo menos ou maior que 37, pelo menos ou maior que 38, pelo menos ou maior que 38, pelo menos ou maior que 39, pelo menos ou maior que 40, pelo menos ou maior que 41, pelo menos ou maior que 42, pelo menos ou maior que 43, pelo menos ou maior que 44, pelo menos ou maior que 45, pelo menos ou maior que 46, pelo menos ou maior que 47, pelo menos ou maior que 48, pelo menos ou maior que 49, ou pelo menos ou maior que 50 aminoácidos de comprimento, ou, pelo menos ou maior que 25-50 aminoácidos de comprimento, ou, pelo menos ou maior que 30-50 aminoácidos de

comprimento, ou, pelo menos ou maior que 35-50 aminoácidos de comprimento, ou, pelo menos ou maior que 40-50 aminoácidos de comprimento, ou, pelo menos ou maior que 45-50 aminoácidos de comprimento, embora proteínas menores possam ser expressas, e proteínas consideravelmente maiores (por exemplo, centenas de aminoácidos de comprimento, ou mesmo alguns milhares de aminoácidos de comprimento) podem ser expressas. Em um aspecto, uma proteína de comprimento completo ou uma proteína que é desprovida de, entre 1 e 20 aminoácidos do término N e/ou o término C pode ser expressa. As proteínas de fusão e proteínas quiméricas são também antígenos que podem ser expressos na invenção. Um "antígeno-alvo" é um antígeno que é especificamente direcionado por uma composição imunoterapêutica da invenção (isto é, um antígeno contra o qual a eliciação de uma resposta imunitária é desejada). Um "antígeno de câncer" é um antígeno que compreende pelo menos um antígeno que é associado a um câncer; tal como um antígeno expresso por uma célula tumoral, de tal modo que direcionamento do antígeno também direciona o câncer. Um antígeno de câncer pode incluir um ou mais antígenos a partir de uma ou mais proteínas, incluindo, uma ou mais proteínas associadas a tumores. Um "antígeno de *Brachyury*" é um antígeno derivado, projetado ou produzido, a partir de uma proteína de *Brachyury*.

[00063] Quando se refere à estimulação de uma resposta imune, o termo "imunógeno" é um subconjunto do termo "antígeno", e, portanto, em alguns exemplos, pode ser utilizado alternadamente com o termo "antígeno". Um imunógeno, conforme usado neste relatório descreve um antígeno que induz uma resposta imune humoral e/ou mediada por células (isto é, imunogênica), tal que administração do imunógeno a um indivíduo aumenta uma resposta imune específica de antígeno contra o mesmo ou antígenos similares que são encontrados pelo



sistema imunológico do indivíduo. Em uma modalidade, o imunógeno induz uma resposta imune mediada por células, incluindo, uma resposta de células T CD4<sup>+</sup> (por exemplo, TH1, TH2 e/ou TH17) e/ou uma resposta de células T CD8<sup>+</sup> (por exemplo, uma resposta de CTL).

[00064] Um "domínio imunogênico" de um dado antígeno pode ser qualquer porção, fragmento ou epítopo de um antígeno (por exemplo, um fragmento ou subunidade de peptídeo, ou um epítopo de anticorpo ou outro epítopo conformacional) que contém pelo menos um epítopo que pode atuar como um imunógeno, quando administrado a um animal. Portanto, um domínio imunogênico é maior que um único aminoácido e é, pelo menos, de um tamanho suficiente para conter pelo menos um epítopo que pode atuar como um imunógeno. Por exemplo, uma única proteína pode conter vários domínios imunogênicos diferentes. Domínios imunogênicos não necessitam de ser sequências lineares dentro de uma proteína, tal como, no caso de uma resposta imune humoral, onde os domínios conformacionais são considerados.

[00065] Um epítopo é definido neste relatório como um único sítio imunogênico dentro de um dado antígeno que é suficiente para induzir uma resposta imune, quando proporcionada ao sistema imune, no contexto de sinais coestimuladores apropriados e/ou células ativadas do sistema imune. Em outras palavras, um epítopo é a parte de um antígeno que é reconhecido por componentes do sistema imune, e pode também ser referido como um determinante antigênico. Aqueles versados no estado da técnica reconhecerão que os epítopos de células T são diferentes no tamanho e composição de epítopos de células B ou anticorpos, e que os epítopos apresentados por meio da via MHC de Classe I diferem no tamanho e atributos estruturais de epítopos apresentados através da via MHC de Classe II. Por exemplo, os epítopos de células T apresentados por moléculas de MHC de

Classe I são tipicamente entre 8 e 11 aminoácidos de comprimento, visto que os epítomos apresentados pelas moléculas de MHC de Classe II são menos restritos no comprimento e podem ser de até 25 aminoácidos ou mais. Além disso, epítomos de células T apresentam características estruturais preditas dependendo das moléculas de MHC específicas ligadas pelo epítomo. Os epítomos podem ser epítomos de sequência linear ou epítomos conformacionais (regiões de ligação conservadas). A maioria dos anticorpos reconhece epítomos conformacionais.

[00066] *Brachyury* (que pode também ser referido como "T") é uma proteína altamente conservada entre múltiplas espécies diferentes de animais e é um fator de transcrição que contém um domínio de "caixa-T" ou "domínio T", um motivo (*motif*) de domínio de ligação a DNA compartilhado entre diversas proteínas diferentes, chamadas coletivamente a família caixa-T de proteínas. *Brachyury* humano foi primeiro clonado em 1996 (Edwards e outros; *supra*). Uma sequência de nucleotídeos que codifica *Brachyury* humano é aqui representada por ID SEQ NO: 1, que é uma sequência de RNAm que foi obtida a partir de GENBANK® No. de acesso NM\_003181 (GI: 19743811). ID SEQ NO: 1 codifica uma proteína de *Brachyury* humana de 435 aminoácidos, a sequência de aminoácidos das quais é representada aqui, como ID SEQ NO: 2 (também encontrada no GENBANK® No. de acesso NP\_003172; GI: 4507339).

[00067] Outra proteína de *Brachyury* humana descrita neste relatório é uma variante da proteína de *Brachyury* humana representada por ID SEQ NO: 2, e apresenta a sequência de aminoácidos de ID SEQ NO: 6. ID SEQ NO: 6, também uma proteína de 435 aminoácidos, é codificada por uma sequência de nucleotídeos representada aqui, por ID SEQ NO: 5. ID SEQ NO: 6 é aproximadamente 99% idêntica à ID SEQ NO: 2 ao longo do

comprimento total da proteína. ID SEQ NO: 6 difere de ID SEQ NO: 2 na posição 177 (Asp vs. Gly, respectivamente), posição 368 (Thr vs. Ser, respectivamente) e posição 409 (Asn vs. Asp, respectivamente).

[00068] Outra proteína de *Brachyury* humana descrita neste relatório é um agonista da proteína de *Brachyury* humana representada por ID SEQ NO: 2 ou ID SEQ NO: 6. Como geralmente usado neste relatório, um "agonista" é qualquer composto ou agente, incluindo, sem limitação, moléculas pequenas, proteínas, peptídeos, anticorpos, agentes de ligação de ácidos nucleicos, etc., que se liga a um receptor ou ligante e produz ou causa uma resposta, o qual pode incluir agentes que imitam ou intensificam a ação de uma substância que ocorre naturalmente, o qual se liga ao receptor ou ligante. Quando usado no contexto de um antígeno de *Brachyury* da invenção, um antígeno "agonista" ou proteína refere-se a um antígeno ou proteína que compreende pelo menos um epítipo de agonista de células T, o qual também pode ser referido como um "mimótopo". Um peptídeo mimótopo é um peptídeo que imita a estrutura de um epítipo do tipo selvagem e, como um agonista, o mimótopo imita ou intensifica a ação (função biológica) do epítipo natural. Por exemplo, a sequência de aminoácidos de ID SEQ NO: 12 (WLLPGTSTL) é um epítipo de célula T de uma proteína de *Brachyury* do tipo selvagem. A sequência de aminoácidos de ID SEQ NO: 13 (WLLPGTSTV) é um mimótopo ou agonista do epítipo de célula T de ID SEQ NO: 12.

[00069] Um antígeno agonista de *Brachyury* humano é aqui, representado por ID SEQ NO: 18. ID SEQ NO: 18 é uma proteína de 435 aminoácidos é codificada por uma sequência de nucleotídeos representada neste relatório por ID SEQ NO: 17. ID SEQ NO: 18 é idêntica a ID SEQ NO: 6, exceto para uma substituição de uma leucina na posição 254 em relação a ID SEQ NO: 6, com uma valina na ID SEQ NO: 18. Essa substituição cria um epítipo agonista de célula T

na ID SEQ NO: 18 nas posições 246 a 254 que, sem ser ligada por teoria, acredita-se induzir respostas de células T intensificadas contra *Brachyury*, quando comparado com o epítipo do tipo selvagem (posições 246 a 254 de ID SEQ NO: 6).

[00070] Posições 41 a 223 de qualquer uma de ID SEQ NO: 2, ID SEQ NO:6 ou ID SEQ NO: 18 representam o domínio de ligação a DNA Caixa-T de *Brachyury* humana, e o domínio caixa-T em outras sequências de *Brachyury*, incluindo, sequências de *Brachyury* de outras espécies, podem ser prontamente identificadas por comparação com essas sequências. Como usado neste relatório, referência a um domínio caixa-T de qualquer proteína de *Brachyury* descrita neste relatório, ou conhecida no estado da técnica e utilizada na invenção pode incluir um adicional de 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 de término N e/ou a extremidade de término C do domínio caixa-T definido (por exemplo, em cada lado das posições 41-223 de ID SEQ NOs: 2, 6 ou 18). *Brachyury* humana, incluindo, as duas proteínas humanas *Brachyury* descritas neste relatório, também contêm vários epítopos de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Tais epítopos são descritos, por exemplo, no WO 2008/106551, e inclui um epítipo de CTL CD8<sup>+</sup>, WLLPGTSTL (também referido neste relatório como Tp2, ID SEQ NO: 12), nas posições 246 a 254 de ID SEQ NO: 2 ou ID SEQ NO: 6. Como discutido acima, ID SEQ NO: 18 compreende um epítipo agonista de ID SEQ NO: 12, representado neste relatório por ID SEQ NO: 13.

[00071] *Brachyury* humana apresenta homologia muito alta com *Brachyury* a partir de outras espécies animais e, portanto, aquele versado no estado da técnica é capaz de utilizar as sequências de *Brachyury* a partir de outros organismos na preparação de uma

composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* da invenção, particularmente, onde essas sequências são idênticas, substancialmente homólogas, e induzem uma resposta imune eficaz contra o antígeno-alvo (por exemplo, *Brachyury* nativa expressa por uma célula tumoral). Por exemplo, *Brachyury* murino, que foi clonado pela primeira vez por Hermann e outros, em 1990 (Herman e outros, *supra*), é aproximadamente 85% idêntico a *Brachyury* humano no nível dos nucleotídeos, e aproximadamente 91% idêntico no nível dos aminoácidos. Com relação à *Brachyury* de outros animais, no nível de aminoácidos, *Brachyury* humana é 99,5% idêntica a *Brachyury* de *Pan troglodytes*, 90,1% idêntica a *Brachyury* de *Canis lupus familiaris*, 88,5% idêntica a *Brachyury* de *Bos Taurus*, 92,2% idêntica a *Brachyury* de *Rattus norvegicus*, e 80,9% idêntica a *Brachyury* de *Gallus gallus*. Dentre aminoácidos 1-223 de *Brachyury*, que contém o domínio caixa-T, *Brachyury* de camundongo e humana diferem em apenas dois aminoácidos (nas posições 26 e 96). Uma sequência de nucleotídeos que codifica *Brachyury* murino é representada neste relatório por ID SEQ NO: 3, que é uma sequência de RNAm que foi obtida de GENBANK<sup>®</sup> No. de acesso NM\_009309 (GI: 118130357). ID SEQ NO: 3 codifica uma proteína de *Brachyury* murina de 436 aminoácidos, a sequência de aminoácidos a qual é aqui representada como ID SEQ NO: 4. Posições 41 a 223 de ID SEQ NO: 4; representa o domínio de ligação a DNA de caixa-T de *Brachyury* murino.

[00072] Em uma modalidade da invenção, um antígeno de *Brachyury* compreende ou consiste da sequência de aminoácidos representada por ID SEQ NO: 2, ID SEQ NO: 4, ID SEQ NO: 6, ID SEQ NO: 18, ou pelo menos um domínio imunogênico deste. Em uma modalidade, um antígeno de *Brachyury* compreende ou consiste em dois, três, quatro, cinco, ou mais domínios imunogênicos de *Brachyury*. Em uma modalidade da invenção, um antígeno de

*Brachyury* compreende ou consiste da sequência de aminoácidos representada por posições 1 ou 2 de aminoácidos por meio de um dos últimos 25 aminoácidos no término C de ID SEQ NO: 2, ID SEQ NO: 4, ID SEQ NO: 6 ou ID SEQ NO: 18 (isto é, por meio de qualquer uma das posições 441 a 435 de ID SEQ NO: 2 ou ID SEQ NO: 6 ou ID SEQ NO: 18, ou por meio de uma das posições 442 a 436 de ID SEQ NO: 4). Outro antígeno de *Brachyury* útil na invenção também inclui, pelo menos, 1-223 posições de aminoácidos de *Brachyury* (por exemplo, posições 1-223 de ID SEQ NO: 2, ID SEQ NO: 4, ID SEQ NO: 6 ou ID SEQ NO: 18) ou posições 41-223 de *Brachyury* (por exemplo, posições 41-223 de ID SEQ NO: 2, ID SEQ NO: 4, ID SEQ NO: 6 ou ID SEQ NO: 18). Outro antígeno de *Brachyury* útil na invenção inclui, pelo menos, posições de aminoácidos 1 a 85, entre a posição 255 e o término C de ID SEQ NO: 2, ID SEQ NO: 4, ID SEQ NO: 6 ou ID SEQ NO: 18. Outro antígeno de *Brachyury* útil na invenção inclui, de pelo menos, posições de aminoácidos 1 a 85, entre a posição 430 e o término C de ID SEQ NO: 2, ID SEQ NO: 4, ID SEQ NO: 6 ou ID SEQ NO: 18. Outro antígeno de *Brachyury* útil na invenção inclui, pelo menos, de posições de aminoácidos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 entre a posição 255 e o término C de ID SEQ NO: 2, ID SEQ NO: 4, ID SEQ NO: 6 ou ID SEQ NO: 18.

[00073] De acordo com qualquer modalidade da presente invenção, referência a uma proteína de "comprimento total" (ou um domínio funcional de comprimento total ou domínio imunológico de comprimento total) inclui a sequência de aminoácidos de comprimento total da proteína ou domínio funcional ou domínio imunológico, conforme descrito neste relatório, ou como de outra maneira conhecida, ou descrito em uma sequência publicamente disponível. Uma proteína ou domínio que é de "comprimento total próximo", a qual é também um tipo de homólogo de uma proteína, difere de uma

proteína ou domínio de comprimento total, através da adição ou deleção, ou omissão de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 aminoácidos, a partir do término N e/ou término C de tal proteína de comprimento total ou domínio de comprimento total. Por meio de exemplo, várias das proteínas de fusão aqui descritas compreendem um antígeno de *Brachyury* de "comprimento total próximo", uma vez que o antígeno omite a metionina na posição 1, e substitui um peptídeo de término N. Referência geral a uma proteína ou um domínio, ou antígeno pode incluir tanto proteínas de comprimento total quanto proteínas de comprimento total próximo, bem como outros homólogos destas.

[00074] Em um aspecto de quaisquer modalidades relatadas para um antígeno de *Brachyury*, um antígeno de câncer ou um antígeno de *Brachyury* é de um tamanho mínimo suficiente para permitir que o antígeno seja expresso por levedura. Para expressão em levedura, uma proteína é tipicamente pelo menos aproximadamente de 25 aminoácidos de comprimento, embora proteínas menores possam ser expressas, e proteínas consideravelmente maiores podem ser expressas por leveduras. Por exemplo, um antígeno de *Brachyury* útil na invenção é um fragmento de uma proteína de *Brachyury* que pode ser expressa de forma recombinante por leveduras e que contém pelo menos um domínio imunogênico de *Brachyury*, que pode incluir pelo menos um domínio imunogênico de qualquer uma de ID SEQ NO: 2, ID SEQ NO: 4, ID SEQ NO: 6 ou ID SEQ NO: 18. Em um aspecto, tal antígeno é de pelo menos 25 aminoácidos de comprimento, e contém pelo menos um domínio imunogênico de *Brachyury*. Em um aspecto, tal antígeno é maior que 30 aminoácidos de comprimento, e contém pelo menos um domínio imunogênico de *Brachyury*. Em um aspecto, tal antígeno é de pelo menos 25-50 aminoácidos de comprimento, e contém pelo menos um domínio imunogênico de *Brachyury*. Em um aspecto, tal antígeno é de pelo menos 30-50 aminoácidos de

comprimento, e contém pelo menos um domínio imunogênico de *Brachyury*. Em um aspecto, tal antígeno é de pelo menos 35-50 aminoácidos de comprimento, e contém pelo menos um domínio imunogênico de *Brachyury*. Em um aspecto, tal antígeno é de pelo menos 40-50 aminoácidos de comprimento, e contém pelo menos um domínio imunogênico de *Brachyury*. Em um aspecto, tal antígeno é de pelo menos 45-50 aminoácidos de comprimento, e contém pelo menos um domínio imunogênico de *Brachyury*. Em uma modalidade, o antígeno de *Brachyury* útil na presente invenção é de 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, que podem incluir qualquer fragmento de, pelo menos qualquer um desses comprimentos de ID SEQ NO: 2, ID SEQ NO: 4, ID SEQ NO: 6 ou ID SEQ NO: 18.

[00075] Em um aspecto, um antígeno de *Brachyury* compreende um ou mais epítomos de CTL, o qual poderá incluir; duas ou mais cópias de qualquer um, dois, três ou mais dos epítomos de CTL descritos neste relatório. Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende um ou mais epítomos de células T CD4<sup>+</sup>. Em um aspecto, a célula T, o antígeno de *Brachyury* compreende um ou mais epítomos de CTL e um ou mais epítomos de células T CD4<sup>+</sup>. Em um aspecto, o epítomo de célula T é um epítomo agonista.

[00076] Em um aspecto, um antígeno de *Brachyury* compreende uma sequência de aminoácidos de WLLPGTSTL (ID SEQ NO: 12, também representada por posições 245 a 254 de ID SEQ NO: 2 ou ID



SEQ NO: 6). Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende uma sequência de aminoácidos de WLLPGTSTV (ID SEQ NO: 13, também representada por posições 245 a 254 de ID SEQ NO: 18). Em um aspecto, o aminoácido em posição 4, de cada ID SEQ NO: 12 ou ID SEQ NO: 13 (uma prolina ou P nessas sequências) é substituído com uma serina (S), uma treonina (T), uma isoleucina (I), ou uma valina (V).

[00077] Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende uma sequência de aminoácidos de SQYPSLWSV (ID SEQ NO:14). Em um aspecto, o aminoácido em posição 2 de ID SEQ NO: 14 (uma glutamina ou Q nessa sequência) é substituído com uma leucina (L). Em um aspecto, o aminoácido em posição 4 de ID SEQ NO: 14 (uma prolina ou P nessa sequência) é substituído com uma serina (S), treonina (T), leucina (L), ou valina (V). Em um aspecto, o aminoácido em posição 7 de ID SEQ NO: 14 (um triptofano ou W nessa sequência) é substituído com uma valina (V), leucina (L), isoleucina (I), serina (S), ou treonina (T). Em um aspecto, o aminoácido em posição 9 de ID SEQ NO: 14 (uma valina ou V nessa sequência) é substituído com uma leucina (L). Um antígeno que compreende uma sequência apresentando qualquer combinação de uma ou mais dessas substituições em ID SEQ NO: 14 é considerado pela invenção.

[00078] Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende uma sequência de aminoácidos de RLIASWTPV (ID SEQ NO: 15). Em um aspecto, o aminoácido em posição 1 de ID SEQ NO: 15 (uma arginina ou R nessa sequência) é substituído com uma tirosina (Y) ou um triptofano (W). Em um aspecto, o aminoácido em posição 6 de ID SEQ NO: 15 (um triptofano ou W nessa sequência) é substituído com uma valina (V), uma lisina (L), uma isoleucina (I), uma serina (S) ou uma treonina (T). Um antígeno compreendendo uma sequência que apresenta qualquer combinação de uma ou ambas dessas

substituições em ID SEQ NO: 15 é considerado pela invenção.

[00079] Em um aspecto, o antígeno de *Brachyury* compreende uma sequência de aminoácidos de AMYSFLLDFV (ID SEQ NO: 16). Em um aspecto, o aminoácido em posição 2 de ID SEQ NO: 16 (uma metionina ou M nessa sequência) é substituído com uma leucina (L).

[00080] Em uma modalidade da invenção, um antígeno de *Brachyury* compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em uma proteína de fusão que apresenta a sequência de aminoácidos de ID SEQ NO: 8. A proteína de fusão de ID SEQ NO: 8 é um único polipeptídeo com os seguintes elementos de sequência fundidos em estrutura a partir de término N a término C: (1) um peptídeo de término N confere resistência à degradação proteassômica e estabiliza expressão em levedura (posições 1-6 de ID SEQ NO: 8); (2) um antígeno de *Brachyury* humano consistindo em posições 2-435 de ID SEQ NO: 6 (posições 7-440 de ID SEQ NO: 8); e (3) uma cauda (*tag*) de hexa-histidina (posições 441-446 de ID SEQ NO: 8). A sequência de aminoácidos de ID SEQ NO: 8 é codificada pela sequência de polinucleotídeo de ID SEQ NO: 7.

[00081] Em outra modalidade da invenção, um antígeno de *Brachyury* compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em uma proteína de fusão que apresenta a sequência de aminoácidos de ID SEQ NO: 10. A proteína de fusão de ID SEQ NO: 10 é um único polipeptídeo com os seguintes elementos de sequência fundidos em estrutura a partir de término N a término C: (1) um peptídeo de término N confere resistência à degradação proteassômica e estabiliza expressão em levedura (posições 1-6 de ID SEQ NO: 10); (2) um antígeno de *Brachyury* murino consistindo em posições 2-436 de ID SEQ NO: 4 (posições 7-441 de ID SEQ NO: 10); e (3) uma cauda (*tag*) de hexa-histidina (posições 442-447 de ID SEQ NO: 10). A sequência de aminoácidos de ID SEQ NO: 10 é codificada pela sequência de

polinucleotídeo de ID SEQ NO: 9.

[00082] Em outra modalidade da invenção, um antígeno de *Brachyury* compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em uma proteína de fusão apresentando a sequência de aminoácidos de ID SEQ NO: 20. A proteína de fusão de ID SEQ NO: 20 é um único polipeptídeo com os seguintes elementos de sequência fundidos em estrutura a partir de término N a C: (1) um peptídeo de término N confere resistência à degradação proteassômica e estabiliza expressão em levedura (posições 1-6 de ID SEQ NO: 20); a sequência de peptídeo também representada neste relatório por ID SEQ NO: 11); (2) 2-435 aminoácidos de ID SEQ NO: 18 (posições 7-440 de ID SEQ NO: 20), ID SEQ NO: 18 representando uma proteína agonista de *Brachyury* humano de comprimento total; e (3) uma cauda (*tag*) de hexa-histidina (posições 441-446 de ID SEQ NO: 20). O epítipo agonista (ID SEQ NO: 13) é localizado em posições 251 a 259 de ID SEQ NO: 20 (posições 246 a 254 de ID SEQ NO: 18). A sequência de aminoácidos de ID SEQ NO: 20 é codificada pela sequência de polinucleotídeo de ID SEQ NO: 19.

[00083] Um antígeno de *Brachyury* útil na presente invenção também inclui proteínas que apresentam uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à sequência de aminoácidos de qualquer uma das proteínas ou antígenos de *Brachyury* descritos neste relatório, sobre o comprimento total da proteína, ou com relação a um fragmento ou domínio deste, definido (por exemplo, um domínio imunológico ou domínio funcional (domínio com pelo menos, uma atividade biológica)) que forma parte da proteína. Por exemplo, um domínio da proteína *Brachyury* descrita neste relatório inclui o domínio caixa-T. Um domínio imunológico foi descrito em detalhes acima.

[00084] Em alguns aspectos da invenção, inserções de aminoácidos, deleções, e/ou substituições podem ser feitas por um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais aminoácidos de uma proteína de *Brachyury* do tipo selvagem ou de referência, contanto que a proteína de *Brachyury* resultante, quando usada como um antígeno em uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* da invenção, induz uma resposta imune contra uma proteína nativa *Brachyury* como a proteína *Brachyury* do tipo selvagem ou de referência, a qual pode incluir uma resposta imune acentuada, uma resposta imune diminuída, ou uma resposta imune substancialmente similar. Por exemplo, a invenção inclui a utilização de antígenos agonistas de *Brachyury*, que podem incluir um ou mais epítomos de células T que foram mutados para aumentar a resposta de células T contra o agonista de *Brachyury*, tal como, aperfeiçoando a avidéz ou afinidade do epítomo para uma molécula de MHC ou para o receptor de células T que reconhece o epítomo no contexto da apresentação de MHC. Agonistas de *Brachyury* podem, portanto, melhorar a potência ou a eficiência de uma resposta de células T contra *Brachyury* nativa expressa por uma célula de tumor. O antígeno de *Brachyury* apresentando a sequência de aminoácidos de ID SEQ NO: 18 é um exemplo não-limitativo de um agonista de *Brachyury* (ou um antígeno de *Brachyury* compreendendo um epítomo de agonista).

[00085] Além disso, sequências de expressão de término N e as caudas (*tags*) de término C, tais como aquelas descritas acima, com relação às proteínas de fusão de ID SEQ NO: 8, ID SEQ NO: 10, ou ID SEQ NO: 20 são opcionais, mas pode ser selecionada a partir de várias sequências diferentes descritas em qualquer outro lugar neste relatório para melhorar ou auxiliar com expressão, estabilidade, e/ou permitir a identificação e/ou purificação da proteína. Também, muitos promotores diferentes adequados para utilização em leveduras são

conhecidos no estado da técnica. Além disso, sequências curtas ligantes intervenientes (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou peptídeos de aminoácidos) podem ser introduzidas entre as porções de uma proteína de fusão que compreende um antígeno de *Brachyury* por uma variedade de razões, incluindo, a introdução de sítios de enzima de restrição para facilitar a clonagem, como sítios de clivagem para proteases hospedeiras fagossomais, para acelerar o processamento de proteína ou antígeno, e para a manipulação futura dos constructos.

[00086] Opcionalmente, proteínas, incluindo proteínas de fusão, que são usadas como um componente da composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* da invenção são produzidas utilizando constructos de antígenos que são particularmente úteis para aperfeiçoar ou estabilizar a expressão de antígenos heterólogos em levedura. Em uma modalidade, as proteínas ou peptídeos antigênicos desejados são fundidos em sua extremidade terminal amino a: (a) um peptídeo sintético específico que estabiliza a expressão da proteína de fusão no veículo de levedura ou impede a modificação pós-tradução da proteína de fusão expressa (tais peptídeos são descritos em detalhes, por exemplo, na Publicação de Patente dos Estados Unidos Nº 2004-0156858 A1, publicada em 12 de agosto de 2004, aqui incorporada como referência em sua totalidade), (b) pelo menos uma porção de uma proteína endógena de levedura, incluindo, mas não se limita a, sequência líder de levedura fator-alfa, em que cada um dos parceiros de fusão proporciona uma melhor estabilidade de expressão da proteína na levedura e/ou impede uma modificação pós-tradução das proteínas pelas células de levedura (tais proteínas são, também descritas em detalhes, por exemplo, *in* Publicação de Patente dos Estados Unidos Nº 2004-0156858 A1, *supra*) e/ou (c) pelo menos uma porção de uma proteína de levedura que leva à proteína de fusão ser expressa na superfície da levedura (por exemplo, uma proteína Aga,

descrita em maiores detalhes neste relatório). Além disso, a presente invenção inclui, opcionalmente, a utilização de peptídeos que são fundidos com o término C do constructo que codifica o antígeno, particularmente, para uso na seleção e identificação da proteína. Tais peptídeos incluem, mas não se limitam a, qualquer peptídeo sintético ou natural, tal como uma cauda (*tag*) de peptídeo (por exemplo, 6X His ou hexapeptídeo) ou qualquer outra cauda (*tag*) de epítipo curta. Os peptídeos ligados ao término C de um antígeno, de acordo com a invenção, podem ser usados com ou sem a adição dos peptídeos de término N discutidos acima, e vice-versa.

[00087] Em uma modalidade, um peptídeo sintético útil em uma proteína de fusão deve ser expresso em uma levedura que é ligada ao término N do antígeno, o peptídeo consistindo em pelo menos duas posições de aminoácidos que são heterólogos para o antígeno, em que o peptídeo estabiliza a expressão da proteína de fusão no veículo de levedura ou impede a modificação pós-tradução da proteína de fusão expressa. O peptídeo sintético e porção de término N do antígeno juntamente formam uma proteína de fusão que apresenta as seguintes exigências: (1) o resíduo de aminoácido na posição um, da proteína de fusão é metionina (isto é, o primeiro aminoácido no peptídeo sintético é uma metionina); (2) o resíduo de aminoácido na posição dois da proteína de fusão não é uma glicina ou uma prolina (isto é, o segundo aminoácido no peptídeo sintético não é uma glicina ou uma prolina); (3) nenhuma das posições de aminoácidos em posições 2-6 da proteína de fusão é uma metionina (isto é, os aminoácidos nas posições 2-6, se, parte do peptídeo sintético ou da proteína, se o peptídeo sintético é inferior a 6 aminoácidos, não inclui 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, se, parte do peptídeo sintético ou da

proteína, se o peptídeo sintético é inferior a 5 aminoácidos, não inclui uma lisina ou uma arginina). O peptídeo sintético pode ser tão pequeno quanto dois aminoácidos, mas em um aspecto, é de 2-6 aminoácidos (incluindo 3, 4, 5 aminoácidos), e pode ser superior a 6 aminoácidos, em números inteiros, até cerca de 200 aminoácidos, 300 aminoácidos, 400 aminoácidos, 500 aminoácidos, ou mais.

[00088] Em uma modalidade, 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 qualquer, 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. Em uma modalidade, o resíduo X6 é uma prolina. Uma sequência sintética exemplar que intensifica a estabilidade de expressão de um antígeno em uma célula de levedura e/ou impede modificação pós-tradução da proteína na levedura inclui a sequência M-A-D-E-A-P (representada neste relatório por ID SEQ NO: 11). Além da estabilidade intensificada do produto de expressão, esse parceiro de fusão não parece ter um impacto negativo na resposta imune contra o antígeno de imunização no constructo. Além disso, os peptídeos sintéticos de fusão podem ser projetados para proporcionar um epítopo que pode ser reconhecido por um agente de seleção, tal como um anticorpo.

[00089] Em um aspecto da invenção, o veículo de levedura é manipulado de tal modo que o antígeno seja expresso ou proporcionado por meio de transferência ou translocação de um produto de proteína expressa, parcial ou totalmente, sobre a superfície do veículo de levedura (expressão extracelular). Um método para a realização deste aspecto da invenção é a utilização de um braço

espaçador para o posicionamento de uma ou mais proteínas sobre a superfície do veículo de levedura. Por exemplo, pode-se usar um braço espaçador para criar uma proteína de fusão do(s) antígeno(s) ou outra proteína de interesse com uma proteína que tem como alvo o(s) antígeno(s) ou outra proteína de interesse para a parede celular de levedura. Por exemplo, uma, tal proteína, que pode ser utilizada para direcionar outras proteínas é uma proteína de levedura (por exemplo, proteína de parede celular 2 (cwp2), proteína Aga2, Pir4 ou Flo1) que permite que o(s) antígeno(s) ou outra proteína sejam direcionados para a parede celular de levedura, de tal modo que o antígeno, ou outra proteína seja localizada na superfície da levedura. Proteínas diferentes de proteínas de leveduras podem ser usadas para o braço espaçador, no entanto, para qualquer proteína de braço espaçador, é mais desejável apresentar a resposta imunogênica direcionada contra o antígeno alvo, em vez da proteína de braço espaçador. Como tal, se outras proteínas são usadas para o braço espaçador, em seguida, a proteína de braço espaçador que é usada não deve gerar uma resposta imune grande para a própria proteína de braço espaçador, tal que a resposta imune para o(s) antígeno(s) alvo é sobrecarregada. Aquele versado no estado da técnica deve visar uma pequena resposta imune para a proteína de braço espaçador, em relação à resposta imune para o(s) antígeno(s) alvo. Braços espaçadores podem ser construídos de modo a ter sítios de clivagem (por exemplo, sítios de clivagem de protease) que permitem que o antígeno seja prontamente, removido, ou processado fora 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 são rapidamente conhecidos daquele versado no estado da técnica.

[00090] Outro método para o posicionamento do(s) antígeno(s)



alvo, ou outras proteínas a serem expostos na superfície da levedura é a utilização de sequências de sinais, tais como glicosilfosfatidil inositol (GPI) para ancorar o alvo para a parede celular de levedura. Alternativamente, o posicionamento pode ser realizado adicionando sequências de sinais que têm como alvo o(s) antígeno(s) ou outras proteínas de interesse na via secretora através de translocação para o retículo endoplasmático (RE), de tal modo que o antígeno liga-se a uma proteína que está ligada à parede celular (por exemplo, cwp).

[00091] Em um aspecto, a proteína de braço espaçador é uma proteína de levedura. A proteína de levedura pode consistir em, entre, aproximadamente dois e aproximadamente 800 aminoácidos de uma proteína de levedura. Em uma modalidade, a proteína de levedura é de aproximadamente 10 a 700 aminoácidos. Em outra modalidade, a proteína de levedura é de aproximadamente 40 a 600 aminoácidos. Outras modalidades da invenção incluem a proteína de levedura sendo, 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. Em uma modalidade, a proteína de levedura é de pelo menos 450 aminoácidos de comprimento. Outra consideração para otimização da expressão de superfície do antígeno, se isso é desejado, é se a combinação do antígeno e braço espaçador deve ser expressa como um monômero ou como dímero ou como um trímero, ou mesmo mais unidades ligadas entre si. Esse uso de monômeros, dímeros, trímeros, etc.; permite espaçamento ou desdobramento apropriado do antígeno de tal forma que alguma parte, se não todos, do antígeno é exibida sobre a superfície do veículo de levedura de uma maneira que o torna mais imunogênico.

[00092] Uso de proteínas de levedura pode estabilizar a expressão

de proteínas de fusão no veículo de levedura, impede modificação pós-tradução da proteína de fusão expressa, e/ou direciona a proteína de fusão a um compartimento particular na levedura (por exemplo, para ser expressa na superfície da célula de levedura). Para transferência para a via secretora de levedura, proteínas de levedura exemplares para utilizar incluem, mas não se limitam a: Aga (incluindo, mas não se limita a, Agal e/ou Aga2); SUC2 (invertase de levedura); sequência líder de fator alfa de sinal; CPY; Cwp2p para sua localização e retenção na parede da célula, genes BUD para localização broto de célula de levedura durante a fase inicial de formação de célula-filha; Flo1p; Pir2p e Pir4p.

[00093] Outras sequências podem ser usadas para direcionar, reter e/ou estabilizar a proteína para outras partes do veículo de levedura, por exemplo, no citosol ou na mitocôndria ou no retículo endoplasmático, ou no núcleo. Exemplos de proteína de levedura adequados que podem ser utilizados para qualquer uma das modalidades acima incluem, mas não se limitam a, TK, AF SEC7; fosfoenolpiruvato carboxiquinase PCK1, fosfogliceroquinase PGK e produtos gênicos triose fosfato isomerase (TPI) para sua expressão reprimível em glicose e localização citosólica; as proteínas de choque térmico, SSA1 SSA3, SSA4, SSC1, cuja expressão é induzida e cujas proteínas são mais termoestáveis após exposição de células a um tratamento térmico, a proteína mitocondrial CYC1 de importação para mitocôndria; ACT1.

[00094] Métodos de produção de veículos de levedura e 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 são consideradas pela invenção.

[00095] De acordo com a presente invenção, o termo "complexo de

antígeno veículo de levedura" ou "complexo de antígeno de levedura" é usado genericamente para descrever qualquer associação de um antígeno, e pode ser usado alternadamente com "composição de imunoterapia à base de levedura" quando tal composição é utilizada para induzir uma resposta imune, conforme descrito acima. Tal associação inclui expressão do antígeno pela levedura (uma levedura recombinante), introdução de um antígeno em uma levedura, ligação física do antígeno com a levedura, e mistura da levedura e antígeno juntamente, tal como em um tampão ou outra solução, ou formulação. Esses tipos de complexos são descritos em detalhes abaixo.

[00096] Em uma modalidade, a célula de levedura usada para preparar o veículo de levedura é transfectada com uma molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica uma proteína (por exemplo, o antígeno) tal que a proteína é expressa pela célula de levedura. Tal levedura é também referida neste relatório como uma levedura recombinante ou um veículo de levedura recombinante. A célula de levedura pode em seguida ser formulada com um excipiente farmacologicamente aceitável e administrada diretamente a um paciente, armazenada para posterior administração, ou carregada para uma célula dendrítica como uma célula intacta. A célula de levedura pode também ser morta, ou pode ser derivada tal como por formação de esferoplastos de levedura, citoplastos, espectros ou partículas subcelulares, qualquer um dos quais pode ser seguido por armazenamento, administração ou carregamento do derivado para a célula dendrítica. Esferoplastos de levedura também podem ser diretamente transfectados com uma molécula de ácido nucleico recombinante (por exemplo, o esferoplasto é produzido a partir de uma levedura total e, em seguida, transfectados) a fim de produzir um esferoplasto recombinante que expressa o antígeno. As células de levedura ou esferoplastos de levedura que expressam de forma

recombinante o(s) antígeno(s) podem ser usadas para produzir um veículo de levedura que compreende um citoplasto de levedura, um espectro de levedura, ou uma partícula de membrana de levedura ou partícula de parede de célula de levedura, ou fração desta.

[00097] Em geral, o veículo de levedura e antígeno(s) e/ou outros agentes podem ser associados por qualquer técnica descrita neste relatório. Em um aspecto, o veículo de levedura foi carregado intracelularmente com o(s) antígeno(s) e/ou agente(s). Em outro aspecto, o(s) antígeno(s) e/ou agente(s) foi (foram) covalentemente ou não covalentemente ligados ao veículo de levedura. Em ainda outro aspecto, o veículo de levedura e o antígeno(s) e/ou agente(s) foram associados por meio de mistura. Em outro aspecto, e em uma modalidade, o antígeno(s) e/ou agente(s) são expressos de forma recombinante pelo veículo de levedura ou pela célula de levedura ou esferoplasto de levedura a partir dos quais o veículo de levedura foi derivado.

[00098] Um número de antígenos e/ou outras proteínas a ser produzido por um veículo de levedura da presente invenção é qualquer número de antígenos e/ou outras proteínas que podem ser razoavelmente produzidos por um veículo de levedura, e tipicamente, varia de pelo menos um a pelo menos cerca de 6 ou mais, incluindo, de aproximadamente 2, a aproximadamente 6 antígenos e ou outras proteínas.

[00099] Expressão de um antígeno ou outra proteína em um veículo de levedura da presente invenção é realizada usando técnicas conhecidas daqueles versados no estado da técnica. Resumidamente, uma molécula de ácido nucleico que codifica pelo menos um antígeno ou outra proteína desejada é inserida em um vetor de expressão, de tal maneira que a molécula de ácido nucleico é operativamente ligada a uma sequência de controle de transcrição a fim de ser capaz de

efetuar a expressão, quer constitutiva, ou regulada da molécula de ácido nucleico, quando transformada em uma célula de levedura hospedeira. As moléculas de ácido nucleico que codificam um ou mais antígenos e/ou outras proteínas podem ser em um ou mais vetores de expressão operativamente ligados a uma ou mais sequências de controle de expressão. Sequências de controle de expressão particularmente importantes são aquelas que controlam iniciação de transcrição, tais como, sequências de promotor e de ativação a montante. Qualquer promotor de levedura adequado pode ser usado na presente invenção e uma variedade de tais promotores é conhecida daqueles versados no estado da técnica. Promotores para a expressão em *Saccharomyces cerevisiae* incluem, mas não se limitam a, promotores de genes que codificam as seguintes proteínas de levedura: álcool desidrogenase I (ADH1) ou II (ADH2), CUP1, fosfoglicerato-quinase (PGK), triose fosfato isomerase (TPI), fator de alongamento translacional EF-1 alfa (TEF2), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH; também referida como TDH3, para triose fosfato desidrogenase), galactoquinase (GAL1), galactose-1-fosfato uridil-transferase (GAL7), UDP-galactose epimerase (GAL10), citocromo c1 (CYC1), proteína Sec7 (SEC7) e fosfatase ácida (PHO5), incluindo, promotores híbridos, tais como promotores *ADH2/GAPDH* e *CYC1/GAL10*, e incluindo, o promotor *ADH2/GAPDH*, o qual é induzido quando concentrações de glicose na célula são baixas (por exemplo, cerca de 0,1 a cerca de 0,2 por cento), bem como o promotor *CUP1* e o promotor *TEF2*. Da mesma maneira, várias sequências de ativação a montante (UASs), também referidas como potenciadores, são conhecidas. Sequências de ativação a montante para expressão em *Saccharomyces cerevisiae* incluem, mas não se limitam a, a UASs de genes que codificam as seguintes proteínas: PCK1, TPI, TDH3, CYC1, ADH1, ADH2, SUC2, GAL1, GAL7 e GAL10, bem como outras

UASs ativadas pelo produto do gene GAL4, com a ADH2 UAS sendo usada em um aspecto. Uma vez que a ADH2 UAS é ativada pelo produto do gene ADR1, pode ser preferível superexpressar o gene ADR1 quando um gene heterólogo encontra-se operacionalmente ligado com a ADH2 UAS. As sequências de terminação da transcrição para expressão em *Saccharomyces cerevisiae* incluem as sequências de terminação do fator- $\alpha$ , GAPDH e genes CYC1.

[000100] Sequências de controle de transcrição expressam genes em levedura metiltrófica incluem as regiões de controle de transcrição das regiões que codificam álcool oxidase e formato desidrogenase.

[000101] Transfecção de uma molécula de ácido nucleico para uma célula de levedura, de acordo com a presente invenção, pode ser realizada por qualquer método através do qual uma molécula de ácido nucleico pode ser introduzida na célula e inclui, mas não se limita a, difusão, transporte ativo, banhos de ultrassons, eletroporação, microinjeção, lipofecção, adsorção, e fusão de protoplastos. As moléculas de ácido nucleico transfectadas podem ser integradas em um cromossomo de levedura ou mantidas em vetores extracromossomais utilizando técnicas conhecidas daqueles versados no estado da técnica. Exemplos de veículos de levedura que transportam tais moléculas de ácidos nucleicos são descritas em detalhes neste relatório. Como discutido acima, as partículas de citoplasto de levedura, espectros de levedura e membrana de levedura ou preparações da parede celular também podem ser produzidas de forma recombinante por meio de transfecção de microrganismos de levedura intactos ou esferoplastos de levedura, com as moléculas de ácidos nucleicos desejadas, produzindo o antígeno nesta, e em seguida, adicionalmente, manipular os microrganismos ou esferoplastos usando técnicas conhecidas daqueles versados no estado da técnica para produzir extrato de citoplasto, espectro, ou

membrana de levedura subcelular, ou frações dos mesmos contendo antígenos ou outras proteínas desejadas.

[000102] Condições eficazes para a produção de veículos de levedura recombinante e expressão do antígeno e/ou outra proteína pelo veículo de levedura incluem um meio eficaz, em que uma cepa de levedura pode ser cultivada. Um meio eficaz é tipicamente um meio aquoso compreendendo fontes assimiláveis de carboidratos, nitrogênio e fosfato, bem como sais, minerais, metais e outros nutrientes apropriados, tais como, vitaminas e fatores de crescimento. O meio pode compreender nutrientes complexos ou pode ser um meio mínimo definido. As cepas de levedura da presente invenção podem ser cultivadas em uma variedade de recipientes, incluindo, mas não se limitam a, biorreatores, frascos de Erlenmeyer, tubos de ensaio, placas de microtitulação, e placas de Petri. A cultura é realizada sob um teor de temperatura, pH e oxigênio adequado para a cepa de levedura. Tais condições de cultura estão bem dentro da habilidade daquele versado no estado da técnica (ver, por exemplo, Guthrie e outros (eds.), 1991, *Methods in Enzymology*, vol. 194, *Academic Press, San Diego*). Por exemplo, sob um protocolo, culturas líquidas contendo um meio adequado, podem ser inoculadas usando culturas obtidas a partir de chapas de arranque e/ou culturas de arranque de composições de imunoterapia de levedura *Brachyury*, e são cultivadas durante cerca de 20 horas a 30°C, com agitação a 250 rpm. As culturas primárias podem então ser expandidas em culturas maiores como desejado. A expressão de proteína a partir de vetores com o qual a levedura foi transformada (por exemplo, expressão de *Brachyury*) pode ser constitutiva se o promotor utilizado é um promotor constitutivo, ou pode ser induzida por adição das condições de indução apropriadas para o promotor, se o promotor utilizado é um promotor induzível (por exemplo, sulfato de cobre, no caso do promotor *CUP1*). No caso de

um promotor induzível, a indução da expressão de proteína pode ser iniciada após a cultura ter crescido até uma densidade celular adequada, a qual pode ser de, cerca de 0,2 Y.U./ml, ou densidades maiores.

[000103] Um exemplo não limitativo de um meio adequado para a cultura de uma composição de imunoterapia de levedura *Brachyury* da invenção é meio U2. Meio U2 compreende os seguintes componentes: 20 g/L de glicose, 6,7 g/L de base de nitrogênio de levedura, contendo sulfato de amônio, e 0,04 mg/mL de cada uma de histidina, leucina, triptofano, e adenina. Outro exemplo não limitativo de um meio adequado para a cultura de composição de imunoterapia de levedura *Brachyury* da invenção é meio UL2. Meio UL2 compreende os seguintes componentes: 20 g/L de glicose, 6,7 g/L de base de nitrogênio de levedura, contendo sulfato de amônio, e 0,04 mg/mL de cada uma de histidina, triptofano e adenina.

[000104] Em uma modalidade da invenção, quando um promotor induzível é utilizado (por exemplo, o promotor *CUP1*) para expressar uma proteína de *Brachyury* em um veículo de levedura, de acordo com a invenção, indução de expressão de proteína é iniciada em uma densidade celular superior, quando comparada com a densidade celular que seria adequada para a maioria das proteínas expressas por levedura utilizando tal promotor. Mais especificamente, os presentes inventores descobriram que expressão ótima de antígeno de *Brachyury* conduzida pelo promotor *CUP1* ocorre quando a levedura que expressa o antígeno de *Brachyury* são deixadas a crescer até uma densidade celular de, pelo menos entre 0,5 Y.U./ml e aproximadamente 2,0 Y.U./ml e em um aspecto, entre 0,5 Y.U./ml e cerca de 1,5 Y.U./ml, e em um aspecto, a pelo menos, entre 1,0 Y.U./ml e cerca de 2,0 Y.U./ml, e em um outro aspecto, a, pelo menos, cerca de 1,0 Y.U./ml, antes de indução da expressão do antígeno de



*Brachyury* na levedura. Os presentes inventores descobriram que, após a indução de expressão de *Brachyury*, a levedura dobraria apenas de cerca de 1X a 1,5 X. Além disso, após indução da expressão de *Brachyury*, os inventores descobriram que o crescimento da levedura para densidades celulares mais elevadas do que cerca de 2,0 Y.U./ml, ou por mais do que cerca de 6-8 horas, resulta em diminuição da viabilidade das culturas, sem melhorar substancialmente acumulação de antígeno na levedura. Portanto, em uma modalidade da invenção, uma composição de imunoterapia de levedura- *Brachyury* apresentando expressão de antígeno, sob o controle de um promotor induzível, tal como o promotor *CUP1*, é cultivada até a fase *log* médio antes de indução da expressão de antígeno. Em um aspecto, as células são cultivadas até entre cerca de 1 e 2 Y.U./ml antes de indução da expressão de antígeno. Em um aspecto, é induzida a expressão do antígeno (por exemplo, pela adição de sulfato de cobre), e continua por até 6; 6,5; 7; 7,5 ou 8 horas. Em um aspecto, a indução ocorre a uma temperatura de cerca de 30°C e taxa de agitação de 250 rpm.

[000105] Em algumas modalidades da invenção, a levedura é crescida sob condições de pH neutro. Conforme usado neste relatório, o uso geral do termo "pH neutro" refere-se a uma faixa de pH entre, aproximadamente pH 5,5 e aproximadamente pH 8, e em um aspecto, entre, aproximadamente pH 6 e aproximadamente pH 8. Aquele versado no estado da técnica avaliará que flutuações menores (por exemplo, décimas ou centésimas) podem ocorrer durante a medição com um medidor de pH. Como tal, a utilização de um pH neutro para crescer células de levedura significa que as células de levedura são crescidas em pH neutro para a maioria do tempo em que eles estão em cultura. Em uma modalidade, a levedura é cultivada em um meio mantido sob um nível de pH de pelo menos 5,5 (isto é, o pH do meio

de cultura não é permitido reduzir abaixo de pH 5,5). Em outro aspecto, a levedura é cultivada em um nível de pH mantido em cerca de 6; 6,5; 7; 7,5 ou 8. O uso de um pH neutro em cultura de levedura promove vários efeitos biológicos, que são características desejáveis para a utilização da levedura, como veículos para imunomodulação. Por exemplo, a cultura da levedura em pH neutro permite um bom crescimento da levedura sem efeito negativo sobre o tempo de geração de células (por exemplo, reduzindo o tempo de duplicação). A levedura pode continuar a crescer a densidades elevadas, sem perder a sua flexibilidade da parede celular. O uso de um pH neutro permite a produção de levedura com paredes celulares flexíveis e/ou levedura, que são mais sensíveis às enzimas de digestão da parede celular (por exemplo, glucanase) em todas as densidades de colheita. Esta característica é desejável, porque a levedura com paredes de células flexíveis pode induzir respostas imunes diferentes ou melhoradas, quando comparadas com levedura cultivada sob condições mais ácidas, por exemplo, através de promoção da secreção de citocinas por células que apresentam antígeno que fagocitaram a levedura (por exemplo, citocinas tipo TH1, incluindo, mas não limitado a, IFN- $\gamma$ , interleucina-12 (IL-12) e IL-2, bem como citocinas pró-inflamatórias, tal como IL-6). Além disso, uma maior acessibilidade aos antígenos localizados na parede da célula é proporcionada por tais métodos de cultura. Em outro aspecto, o uso de pH neutro para alguns antígenos permite a liberação do antígeno ligado a dissulfureto por meio de tratamento com ditioneitol (DTT), que não é possível quando tal levedura expressando antígeno é cultivada em meios de pH mais baixo (por exemplo, pH 5).

[000106] Em uma modalidade, controle da quantidade de glicosilação de levedura é usado para controlar a expressão de antígenos pela levedura, particularmente na superfície. A quantidade

de glicosilação de levedura pode afetar a imunogenicidade e antigenicidade do antígeno, particularmente, aquela expressa na superfície, uma vez que porções de açúcar tendem a ser volumosos. Como tal, a existência de porções de açúcar na superfície de levedura e seu impacto no espaço tridimensional em torno do(s) antígeno(s) alvo devem ser considerados na modulação da levedura, de acordo com a invenção. Qualquer método pode ser usado para reduzir a quantidade de glicosilação da levedura (ou aumentá-la, se desejada). Por exemplo, pode-se usar uma cepa mutante de levedura que tenha sido selecionada por apresentar baixa glicosilação (por exemplo, mutantes *mn1*, *och1h* e *mn9*), ou pode-se eliminar por meio de mutação das sequências aceitadoras de glicosilação no antígeno alvo. Alternativamente, pode-se usar levedura com padrões de glicosilação abreviados, por exemplo, *Pichia*. Pode-se também tratar a levedura usando métodos que reduzem ou alteram a glicosilação.

[000107] Em uma modalidade da presente invenção, como uma alternativa para 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 peptídeo, ou com carboidratos ou outras moléculas que funcionam como um antígeno e/ou são úteis como agentes imunomoduladores ou modificadores de resposta biológica, de acordo com a invenção. Subsequentemente, o veículo de levedura, que agora contém o antígeno e/ou outras proteínas intracelulares, pode ser administrado a um indivíduo ou carregado em um transportador, tal como uma célula dendrítica. Os peptídeos e as proteínas podem ser inseridos diretamente nos veículos de levedura da presente invenção por meio de técnicas conhecidas daqueles versados no estado da técnica, tais como, por difusão, transporte ativo, fusão de lipossomas, eletroporação, fagocitose, ciclos de congelamento-descongelamento e banhos de

ultrassons. Veículos de levedura que podem ser diretamente carregados com peptídeos, proteínas, carboidratos, ou outras moléculas incluem leveduras intactas, bem como esferoplastos, citoplastos ou espectros, que podem ser carregados com antígenos e outros agentes após produção. Alternativamente, a levedura intacta pode ser carregada com o antígeno e/ou o agente e, em seguida, esferoplastos, espectros, citoplastos, ou partículas subcelulares podem ser preparados a partir destes. Qualquer número de antígenos e/ou outros agentes podem ser carregados em um veículo de levedura nesta modalidade, a partir de, pelo menos 1, 2, 3, 4, ou qualquer número inteiro até centenas ou milhares de antígenos e/ou outros agentes, tal como, seria proporcionado pelo carregamento de um microrganismo ou porções deste, por exemplo.

[000108] Em outra modalidade da presente invenção, um antígeno e/ou outro agente é fisicamente ligado ao veículo de levedura. Ligação física do antígeno e/ou de outro agente para o veículo de levedura pode ser realizada por qualquer método adequado no estado da técnica, incluindo, os métodos de associação covalente e não-covalente, os quais incluem, mas não se limitam aos mesmos, reticulação química do antígeno, e/ou outro agente para a superfície externa do veículo de levedura, ou biologicamente que liga o antígeno e/ou outro agente na superfície externa do veículo de levedura, tal como, usando um anticorpo ou outro parceiro de ligação. Reticulação química pode ser obtida, por exemplo, por métodos que incluem ligação de glutaraldeído, marcação de fotoafinidade, tratamento com carbodiimidas, tratamento com produtos químicos capazes de ligação de dissulfureto, e o tratamento com outros produtos químicos de reticulação padrão no estado da técnica. Alternativamente, um produto químico pode ser contatado com o veículo de levedura que altera a carga da bicamada lipídica da membrana de levedura, ou a

composição da parede da célula, de modo que a superfície externa da levedura é mais suscetível de se fundir ou ligar-se a antígenos e/ou a outro agente que apresenta características de carga específicas. Agentes de direcionamento, tais como anticorpos, peptídeos de ligação, receptores solúveis, e outros ligantes, também podem ser incorporados em um antígeno como uma proteína de fusão ou de outro modo associado a um antígeno para ligação do antígeno ao veículo de levedura.

[000109] Quando o antígeno ou outra proteína é expresso sobre, ou fisicamente ligado à superfície da levedura, braços espaçadores podem, em um aspecto, ser cuidadosamente selecionados para otimizar expressão de antígeno ou outras proteínas ou teor na superfície. O tamanho do(s) braço(s) espaçador(es) pode afetar a quantidade do antígeno ou de outra proteína está exposta à ligação na superfície da levedura. Desse modo, dependendo de qual antígeno(s) ou outra(s) proteína(s) são utilizados, aquele versado no estado da técnica selecionará um braço espaçador que efetua o espaçamento adequado para o antígeno ou outra proteína na superfície da levedura. Em uma modalidade, o braço espaçador é uma proteína de levedura de, pelo menos 450 aminoácidos. Braços espaçadores são discutidos em detalhes acima.

[000110] Em ainda outra modalidade, o veículo de levedura e o antígeno ou outra proteína são associados uns aos outros, por um mecanismo de ligação mais passivo, não-específico ou não-covalente, tal como, por mistura suavemente do veículo de levedura e do antígeno, ou outras proteínas juntamente em um tampão ou outra formulação adequada (por exemplo, mistura).

[000111] Em uma modalidade, levedura intacta (com ou sem expressão de antígenos heterólogos ou outras proteínas) pode ser moída ou processada de modo a produzir preparações da parede

celular de levedura, partículas de membrana de levedura ou fragmentos de levedura (isto é, não intacta) e os fragmentos de levedura podem, em algumas modalidades, ser proporcionados com, ou administrados com outras composições que incluem antígenos (por exemplo, vacinas de DNA, vacinas de subunidades da proteína, patógenos mortos ou inativados, vacinas de vetor viral) para aumentar respostas imunes. Por exemplo, tratamento enzimático, tratamento químico ou força física (por exemplo, desagregação mecânica ou ultrassons) podem ser usados para quebrar a levedura em partes que são usadas como um adjuvante.

[000112] Em uma modalidade da invenção, veículos de levedura úteis na invenção incluem veículos de levedura que são mortos ou inativados. Morte ou inativação de levedura pode ser realizada por qualquer de uma variedade de métodos adequados conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, inativação por calor da levedura é uma forma padrão de inativação de levedura, e aquele versado no estado da técnica pode monitorar as alterações estruturais do antígeno alvo, se desejada, por meio de métodos padrões conhecidos no estado da técnica. Alternativamente, outros métodos de inativação da levedura podem ser utilizados, tais como, métodos químicos, elétricos, radioativos ou UV. Ver, por exemplo, a metodologia descrita em livros-texto padrão de cultura de leveduras, tais como *Methods of Enzymology*, vol. 194, Cold Spring Harbor Publishing (1990). Qualquer uma das estratégias de inativação utilizada deve assumir a estrutura secundária, terciária ou quaternária do antígeno alvo para consideração e preservar tal estrutura quanto otimizar sua imunogenicidade.

[000113] Veículos de levedura podem ser formulados em composições de imunoterapia com base em levedura ou produtos da presente invenção utilizando várias técnicas conhecidas daqueles

versados no estado da técnica. Por exemplo, veículos de levedura podem ser secos por liofilização. As formulações que compreendem veículos de levedura também podem ser preparadas por meio de embalagem da levedura em um bolo ou um comprimido, tal como é feito para a levedura utilizada em operações de cozimento ou preparação de bebida fermentada. Além disso, os veículos de levedura podem ser misturados com um excipiente farmacologicamente aceitável, tal como um tampão isotônico que é tolerado por um hospedeiro ou célula hospedeira. Exemplos de tais excipientes incluem água, solução salina, solução de Ringer, solução de dextrose, solução de Hank, e outras soluções aquosas salinas fisiologicamente equilibradas. Veículos não aquosos, tais como óleos fixos, óleo de sésamo, oleato de etila, ou triglicerídeos podem também ser utilizados. Outras formulações úteis incluem suspensões contendo agentes que aumentam a viscosidade, tais como carboximetilcelulose de sódio, sorbitol, glicerol, ou dextrano. Os excipientes podem também conter quantidades menores de aditivos, tais como substâncias que aumentam a isotonicidade e a estabilidade química. Exemplos de tampões incluem tampão fosfato, tampão de bicarbonato e tampão Tris, enquanto exemplos de conservantes incluem timerosal, m-cresol ou o-cresol, formalina e álcool benzílico. Formulações-padrão podem ser tanto injetáveis líquidas ou sólidas que podem ser tomadas em um líquido apropriado como uma suspensão ou solução para injeção. Desse modo, em uma formulação não-líquida, o excipiente pode compreender, por exemplo, dextrose, albumina de soro humano, e/ou conservantes para o qual a água estéril ou solução salina podem ser adicionadas antes de administração.

[000114] Em uma modalidade da presente invenção, uma composição pode incluir agentes adicionais, que podem também ser referidos como compostos modificadores de resposta biológica, ou a

capacidade de produzir tais agentes/modificadores. Por exemplo, um veículo de levedura pode ser transfectado com ou carregado com pelo menos um antígeno e pelo menos um agente/composto modificador de resposta biológica, ou uma composição da invenção pode ser administrada juntamente com pelo menos um agente/modificador de resposta biológica. Modificadores de resposta biológica incluem adjuvantes e outros compostos que podem modular as respostas imunes, que podem ser referidos como compostos imunomoduladores, bem como compostos que modificam a atividade biológica de outro composto ou agente, tal como, um imunoterapêutico à base de levedura, tal atividade biológica não sendo limitada a efeitos do sistema imune. Certos compostos imunomoduladores podem estimular uma resposta imune protetora, visto que outros podem suprimir uma resposta imune prejudicial, e se um imunomodulador é útil em combinação com um dado imunoterapêutico à base de levedura pode depender, pelo menos em parte, do estado ou condição da doença que deve ser tratada ou impedida, e/ou no indivíduo que deve ser tratado. Certos modificadores de resposta biológica, preferencialmente melhoram uma resposta imune mediada por células, enquanto que outros, preferencialmente, melhoram uma resposta imune humoral (isto é, pode estimular uma resposta imune em que há um aumento do nível de células mediadas comparadas com a imunidade humoral, ou vice-versa.). Certos modificadores de resposta biológica têm uma ou mais propriedades em comum com as propriedades biológicas de imunoterapêuticos baseados em levedura ou aumentam ou complementam as propriedades biológicas de imunoterapêuticos baseados em levedura. Há várias técnicas conhecidas daqueles versados no estado da técnica para medir estimulação ou supressão de respostas imunes, bem como para diferenciar as respostas imunes mediadas por células a partir das respostas imunes humorais, e



diferenciar um tipo de resposta mediada por células a partir de outras (por exemplo, uma resposta de TH17 versus uma resposta de TH1).

[000115] Agentes/modificadores de resposta biológica úteis na invenção podem incluir, mas sem se limitar aos mesmos, citocinas, quimiocinas, hormônios, derivados lipídicos, peptídeos, proteínas, polissacarídeos, fármacos de moléculas pequenas, anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno destes (incluindo, mas não se limitam aos mesmos, anticorpos anticitocina, anticorpos de receptores de anticitocinas, anticorpos antiquimioquinas), vitaminas, polinucleotídeos, porções de ligação de ácidos nucleicos, aptâmeros, e moduladores de crescimento. Alguns agentes adequados incluem, mas não se limitam aos mesmos, 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; interferon tipo I (incluindo, IFN- $\alpha$ ) ou agonistas ou antagonistas de interferon tipo I ou um receptor deste; interferon tipo II (incluindo, IFN- $\gamma$ ) ou agonistas ou antagonistas de interferon tipo II ou um receptor deste; anti-CD40, CD40L, gene de ativação de linfócitos 3 (LAG3) de proteína e/ou IMP321 (fator imunoestimulatório 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); alentuzumab (por exemplo, *CamPath*<sup>®</sup>), denileucina diftotox (por exemplo, *ONTAK*<sup>®</sup>), anti-CD4, anti-CD25; anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-PD-L2; agentes que bloqueiam FOXP3 (por exemplo, para revogar a atividade/matar células T reguladoras CD4+/CD25+); ligante Flt3, imiquimode (*Aldara*<sup>TM</sup>), fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF); fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF); sargramostima (*Leukine*<sup>®</sup>); hormônios, incluindo, sem limitação a, prolactina e hormônio de crescimento; agonistas de receptor tal como Toll (TLR), incluindo, mas não se limitam a, agonistas de TLR-2, agonistas de TLR-4, agonistas de TLR-7, e agonistas de TLR-9; antagonistas de TLR, incluindo, mas não se limitam 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 se limitam a, inibidores de COX-2 (por exemplo, Celecoxib, NSAIDs), glicocorticoides, estatinas, e talidomida e seus análogos, incluindo, *IMiD*<sup>TM</sup>s (que são análogos estruturais e funcionais de talidomida (por exemplo, *REVLIMID*<sup>®</sup> (lenalidomida), *ACTIMID*<sup>®</sup> (pomalidomida))); agentes pró-inflamatórios, tais como, componentes fúngicos ou bacterianos, ou qualquer citocina ou quimiocina pró-inflamatórias; vacinas imunoterapêuticas, incluindo, mas não se limitam a, vacinas com base em vírus, vacinas à base de bactérias, ou vacinas à base de anticorpos; e quaisquer outros agentes imunomoduladores, imunopotenciadores, e anti-inflamatórios, agentes pró-inflamatórios, e quaisquer agentes que modulam a número de, modular o estado de ativação e/ou modular a sobrevivência de células que apresentam antígeno ou de células TH17, TH1, e/ou Treg. Qualquer combinação de tais agentes é considerado pela invenção, e qualquer um de tais agentes combinado com, ou administrado em um protocolo com (por exemplo, simultaneamente, sequencialmente, ou em outros formatos com) um

imunoterapêutico à base de levedura é uma composição abrangida pela invenção. Tais agentes são bem conhecidos no estado da técnica. Esses agentes podem ser utilizados isoladamente ou em combinação com outros agentes descritos neste relatório.

[000116] Agentes podem incluir agonistas e antagonistas de uma dada proteína ou peptídeo ou domínio deste. Conforme usado neste relatório, um "agonista" é qualquer composto ou agente, incluindo, mas sem se limitar a, pequenas moléculas, proteínas, peptídeos, anticorpos, agentes de ligação de ácido nucleico, etc., que se liga a um receptor ou ligante e produz ou provoca uma resposta, o qual pode incluir agentes que imitam ou aumentam a ação de uma substância que ocorre naturalmente que se liga ao receptor ou ligante. Um "antagonista" é qualquer composto ou agente, incluindo, sem limitação a, moléculas pequenas, proteínas, peptídeos, anticorpos, agentes de ligação de ácidos nucleicos, etc., que bloqueia ou inibem, ou reduz a ação de um agonista.

[000117] Composições da invenção podem adicionalmente incluir ou podem ser administradas com (simultânea, sequencial, ou intermitentemente com) quaisquer outros agentes ou composições, ou protocolos que são úteis para a prevenção ou tratamento de câncer ou quaisquer compostos que tratam ou atenuam qualquer sintoma de câncer, e particularmente, cânceres associados à expressão ou superexpressão de *Brachyury*. Além disso, as composições da invenção podem ser utilizadas juntamente com outras composições imunoterapêuticas, incluindo, imunoterapia profilática e/ou terapêutica. Na verdade, as composições da invenção podem ser utilizadas para inibir ou reduzir resistência à quimioterapia ou resistência à radiação, que pode ocorrer no câncer metastático por meio de inibição da expressão de *Brachyury* no câncer (e, desse modo, inibindo influências antiproliferativas) ou as composições da invenção podem

aumentar o desempenho de terapia de quimioterapia ou de radiação em um indivíduo. Agentes adicionais, composições ou protocolos (por exemplo, protocolos terapêuticos) que são úteis para o tratamento de câncer incluem, mas não se limitam aos mesmos, quimioterapia, ressecção cirúrgica de um tumor, terapia de radiação, transplantação de células-tronco alogênicas ou autólogas, e/ou terapias de câncer direcionadas (por exemplo, fármacos de moléculas pequenas, produtos biológicos, ou terapias de anticorpos monoclonais que especificamente alvejam moléculas envolvidas no crescimento e progressão tumoral, incluindo, mas não se limitam aos mesmos, moduladores de receptores de estrogênio seletivos (SERMs), inibidores de aromatase, inibidores de tirosina-quinase, inibidores de serina/treonina quinase, inibidores de desacetilase histonas (HDAC), ativadores de receptores retinoides, estimuladores de apoptose, inibidores de angiogênese, inibidores de poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) ou imunoestimuladores). Qualquer desses agentes terapêuticos adicionais e/ou protocolos terapêuticos podem ser administrados antes, simultaneamente com, alternando com, ou após as composições de imunoterapia da invenção, ou em diferentes pontos de tempo. Por exemplo, quando administrados a um indivíduo juntamente com quimioterapia ou uma terapia direcionada a câncer, pode ser desejável administrar as composições de imunoterapia de levedura *Brachyury* durante as "férias" entre doses de quimioterapia ou terapia direcionada a câncer, a fim de maximizar a eficácia das composições de imunoterapia. A ressecção cirúrgica de um tumor pode frequentemente preceder à administração de uma composição de imunoterapia de levedura *Brachyury*, mas cirurgia adicional ou primária pode ocorrer durante ou após a administração de uma composição imunoterapia de levedura *Brachyury*.

[000118] A invenção também inclui um *kit* que compreende qualquer

uma das composições descritas neste relatório, ou qualquer um dos componentes individuais das composições descritas neste relatório. *Kits* poderão incluir reagentes adicionais e instruções escritas ou direções para utilização de qualquer uma das composições da invenção para impedir ou tratar câncer associado à expressão ou superexpressão de *Brachyury*.

*Métodos para Administração ou Uso de Composições da Invenção*

[000119] Composições imunoterapêuticas de levedura *Brachyury* da invenção são elaboradas para uso para impedir ou tratar cânceres que são associados a, ou caracterizados por expressão ou superexpressão de *Brachyury*, incluindo, impedindo surgimento de tais tipos de câncer, detendo progressão de tais cânceres ou eliminando tais tipos de cânceres. Mais particularmente, as composições imunoterapêuticas de levedura *Brachyury* podem ser utilizadas para impedir, inibir ou retardar o desenvolvimento de tumores expressando *Brachyury*, e/ou para impedir, inibir ou retardar a migração do tumor e/ou invasão do tumor de outros tecidos (metástases) e/ou para geralmente impedir ou inibir a progressão de câncer em um indivíduo. Composições imunoterapêuticas de levedura *Brachyury* podem também ser usadas para melhorar pelo menos um sintoma do câncer, tal como, por redução de carga tumoral do indivíduo; impedir, inibir o crescimento do tumor no indivíduo; aumentar sobrevivência do indivíduo; impedir, inibir, reverter ou retardar o desenvolvimento de migração do tumor e/ou invasão do tumor de outros tecidos (câncer metastático) e/ou impedir, inibir, reverter ou retardar progressão do câncer no indivíduo. Imunoterapia de levedura *Brachyury* também pode ser usada terapêuticamente para inibir, reduzir ou eliminar resistência à quimioterapia ou resistência à radiação, que pode ocorrer no câncer metastático por meio de inibição da expressão de *Brachyury* no

câncer, e as composições da invenção podem aumentar o desempenho da terapia de quimioterapia ou radiação, em um indivíduo.

[000120] Cânceres que são relevantes para as composições e métodos da invenção são qualquer câncer que expressa, ou pode exprimir, *Brachyury*, ou cânceres na proximidade a cânceres que expressam ou podem exprimir *Brachyury*, e incluem, mas não se limitam a, câncer da mama, intestino delgado, estômago, rim, bexiga, útero, ovário, testículos, pulmão, cólon, pâncreas, ou de próstata, e incluem cânceres metastáticos e de fase final. Além disso, *Brachyury* é expressa em tumores de origem de células B, tais como a leucemia linfocítica crônica (CLL), células B transformadas por vírus de *Epstein-Barr*, linfomas de Burkitt e Hodgkin, bem como cânceres metastáticos dos mesmos.

[000121] Uma modalidade da invenção refere-se a um método de inibir migração do tumor e/ou reduzir, parar (deter), reverter ou impedir a progressão metastática de câncer em um indivíduo que tem câncer, ou para reverter o desenvolvimento de eventos metastáticos em um câncer. Como discutido acima, *Brachyury* promove a transição epitelial-mesenquimal (EMT) em células de tumores humanos, que confere em células tumorais um fenótipo mesenquimal, bem como, capacidades migratórias e invasivas, enquanto atenua a progressão do ciclo de células tumorais. Portanto, o envolvimento de *Brachyury* em processos metastáticos o torna um alvo ideal para a prevenção ou inibição de processos metastáticos, incluindo, deter câncer em um estágio pré-metastático. Uso de uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* da invenção pode ser eficaz para impedir ou tratar câncer metastático, incluindo, deter progressão do câncer, em face de fuga (ou tentativa de fuga) do câncer a partir de terapia tradicional, tal como quimioterapia e radiação. O método inclui as etapas de

administração a um indivíduo que tem câncer, de uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* da invenção como descrita neste relatório, incluindo, mas não se limita a: (a) um veículo de levedura; e (b) um antígeno de câncer compreendendo pelo menos um antígeno de *Brachyury*.

[000122] Em um aspecto, *Brachyury* não é detectado no câncer do indivíduo quando a composição é primeiro, administrada. Em geral, quando *Brachyury* não é detectada no câncer do indivíduo, o indivíduo poderá apresentar um câncer de estágio prematuro, em que expressão de *Brachyury* não foi ainda manifestada (por exemplo, estágio I ou estágio II), ou em que expressão de *Brachyury* não é ainda detectável em qualquer evento (isto é, *Brachyury* pode ou não ser expresso em um nível reduzido, ou em um pequeno número de células do tumor, mas não é ainda facilmente detectável utilizando métodos de detecção padrão). Nesse aspecto da invenção, o desenvolvimento de células tumorais que expressam *Brachyury* é impedido, retardado ou inibido por uso da composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury*. Como um resultado, migração do tumor e/ou outros processos metastáticos que levam à progressão metastática do tumor, são impedidos, retardados ou inibidos e/ou detenção geral de progressão do tumor ocorre no indivíduo.

[000123] Em outro aspecto, expressão de *Brachyury* é ou pode ser detectada no câncer do indivíduo, no momento, em que a composição é primeiro, administrada. O indivíduo pode apresentar câncer de estágio I, estágio II, estágio III, ou estágio IV, neste aspecto da invenção. Neste aspecto, o uso da composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* reduz, elimina ou diminui, ou detém o crescimento de tumores que expressam *Brachyury*, o que pode resultar na redução da carga de tumor no indivíduo, inibição de crescimento de tumor

expressando *Brachyury* e/ou um aumento de sobrevivência do indivíduo. O indivíduo pode experimentar uma detenção, redução ou reversão em processos metastáticos, melhoria da sobrevivência e da saúde do paciente, e, além disso, permitindo outros protocolos terapêuticos para o tratamento do câncer.

[000124] Na verdade, câncer metastático pode ser associado à resistência, ou maior resistência, para terapias contra o câncer, tais como quimioterapia, radiação ou terapia direcionada a câncer, por meio da qual o câncer "escapa" da terapia ou é simplesmente menos impactado pela terapia e avança. Consequentemente há uma necessidade de reduzir ou eliminar a resistência a tais terapias para melhorar ou aumentar a eficácia da terapia e melhorar a saúde do paciente e da sobrevivência. Desse modo, uma modalidade da invenção refere-se a um método para reduzir ou impedir resistência à quimioterapia, resistência à terapia direcionada a câncer, ou resistência à radiação em um paciente com câncer. O método compreende a administração a um indivíduo que tem câncer e está recebendo terapia de quimioterapia e/ou radiação para o câncer, uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* conforme descrita neste relatório, o qual pode incluir uma composição compreendendo: (a) um veículo de levedura; e (b) um antígeno de câncer compreendendo pelo menos um antígeno de *Brachyury*. Este método da invenção também pode ser utilizado para tratar a resistência associada a outros tratamentos terapêuticos de câncer, incluindo, mas não limitado a, terapia direcionada a câncer.

[000125] Em um aspecto dessa modalidade, *Brachyury* não é detectada no câncer do indivíduo, no momento, em que a composição é primeiro, administrada. Neste aspecto, administração de uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* impede ou inibe o início de resistência à quimioterapia ou terapia à radiação, inibindo o



desenvolvimento de células tumorais expressando *Brachyury* no câncer. Em outro aspecto, a expressão de *Brachyury* é detectada no câncer do indivíduo, no momento, em que a composição é primeiro, administrada. Neste aspecto, o indivíduo pode ou não, já estar experimentando resistência à quimioterapia ou radiação. Em cada caso, administração da composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* da invenção impede ou inibe a terapia de resistência à quimioterapia ou resistência à radiação, ou aumenta a capacidade da terapia de quimioterapia ou radiação para tratar o indivíduo, através de redução ou eliminação de células tumorais expressando *Brachyury* no paciente.

[000126] Outra modalidade da invenção refere-se a um método para tratar câncer, e particularmente, um câncer expressando *Brachyury*. O método inclui administrar a um indivíduo que apresenta um câncer expressando *Brachyury* uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* descrita neste relatório, o qual pode incluir uma composição compreendendo: (a) um veículo de levedura; e (b) um antígeno de câncer compreendendo pelo menos um antígeno de *Brachyury*. Em um aspecto, o método reduz carga tumoral no paciente. Em um aspecto, o método aumenta a sobrevivência do paciente. Em um aspecto, o método inibe o crescimento do tumor no indivíduo. Em um aspecto, o método impede, detém ou reverte à progressão metastática do tumor.

[000127] Uma vez que expressão de *Brachyury* acredita-se ser mais prevalente como um avanço ou progressão de câncer em estágios mais elevados (por exemplo, a partir de estágio I, estágio II, estágio III, estágio IV, dependendo do câncer particular) e é associada a processos metastáticos, é uma modalidade da invenção, proporcionar um método de impedir ou retardar o início de um câncer expressando *Brachyury*, ou deter o câncer em um estágio pré-metastático ou pré-

maligno. Tal método inclui administração a um indivíduo em quem células cancerosas expressando *Brachyury* não são detectadas, de uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* descrita neste relatório, o qual pode incluir uma composição compreendendo: (a) um veículo de levedura; e (b) um antígeno de câncer compreendendo pelo menos um antígeno de *Brachyury*. Em um aspecto desta modalidade, o câncer é sabido expressar ou acredita-se ser susceptível a expressar *Brachyury* em algum estágio do câncer em pelo menos um subconjunto de indivíduos com o câncer. Em um aspecto desta modalidade, o indivíduo já apresenta um câncer, mas *Brachyury* não é detectada no câncer, no momento, em que a composição é primeiro, administrada, o que significa que o indivíduo pode apresentar um estágio mais precoce do cancro em que a expressão de *Brachyury* ainda não foi manifestada, ou em que a expressão de *Brachyury* não é ainda detectável em qualquer evento (isto é, *Brachyury* pode ou não ser expressa em um nível baixo, ou em um pequeno número de células do tumor, mas não é ainda facilmente detectável utilizando métodos de detecção padrão). Em alguns casos, o tipo de câncer pode ser conhecido apresentar uma alta taxa de progressão metastática. Neste aspecto, administração da composição imunoterapêutica de levedura de *Brachyury* impede, retarda ou inibe o desenvolvimento de células tumorais expressando *Brachyury* no câncer do paciente, e, portanto, impede, detém, retarda ou inibe processos metastáticos que acompanham a expressão de *Brachyury*. Em outro aspecto, o indivíduo não apresenta câncer, quando a composição é administrada. Tal indivíduo pode ser "predisposto" ou propenso a desenvolver câncer, talvez devido à história da família ou um marcador genético, ou porque o indivíduo tem mostrado sinais de células ou lesões pré-cancerosas, ou apresenta células ou lesões pré-cancerosas (pré-malignas).

[000128] Em um aspecto, o indivíduo é adicionalmente tratado com pelo menos outro composto terapêutico ou protocolo terapêutico útil para o tratamento de câncer. Tais agentes e protocolos terapêuticos são discutidos em detalhes em qualquer outro lugar neste relatório. Por exemplo, em qualquer uma das modalidades em relação a métodos da invenção descritos neste relatório, em um aspecto, quando o indivíduo tem câncer (independente do *status* de expressão de *Brachyury* detectável em células tumorais), o indivíduo que está sendo tratado ou foi tratado com outra terapia para câncer. Tal terapia pode incluir qualquer um dos protocolos terapêuticos, ou o uso de qualquer composto terapêutico ou agente descrito previamente aqui, incluindo, mas não limitado aos mesmos, terapia de quimioterapia, radiação, terapia direcionada a câncer, ressecção cirúrgica de um tumor, transferência de células-tronco, terapia de citocina, transferência de células T adotivas, e/ou administração de uma segunda composição imunoterapêutica. No caso de administração de uma segunda composição imunoterapêutica, tais composições podem incluir, mas não se limitam as mesmas, imunoterapia à base de levedura adicional, imunoterapia à base de vírus recombinante (vetores virais), terapia de citocina, terapia imunoestimulante (incluindo, quimioterapia com propriedades imunoestimulantes), vacinas de DNA, e outras composições de imunoterapia.

[000129] Em um aspecto, a segunda composição imunoterapêutica inclui um segundo antígeno de câncer que não inclui antígeno de *Brachyury*. Por exemplo, uma segunda composição imunoterapêutica útil em combinação com uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* é uma composição imunoterapêutica de levedura compreendendo outro antígeno de câncer. Tais antígenos de câncer poderão incluir, mas não se limitam aos mesmos, antígeno carcinoembrionário (CEA), oncoproteína Ras de ponto mutado, MUC-

1, EGFR, BCR-Ab1, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, oncoproteínas p53 normais e de ponto mutado, 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, polipose adenomatosa coli (APC), Myc, proteína de *von Hippel-Lindau* (VHL), Rb-1, Rb-2, receptor de andrógeno (RA), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ewsfli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, Mesotelina, NGEP, modificações de tais antígenos, variantes de junção de tais antígenos, e agonistas de epítipo de tais antígenos, bem como combinações de tais antígenos, e/ou domínios imunogênicos destes, modificações destes, variantes destes, e/ou agonistas de epítipo destes.

[000130] Conforme usado neste relatório, para "tratar" um câncer, ou qualquer permutação deste (por exemplo, "tratado de câncer", etc.) geralmente refere-se à administração de uma composição da invenção, uma vez que o câncer tenha ocorrido (por exemplo, uma vez que o câncer foi diagnosticado ou detectado em um indivíduo), com pelo menos, um objetivo terapêutico do tratamento (quando comparado na ausência desse tratamento), incluindo: redução na carga tumoral, inibição de crescimento do tumor, aumento na sobrevivência do indivíduo, retardando, inibindo, detendo ou impedindo o início ou desenvolvimento de câncer metastático (tal como, retardando, inibindo, detendo ou impedindo o início do desenvolvimento de migração do tumor e/ou invasão tumoral de tecidos fora do câncer primário e/ou outros processos associados à progressão metastática de câncer), retardando ou detendo progressão de câncer, melhoria de respostas imunes contra o tumor, melhoria de respostas imunes de memória a longo prazo contra os antígenos do tumor, e/ou melhoria da saúde geral do indivíduo. Para "prevenir" ou "proteger" a partir de um câncer, ou qualquer permutação deste (por

exemplo, "prevenção de câncer", etc.), geralmente, refere-se à administração de uma composição da invenção antes de um câncer ter ocorrido, ou antes, de um estágio específico de câncer ou expressão do antígeno de tumor em um câncer ter ocorrido (por exemplo, antes de expressão de *Brachyury* ser detectada no câncer), com, pelo menos, um objetivo do tratamento (quando comparado com a ausência desse tratamento), incluindo: impedir ou retardar o início ou desenvolvimento de um câncer, ou, caso o câncer ocorra após o tratamento, pelo menos, reduzindo a gravidade do câncer (por exemplo, reduzindo o nível de crescimento do tumor, detendo progressão do câncer, melhorando a resposta imune contra o câncer, inibindo processos metastáticos) ou melhorar os resultados no indivíduo (por exemplo, a melhoria de sobrevivência).

[000131] A presente invenção inclui a transferência (administração, imunização) de uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* da invenção para um sujeito ou indivíduo. O processo de administração pode ser realizado *ex vivo* ou *in vivo*, mas é tipicamente, realizado *in vivo*. Administração, *ex vivo* refere-se à parte de realização da etapa reguladora fora do paciente, tal como administração de uma composição da presente invenção a uma população de células (células dendríticas) removidas de um paciente sob condições, tal que um veículo de levedura, antígeno(s) e quaisquer outros agentes ou composições são carregados para a célula, e retornando as células ao paciente. A composição terapêutica da presente invenção pode ser retornada a um paciente, ou administrada a um paciente, por qualquer modo adequado de administração.

[000132] Administração de uma composição pode ser sistêmica, mucosa e/ou proximal à localização do sítio alvo (por exemplo, próximo de um sítio de um tumor). Vias adequadas de administração

serão evidentes àqueles versados no estado da técnica, dependendo do tipo de câncer que deve ser impedido ou tratado e/ou, a população de células ou tecido alvo. Vários métodos aceitáveis de administração incluem, mas não se limitam aos mesmos, administração intravenosa, administração intraperitoneal, administração intramuscular, administração intranodal, administração intracoronária, administração intra-arterial (por exemplo, em uma artéria carótida), administração subcutânea, administração transdérmica, administração intratraqueal, administração intra-articular, administração intraventricular, inalação (por exemplo, aerossol), administração intracraniana intraespinhal intraocular, aural, intranasal, oral, pulmonar, impregnação de um cateter e injeção direta em um tecido. Em um aspecto, as vias de administração incluem: intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intradérmica, intranodal, intramuscular, transdérmica, inalação, intranasal, oral, intraocular, intra-articular, intracraniana, intraspinal. Transferência parenteral pode incluir vias: intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapleural, intrapulmonar, intravenosa, subcutânea, cateter atrial e cateter venal. Transferência auricular pode incluir gotas para os ouvidos, transferência intranasal pode incluir gotas nasais ou injeção intranasal, e transferência intraocular pode incluir colírios. Transferência por aerossol (inalação) pode também ser realizada utilizando métodos padrão no estado da técnica (ver, por exemplo, Stribling e outros; *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 189:11277-11281, 1992). Em um aspecto, uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* da invenção é administrada por via subcutânea. Em um aspecto, a composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* é administrada diretamente em um meio tumoral.

[000133] Em geral, uma única dose adequada de uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* é uma dose que é capaz de eficazmente proporcionar um veículo de levedura e o antígeno de

*Brachyury* para um dado tipo celular, tecido, ou região do corpo do paciente em uma quantidade eficaz para induzir uma resposta imune específica de tumor contra um ou mais antígenos ou epítomos de *Brachyury*, quando administrada uma ou mais vezes durante um período de tempo adequado. Por exemplo, em uma modalidade, uma dose única de uma levedura *Brachyury* da presente invenção é de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $5 \times 10^7$  de equivalentes de células de levedura por quilograma de peso corporal do organismo que deve ser administrada a composição. Em um aspecto, uma dose única de um veículo de levedura da presente invenção é de aproximadamente 0,1 Unidade de levedura (Y.U., que é  $1 \times 10^6$  células de levedura ou equivalentes de células de levedura), a cerca de 100 Y.U. ( $1 \times 10^9$  células) por dose (isto é, por organismo), incluindo qualquer dose intercalar, em incrementos de  $0,1 \times 10^6$  células (isto é,  $1,1 \times 10^6$ ,  $1,2 \times 10^6$ ,  $1,3 \times 10^6$ ...). Em uma modalidade, uma dose adequada inclui doses entre 1 Y.U. e 40 Y.U. e em um aspecto, entre 10 Y.U. e 40 Y.U. Em uma modalidade, as doses são administradas em diferentes sítios no indivíduo, mas durante o mesmo período de dosagem. Por exemplo, uma dose de 40 Y.U. poderá ser administrada por meio de injeção de doses de 10 Y.U. para quatro sítios diferentes no indivíduo durante um período de dosagem. A invenção inclui a administração de uma quantidade da composição de imunoterapia 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 sítios diferentes em um indivíduo para formar uma dose única. Uma Unidade de levedura (Y.U.) é  $1 \times 10^7$  de células de levedura ou equivalentes de células de levedura.

[000134] "Reforços" ou "*boosters*" de uma composição terapêutica são administrados, por exemplo, quando a resposta imune contra o antígeno tem diminuído ou conforme necessário, proporcionar uma

resposta imune ou induzir uma resposta de memória contra um antígeno ou antígenos específicos. Reforços (*boosters*) podem ser administrados cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 semanas de intervalo, ou mensal, bimestral, trimestral, anualmente, e/ou em alguns ou vários incrementos anuais após a administração original, dependendo do estado do indivíduo a ser tratado e do objetivo da terapia no momento de administração (por exemplo, profilático, tratamento ativo, manutenção). Em uma modalidade, um programa de administração é aquele em que doses de composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* são administradas pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou mais vezes durante um período de tempo de semanas, meses, ou até anos. Em uma modalidade, as doses são administradas semanalmente ou quinzenalmente, durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais doses, seguido por doses quinzenais ou mensais, conforme necessárias para atingir o tratamento preventivo ou terapêutico desejado para câncer. Reforços (*boosters*) adicionais podem em seguida ser dados em intervalos similares ou mais longos (meses ou anos) como uma terapia de manutenção ou remissão, se desejada.

[000135] Em um aspecto da invenção, um ou mais agentes terapêuticos ou protocolos terapêuticos adicionais são administrados ou realizados, sequencialmente e/ou simultaneamente com a administração da composição de imunoterapia de levedura *Brachyury* (por exemplo, ressecção cirúrgica do tumor, administração de quimioterapia, administração de terapia de radiação, administração de outra composição ou protocolo de imunoterapia, terapia de citocina, transferência de células T adotivas, ou transplante de células-tronco). Por exemplo, uma ou mais terapias podem ser administradas ou realizadas antes da primeira dose de composição de imunoterapia de levedura *Brachyury* ou após a primeira dose ser administrada. Em uma modalidade, uma ou mais terapias podem ser administradas ou



realizadas de uma maneira alternada, com a dosagem de composição de imunoterapia de levedura *Brachyury*, tal como em um protocolo em que a composição de levedura *Brachyury* é administrada sob intervalos prescritos, entre uma ou mais doses consecutivas de quimioterapia ou outra terapia. Em uma modalidade, a composição de imunoterapia de levedura *Brachyury* é administrada em uma ou mais doses, durante um período de tempo antes de iniciar as terapias adicionais. Em outras palavras, a composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* é administrada como uma monoterapia por um período de tempo e, em seguida, uma terapia adicional é adicionada (por exemplo, quimioterapia), quer simultaneamente, com novas doses de imunoterapia de levedura *Brachyury*, ou em uma forma alternada com imunoterapia de levedura *Brachyury*. Alternativamente, ou em adição, outra terapia pode ser administrada por um período de tempo antes de iniciar administração da composição de imunoterapia de levedura *Brachyury*, e os conceitos podem ser combinados (por exemplo, ressecção cirúrgica de um tumor, seguido por monoterapia com imunoterapia de levedura *Brachyury* por várias semanas, seguido por doses alternadas de quimioterapia e imunoterapia de levedura *Brachyury*, por semanas ou meses, opcionalmente, seguido por monoterapia utilizando imunoterapia de levedura *Brachyury* ou outra terapia, ou por um novo protocolo de combinações de terapia proporcionada, sequencial, simultaneamente, ou em forma alternativa). Vários protocolos para o tratamento de câncer usando imunoterapia de levedura *Brachyury* são considerados pela invenção, e esses exemplos devem ser considerados como exemplos não-limitativos de vários protocolos possíveis.

[000136] Em um aspecto da invenção, antígenos adicionais diferentes de *Brachyury* são também direcionados usando imunoterapia à base de levedura, além de direcionamento de

*Brachyury*. Tais antígenos alvo adicionais podem ser incluídos dentro do mesmo veículo de levedura como os antígenos de *Brachyury*, ou composições de imunoterapia à base de levedura adicionais direcionando diferentes antígenos podem ser produzidas e, em seguida, combinadas como desejado, dependendo do indivíduo que deve ser tratado, dos antígenos expressos pelo tipo de câncer ou pelo tumor específico do indivíduo, e/ou dependendo do estágio de câncer no indivíduo, ou do estágio de tratamento do indivíduo. Para exemplos, uma combinação de antígenos poderá ser selecionada que abrange: (1) antígenos envolvidos em eventos seminais em desenvolvimento de câncer, tal como Ras mutante, antígenos envolvidos em, ou associados à desregulação de processos celulares, tal como CEA, e (3) *Brachyury*, que está envolvido em processos metastáticos. Por exemplo, em, ou mais outras composições de imunoterapia à base de levedura podem expressar um ou mais antígenos, incluindo, mas não se limitam aos mesmos, antígeno carcinoembrionário (CEA), oncoproteína Ras mutante em ponto, MUC-1, EGFR, BCR-Ab1, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GAGE, GP-100, MUC-2, oncoproteínas p53 mutantes normais e em ponto, 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, polipose adenomatosa coli (APC), Myc, proteína *von Hippel-Lindau* (VHL), Rb-1, Rb-2, receptor de andrógeno (RA), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ews-fli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, Mesotelina, NGEP, modificações de tais antígenos, variantes de junção de tais antígenos, e agonistas do epítipo de tais antígenos, bem como combinações de tais antígenos, e/ou domínios imunogênicos destes, modificações destes, variantes destes, e/ou agonistas de epítipo destes. Uma, duas, três ou mais dessas composições de imunoterapia à base de levedura podem ser administradas a um indivíduo antes, simultaneamente, ou alternando

com, e/ou após administração de uma composição de imunoterapia de levedura *Brachyury*, a fim de otimizar direcionamento de antígenos no tumor do indivíduo. Como acima, terapias adicionais podem também ser usadas em tais protocolos (por exemplo, ressecção cirúrgica de tumor, quimioterapia, terapia direcionada a câncer, terapia de radiação, etc.).

[000137] Em uma modalidade da invenção, é proporcionado um método para tratar câncer. O método inclui as etapas de: (a) administrar a um indivíduo que apresenta câncer em que expressão de *Brachyury* não foi detectada, uma primeira composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um primeiro antígeno de câncer que não compreende um antígeno de *Brachyury*; e (b) administrar ao indivíduo, antes, simultaneamente com, ou subsequente a, administração da primeira composição imunoterapêutica, uma segunda composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um segundo antígeno de câncer que compreende um antígeno de *Brachyury*. Em modalidades adicionais, o método pode incluir administração de uma ou mais composições imunoterapêuticas adicionais, em que a cada uma das uma ou mais composições imunoterapêuticas adicionais compreendem um antígeno de câncer adicional. O antígeno adicional pode ser qualquer um daqueles conhecidos no estado da técnica ou descritos neste relatório, incluindo, mas não se limitam aos mesmos, Ras mutante, antígeno carcinoembrionário (CEA) e MUC-1.

[000138] Em outra modalidade da invenção, um método para tratar câncer inclui as seguintes etapas: (a) administrar a um indivíduo que apresenta câncer, uma primeira composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um antígeno Ras mutante; (b) administrar ao indivíduo de (a) uma segunda composição imunoterapêutica compreendendo um veículo de levedura e um

antígeno selecionado do grupo que consiste em antígeno 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 antígeno de *Brachyury*. Uma ou mais das etapas de administração em (a), (b) e (c) podem ser realizadas simultânea, ou sequencialmente. As etapas podem ser repetidas conforme necessárias para tratar um câncer específico do indivíduo, e os antígenos de câncer podem ser modificados antes ou durante tratamento para abordar especificamente o câncer específico do indivíduo.

[000139] No método da presente invenção, composições e composições terapêuticas podem ser administradas a animais, incluindo qualquer vertebrado, e particularmente, a qualquer membro da classe vertebrado, *Mammalia*, incluindo, sem limitação, primatas, roedores, gados e animais domésticos. Gados incluem mamíferos a serem consumidos ou que produzem produtos úteis (por exemplo, ovelhas para produção de lã). Mamíferos para tratar ou proteger utilizando a invenção incluem seres humanos, primatas não-humanos, cães, gatos, camundongos, ratos, cabras, ovelhas, gado, cavalos e porcos.

[000140] Um "indivíduo" é um vertebrado, tal como um mamífero, incluindo, sem limitação, um ser humano. Mamíferos incluem, mas não se limitam aos mesmos, animais de criação, animais de desporto, animais de estimação, primatas, camundongos e ratos. O termo "indivíduo" pode ser utilizado alternadamente com o termo "animal", "sujeito" ou "paciente".

#### *Técnicas Gerais Úteis na Invenção*

[000141] A prática da presente invenção empregará, a não ser que de outra maneira indicada, técnicas convencionais de biologia molecular (incluindo, técnicas recombinantes), microbiologia, biologia

celular, bioquímica, química de ácido nucleico, e imunologia, que são bem conhecidas daqueles versados no estado da técnica. Tais técnicas são completamente explicadas na literatura, tais como, Methods of Enzymology, (Métodos de Enzimologia), vol. 194, Guthrie e outros, Eds., *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1990); Biology and activities of yeasts, (Biologia e atividades de leveduras), Skinner, e outros, Eds., *Academic Press* (1980); Methods in yeast genetics: a laboratory course manual, (Métodos em genética de leveduras: um manual de curso de laboratório), Rose e outros, *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1990); The Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology, (A Levedura Saccharomyces: Ciclo Celular e Biologia Celular), Pringle e outros, eds., *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1997); The Yeast Saccharomyces: Gene Expression, (A Levedura Saccharomyces: Expressão Gênica), Jones e outros, eds., *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1993); The Yeast Saccaromyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics, (A levedura Saccharomyces: Dinâmica de Genoma, Síntese Protéica e Energética), Broach e outros, Eds., *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1992); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Clonagem Molecular: Um Manual de Laboratório) segunda edição (Sambrook e outros, 1989) e Molecular Cloning: A Laboratory Manual, terceira edição (Sambrook e Russel, 2001), (juntamente referidos neste relatório como "Sambrook"); Current Protocols in Molecular Biology, (Protocolos Atuais na Biologia Molecular) (F.M. Ausubel e outros, Eds., 1987, incluindo suplementos até 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (RCP: Reação em Cadeia da Polimerase), (Mullis e outros, Eds., 1994); Harlow e Lane (1988), Antibodies, A Laboratory Manual, (Anticorpos, Um Manual de Laboratório), *Cold Spring Harbor Publications*, Nova Iorque; Harlow e Lane (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, (Utilização de Anticorpos: Um Manual de

Laboratório), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (juntamente aqui referidas como "Harlow e Lane"), Beaucage e outros, Eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, (Protocolos Atuais em Química de Ácidos Nucleicos), John Wiley & Sons, Inc. Nova Iorque, 2000); Casarett e Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons, (Toxicologia, A Ciência Básica de Venenos), C. Klaassen, Ed., 6ª. edição (2001), e Vaccines, (Vacinas), S. Plotkin, W. Orenstein e P. Offit, eds., quinta edição (2008).

#### *Definições Gerais*

[000142] Um "TARMOGEN<sup>®</sup>" (GlobelImmune, Inc., Louisville, Colorado) geralmente, refere-se a um veículo de levedura que expressa um ou mais antígenos heterólogos extracelularmente (em sua superfície), intracelularmente (internamente ou citosolicamente) ou ambos, extracelular e intracelularmente. TARMOGENs<sup>®</sup> têm sido geralmente descrito (ver, por exemplo, Patente dos Estados Unidos No. 5.830.463). Certas composições de imunoterapia à base de levedura, e métodos de produção e, geralmente, utilização do mesmo, são também descritos em detalhes, por exemplo, *in* Patente dos Estados Unidos No. 5.830.463, Patente dos Estados Unidos No. 7.083.787, Patente dos Estados Unidos No. 7.736.642, Stubbs e outros, *Nat. Med. Chem.* 7:625-629 (2001), Lu e outros, *Cancer Research* 64:5084-5088 (2004), e Bernstein e outros, *Vaccine*, 24 de janeiro de 2008; 26 (4) :509-21, cada uma das quais é incorporada como referência neste relatório em sua totalidade.

[000143] Conforme usado neste relatório, o termo "análogo" refere-se a um composto químico que é estruturalmente similar a outro composto, mas difere ligeiramente na composição (como na substituição de um átomo por um átomo de um elemento diferente ou na presença de um grupo funcional particular, ou a substituição de um grupo funcional por outro grupo funcional). Desse modo, um análogo é

um composto que é similar ou comparável na função e aparência, mas apresenta uma estrutura ou origem diferente com relação ao composto de referência.

[000144] Os termos, "substituído", "derivado substituído" e "derivado", quando usados para descrever um composto, significa que pelo menos um hidrogênio ligado ao composto não substituído é substituído com um átomo diferente ou uma porção química.

[000145] Embora um derivado apresente uma estrutura física similar a do composto original, o derivado pode apresentar diferentes propriedades químicas e/ou biológicas do que o composto original. Tais propriedades podem incluir, mas não se limitam a, atividade aumentada ou reduzida do composto original, nova atividade, em comparação com o composto original, biodisponibilidade aumentada ou reduzida, eficácia aumentada ou reduzida, estabilidade aumentada ou reduzida *in vitro* e/ou *in vivo*, e/ou propriedades de absorção aumentadas ou reduzidas.

[000146] Em geral, o termo "biologicamente ativo" indica que um composto (incluindo, uma proteína ou peptídeo) apresenta pelo menos uma atividade detectável que tem um efeito nos processos metabólicos, fisiológicos, químicos, ou outros processos de uma célula, um tecido, ou um organismo, quando medida ou observada *in vivo* (isto é, em um ambiente fisiológico natural) ou *in vitro* (isto é, sob condições laboratoriais).

[000147] De acordo com a presente invenção, o termo "modular" pode ser usado alternadamente com "regular" e refere-se geralmente a super-regulação ou desregulação de uma atividade específica. Como aqui utilizado, o termo "super-regular" pode ser usado em geral para descrever qualquer de: eliciação, iniciação, aumento, elevação, reforço, aperfeiçoamento, intensificação, amplificação, promoção ou fornecimento, em relação a uma atividade particular. Similarmente, o

termo "desregular" pode ser usado geralmente para descrever qualquer de: diminuição, redução, inibição, melhora, diminuição, redução, bloqueio, ou impedimento, com relação a uma atividade particular.

[000148] Em uma modalidade da presente invenção, qualquer uma das sequências de aminoácidos descritas neste relatório pode ser produzida com pelo menos um, e até aproximadamente 20, aminoácidos heterólogos adicionais que flanqueiam cada uma das extremidades de término C e/ou N da sequência de aminoácidos especificada. A proteína ou polipeptídeo resultante pode ser referida como "consistindo essencialmente de" a sequência de aminoácidos especificada. De acordo com a presente invenção, os aminoácidos heterólogos são sequências de aminoácidos que não são encontradas naturalmente (isto é, não encontrada na natureza, *in vivo*), que flanqueiam a sequência de aminoácido especificada, ou que não são relacionadas com a função da sequência de aminoácido especificada, ou que não seria ser codificada pelos nucleotídeos que flanqueiam a sequência de ácido nucleico que ocorre naturalmente codificando a sequência de aminoácido especificada quando esta ocorre no gene, se tais nucleotídeos na sequência que ocorre naturalmente foram traduzidos usando códon padrão de costume para o organismo, a partir do qual a sequência de aminoácido especificada é derivada. Similarmente, a expressão "consistindo essencialmente de", quando usada com referência a uma sequência de ácido nucleico neste relatório, refere-se a uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácido especificada que pode ser flanqueada por pelo menos um, ou até tantos quanto aproximadamente 60; nucleotídeos heterólogos adicionais em cada uma das extremidades 5' e/ou 3' da sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácido especificada. Os nucleotídeos heterólogos não são



naturalmente encontrados (isto é, não encontrados na natureza, *in vivo*) que flanqueiam a sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácido especificada quando esta ocorre no gene natural ou, não codifica uma proteína que confere qualquer função adicional para a proteína ou altera a função da proteína que apresenta a sequência de aminoácido especificada.

[000149] De acordo com a presente invenção, a expressão "liga-se seletivamente a" refere-se à capacidade de um anticorpo, fragmento de ligação a antígeno ou parceiro de ligação da presente invenção ligar-se preferencialmente, a proteínas específicas. Mais especificamente, a expressão "liga-se seletivamente" refere-se à ligação específica de uma proteína com outra (por exemplo, um anticorpo, fragmento deste, ou parceiro de ligação a um antígeno), em que o nível de ligação, como medido por qualquer ensaio padrão (por exemplo, um imunensaio), é estatística e significativamente maior que o controle base para o ensaio. Por exemplo, quando se realiza um imunensaio, controles tipicamente incluem uma poço/tubo de reação que contém anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno isolado (isto é, na ausência de antígeno), em que uma quantidade de reatividade (por exemplo, ligação não específica do poço) pelo anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo na ausência do antígeno, é considerada ser a base. Ligação pode ser medida utilizando uma variedade de métodos padrões no estado da técnica, incluindo, imunensaio enzimáticos (por exemplo, ELISA, ensaios de *immunoblot*, etc.).

[000150] Referência geral a uma proteína ou polipeptídeo usado na presente invenção incluem proteínas de comprimento total, proteínas de comprimento total próximo (definido acima), ou qualquer fragmento; domínio (estruturais, funcionais ou imunogênicos), epítipo conformacional, ou um homólogo ou variante de uma proteína

específica. Uma proteína de fusão pode também ser geralmente referida como uma proteína ou um polipeptídeo. Uma proteína isolada, de acordo com a presente invenção, é uma proteína (incluindo, um polipeptídeo ou peptídeo) que foi removido de seu meio natural (isto é, que foi submetido à manipulação humana), e pode incluir proteínas purificadas, proteínas parcialmente purificadas, proteínas produzidas de forma recombinante, e proteínas produzidas sinteticamente, por exemplo. Como tal, "isolado" não reflete a extensão em que a proteína foi purificada. De preferência, uma proteína isolada da presente invenção é produzida de forma recombinante. De acordo com a presente invenção, os termos "modificação" e "mutação" podem ser utilizados alternadamente, em particular, com relação às modificações/mutações com a sequência de aminoácidos de proteínas ou porções destas (ou sequências de ácidos nucleicos) descritas neste relatório.

[000151] Conforme usado neste relatório, o termo "homólogo" ou "variante" é usado para se referir a uma proteína ou peptídeo que difere de uma proteína ou peptídeo de referência (isto é, a proteína "protótipo" ou "tipo selvagem") por modificações menores com a proteína ou o peptídeo de referência, mas que mantém a estrutura proteica básica e de cadeia lateral da forma que ocorre naturalmente. Tais alterações incluem, mas não se limitam a: alterações em uma ou algumas cadeias laterais de aminoácidos, alterações em um ou alguns aminoácidos, incluindo, deleções (por exemplo, uma versão truncada da proteína ou peptídeo), inserções e/ou substituições; alterações na estereoquímica de um ou alguns átomos; e/ou derivatizações menores, incluindo, mas não limitados a: metilação, glicosilação, fosforilação, acetilação, miristoilação, prenilação, palmitação, amidação e/ou adição de glicosilfosfatidil inositol. Um homólogo ou variante pode apresentar propriedades aumentadas, diminuídas, ou

substancialmente similares, em comparação com a proteína ou o peptídeo 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 utilizando técnicas conhecidas no estado da técnica para a produção de proteínas, incluindo, mas não se limitam as mesmas, modificações diretas para a proteína de referência isolada, síntese proteica direta; ou modificações na sequência de ácido nucleico que codifica a proteína utilizando, por exemplo, técnicas de DNA clássicas ou recombinantes para efetuar mutagênese aleatória ou direcionada, resultando na codificação de uma variante de proteína. Além disso, pode haver variantes de ocorrência natural de uma proteína de referência (por exemplo, isoformas, variantes alélicas, ou outras variantes naturais que podem ocorrer de indivíduo a indivíduo) e podem ser isoladas, produzidas e/ou utilizadas na invenção.

[000152] Um homólogo ou variante de uma proteína especificada pode compreender, consistir essencialmente em, ou consistir em, uma sequência de aminoácidos que é 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% idênticas, ou pelo menos cerca de 87% idênticas, ou pelo menos cerca de 88% idênticas, ou pelo menos cerca de 89% idênticas, ou pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos cerca de 91% idênticas, ou pelo menos cerca de 92% idênticas, ou pelo menos cerca de 93% idênticas, ou pelo menos cerca de 94% idênticas, ou pelo menos cerca de 95% idênticas, ou pelo menos cerca de 96% idênticas, ou pelo menos cerca de 97% idênticas, ou pelo menos cerca de 98% idênticas, ou pelo menos cerca de 99% idênticas (ou qualquer porcentagem de

identidade entre 45% e 99%, em incrementos totais de um número inteiro), 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). Em uma modalidade, o homólogo ou variante compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em, uma sequência de aminoácidos que é inferior a 100% idênticas, a menos de cerca de 99% idênticas, a menos de cerca de 98% idênticas, a menos de cerca de 97% idênticas, a menos do que cerca de 96% idênticas, a menos de cerca de 95% idênticas, e assim por diante, em incrementos de 1%, a menos que cerca de 70% idênticas à sequência de aminoácidos da proteína de referência.

[000153] Conforme usado neste relatório, a não ser que de outra maneira especificada, referência a uma porcentagem (%) de identidade refere-se a uma avaliação de homologia que é realizada usando: (1) uma pesquisa de homologia básica, Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico (*Basic Local Alignment Search Tool*) (BLAST) usando *blastp* para pesquisas de aminoácidos e *blastn* para pesquisas de ácidos nucleicos com parâmetros prefixados (*default*) padrão, em que a sequência de consulta é filtrada para as regiões de baixa complexidade por *default* (tal como descrito em Altschul, SF, Madden, T.L., Schääffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997); "gapped BLAST e PSI-BLAST: uma nova geração de programas de pesquisa de banco de dados de proteínas" *Ácidos Nucleicos Res.* 25:3389-3402, aqui incorporada como referência em sua totalidade), (2) um alinhamento BLAST de duas sequências (por exemplo, usando os parâmetros descritos abaixo), (3) e/ou PSI-BLAST com os parâmetros-padrão (posição-*Specific Iterated BLAST*. Nota-se que, devido a algumas diferenças nos parâmetros-padrão entre BLAST básico e BLAST para duas

sequências, duas sequências específicas podem ser reconhecidas como apresentando homologia significativa utilizando o programa BLAST, visto que uma pesquisa realizada em BLAST Básico usando uma das sequências como a sequência de consulta poderá não identificar a segunda sequência na combinação de topo. Além disso, PSI-BLAST fornece uma versão automatizada, fácil de usar de um "perfil" de pesquisa, que é uma forma sensível de procurar homólogos de sequência. O primeiro programa executa uma pesquisa do banco de dados *gapped* BLAST. O programa PSI-BLAST usa as informações de quaisquer alinhamentos significativos retornados para o constructo de uma matriz de pontuação específica da posição, que substitui a sequência de consulta para a próxima rodada de pesquisa de banco de dados. Portanto, deve-se entender que a porcentagem de identidade pode ser determinada utilizando qualquer um desses programas.

[000154] Duas sequências específicas podem ser alinhadas umas as outras usando BLAST conforme descrito em Tatusova e Madden, (1999), "*Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences*", *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-250, aqui incorporada como referência em sua totalidade. Tal alinhamento da sequência é realizado em *blastp* ou *blastn* utilizando o algoritmo BLAST 2.0 para realizar uma pesquisa BLAST *gapped* (BLAST 2.0) entre as duas sequências que permitem a introdução de lacunas (deleções e inserções) no alinhamento resultante. Para fins de clareza, aqui, uma sequência de alinhamento BLAST para duas sequências é feita utilizando os parâmetros-padrão como segue.

[000155] Para *blastn*, usando matriz BLOSUM62 0:

[000156] Recompensa para correspondência = 1

[000157] Multa para incompatibilidade = -2

[000158] Lacuna aberta (5) e lacuna de extensão (2) penalidades

[000159] Lacuna x\_dropoff (50) esperar (10) expressar tamanho (11) filtrar (em)

[000160] Para blastp, usando matriz BLOSUM62 0:

[000161] Lacuna aberta (11) e lacuna de extensão (1) penalidades

[000162] Lacuna x\_dropoff (50) esperar (10) expressar tamanho (3) filtrar (em).

[000163] Uma molécula de ácido nucleico isolada é uma molécula de ácido nucleico que foi removida de seu meio natural (isto é, que foi submetida à manipulação humana), seu meio natural, sendo o genoma ou cromossoma em que a molécula de ácido nucleico é encontrada na natureza. Como tal, "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 que contém mais do que um gene, em que a molécula de ácido nucleico que 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 que não é um fragmento de um cromossoma que inclui tal gene, mas em vez disso inclui a região de codificação e as regiões reguladoras associadas ao gene, mas genes adicionais que não são naturalmente encontrados no mesmo cromossoma. Uma molécula de ácido nucleico isolada pode também incluir porções de um gene. Uma molécula de ácido nucleico isolada pode também incluir uma sequência de ácido nucleico especificada, flanqueada por (isto é, na extremidade 5' e/ou extremidade 3' da sequência) ácidos nucleicos adicionais que não normalmente flanqueiam a sequência de ácido nucleico especificada na natureza (isto é, sequências heterólogas). Molécula de ácido nucleico isolada pode incluir DNA, RNA (por exemplo, RNAm), ou derivados de DNA ou RNA (por exemplo, DNAc). Embora a expressão "molécula de ácido nucleico" refere-se principalmente à molécula de

ácido nucleico física e a expressão "sequência de ácido nucleico" refere-se principalmente à sequência de nucleotídeos na molécula de ácido nucleico, as duas expressões podem ser usadas alternadamente, em especial, com relação a uma molécula de ácido nucleico, ou uma sequência de ácido nucleico, sendo capazes de codificar uma proteína ou um domínio de uma proteína.

[000164] Uma molécula de ácido nucleico recombinante é uma molécula que pode incluir, pelo menos, uma de qualquer sequência de ácido nucleico que codifica uma ou mais proteínas aqui descritas operativamente ligadas a pelo menos uma de qualquer sequência de controle da transcrição capaz de regular eficazmente a expressão da molécula de ácido nucleico na célula a ser transfectada. Embora a expressão "molécula de ácido nucleico" refere-se principalmente à molécula física de ácido nucleico e a expressão "sequência de ácido nucleico" refere-se principalmente com a sequência de nucleotídeos na molécula de ácido nucleico, as duas expressões podem ser utilizadas alternadamente, em especial, com relação a uma molécula de ácido nucleico, ou uma sequência de ácido nucleico, sendo capazes de codificar uma proteína. Além disso, a expressão "molécula recombinante" refere-se principalmente a uma molécula de ácido nucleico ligada operativamente a uma sequência de controle da transcrição, mas pode ser utilizada alternadamente com a expressão "molécula de ácido nucleico", que é administrada a um animal.

[000165] Uma molécula de ácido nucleico recombinante inclui um vetor recombinante, que é qualquer sequência de ácido nucleico, tipicamente uma sequência heteróloga que é operativamente ligada à molécula de ácido nucleico, isolada que codifica uma proteína de fusão da presente invenção, a qual é capaz de permitir a produção recombinante da proteína de fusão, e que é capaz de transferir a molécula de ácido nucleico para uma célula hospedeira de acordo com

a presente invenção. Tal vetor pode conter sequências de ácidos nucleicos que não são naturalmente encontradas adjacentes às moléculas de ácidos nucleicos, isoladas que devem ser inseridas no vetor. O vetor pode ser RNA ou DNA, quer procariótico ou eucariótico, e de preferência, na presente invenção, é um plasmídeo útil para transfecção de levedura. Vetores recombinantes podem ser utilizados na clonagem, sequenciamento, e/ou de outra maneira manipulação de moléculas de ácido nucleico, e podem ser usados na transferência de tais moléculas (por exemplo, como em uma composição de DNA ou uma composição à base de vetor viral). Vetores recombinantes são preferencialmente usados na expressão de moléculas de ácido nucleico, e podem ser também referidos como vetores de expressão. Vetores recombinantes preferidos são capazes de serem expressos em uma célula hospedeira transfectada, tal como uma levedura.

[000166] Em uma molécula recombinante da presente invenção, as moléculas de ácido nucleico são operativamente ligadas a vetores de expressão que contêm sequências reguladoras, tais como sequências de controle da transcrição, sequências de controle 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 da presente invenção. Em particular, as moléculas recombinantes da presente invenção incluem moléculas de ácido nucleico que são operativamente ligadas a uma ou mais sequências de controle de expressão. A expressão "ligada operacionalmente" refere-se a ligação de uma molécula de ácido nucleico com uma sequência de controle da expressão de tal forma que a molécula é expressa quando transfectada (isto é, transformada, traduzida ou transfectada) para uma célula hospedeira.

[000167] De acordo com a presente invenção, o termo "transfecção" é usado para referir-se a qualquer método através do qual uma



molécula de ácido nucleico exógeno (isto é, uma molécula de ácido nucleico recombinante) pode ser inserida em uma célula. O termo "transformação" pode ser utilizado alternadamente com o termo "transfecção", quando tal termo é usado para referir-se à introdução de moléculas de ácido nucleico em células microbianas, tais como algas, bactérias e leveduras. Em sistemas microbianos, o termo "transformação" é utilizado para descrever uma mudança herdada, devido à aquisição de ácidos nucleicos exógenos pelo microrganismo e é essencialmente sinônimo do termo "transfecção". Portanto, as técnicas de transfecção incluem, mas não se limitam as mesmas, transformação, tratamento químico das células, bombardeamento de partículas, eletroporação, microinjeção, lipofecção, adsorção, infecção e fusão de protoplastos.

[000168] Os resultados experimentais seguintes são proporcionados para fins de ilustração, e não pretendem limitar o escopo da invenção.

#### EXEMPLOS

##### **Exemplo 1**

[000169] O exemplo seguinte descreve a produção de uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury*.

[000170] Nesse experimento, a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) foi manipulada para expressar *Brachyury* humana sob o controle do promotor induzível por cobre, *CUP1*, ou o promotor constitutivo, *TEF2*, produzindo composições de imunoterapia de levedura *Brachyury*. Em cada caso, uma proteína de fusão que compreende um antígeno de *Brachyury* foi produzida como um polipeptídeo único com os seguintes elementos de sequência fundidos na estrutura a partir de término N a término C, representada por ID SEQ NO: 8 (1) um peptídeo de término N para conferir resistência à degradação proteassômica e estabilizar expressão (posições 1 a 6 de ID SEQ NO: 8, a sequência de peptídeo também aqui representada por ID SEQ NO: 11); (2) aminoácidos 2-

435 de ID SEQ NO: 6, ID SEQ NO: 6, que representa uma proteína de *Brachyury* humana de comprimento total próximo (posições 7-440 de ID SEQ NO: 8); e (3) uma cauda (*tag*) de hexa-histidina (posições 441-446 de ID SEQ NO: 8). As sequências de aminoácidos utilizadas nessa proteína de fusão podem ser modificadas pela utilização de aminoácidos adicionais ou alternados que flanqueiam cada extremidade do antígeno de *Brachyury*, se desejado, e as porções mais curtas do antígeno de *Brachyury* também podem ser utilizadas. Uma sequência de ácido nucleico que codifica a proteína de fusão de ID SEQ NO: 8 (códon otimizado para expressão de levedura) é aqui representada por ID SEQ NO: 7.

[000171] Resumidamente, DNA que codifica uma proteína de *Brachyury* humana de comprimento total a partir de um plasmídeo pCRII-*Brachyury* fornecido pelo *National Cancer Institute* (Dr. Jeffrey Schlom) foi amplificado utilizando RCP, e, em seguida, inserido em sítios de clonagem *EcoRI* e *SpeI* atrás do promotor *CUP1* (vetor pGI-100) ou o promotor *TEF2* (vetores plu011 ou pGI-172), em vetores de expressão de leveduras de 2  $\mu$ m. As sequências de nucleotídeos que codificam o peptídeo de estabilização de término N, MADEAP (ID SEQ NO: 11) e um peptídeo de hexa-histidina de término C foram também adicionados ao vetor de plasmídeo para codificar a proteína de fusão completa, representada por ID SEQ NO: 8. Os plasmídeos resultantes foram transformados em DH5 $\alpha$  para armazenamento de plasmídeo, e em *Saccharomyces cerevisiae* W303 $\alpha$  para produção das composições imunoterapêuticas de levedura *Brachyury*.

[000172] Transformação em *Saccharomyces cerevisiae* foi realizada por transfecção de acetato de lítio/polietileno glicol, e transfectantes primários foram selecionados em placas mínimas sólidas desprovidas de uracila (UDM; meio de abandono uridina). As colônias foram selecionadas por crescimento em U2 (meio de abandono uridina) ou

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

[000173] A composição de imunoterapia de levedura *Brachyury* que compreende um polinucleotídeo que codifica a proteína de fusão *Brachyury* humana representada por ID SEQ NO: 8, sob o controle do promotor *CUP1* é também referida aqui como GI-6301. A composição de imunoterapia de levedura *Brachyury* compreendendo um polinucleotídeo que codifica a proteína de fusão *Brachyury* humana representada por ID SEQ NO: 8, sob o controle do promotor *TEF2* (em vetor plu011) é também referida aqui como GI-6302. A composição de imunoterapia de levedura *Brachyury* compreendendo um polinucleotídeo que codifica a proteína de fusão *Brachyury* humana representada por ID SEQ NO: 8, sob o controle do promotor *TEF2* (em vetor pGI-172) é também referido aqui como GI-6303.

[000174] Culturas líquidas que faltam uridina (U2) ou que faltam uridina e leucina (UL2) foram inoculadas usando as placas e as culturas de arranque acima descritas, e foram cultivadas durante 20 horas a 30°C, 250 rpm. Meios tamponados de pH contendo 4,2 g/L de Bis-Tris (BT-U2; BT-UL2) foram também inoculados para avaliar imunoterapêuticos de levedura-*Brachyury* produzidos sob condições de produção de pH neutro (dados não mostrados). As culturas primárias foram usadas para inocular culturas finais da mesma formulação.

Receita de meios líquidos U2:

- 15 g/L de glicose
- 6,7 g/L de sulfato de amônio contendo base de nitrogênio de levedura
- 0,04 g/L de cada uma de histidina, triptofano, adenina e 0,06 g/L de leucina.

Receita de meios líquidos UL2:

- 15 g/L de glicose

- 6,7 g/L de sulfato de amônio contendo base de nitrogênio de levedura

- 0,04 g/L de cada uma de histidina, triptofano, e adenina.

[000175] Em experimentos iniciais comparando composições imunoterapêuticas de levedura *Brachyury* sob o controle de diferentes promotores, *CUP1*-direcionado (expressão induzível) expressão de levedura-*Brachyury* foi iniciada pela adição de sulfato de cobre 0,5 mM, após a cultura de levedura-*Brachyury* atingiu uma densidade de aproximadamente 0,2 Y.U./ml, e foi continuada até que a cultura atingiu uma densidade de 0,5-1,5 Y.U. (levedura-*Brachyury* dobrou apenas aproximadamente 1-1,5, após a adição de sulfato de cobre, mas uma grande quantidade de proteína *Brachyury* foi produzida pelas células). *TEF2*-direcionada de expressão de levedura-*Brachyury* é constitutiva, e o crescimento dessas células foi continuado até que as culturas atingiram uma densidade de, entre 1,1 a 4,0 Y.U./ml. As células de cada cultura foram em seguida colhidas, lavadas e mortas pelo calor a 56°C durante 1 hora em PBS. As células vivas a partir de cada cultura foram também processadas para efeitos de comparação.

[000176] Após morte por calor das culturas, as células foram lavadas três vezes em PBS. Expressão de proteína total foi medida por um ensaio de precipitação de TCA/ligação a nitrocelulose e *Western blot* usando um anticorpo monoclonal de marcação anti-his e um anticorpo anti-*Brachyury* (*Abcam, Cambridge, MA*). O teor de proteína foi quantificado usando métodos de imagem digitais semiquantitativos.

[000177] Os resultados dos experimentos de expressão inicial (dados não mostrados) demonstraram que cada uma das composições da imunoterapia de levedura *Brachyury* da invenção expressa a proteína de fusão *Brachyury*, isto é, utilizando o promotor *CUP1* ou o promotor *TEF2*, e expressão foi detectada usando meios (U2 e UL2). Além disso, a expressão de antígeno foi detectada em

ambas as células de levedura mortas pelo calor e vivas (dados não mostrados). Expressão de *Brachyury* foi significativamente mais elevada na composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* compreendendo o promotor *CUP1* (GI-6301), e assim essa composição foi selecionada para estudos adicionais, incluindo, otimização de expressão e para experimentos *in vitro* e *in vivo* (ver, Exemplos abaixo).

[000178] Fig. 1A mostra expressão de *Brachyury* em GI-6301 utilizando tanto meios U2 quanto UL2 usando o anticorpo anti-*Brachyury* para detecção. Levedura de controle que expressa um antígeno não-*Brachyury* não coram com o anticorpo. Fig. 1B mostra expressão de *Brachyury* nas mesmas preparações GI-6301, utilizando anticorpos anti-His para identificar a marcação de hexa-histidina na proteína de fusão *Brachyury*. Levedura de controle que expressa um antígeno não-*Brachyury*, mas apresentando uma cauda (*tag*) de hexa-histidina é também mostrada. Esses resultados mostraram boa expressão de *Brachyury* usando cada um dos meios, embora expressão em meios UL2 foi significativamente maior.

### **Exemplo 2**

[000179] O exemplo seguinte descreve a identificação de condições de expressão de antígeno e produção da composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury*, GI-6301.

[000180] Para determinar a densidade ótima para indução de cobre de expressão de antígeno GI-6301, culturas iniciadoras e intermediárias de GI-6301 foram preparadas usando as condições de crescimento padrão em meios UL2 descritos no Exemplo 1 acima. Alíquotas da cultura foram em seguida diluídas para 0,5 Y.U./ml, 1,0 Y.U./ml e 1,5 Y.U./ml e incubadas a 30°C durante 1 hora. CuSO<sub>4</sub> 0,5 mM foi adicionado às culturas para induzir expressão de *Brachyury*, e a cultura foi continuada. As células foram coletadas e contadas em 6

horas e 14 horas para medição de densidade celular. 20 Y.U. de levedura morta pelo calor de cada condição foi lisada, proteína total foi medida, e manchas (blots) de *Western* foram geradas utilizando os anticorpos anti-His.

**Tabela 1**

|                                | Tempo de Indução |         |          |
|--------------------------------|------------------|---------|----------|
| Densidade Celular<br>(Y.U./ml) | 0 horas          | 6 horas | 14 horas |
|                                | 0,5              | 1,03    | 0,96     |
|                                | 1,0              | 1,88    | 1,74     |
|                                | 1,5              | 3,14    | 2,7      |

[000181] Conforme mostrado na Tabela 1, levedura apenas dobrou em aproximadamente 1 hora após a indução de cobre (outros experimentos mostraram até 1,5X duplicação), e densidade e viabilidade celular (não mostradas) diminuíram após 6 horas de indução do cobre. Fig. 2 mostra que todas as três densidades de indução resultaram em expressão significativa de *Brachyury*, com uma tendência no sentido de maior expressão de *Brachyury* nas maiores densidades de indução. Contudo, experimentos adicionais usando densidades de partida de indução de 2,1 Y.U./ml e 2,8 Y.U./ml e 375  $\mu$ M de  $\text{CuSO}_4$  mostraram que a expressão da proteína começou a diminuir à medida que a densidade das culturas no início de indução de cobre aumentou, e não melhorou significativamente após aproximadamente 6-8 horas (dados não mostrados).

[000182] Em seguida, o efeito da quantidade de  $\text{CuSO}_4$  em expressão de *Brachyury* foi investigado. GI-6301 foi cultivado a partir de culturas iniciadoras e intermediários em meios UL2, como descrito no Exemplo 1. Alíquotas da cultura foram, em seguida, diluídas a 1,0 Y.U./ml e incubadas a 30°C durante 1 hora.  $\text{CuSO}_4$  foi adicionado a cada cultura sob uma concentração de 375  $\mu$ M, ou 500  $\mu$ M, e indução de expressão da proteína foi deixada prosseguir a vários pontos de tempo (2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 24 horas), em cujo ponto as

células foram colhidas, mortas pelo calor, e processadas para avaliação de expressão da proteína utilizando *Blots Western* de anti-His como descrito acima. Embora ambas as concentrações de  $\text{CuSO}_4$  resultaram em boa expressão de *Brachyury*, a expressão da proteína usando 375  $\mu\text{M}$  pareceu ser ligeiramente melhor, particularmente, em pontos de tempo posteriores (dados não mostrados).

[000183] Consequentemente, para levedura de *Brachyury* direcionada por *CUP1* (expressão induzível), os inventores descobriram que indução de expressão de antígenos em crescimento de fase *log* médio da levedura foi ótima para produção de antígeno. Para produção da composição imunoterapêutica de levedura-*Brachyury* (GI-6301) utilizada nos Exemplos seguintes, células foram cultivadas em meios UL2 como descrito no Exemplo 1 para entre 1 e 2 Y.U./ml, e foram, em seguida, induzidas pela adição de 0,375-0,5 mM de sulfato de cobre por até 6-8 horas a 30°C, 250 rpm. As células foram colhidas, lavadas e mortas por calor a 56°C durante 1 hora em PBS.

### **Exemplo 3**

[000184] O exemplo seguinte descreve a construção e produção de uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* adicional, em que o antígeno de *Brachyury* contém um epítipo agonista de células T.

[000185] Nesse experimento, levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) foi manipulada para expressar um antígeno de *Brachyury* humana que é uma proteína de *Brachyury* de comprimento total próximo que compreende o epítipo de célula T WLLPGTSTV (ID SEQ NO: 13), que é um epítipo de agonista. O epítipo de células T *Brachyury* nativo, presente em ID SEQ NO: 6 ou 8, por exemplo, é WLLPGTSTL (ID SEQ NO: 12). O antígeno agonista de *Brachyury* humana foi expresso sob o controle do promotor induzível por cobre, *CUP1*, produzindo

uma composição de imunoterapia de levedura-*Brachyury*. Mais particularmente, uma proteína de fusão que compreende um antígeno agonista de *Brachyury* (isto é, um antígeno de *Brachyury* contendo pelo menos um epítipo de agonista), foi produzida como um polipeptídeo único com os seguintes elementos de sequência fundidos na estrutura a partir de término N a término C, representada por ID SEQ NO: 20 (1), um peptídeo de término N para conferir resistência à degradação proteossômica e estabilizar a expressão (posições 1 a 6 de ID SEQ NO: 20, a sequência do peptídeo também aqui representada por ID SEQ NO: 11), (2) aminoácidos 2-435 de ID SEQ NO: 18 (representada por posições 7-440 de ID SEQ NO: 20; ID SEQ NO: 18 representa uma proteína de agonista *Brachyury* humana de comprimento total que apresenta uma única substituição de aminoácido na posição 254, quando comparada com proteína do tipo selvagem *Brachyury*), e (3) uma marca de hexa-histidina (posições 441-446 de ID SEQ NO: 20). O epítipo de agonista (ID SEQ NO: 13) é localizado nas posições 251 a 259 de ID SEQ NO: 20 (posições 246 a 254 de ID SEQ NO: 18). As sequências de aminoácidos utilizadas nessa proteína de fusão podem ser modificadas pela utilização de aminoácidos adicionais ou alternativos que flanqueiam cada extremidade do antígeno de *Brachyury*, se desejado, e as porções mais curtas do antígeno *Brachyury* também podem ser utilizadas. Uma sequência de ácido nucleico que codifica a proteína de fusão de ID SEQ NO: 20 (códon otimizado para expressão de levedura) é aqui representada por ID SEQ NO: 19.

[000186] Resumidamente, o DNA que codifica a proteína de *Brachyury* humana de comprimento total próximo, como descrita no Exemplo 1 (isto é, *Brachyury* de comprimento total menos a metionina de término N), modificado por mutagênese direcionada a sítio para introduzir uma substituição de valina por leucina na posição 254 em



relação à proteína de *Brachyury* de comprimento total, foi amplificado utilizando RCP, e, em seguida, inserido nos sítios de clonagem *EcoRI* e *SpeI* atrás do promotor *CUP1* (vetor pGI-100) em vetores de expressão de levedura de 2  $\mu$ M. As sequências de nucleotídeos que codificam o peptídeo de estabilização de término N, MADEAP (ID SEQ NO: 11) e um peptídeo de hexa-histidina de término C foram também adicionadas ao vetor de plasmídeo para codificar a proteína de fusão completa, representada por ID SEQ NO: 20. Os plasmídeos resultantes foram transformados em DH5 $\alpha$  para armazenamento de plasmídeo, e em *Saccharomyces cerevisiae* W303 $\alpha$  para produção da composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury*.

[000187] Transformação em *Saccharomyces cerevisiae* foi realizada por meio de transfecção de acetato de lítio/polietileno glicol, e transfectantes primários foram selecionados em placas mínimas sólidas que faltam uracila (UDM; meio de abandono de uridina). As colônias foram selecionadas por crescimento em meio UL2 (meio de abandono de uridina e leucina) a 30°C.

[000188] A composição de imunoterapia de levedura *Brachyury* compreendendo um polinucleotídeo que codifica a proteína de fusão agonista de *Brachyury* humana representada por ID SEQ NO: 20 sob o controle do promotor *CUP1* é também referida neste relatório como GI-6305.

[000189] Células GI-6305 foram cultivadas em meios UL2 conforme descrito no Exemplo 1 para, entre 1 e 2 Y.U./ml, e foram, em seguida, induzidas pela adição de sulfato de cobre 0,375-0,5 mM por até 6-8 horas a 30°C, 250 rpm, usando as condições desenvolvidas pelos inventores para GI-6301, conforme descrito no Exemplo 2. As células foram colhidas, lavadas e mortas por calor, a 56°C durante 1 hora em PBS.

[000190] Após morte por calor das culturas, as células foram lavadas

três vezes em PBS. Expressão de proteína total foi medida por meio de um ensaio de precipitação de TCA/ligação a nitrocelulose e por *Western blot* usando um anticorpo monoclonal de marca anti-his e um anticorpo anti-*Brachyury* (Abcam, Cambridge, MA). O teor de proteína foi quantificado usando métodos de imagem digital semiquantitativos.

[000191] Fig. 1C mostra a expressão robusta de antígeno de agonista de *Brachyury* em GI-6305 usando anti-His para identificar a marca de hexa-histidina na proteína de fusão *Brachyury*. O teor aproximado de antígeno para crescimento de GI-6305 em meio UL2 nesse experimento foi >22615 ng/Y.U.

#### **Exemplo 4**

[000192] O exemplo seguinte demonstra a expansão de células T específicas de *Brachyury* usando uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* da invenção.

[000193] Para determinar se as células T a partir de doadores normais foram capazes de gerar células T, que são específicas de antígeno de *Brachyury*, células dendríticas (DCs) foram preparadas a partir de células mononucleares sangüíneas periféricas (PBMCs) de dois doadores normais. Resumidamente, PBMCs isoladas foram cultivadas durante 5 dias na presença de GM-CSF e IL-4, e foram subsequentemente incubadas com levedura de controle (também denotada "YVEC", que é uma levedura de *Saccharomyces cerevisiae*, que é transformada com um vetor vazio, ou um vetor que não contém uma inserção que codifica antígeno) ou levedura de *Brachyury* (GI-6301, descrito nos Exemplos 1 e 2 acima), em uma proporção de levedura: DCs = 1:1. Após 48 horas de co-cultura, as DCs foram usadas como APCs para estimulação das células T autólogas. Cada ciclo de estimulação, designado como IVS (estimulação *in vitro*), consistiu de cultura de 3 dias, na ausência de IL-2, seguindo por 4 dias adicionais na presença de IL-2 recombinante (20 U/ml). No final de IVS 2, as células T foram marcadas com um tetrâmero

de controle ou um tetrâmero específico do peptídeo de *Brachyury* Tp2 (WLLPGTSTL, posições 246 a 254 de ID SEQ NO: 2 ou ID SEQ NO: 6). A Tabela 2 mostra a porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> coradas positivamente com cada tetrâmero.

**Tabela 2**

| Doador | Estimulação               | Tetrâmero de Controle | Tetrâmero de <i>Brachyury</i> |
|--------|---------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| 07706  | Levedura de Controle      | 0,21                  | 0,30                          |
|        | Levedura <i>Brachyury</i> | 0,28                  | <b>0,67</b>                   |
| 17663  | Levedura de Controle      | 0,04                  | 0,29                          |
|        | Levedura <i>Brachyury</i> | 0,05                  | <b>0,54</b>                   |

[000194] Em um segundo experimento, as células dendríticas (DCs) foram preparadas a partir de PBMCs de nove doadores normais, usando uma cultura de 5 dias na presença de GM-CSF e IL-4, subsequentemente, incubadas com levedura *Brachyury* (GI-6301), em uma proporção de levedura: DCs = 1:1, como descrito acima. Após 48 horas em co-cultura, as DCs foram usadas como APCs para estimulação de células T autólogas. Cada ciclo de IVS foi realizado conforme descrito acima. No final de IVS 2, as células T foram marcadas com um tetrâmero de controle ou um tetrâmero específico do peptídeo de *Brachyury* Tp2. A Tabela 3 mostra a porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> coradas positivamente com cada tetrâmero.

**Tabela 3**

| Doador | Estimulação             | Tetrâmero de Controle | Tetrâmero de <i>Brachyury</i> |
|--------|-------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| 07706  | Leved. <i>Brachyury</i> | 0,28                  | <b>0,67</b>                   |
| 17663  | Leved. <i>Brachyury</i> | 0,05                  | <b>0,54</b>                   |
| 32249  | Leved. <i>Brachyury</i> | 0,01                  | <b>1,24</b>                   |
| 29004  | Leved. <i>Brachyury</i> | 0,02                  | <b>0,36</b>                   |
| 19063  | Leved. <i>Brachyury</i> | 0,10                  | <b>2,57</b>                   |
| 06852  | Leved. <i>Brachyury</i> | 0,05                  | <b>0,33</b>                   |
| 26532  | Leved. <i>Brachyury</i> | 0,07                  | 0,11                          |
| 12172  | Leved. <i>Brachyury</i> | 0,01                  | 0,11                          |
| 26725  | Leved. <i>Brachyury</i> | 0,01                  | 0,20                          |

[000195] Os resultados nas Tabelas 2 e 3 mostram que estimulação de células T doadoras normais com um imunoterapêutico de levedura *Brachyury* da invenção aumenta a porcentagem de células T CD8<sup>+</sup>

positivas a tetrâmero em uma maioria dos doadores normais, quando comparada com controles, indicando que células T humanas normais apresentam a capacidade de reconhecer *Brachyury* como um imunógeno.

### **Exemplo 5**

[000196] O exemplo seguinte demonstra a capacidade de uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* gerar CTLs específicas de *Brachyury* a partir de PBMCs de doador normal que lise alvos expressando *Brachyury*

[000197] Nesse experimento, células T específicas de *Brachyury* de três dos doadores normais da Tabela 2 acima foram expandidas *in vitro*, utilizando DCs incubadas com levedura *Brachyury* (GI-6301) por 2 ciclos de IVS (conforme descrito no Exemplo 4). Uma terceira IVS foi realizada com DCs maduras, em presença de CD40L e pulsada com o peptídeo Tp2 específico de *Brachyury* (WLLPGTSTL, posições 246 a 254 de ID SEQ NO: 2 ou ID SEQ NO: 6). No dia 5, as células T CD8<sup>+</sup> foram isoladas e utilizadas em um ensaio citotóxico de linfócito T (CTL) durante a noite contra SW480 (HLA-A2<sup>+</sup>/*Brachyury* alto) e MCF7 (HLA-A2<sup>+</sup>/*Brachyury* baixo) alvos celulares tumorais, nas razões de efetor:alvo indicadas (EA) (ver, Figura 3.). Na Tabela 4, é mostrada a porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> que foram coradas positivamente com um tetrâmero de controle versus um tetrâmero Tp2 específico de *Brachyury*.

**Tabela 4**

| <b>Doador Normal</b> | <b>Estimulação</b>                | <b>Tetrâmero de Controle</b> | <b>Tetrâmero de <i>Brachyury</i></b> |
|----------------------|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| 07706                | Levedura<br><i>Brachyury</i> /Tp2 | 0,33                         | <b>1,84</b>                          |
| 17663                | Levedura<br><i>Brachyury</i> /Tp2 | 0,11                         | <b>0,65</b>                          |
| 26532                | Levedura<br><i>Brachyury</i> /Tp2 | 0,05                         | 0,11                                 |

[000198] Figuras 3A (doador 07706), 3B (doador 17663) e 3C (doador 26532) mostram que PBMCs de dois dos três doadores

normais foram capazes de gerar CTLs CD8<sup>+</sup> que poderiam matar alvos expressando *Brachyury*. Tomados juntamente, esses dados demonstram que as composições imunoterapêuticas de levedura *Brachyury* podem gerar CTLs específicos de *Brachyury* que são capazes de matar uma célula tumoral que expressa *Brachyury*.

[000199] A fim de mostrar que imunoterapia de levedura *Brachyury* pode induzir CTLs específicos a *Brachyury* na ausência de pulsação com um peptídeo específico (isto é, através de geração de CTLs contra potencialmente vários diferentes epítomos de CTL), experimentos adicionais foram realizados utilizando células T doadoras normais expandidas *in vitro* utilizando apenas a composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury*, GI-6301 (isto é, nenhum pulso de peptídeo). Resumidamente, as células T específicas de *Brachyury* de PBMC de doadores normais (doador 19063) foram expandidas *in vitro* utilizando DCs incubadas com GI-6301 por 2 ciclos de IVS (como descrito no Exemplo 4). No dia 5, as células T CD8<sup>+</sup> foram isoladas e usadas em um ensaio de CTL durante a noite contra as células tumorais SW480 (HLA-A2 positivo/*Brachyury* alto) e H226 (HLA-A2 negativo/*Brachyury* elevado), em uma razão de efector:alvo (EA) de 15:1. Fig. 4A mostra a porcentagem de lise específica de células tumorais SW480 e H226. Fig. 4B mostra a expressão de RNAm de *Brachyury* em relação àquela de GAPDH em células tumorais SW480 e H226 por RT-RCP em tempo real. Esses experimentos demonstram adicionalmente que a composição imunoterapêutica de levedura-*Brachyury* pode gerar CTLs específicas de *Brachyury* que são capazes de matar uma célula tumoral que expressa *Brachyury*.

### **Exemplo 6**

[000200] O exemplo seguinte demonstra que uma composição de levedura *Brachyury* da invenção pode expandir células T específicas

de *Brachyury* a partir de pacientes com câncer.

[000201] Nesse experimento, DCs foram preparadas a partir do PBMCs de dois pacientes com câncer de mama, pós-vacinação com vacinas de veto viral compreendendo antígenos CEA e MUC-1. As DCs foram preparadas em uma cultura de 5 dias na presença de GM-CSF e IL-4, como descrito no Exemplo 4, seguido por incubação na presença de levedura *Brachyury* (GI-6301), em uma razão de levedura: DCs = 1:1. Após 48 horas de co-cultura, as DCs foram usadas como APCs para estimulação de células T autólogas. Cada ciclo de IVS consistiu de três dias, na ausência de IL-2, seguindo por quatro dias adicionais na presença de 20 U/ml de IL-2 recombinante. Mostrada na Tabela 5 é a porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> (IVS1) que foram coradas positivamente com um tetrâmero de controle ou um tetrâmero específico do peptídeo Tp2 de *Brachyury*.

**Tabela 5**

| <i>Paciente</i> | <i>Estimulação</i>        | <i>Tetrâmero de Controle</i> | <i>Tetrâmero de Brachyury</i> |
|-----------------|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Mama Pt 01      | Levedura <i>Brachyury</i> | 0,11                         | <b>0,42</b>                   |
| Mama Pt 10      | Levedura <i>Brachyury</i> | 0,23                         | <b>0,91</b>                   |

[000202] Os resultados na Tabela 5 demonstram que estimulação de células T a partir de doadores de câncer de mama com um imunoterapêutico de levedura *Brachyury* da invenção aumenta a porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> de tetrâmero-positivo na maioria dos doadores, quando comparados com os controles, indicando que as células T a partir de doadores com câncer existente apresentam a capacidade de reconhecer *Brachyury* como um imunógeno.

### **Exemplo 7**

[000203] O exemplo seguinte demonstra a geração de respostas de células T CD4<sup>+</sup> específicas de *Brachyury in vivo* usando imunoterapia de levedura *Brachyury*.

[000204] Nesse experimento, camundongos C57BL/6 foram

vacinados semanalmente por um total de 4 vezes com 4 Y.U. de levedura *hBrachyury* (GI-6301), administradas em quatro locais de injeção separada em 1 Y.U. por local). Duas semanas após o reforço final, os camundongos foram sacrificados e as células T CD4<sup>+</sup> foram purificadas e testadas para proliferação na presença de várias concentrações de proteína *Brachyury* purificada (obtida a partir de células de inseto). Como um controle,  $\beta$ -Gal foi utilizado em 40  $\mu$ g/ml.

[000205] Os resultados que mostram a proliferação de células T CD4<sup>+</sup> isoladas a partir dos baços de animais vacinados com a levedura de controle (YVEC, ver Exemplo 4) e levedura *hBrachyury* (GI-6301), são mostrados na Fig. 5. Fig. 5 mostra que imunização com a levedura-*Brachyury* (GI-6301) gera células T CD4<sup>+</sup> específicas de *Brachyury*.

### **Exemplo 8**

[000206] O exemplo seguinte demonstra que imunização com composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* reduz tumores expressando *Brachyury in vivo*.

[000207] Nesse experimento, camundongos C57BL/6 receberam  $1 \times 10^6$  células MC38-*phBrachyury* (células tumorais MC38 expressando uma *Brachyury* humana recombinante) via veia da cauda (dia 0). Quatro dias pós-implantação do tumor, os animais começaram a receber vacinas semanais com controle de levedura (YVEC, ver Exemplo 4) versus levedura *hBrachyury* (GI-6301), administradas em uma dose de 1 Y.U. por local em quatro locais diferentes (4 Y.U. total por dose). No dia 40 pós-implantação do tumor, os animais foram sacrificados e o número de nódulos tumorais pulmonares foi avaliado. Os resultados de dois experimentos combinados são mostrados na Fig. 6. A Tabela 6 mostra o número de tumor pulmonar médio ( $\pm$  SEM) e o número (e porcentagem) de animais portadores  $\geq 5$  de nódulos pulmonares.

**Tabela 6**

| <b>Tratamento com Vacina</b>         | <b>Tumores Pulmonares (médio <math>\pm</math> SEM)</b> | <b>Animais Portadores <math>\geq</math> 5 de nódulos Pulmonares (%)</b> |
|--------------------------------------|--|---|
| Controle-Levedura (YVEC)             | 4,1 $\pm$ 1,2  | 7/15 (46,7%)  |
| Levedura- <i>Brachyury</i> (GI-6301) | 1,9 $\pm$ 0,5  | 2/15 (13,3%)  |

[000208] Os resultados na Fig. 6 e Tabela 6 demonstram que administração de uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* da invenção é capaz de reduzir tumores expressando *Brachyury* em camundongos, quando comparados com camundongos que receberam levedura isolada (nenhum antígeno de *Brachyury*).

### **Exemplo 9**

[000209] O exemplo seguinte demonstra a geração de respostas de células T CD4<sup>+</sup> específicas de *Brachyury in vitro* utilizando imunoterapia de levedura *Brachyury* em células mononucleares sangüíneas periféricas humanas (PBMCs) obtidas de doadores saudáveis.

[000210] Nos experimentos seguintes, uma proteína de *Brachyury* humana de comprimento total foi expressa em células de inseto via expressão de baculovírus e subsequentemente purificada.

[000211] Células dendríticas (DCs) foram preparadas a partir de PBMCs de doadores saudáveis por cultura de 5 dias com GM-CSF e IL-4 e, subsequentemente tratados *in vitro* com controle de levedura (YVEC, ver Exemplo 4), ou levedura *Brachyury* (GI-6301, ver exemplos 1 e 2) (razão levedura:DCs = 1:1). Após 48 horas, DCs foram colhidas, irradiadas (30 Gy) e usadas para estimulação de PBMCs autólogas, em uma razão DC:PBMC = 1:10. No dia 3, IL-2 (10 U/ml) foi adicionada às culturas. No dia 7, as células T estimuladas foram colhidas e testadas subsequentemente para produção de IFN- $\gamma$



em resposta a, PBMCs autólogas irradiadas (razão células T:PBMC = 1:3), isoladamente ou na presença de 10 µg/ml de proteína purificada *Brachyury* ou controle de proteína soroalbumina humana. Após 96 horas de estimulação, os sobrenadantes foram coletados e avaliados para níveis de IFN- $\gamma$  por ensaio ELISA. Um total de 9 doadores saudáveis foi avaliado, com 3/9 doadores demonstrando respostas de células T CD4<sup>+</sup> específicas de *Brachyury* pós-estimulação *in vitro* com DCs tratadas com levedura *Brachyury*. Os resultados para 3 casos positivos são apresentados na Tabela 7 (valores indicam os níveis de IFN- $\gamma$  em resposta para proteína *Brachyury*, após subtração de níveis de base induzidos por estimulação com proteína de controle soroalbumina humana; em relação a 3 doadores, dois ciclos de estimulação foram realizados antes de avaliar resposta para proteína de *Brachyury*).

**Tabela 7**

| Doador ID | Estimulação de DC         | $\Delta$ IFN- $\gamma$<br>(pg/ml) |
|-----------|---------------------------|-----------------------------------|
| 1         | Controle de Levedura      | 1500,0                            |
|           | Levedura <i>Brachyury</i> | <b>2950,0</b>                     |
| 2         | Controle de Levedura      | 13,4                              |
|           | Levedura <i>Brachyury</i> | <b>889,0</b>                      |
| 3         | Controle de Levedura      | 17,4                              |
|           | Levedura <i>Brachyury</i> | <b>102,8</b>                      |

[000212] Seis doadores saudáveis adicionais foram avaliados para respostas de células T CD4<sup>+</sup> à proteína de *Brachyury*, após estimulação *in vitro* com DCs tratadas com levedura-*Brachyury* (GI-6301) através de coloração de citocinas intracelulares de IFN- $\gamma$  em células CD4<sup>+</sup>. As células dendríticas foram preparadas a partir de PBMCs de doadores saudáveis, por cultura de 5 dias com GMCSF e IL-4 e, subsequentemente, tratados *in vitro* com controle de levedura

(YVEC) ou levedura *Brachyury* (GI-6301) (razão de levedura:DCs = 1:1). Após 48 horas, as DCs foram colhidas, irradiadas (30 Gy) e usadas para estimulação de PBMCs autólogas, em uma razão de DC:PBMCs = 1:10. No dia 3, IL-2 (10 U/ml) foi adicionada às culturas. No dia 7, as células T estimuladas foram colhidas e testadas subsequentemente para produção de IFN- $\gamma$  em resposta às PBMCs autólogas (razão de células T:PBMCs = 1:3), isoladamente ou na presença de 10  $\mu$ g/ml de proteína *Brachyury* purificada ou controle de proteína soroalbumina humana. Após 2 horas de estimulação, inibidor de transporte de proteína *BD GOLGISTOP™* (*BD Biosciences*) foi adicionado às culturas. Após 4 horas de estimulação, as células foram colhidas, permeabilizadas, e coradas para CD4<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$  utilizando anticorpos anti-CD4 PerCP-Cy5.5 e anti-IFN- $\gamma$  FITC (*BD Biosciences*). Um total de 6 doadores saudáveis foi avaliado, com 2/6 doadores demonstrando respostas de células T CD4<sup>+</sup> específicas de *Brachyury* pós-estimulação *in vitro* com DCs tratadas com levedura *Brachyury*. Os resultados para os casos positivos são apresentados na Tabela 8 (valores indicam a porcentagem de células T que foram simultaneamente positivas para CD4 e IFN- $\gamma$  intracelular em resposta para controle de albumina sérica humana (HSA) ou proteína *Brachyury* humana, após subtração dos níveis de base induzidos por estimulação com PBMCs isoladas).

**Tabela 8**

| Doador | Número de estimulações<br><i>in vitro</i> | % de células CD4 <sup>+</sup> /IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> |                  |
|--------|---|---|------------------|
|        |   | HSA   | <i>Brachyury</i> |
| 4      | 1   | 0,07  | <b>0,24</b>      |
| 5      | 2   | 0,00  | <b>1,00</b>      |

**Exemplo 10**

[000213] O exemplo seguinte demonstra que uma composição de

imunoterapia de levedura *Brachyury* expressando um antígeno agonista de *Brachyury* gera células T específicas de *Brachyury* a partir de um paciente com câncer de próstata.

[000214] Para gerar uma linhagem de células T específicas de *Brachyury*, células dendríticas autólogas imaturas (DCs) foram expostas à composição de imunoterapia de levedura *Brachyury* conhecida em GI-6305 (ver, Exemplo 3) em uma razão de DCs:GI-6305 = 1:1 por 48 horas, e subsequentemente, usada como células apresentando antígeno (APCs) para estimular células autólogas não aderentes em uma razão efetuator-para-APC de 10:1. Culturas foram incubadas durante 3 dias a 37°C, em uma atmosfera umidificada contendo CO<sub>2</sub> a 5%, e subsequentemente, suplementadas com IL-2 humano recombinante em uma concentração de 20 U/ml por um adicional de 7 dias. A cultura no dia 10, constituída de um ciclo de estimulação *in vitro* (IVS). As células T foram novamente estimuladas com DCs autólogas expostas a GI-6305, conforme descrito acima, no dia 11, para começar o ciclo de IVS seguinte. DCs autólogas expostas a GI-6305 foram usadas como APCs para três ciclos de IVS. Após a terceira IVS, células B transformadas por EBV autólogas irradiadas (23.000 rads.), pulsadas com um peptídeo de agonista de *Brachyury*, WLLPGTSTV (ID SEQ NO: 13), foram usadas como APCs. Uma linhagem de células T específicas de *Brachyury*, denotada, T-2-BR-A, foi estabelecida. Essa linhagem de células T foi utilizada nos imunoensaios descritos abaixo.

[000215] Tabela 9 demonstra que as células T específicas de *Brachyury* (T-2-BR-A) liberam níveis significativos de IFN- $\gamma$  após estimulação com DCs alogênicas tratadas com GI-6305, visto que controle de levedura (YVEC, ver Exemplo 4), não estimulou a liberação de IFN- $\gamma$  por células T-2-BR-A. Os resultados são expressos em pg/ml/10<sup>5</sup> células T. Resumidamente, DCs alogênicas positivas a

HLA-A2 de um doador normal foram tratadas com GI-6305 por 48 horas em várias razões de levedura para DC (indicadas na Tabela 9), e, em seguida, utilizadas para estimular células T específicas do epítipo agonista de *Brachyury* (T-2-BR-A). Nesse experimento, a razão de DC para célula T foi de 1:10.

**Tabela 9**

| Células Dendríticas | Tratamento           | Razão de Levedura/DC | Células T | IFN- $\gamma$ |
|---------------------|----------------------|----------------------|-----------|---------------|
| +                   | Levedura de controle | 10:1                 | -         | <15,6         |
| +                   | Levedura de controle | 10:1                 | +         | <15,6         |
| -                   | -                    | -                    | +         | 52,1          |
| +                   | GI-6305              | 10:1                 | -         | <15,6         |
| +                   | GI-6305              | 10:1                 | +         | <b>589,0</b>  |
| +                   | GI-6305              | 5:1                  | -         | <15,6         |
| +                   | GI-6305              | 5:1                  | +         | <b>661,1</b>  |
| +                   | GI-6305              | 2,5:1                | -         | <15,6         |
| +                   | GI-6305              | 2,5:1                | +         | <b>341,3</b>  |
| +                   | GI-6305              | 1:1                  | -         | <15,6         |
| +                   | GI-6305              | 1:1                  | +         | <b>388,2</b>  |

[000216] Tabela 10 demonstra que células T específicas de *Brachyury* estabelecidas usando DCs tratadas com GI-6305 podem eficazmente fazer lise de células de câncer de mama MDA-MB-231 que são positivas para HLA-A2/positivas para *Brachyury*, mas não faz lise de células de câncer pancreático ASPC-1 que são negativas para HLA-A2/positivas para *Brachyury*. Resumidamente, a linhagem de células T específicas de *Brachyury* T-2-BR-A foi utilizada em IVS-6 em um ensaio citotóxico de linfócito T durante a noite, contra alvos de células tumorais MDA-MB-231 (HLA-A2<sup>+</sup>/*Brachyury*<sup>+</sup>) e ASPC-1 (HLA-A2<sup>-</sup>/*Brachyury*<sup>+</sup>), nas razões de efetor:alvo indicadas (EA) (ver Tabela

10). Os resultados são expressos como a percentagem de lise específica.

**Tabela 10**

| Razão 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)  |

[000217] Em outro experimento, avaliou-se a capacidade da linhagem de células T-2-BR-A ligar-se aos tetrâmeros de HLA-A2 específicos de *Brachyury*. Resumidamente, as células T-2-BR-A (usadas em IVS-4) foram coradas com um tetrâmero de controle ou um tetrâmero específico para o peptídeo agonista de *Brachyury*. Figuras 7A e 7B mostram que 10,8% de células T CD8<sup>+</sup> na linhagem de células T-2-BR-A gerada com DCs tratadas com GI-6305 especificamente ligam-se a um tetrâmero HLA-A2 de *Brachyury* (Fig. 7B) e não a um tetrâmero de controle (Fig. 7A).

[000218] Expressão de perforina da linhagem de células T, T-2-BR-A foi analisada por citometria de fluxo (perforina é um mediador da atividade citolítica de linfócitos T citotóxicos (CTLs)). Resumidamente, as células T foram testadas no dia 5 após reestimulação com células B autólogas transformadas por EBV pulsadas com peptídeo agonista de *Brachyury*. Fig. 8 mostra a expressão de perforina na linhagem de célula T-2-BR-A, após estimulação com células B autólogas pulsadas com peptídeo agonista de *Brachyury*, demonstrando adicionalmente a capacidade citotóxica dessa linhagem de células T específicas de *Brachyury*, que foi gerada usando DCs tratadas com GI-6305.

### **Exemplo 11**

[000219] O exemplo seguinte descreve um ensaio clínico fase 1 em indivíduos com câncer positivo a *Brachyury*.

[000220] Um ensaio clínico fase 1 de estudo aberto, escalonamento de dose seqüencial foi iniciado utilizando a composição de imunoterapia de

levedura *Brachyury* conhecida como GI-6301, descrita nos Exemplos 1, 2 e 4-9. Sob esse protocolo de ensaio clínico, 9-18 pacientes com câncer (3-6 pacientes por grupo de dose) são administrados a composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* conhecida como GI-6301 em um protocolo de escalonamento por grupo de dose sequencial utilizando faixas de dose de 4 Y.U. (1 Y.U. x 4 sítios, significando que 1 Y.U. de GI-6301 é administrada em 4 diferentes locais no corpo do paciente, em cada visita), 16 Y.U. (4 Y.U x 4 sítios) e 40 Y.U. (10 Y.U. x 4 sítios), administrada por via subcutânea. GI-6301 é administrada em intervalos de 2 semanas para um total de sete visitas (~ 3 meses), e em seguida, mensalmente, por conseguinte, até que os pacientes satisfaçam critérios fora de estudo. Um grupo de pacientes de expansão (n = 10), em dose máxima tolerada (DMT) ou a melhor dose observada são selecionados para estudo adicional. Os resultados são segurança de monitoração e tolerabilidade como um ponto final primário, e no grupo de expansão, se uma alteração significativa em precursores de células T é detectável quando medida por um aumento em células T específicas de *Brachyury* no ensaio *ELISpot* e proliferação em resposta à proteína *Brachyury* (por exemplo, células T CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup> específicas de *Brachyury* ou emergentes ou expansivas no tratamento). Como pontos finais secundários, benefício clínico, tais como, sobrevivência livre de progressão, resposta clínica radiográfica, redução em marcadores séricos e/ou redução em células tumorais circulantes é medido, bem como parâmetros de ativação imune geral, incluindo, frequência de subconjuntos de células imunes em sangue periférico (células T CD8<sup>+</sup> de memória/efetoras, células CD4<sup>+</sup> de memória/efetoras, *Tregs*, células NK, células dendríticas-DCs), e as alterações nos níveis séricos de citocinas (por exemplo, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12, IL-2, IL-4, TGF- $\beta$ , etc.).

[000221] GI-6301 espera-se que seja segura e bem tolerada, sem toxicidades significativas. Além disso, GI-6301 é esperada produzir

respostas de células T específicas de *Brachyury* emergentes do tratamento ou uma melhoria nas respostas das células T de base de referência pré-existentes específicas de *Brachyury*, pelo menos algum, ou uma maioria de pacientes. Alguns pacientes também se espera que tenham doença estabilizada.

[000222] Em um estudo adicional ou uma expansão desse estudo, a composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* conhecida como GI-6305 (ver Exemplo 3) é administrada a um grupo adicional de pacientes, utilizando a dose máxima tolerada ou a melhor dose observada determinada acima, e os mesmos pontos finais primários e secundários são medidos. GI-6305, também se espera que seja segura e bem tolerada, sem toxicidades significativas, bem como produzir as respostas das células T específicas de *Brachyury* emergentes do tratamento ou uma melhoria nas respostas das células T de base de referência pré-existentes específicas de *Brachyury*, pelo menos algum, ou uma maioria de pacientes. Alguns pacientes também se espera que tenham doença estabilizada.

### **Exemplo 12**

[000223] O exemplo seguinte descreve um ensaio clínico de fase 2 utilizando composições imunoterapêuticas de levedura *Brachyury*.

[000224] Um ensaio clínico randomizado de fase 2, em pacientes com câncer de mama é realizado utilizando uma composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury*, como descrita no Exemplo 1 e 2 (por exemplo, GI-6301) ou, no Exemplo 3 (GI-6305). Pelo menos 100 ou mais indivíduos com câncer de mama positivo a *Brachyury* de estágio I, II ou III são inscritos. Critérios de inclusão dos indivíduos podem incluir indivíduos com cânceres de grau 1, 2 ou 3. Critérios, incluindo indivíduos também podem incluir indivíduos com câncer de mama "triplo negativo" (cânceres que são negativos para cada um de receptores de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e

HER2). Critérios de inclusão de indivíduos também podem incluir pacientes com câncer negativo para nódulo linfático.

[000225] O ensaio é processado como um ensaio multicêntrico, duplo-cego, ou aberto, controlado por placebo. Todos os pacientes recebem terapia padrão de cuidados com pacientes do braço de tratamento recebendo várias injeções em série de composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* durante o tratamento. O ponto final primário é sobrevida livre de recorrência ou sobrevida total. Pontos finais adicionais podem incluir respostas de células T específicas de antígeno (por exemplo, células T CD8<sup>+</sup> específicas de *Brachyury* emergentes ou expansivas no tratamento), manutenção de negatividade de nódulo linfático, progressão a metástases, e expressão de *Brachyury* em células tumorais.

[000226] A composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* é esperada ser segura e bem tolerada, sem toxicidades significativas. Além disso, a composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* é esperada produzir respostas de células T específicas de *Brachyury* emergentes do tratamento e/ou uma melhoria nas respostas de células T de base de referência pré-existentes específicas de *Brachyury* em, pelo menos algum, ou uma maioria de pacientes. Alguns ou uma maioria de pacientes também são esperados apresentar doença estabilizada, manter negatividade de nódulo linfático, e/ou prevenção, redução ou parada na progressão metastática.

[000227] Embora várias modalidades da presente invenção sejam descritas em detalhes, é evidente que modificações e adaptações dessas modalidades ocorrerão àqueles versados no estado da técnica. Deve ser expressamente entendido, contudo, que tais modificações e adaptações estão dentro do escopo da presente invenção, conforme apresentadas nas reivindicações seguintes exemplares.



## REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma composição imunoterapêutica compreendendo:

(a) uma levedura inteira inativada; e

(b) uma proteína de fusão de *Brachyury*,

caracterizado pelo fato de que é na preparação de um medicamento para reduzir, deter, reverter, retardar ou impedir a progressão metastática de câncer em um indivíduo que tem câncer, em que a proteína de fusão de *Brachyury* tem uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 6, posições 2-435 da SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 18 ou posições 2-435 da SEQ ID NO: 18.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a expressão de *Brachyury* não é detectada no câncer do indivíduo no momento em que a composição é primeiro administrada.

3. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a expressão de *Brachyury* é detectada no câncer do indivíduo no momento em que a composição é primeiro administrada.

4. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado dentre o grupo que consiste em: câncer de mama, câncer de intestino delgado, câncer de estômago, câncer pancreático, câncer de rim, câncer de bexiga, câncer uterino, câncer ovariano, câncer testicular, câncer de pulmão, câncer de colon, câncer de próstata, leucemia linfocítica crônica (CLL), células B transformadas pelo vírus do *Epstein-Barr*, linfoma de *Burkitt*, linfoma de *Hodgkin* e cânceres metastáticos destes.

5. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as composições imunoterapêuticas adicionais compreendem um veículo de levedura e um segundo antígeno de câncer que não inclui antígeno de *Brachyury*.

6. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado

pelo fato de que o segundo antígeno de câncer é selecionado dentre o grupo que consiste em: Ras mutante, antígeno carcinoembrionário (CEA), MUC-1, EGFR, BCR-Ab1, 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, polipose adenomatosa *coli* (APC), Myc, proteína de *Von Hippel-Lindau* (VHL), Rb-1, Rb-2, receptor andrógeno (RA), Smad4, MDR1, Flt-3, BRCA-1, BRCA-2, pax3-fkhr, ewsfli-1, HERV-H, HERV-K, TWIST, Mesotelina e NGEF.

7. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a proteína de fusão de *Brachyury* apresenta uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 18 ou SEQ ID NO: 6.

8. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a proteína de fusão apresenta uma sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8 ou SEQ ID NO: 20.

9. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a expressão da proteína de fusão está sob controle do promotor *CUP1*.

10. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a proteína de fusão de *Brachyury* é expressa por uma levedura.

11. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que a composição é formulada em um excipiente farmacologicamente aceitável adequado para administração a um indivíduo.

12. Composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury*, caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) uma levedura inteira inativada;

(b) um antígeno expresso pelo veículo de levedura e compreendendo pelo menos um antígeno de *Brachyury*, em que o antígeno de *Brachyury* compreende uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 18, posições 2-435 da SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 6 ou posições 2-435 da SEQ ID NO: 6, e

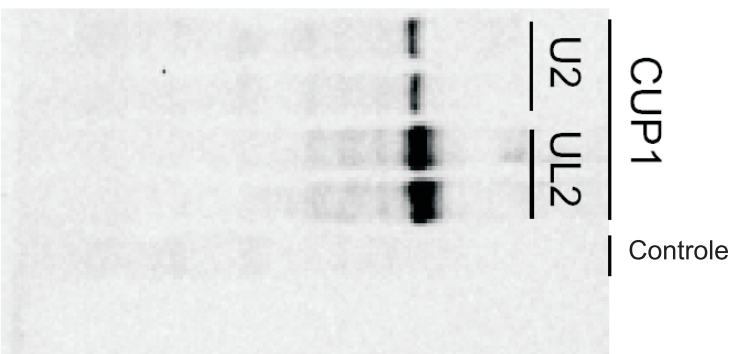
(c) um excipiente farmacologicamente aceitável adequado para administração a um ser humano.

13. Composição imunoterapêutica de levedura *Brachyury* de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de uma doença.

14. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem câncer em estágio I, câncer em estágio II, câncer em estágio III ou câncer em estágio IV.

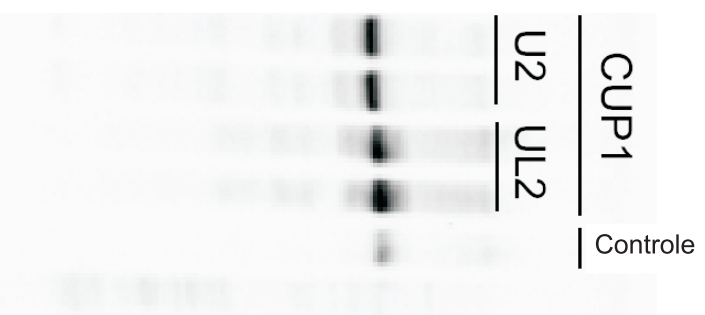
15. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que a levedura é de *Saccharomyces cerevisiae*.

FIG. 1A



Anti-Brachyury

FIG. 1B



Anti-His

FIG. 1C

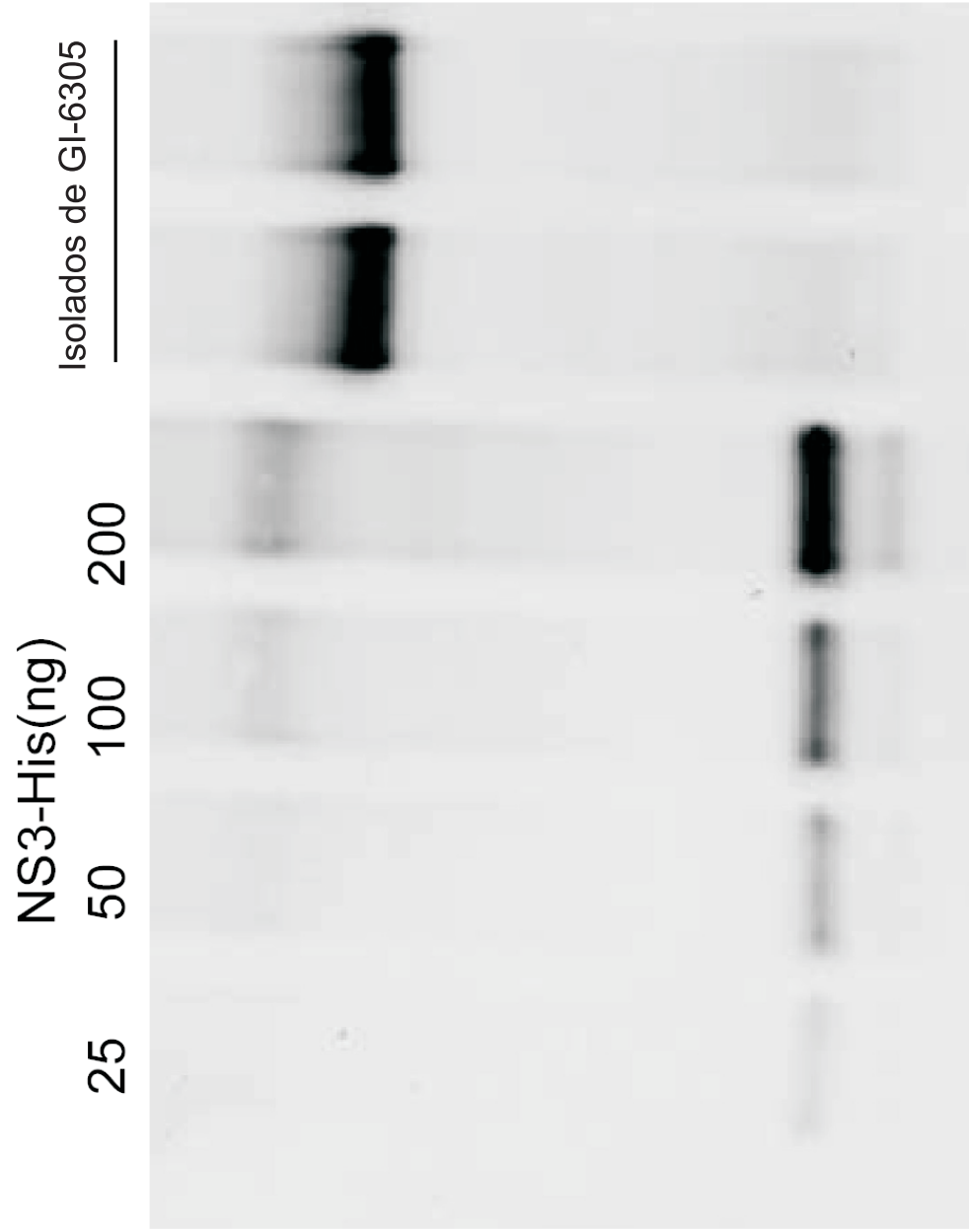
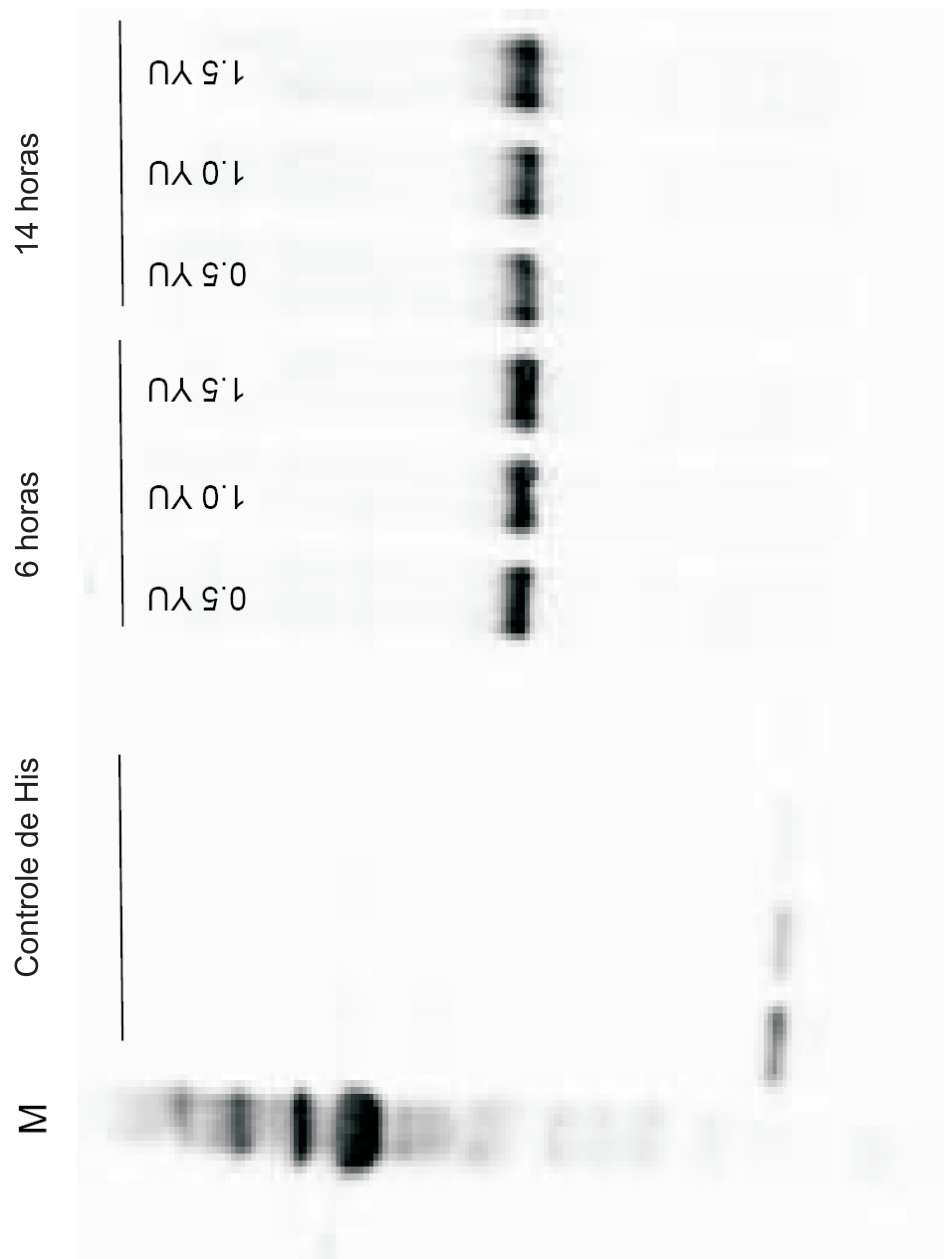


FIG. 2



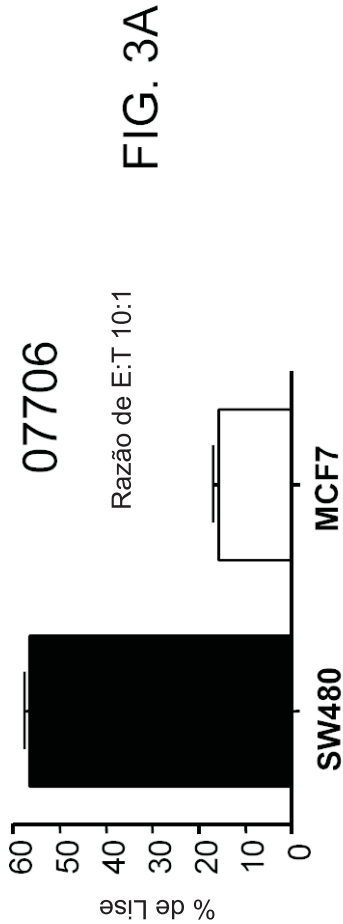


FIG. 3A

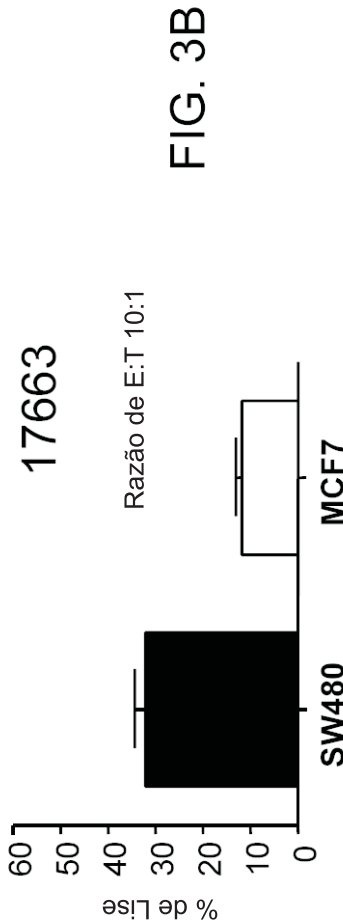


FIG. 3B

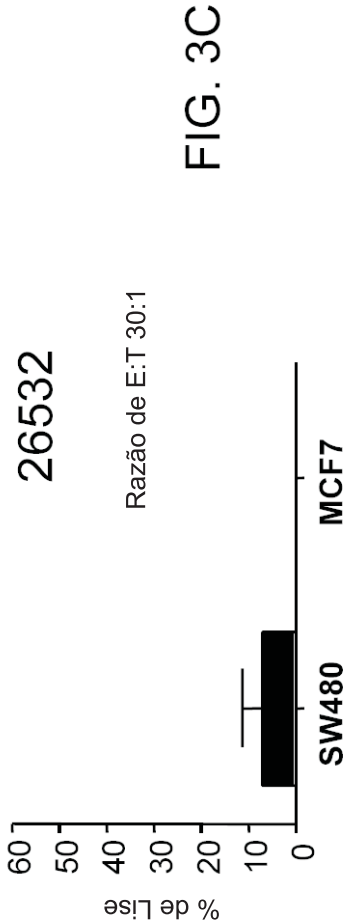


FIG. 3C

FIG. 4A

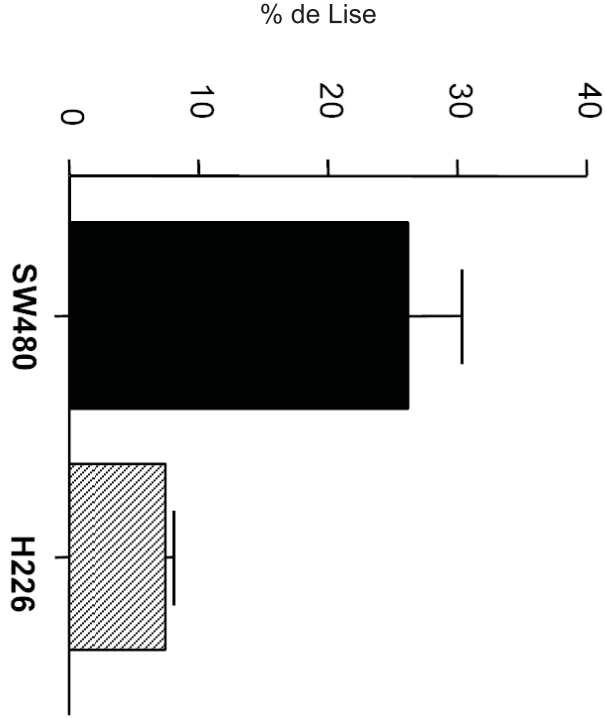


FIG. 4B

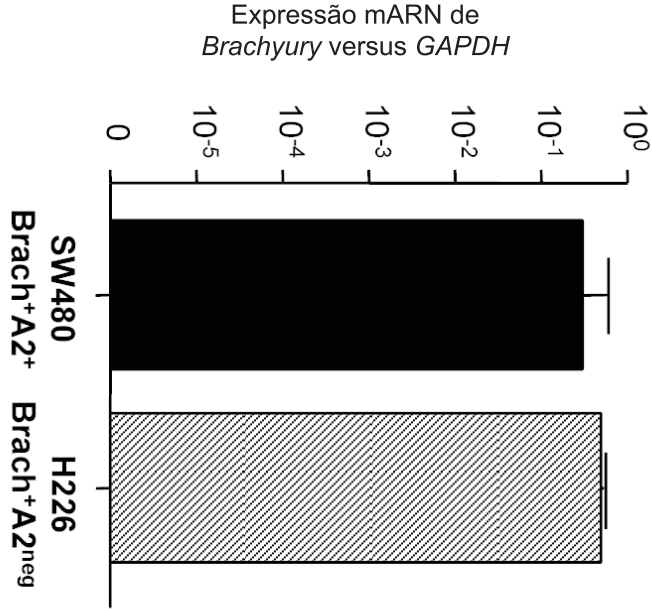




FIG. 5

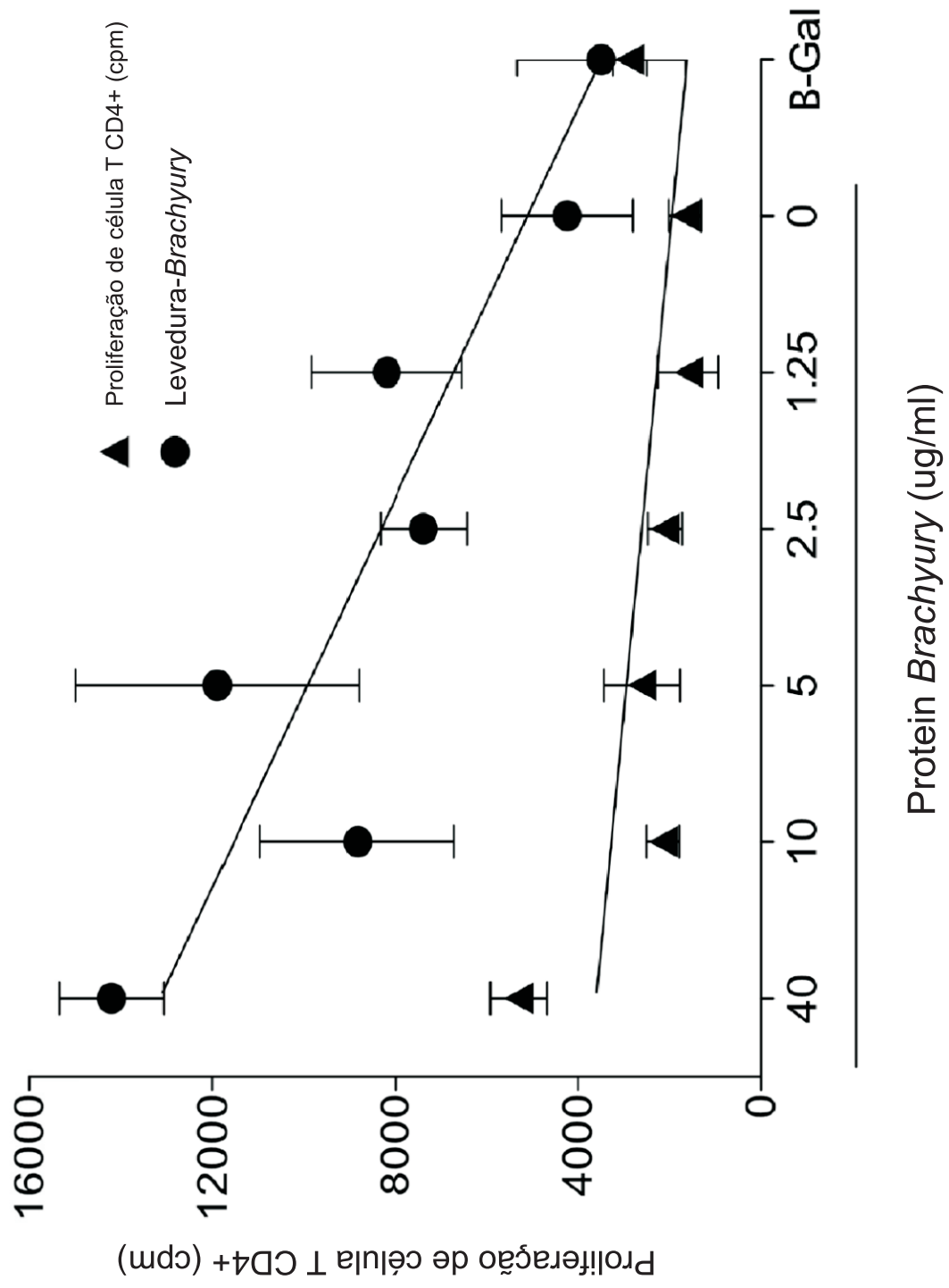
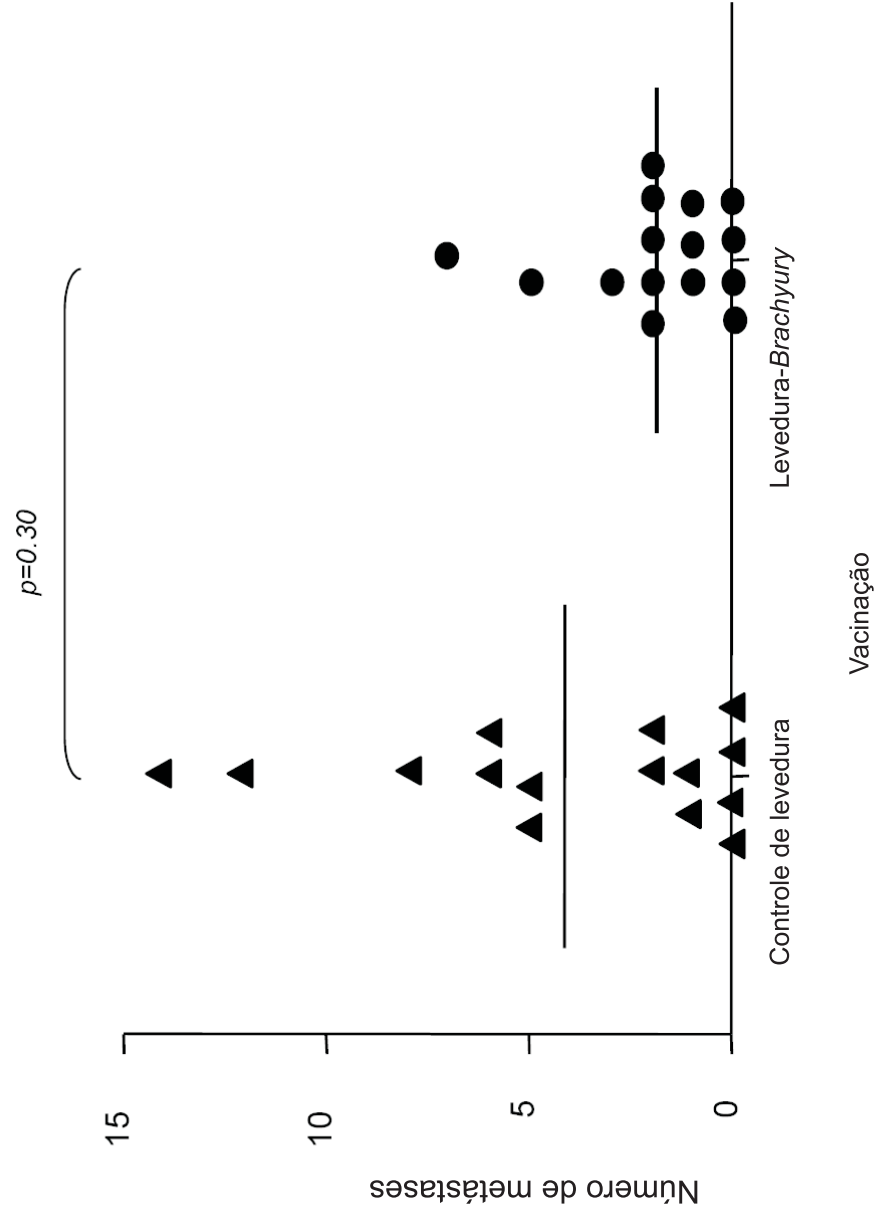


FIG. 6



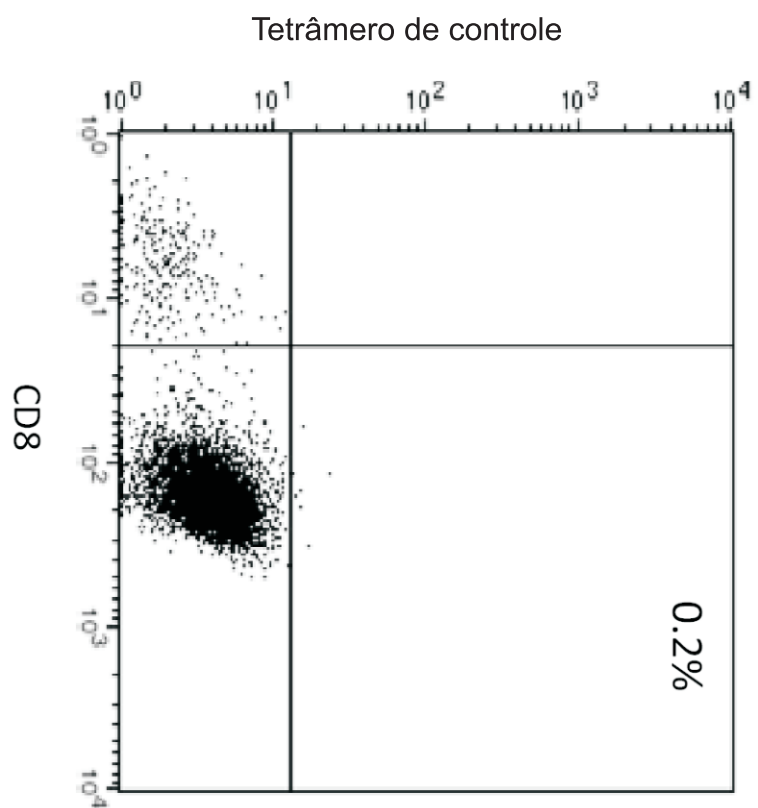


FIG. 7A

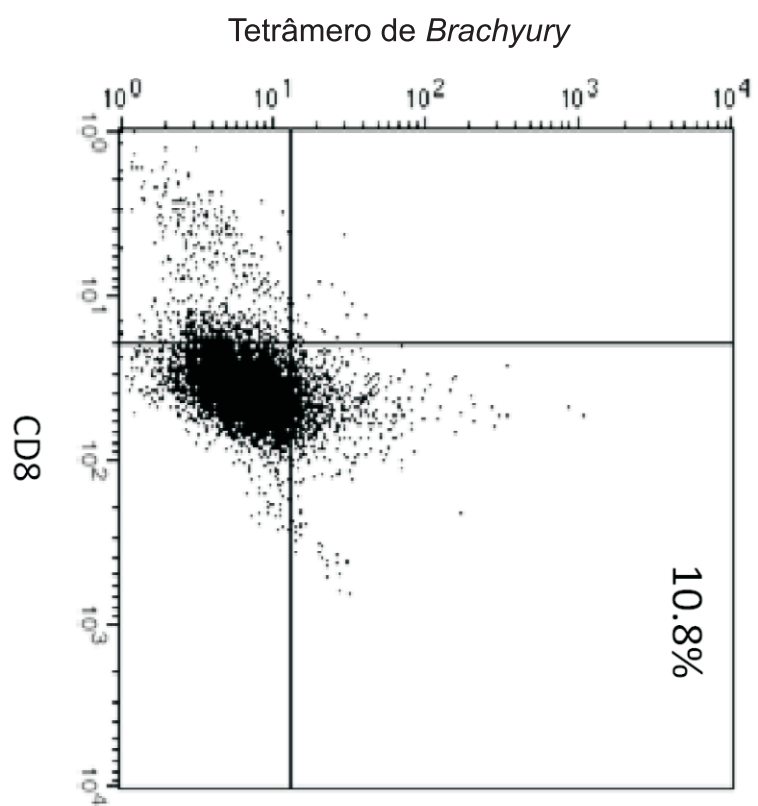


FIG. 7B

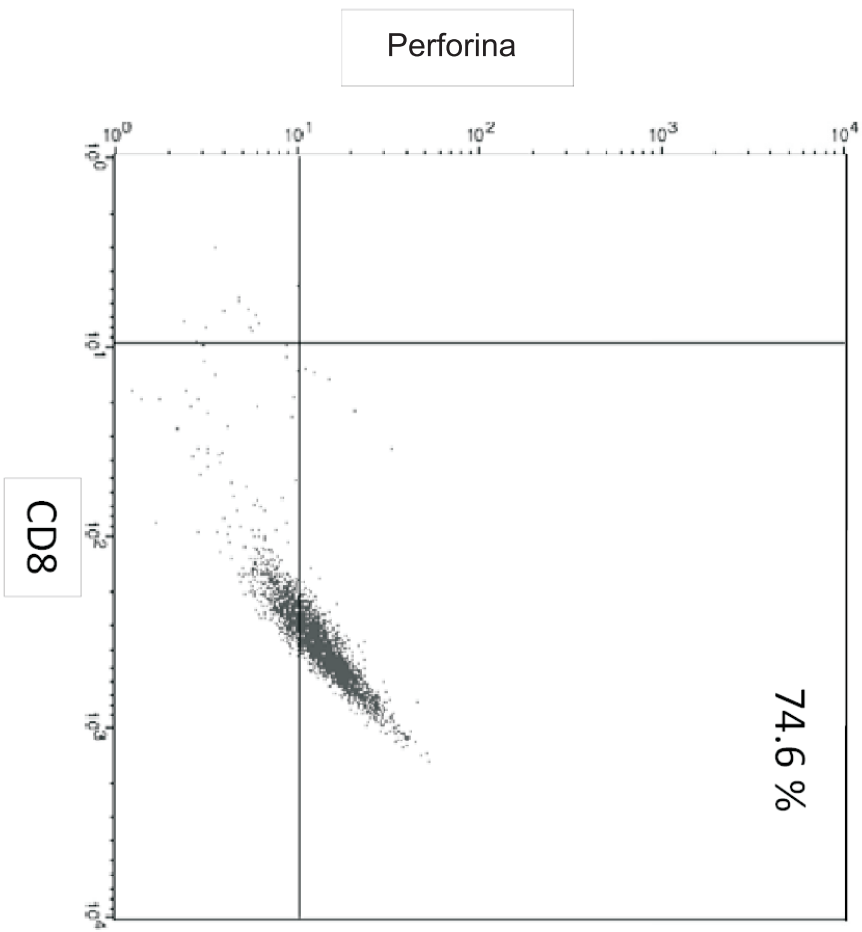


FIG. 8